

Natural Tissue Engineering
**Plastizität zirkulierender Stammzellen im
gesunden kardialen Milieu**

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

vorgelegt von Matthias Willmer
geboren in Oelde / Westfalen

Gießen 2012

Natural Tissue Engineering
**Plastizität zirkulierender Stammzellen im
gesunden kardialen Milieu**

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

vorgelegt von Matthias Willmer
geboren in Oelde / Westfalen

Gießen 2012

Aus der experimentellen Kardiologie
der Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. C. Hamm

Gutachter: Prof. Dr. H. Möllmann

Gutachter: Prof. Dr. H. Sauer

Tag der Disputation: 07.12.2012

„Wunder stehen nicht im Gegensatz zur Natur,
sondern nur im Gegensatz zu dem,
was wir über die Natur wissen.“

St. Augustin
Apostel von England und erster Erzbischof von Canterbury

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	- 7 -
1.1	PROJEKTBSCHREIBUNG	- 8 -
1.2	MYOKARDINFARKT UND POSTINFARKTREMDELING.....	- 10 -
1.3	ADULTE ZIRKULIERENDE STAMMZELLEN.....	- 11 -
1.3.1	MESENCHYMALE STAMMZELLEN.....	- 12 -
1.3.2	HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLEN	- 15 -
1.3.3	KARDIALE STAMM- / PROGENITORZELLEN.....	- 18 -
1.4	KURATIVER THERAPIEANSATZ: STAMMZELLMOBILISATION	- 20 -
1.5	KURATIVER THERAPIEANSATZ: STAMMZELLINJEKTIONSTHERAPIE.....	- 22 -
1.6	KURATIVER THERAPIEANSATZ: TISSUE ENGINEERING.....	- 25 -
1.7	DIE TYPISCHE FREMDKÖRPERREAKTION	- 27 -
2	ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNGEN	- 28 -
3	MATERIAL UND METHODEN	- 29 -
3.1	METHODEN	- 29 -
3.1.1	TIEREXPERIMENTELLE METHODEN	- 29 -
3.1.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	- 32 -
3.1.3	HISTOLOGISCHE METHODEN.....	- 40 -
3.1.4	IN-SITU-HYBRIDISIERUNG	- 44 -
3.1.5	STATISTISCHE METHODEN	- 47 -
4	ERGEBNISSE	- 48 -
4.1	EFFIZIENZ DES TIERMODELLS	- 48 -
4.2	ENTZÜNDUNGSPROZESSE	- 49 -
4.3	GEWEBEBILDUNGSPROZESSE	- 50 -
4.3.1	NACHWEIS VON ENDOTHELZELLEN UND KAPILLAREN.....	- 51 -
4.3.2	NACHWEIS VON GLATTEN MUSKELZELLEN.....	- 53 -
4.4	STAMMZELL-NACHWEIS	- 55 -
4.4.1	CHEMOTAXINE	- 55 -
4.4.2	NACHWEIS VON HSC-TYPISCHEN MARKERN	- 56 -
4.4.3	NACHWEIS VON MSC-TYPISCHEN MARKERN	- 59 -
4.4.4	NACHWEIS VON EPC / CEC-TYPISCHEN MARKERN	- 61 -
4.5	GM-CSF STIMULATION	- 62 -
4.5.1	NACHWEIS DER GM-CSF-WIRKSAMKEIT	- 62 -
4.5.2	NACHWEIS DER VERMEHRTEN BILDUNG VON CHEMOTAKTISCHEN MEDIATOREN ...	- 63 -
4.5.3	NACHWEIS DER VERMEHRTEN STAMMZELLBESIEDELUNG	- 64 -
4.5.4	NACHWEIS DER VERMEHRTEN STAMMZELLDIFFERENZIERUNG	- 66 -
4.5.5	NACHWEIS DER GESTEIGERTEN GEWEBEBILDUNG	- 67 -

5	DISKUSSION	- 69 -
5.1	TIERMODELL	- 69 -
5.2	GEWEBEENTSTEHUNG	- 70 -
5.3	STAMMZELLBETEILIGUNG UND -DIFFERENZIERUNG	- 73 -
5.3.1	HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLEN	- 73 -
5.3.2	MESENCHYMALE STAMMZELLEN	- 74 -
5.3.3	ENDOTHELIALE VORLÄUFERZELLEN	- 74 -
5.3.4	PROGENITORZELLEN	- 75 -
5.3.5	ZYTOKINE	- 75 -
5.3.6	DIFFERENZIERUNG IN GLATTE MUSKELZELLEN UND (MYO-) FIBROBLASTEN	- 76 -
5.3.7	DIFFERENZIERUNG IN ENDOTHELZELLEN / KAPILLARBILDUNG	- 77 -
5.4	STAMMZELLMOBILISATION	- 79 -
5.5	KLINISCHE BEDEUTUNGEN	- 81 -
6	ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	- 83 -
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	- 85 -
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	- 88 -
9	TABELLENVERZEICHNIS	- 89 -
10	LITERATURVERZEICHNIS	- 90 -
11	ANHANG	- 101 -
11.1	OPERATIVES ZUBEHÖR	- 101 -
11.2	LABORZUBEHÖR	- 102 -
11.3	SCHWEINE	- 109 -
12	ERKLÄRUNG	- 110 -
13	DANKSAGUNGEN	- 111 -

1 Einleitung

Kurative Therapien eines Herzmuskelverlustes, z.B. nach Myokardinfarkt, sind bis heute Gegenstand intensiver medizinischer Forschung. Experimentelle Ansätze zur regenerativen Therapie des Herzinfarktes untersuchen:

- a) die Mobilisierung von Stammzellen mit den Wachstumsfaktoren Granulozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor (G-CSF) bzw. Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor (GM-CSF),
- b) die direkte Stammzellinjektion,
- c) die In-vitro-Erzeugung eines Herzmuskelgewebes (Tissue Engineering; TE).

Die Studienergebnisse der Ansätze a) und b) zeigen teilweise widersprüchliche Ergebnisse. Die positiven Beobachtungen scheinen nicht auf den primär gewünschten lokalen Stammzelldifferenzierungen in Herzmuskelgewebe und Gefäßstrukturen zu beruhen. Vielmehr sind offenbar im Ansatz a) die direkten Wirkungen der applizierten Wachstumsfaktoren [1-3] und im Ansatz b) parakrine Eigenschaften der injizierten Stammzellen [4, 5] für die verbesserte klinische Postinfarkt-Situation ursächlich. Dagegen lassen sich *in vitro* in Ansätzen eine (kardio-) myozytäre Differenzierung und eine Vaskularisation beobachten (Ansatz c) [6, 7].

Bis heute ist ungeklärt, warum Stammzellen im Infarkt scheinbar nicht das gleiche Differenzierungspotential entfalten können, wie sich *in vitro* erreichen lässt. Möglich wäre, dass *in vivo* eine zahlenmäßig adäquate Stammzelldifferenzierung, die man für einen kurativen Therapieansatz benötigt, physiologisch, aufgrund limitierender Faktoren, gar nicht erreichbar ist. Möglicherweise ist dies durch ischämisch-nekrotischen Mediatoren im Infarktgebiet begründet.

Wir vermuten, dass bisherige Studien aufgrund des entzündlichen Umgebungsmilieus im Myokardinfarkt keine hinreichenden Stammzelldifferenzierungen zeigen konnten.

Unsere Hypothese ist daher, dass adulte zirkulierende Stammzellen in physiologischer Umgebung *in vivo* ein ähnliches Differenzierungspotential entfalten können wie sie es *in vitro* zeigen.

1.1 Projektbeschreibung

Die Grundlage des im Nachfolgenden beschriebenen experimentellen Ansatzes zur Überprüfung unserer These ergab sich durch die histologische Aufarbeitung eines explantierten Occluders. Dieser war als temporäre Therapie eines akut aufgetretenen Ventrikelseptumdefektes infolge eines anterioren Myokardinfarktes perkutan implantiert worden [8]. Sechs Wochen nach Implantation wurde der platzierte Occluder während einer Aneurysmektomie entfernt. Makroskopisch war der Occluder vollständig von Narbengewebe umgeben und hatte somit keinen Kontakt zu vitalem Myokardgewebe. Die histologische Aufarbeitung des auf dem Occluder gewachsenen Gewebes zeigte jedoch eine vollständig differenzierte Gewebeschicht mit Ausbildung von Kapillaren, Arteriolen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen, während das umgebende Narbengewebe lediglich eine Reparationsfibrose zeigte [9].

Diese Beobachtungen führten zu der Vermutung, dass zirkulierende (Stamm-) Zellen, die auf den Occluder migriert waren, der Ursprung des neuen Gewebes waren und nicht Zellen, die aus dem Myokard über die Narbe *per continuitatem* eingewandert waren. Dies würde bedeuten, dass Stammzellen *in vivo* im Herzen zur Neubildung eines organisierten Gewebes fähig wären, wenn ihnen eine zellfreie Differenzierungsniße angeboten würde.

Um die Hypothese zu überprüfen, entwickelte unsere Arbeitsgruppe ein Schweinemodell, in dem ein speziell konstruierter Fremdkörper perkutan intraventrikulär implantiert wurde. Dieser Fremdkörper bot zirkulierenden (Stamm-) Zellen eine neutrale Siedlungsfläche und verhinderte durch seine Bauweise eine Zellkontamination durch Berührungen mit den umgebenden Geweben. Der entwickelte Fremdkörper (Abb. 1) bestand aus einer chirurgischen Polyvinylchlorid-Membran und einem Scaffoldsystem.

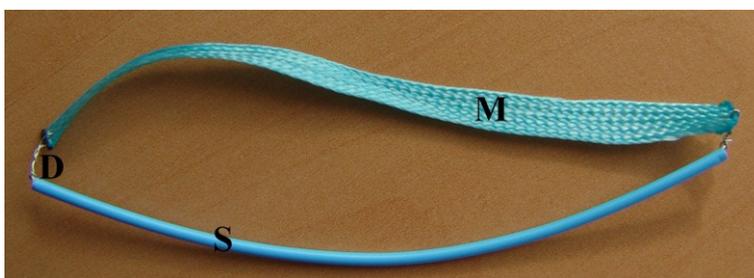


Abbildung 1: Fremdkörper im nicht implantierten Zustand

Exemplarischer Fremdkörper, bestehend aus dem Scaffold (S) und einer Membran (M). Beide sind über einen verzwirnten Edelstahldraht (D) miteinander verbunden.

Die Membran sollte den Stammzellen die nötige Siedlungsfläche bieten und frei im Blutstrom flottieren. Dazu diente das Scaffold, das durch Aufspannen die Membran im Blutstrom hielt. So wurde jeglicher Kontakt zwischen Membran und umgebenden Geweben verhindert. Der Fremdkörper wurde durch perkutanes Vorgehen in den linken Ventrikel (LV) eingebracht. Als Kontrolle wurde jedem Schwein ein Fremdkörper gleichen Konstrukts in die Aorta abdominalis implantiert. Abbildung 2 und 3 zeigen die korrekte linksventrikuläre Lage des Fremdkörpers.

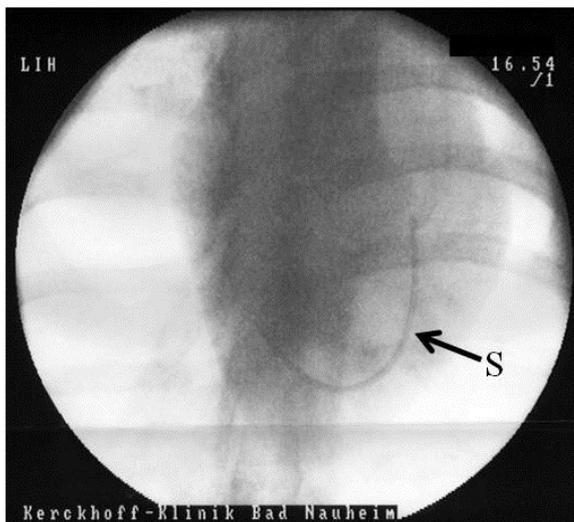


Abbildung 2: Lagekontrolle eines Fremdkörpers im linken Ventrikel

Unter Durchleuchtung wurde die korrekte Lage des Fremdkörpers im linken Ventrikel dokumentiert. Die Dokumentation erfolgte direkt nach der Implantation sowie kurz vor der Euthanasie und Entnahme der Fremdkörper. Deutlich ist das Scaffold (S) zu erkennen. Die Membran ist aufgrund ihrer Röntgendurchlässigkeit nicht abgebildet.

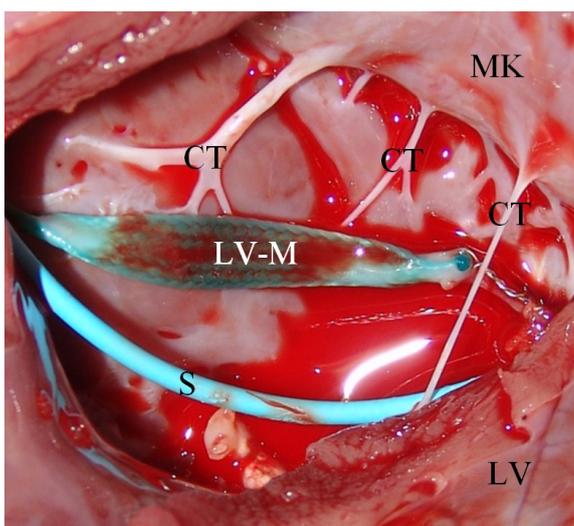


Abbildung 3: In-situ-Darstellung eines in den LV implantierten Fremdkörpers

In-situ-Lage eines linksventrikulär implantierten Fremdkörpers. Der Kontakt zum Myokard besteht nur nach Öffnung des Ventrikels (MK: Mitralklappe, CT: Chordae tendineae, LV-M: linksventrikuläre Membran, S: Scaffold, LV: Myokard des linken Ventrikels)

1.2 Myokardinfarkt und Postinfarktremodeling

Die Haupttodesursache in den westlichen Industrienationen sind kardiovaskuläre Erkrankungen. Jährlich versterben in der Europäischen Union zwei Millionen Menschen (42% der Gesamttodesfälle) an den Folgen einer Koronaren Herzkrankheit (KHK). Die Gesamtkosten, die durch die KHK pro Jahr anfallen, belaufen sich dabei auf 192 Milliarden Euro [10]. Zwar konnte das therapeutische Spektrum im kardiologischen Bereich in den letzten Jahrzehnten durch eine optimierte Pharmakotherapie sowie durch operative und interventionelle Fortschritte verbessert werden, jedoch ist momentan keine Möglichkeit gegeben, verlorenes Herzgewebe, z.B. nach Herzinfarkt, zu ersetzen. Somit ist bis heute die Progression vom Herzinfarkt über das Postinfarktremodeling zur Herzinsuffizienz nicht umzukehren [11].

Der morphologische Adaptationsprozess an den durch den Herzinfarkt erlittenen Kardiomyozytenverlust wird als Postinfarktremodeling bezeichnet. Dieser verläuft in drei Phasen [12]. Die erste Phase wird durch die inflammatorische Wirkung des hypoxisch-nekrotischen Milieus bestimmt. Dabei kommt es an den luminalen Endothelzelloberflächen zur Hochregulation adhäsiver Moleküle und darüber vermittelt zu einer Infiltration inflammatorischer Zellen. Nach Phagozytose der Zellreste und Matrixproteine kommt es in der zweiten Phase zu einer Einwanderung von Fibroblasten und Endothelzellen in das Infarktareal. Über die Synthese von Matrixproteinen und die Organisation eines Kapillarnetzwerkes entsteht so die vorläufige Infarktnarbe. In der letzten Phase des Remodelings gehen Fibroblasten und Endothelzellen in Apoptose und es verbleibt ein zellarmes, quervernetztes kollagenes Bindegewebe.

Die mit dem narbigen Myokardersatz verbundene langfristig schlechte Prognose ergibt sich aus den erheblichen negativen hämodynamischen Auswirkungen und der damit verbundenen funktionellen Mehrbelastung der verbliebenen Herzmuskelarchitektur. Dies kann sich nachfolgend in einer systolischen Herzinsuffizienz manifestieren.

Seitdem gezeigt werden konnte, dass nach einem Herzinfarkt begrenzte Reparaturprozesse ablaufen, bei denen offenbar Stammzellen Differenzierungsprozesse durchlaufen, wird versucht, dieses endogene Reparaturprogramm zu optimieren [13]. Grundlage dieser Optimierungsbestrebungen bilden in vielen Fällen adulte Stammzellen (ASC).

1.3 Adulte zirkulierende Stammzellen

Als Stammzellen werden *per definitionem* Zellen bezeichnet, die erstens aus der G₀-Phase des Zellzyklus wieder in die G₁-Phase treten, sich damit teilen können und zweitens die Fähigkeit besitzen, in unterschiedliche Gewebezellen zu differenzieren, was als Plastizität bezeichnet wird [14, 15]. Die im Säugetier vorkommenden Stammzellenpopulationen lassen sich aufteilen in embryonale Stammzellen (ESC) und postembryonale ASC. Erstere gelten als pluripotente Stammzellen, können sich also in die Gewebearten aller drei Keimblätter differenzieren, während die multipotenten ASC weiter spezialisiert sind und, je nach Gruppe, nur in Gewebezellen einer Keimscheibe differenzieren können [16]. Zu den ASC gehören die Gruppen der mesenchymalen Stammzellen (MSC) und der hämatopoetischen Stammzellen (HSC). Beide Gruppen lassen sich durch ihre charakteristische Antigenexpression noch weiter unterteilen. Hierüber besteht aber noch weitestgehend Unklarheit.

Das typische Kompartiment der ASC stellt das Knochenmark dar. Hauptaufgabe der dortigen Stammzellpopulationen (v.a. MSC und HSC) ist die Sicherstellung der Hämatopoese.

Durch die Entdeckung von ASC (mit typischen Oberflächenmarkern von MSC [17] und HSC [18]) im peripheren Blut kam die Überlegung auf, ob diese Zellen aus dem Knochenmark in die Zirkulation freigesetzt werden und an der Zellhomöostase des ganzen Organismus beteiligt sind [16]. Offenbar migrieren diese zirkulierenden Stammzellen in periphere Gewebe und verbleiben dort, ohne (zwangsläufig) in das Knochenmark zurückzuwandern [19]. Die Regelmäßigkeit, mit der peripher Stammzellen nachweisbar sind, spricht gegen ein zufälliges Vorkommen, so dass diese Stammzellen möglicherweise an lokalen Regenerationsprozessen beteiligt sind [20-22]. Auch scheinen diese gewebeständigen Stammzellen eine ausgeprägte Plastizität zu besitzen. So konnte gezeigt werden, dass adulte leberständige Stammzellen in Myozyten differenzieren, wenn sie in das Myokard eingebracht werden [23]. Neben diesen (gewebeständigen) Stammzellen scheint es aber auch spezielle gewebeständige Zellen zu geben, die eine stark reduzierte Plastizität aufweisen. Diese Zellen werden als Progenitorzellen bezeichnet. Sie konnten ebenfalls im Blutkreislauf nachgewiesen werden (endotheliale Progenitorzellen (EPC) / zirkulierende Endothelzellen (CEC)) [24]. Der Begriff „Progenitorzelle“ wird jedoch teilweise auch synonym mit „Stammzelle“ verwendet.

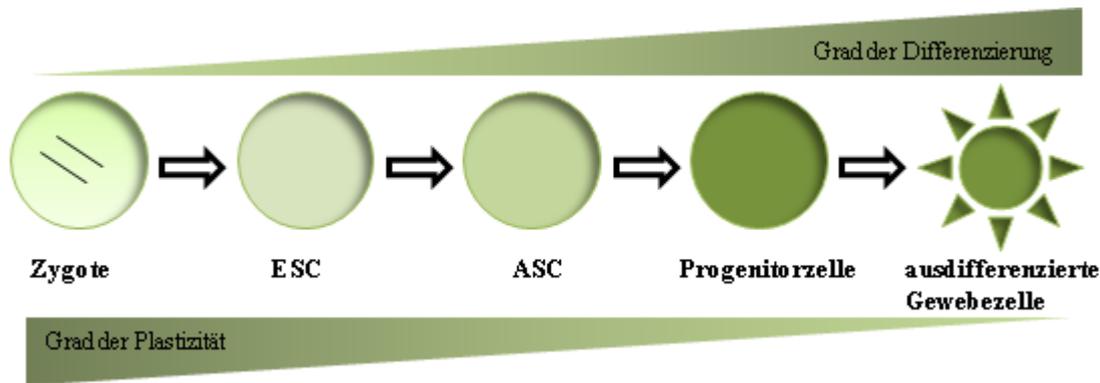


Abbildung 4: Abnahme der Stammzellplastizität

Dargestellt ist die absteigende Plastizität / Differenzierbarkeit von der diploiden Zygote über embryonale (ESC) und adulte Stammzellen (ASC) zu Progenitorzellen sowie gewebeständigen, ausdifferenzierten Zellen. Nach neuesten Erkenntnissen ist dieser Prozess möglicher Weise umkehrbar [25].

1.3.1 Mesenchymale Stammzellen

Die MSC gelten als die im Hinblick auf den therapeutischen Einsatz meist versprechenden Zellen, da sie die Fähigkeit besitzen, in mesenchymale Gewebezellen wie Knorpel-, Knochenzellen und Myozyten zu differenzieren. Die typische MSC-„Nische“ befindet sich im Knochenmark, wo die Zellen an der Unterstützung der Hämatopoese beteiligt zu sein scheinen [26]. Dort machen die morphologisch Fibroblasten-ähnlichen Zellen ungefähr 0,001-0,01% der kernhaltigen Zellen aus [27]. Jedoch sind Zellen mit MSC-typischem Expressions- und Differenzierungsmuster darüber hinaus auch in der Nabelschnur [28] sowie dem Nabelschnurblut [29], der Plazenta [30], dem Zahngewebe [31], im Fettgewebe [32] sowie in der Blutzirkulation [17, 33] beschrieben.

Neben der Unterstützung der Hämatopoese im Knochenmark scheinen MSC (*in vitro*) auch an der Modulation der T-Zell-Funktion beteiligt zu sein [34]. Dort unterdrücken sie wahrscheinlich die T-Zell-Proliferation und -Aktivierung [35]. Fraglich ist, ob den MSC in ihrer weiten Verbreitung eine Art Zellreservefunktion zukommt. Beispielsweise ist die osteogene Differenzierung der knochenständigen MSC offenbar ein Hauptfaktor der Frakturheilung [36]. Bei älteren Menschen ist die Anzahl der MSC reduziert, wodurch auch die verzögerte Kallusbildung und reduzierte Frakturheilung bei diesem Patientenkollektiv erklärbar wäre [37]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich die Anzahl der im Blut zirkulierenden MSC bei Verletzungen und unter Hypoxie erhöht [17, 38]. Dies lässt vermuten, dass auch die aus dem Knochenmark in die Blutbahn mobilisierten MSC an einer Wundreaktion beteiligt sind.

Über typische membranständige Marker der MSC ist bislang wenig bekannt. Einzelne unspezifische Marker, wie CD29, CD44, CD90 und CD105 [32], wurden nachgewiesen. Für

Marker der hämatopoetischen Zelllinien (CD34, CD133) und Marker der leukozytären Zelllinie (CD45) sowie für CD117 (c-kit) sind sie negativ [32]. Bis jetzt lässt sich mittels Bestimmung von spezifischen Oberflächenproteinen die Zellfraktion der MSC nur unzureichend bestimmen [39]. Einzelne, für MSC typische Marker, zeigt Tabelle 1.

Positiv	Negativ
CD29 [32]	CD34 [40]
CD44 [32]	CD45 [40]
CD56 [41]	CD133 [42]
CD90 [32]	CD117 [32]
CD105 [32]	
CD140b [43]	
CD271 [41, 43]	
Vimentin [40]	

Tabelle 1: Marker der MSC

Zellisolationen der MSC aus Organen und Knochenmark erfolgen zumeist über Dichtezentrifugation und ihre Eigenschaft zur Oberflächenadhäsion, wodurch sie sich von vielen anderen Knochenmarkzellen unterscheiden. Der anschließende MSC-Nachweis gilt als gegeben, wenn sich die isolierten Zellen in Osteozyten, Chondrozyten und Adipozyten differenzieren lassen.

Diese Plastizität zeigen aber nicht nur entsprechend isolierte Knochenmark-MSC (bmMSC) sondern auch Zellen aus dem Fettgewebe (dann bekannt als „Adipose-Tissue-Derived-Stromal Cells“ (ATSC)), dem Muskelgewebe, der Haut sowie aus dem Nabelschnurblut [44-46]. Für die ATSC konnte darüber hinaus dasselbe Oberflächenexpressionsmuster (99% Übereinstimmung) wie bei den bmMSC nachgewiesen werden [32, 47]. Entsprechend ihres ubiquitären Vorkommens zeigen MSC eine ausgeprägte Differenzierbarkeit, die über die bereits beschriebene Differenzierbarkeit zu Knochen, Knorpel und Fettgewebe hinausgeht. So konnte *in vitro* eine (spontane) Differenzierung von MSC in Endothelzellen nachgewiesen werden [48]. Die Differenzierung ließ sich durch Stimulation mittels „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) steigern und resultierte in einer kapillarähnlichen Formation. Ebenso ist *in vitro* eine myozytäre Differenzierbarkeit der MSC nachgewiesen [49]. Eine Zellkontraktion scheint nach den ersten 14 Tagen noch unspezifisch zu erfolgen, nach 21

Tagen jedoch synchron. Darüber hinaus scheinen MSC *in vitro* und ggf. auch *in vivo* in Herzmuskelzellen differenzieren zu können [50, 51].

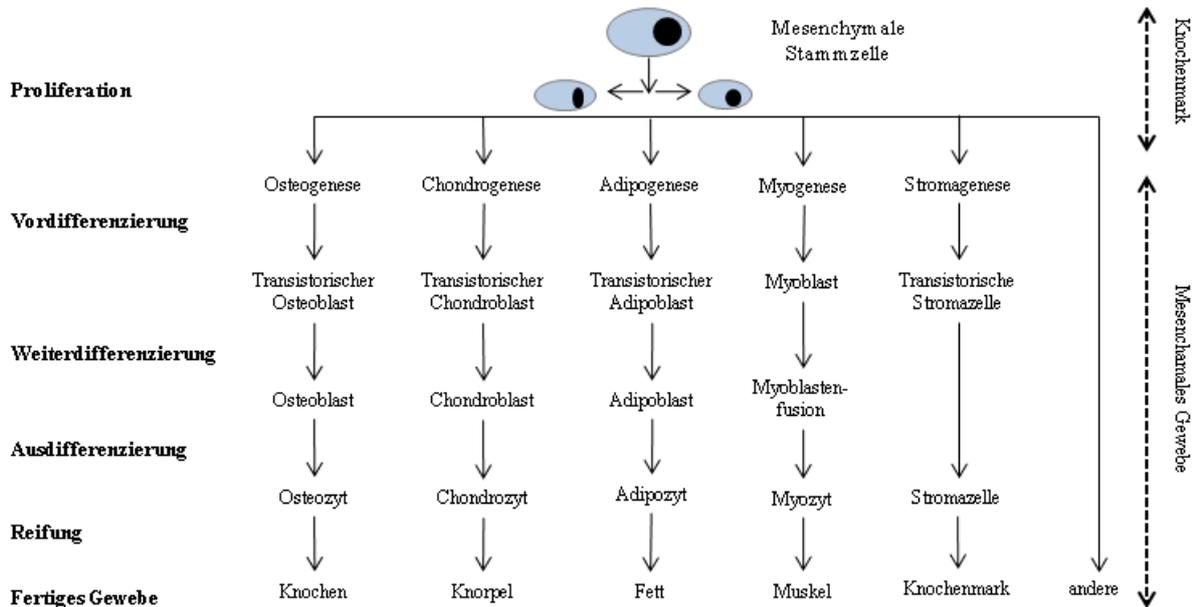


Abbildung 5: Differenzierungsschema von mesenchymalen Stammzellen

Einige Differenzierungsrichtungen wie die osteozytäre, die chondrozytäre und die adipozytäre Linie sind typisch für MSC und werden deshalb als MSC-Nachweistest verwendet.

MSC besitzen ebenfalls wichtige parakrine Funktionen, mit denen sie offenbar großen Einfluss auf ihr „Microenvironment“ ausüben [52]. Diese parakrinen Wirkungen der MSC sind wahrscheinlich ursächlich dafür, dass HSC und andere im peripheren Blut zirkulierende Stammzellen unter dem Einfluss von MSC effektiver *in vitro* kultiviert werden können [53]. Darüber hinaus wirken MSC auf kardiale Stammzellen (CSC) proliferationsfördernd, chemotaktisch und antiapoptotisch und steigern die Expression von kardiomyozyten-spezifischen Genen [54]. Zu diesen parakrin sezernierten Faktoren zählen u.a. der angiogenetische Faktor VEGF, der Wachstums- und Differenzierungsfaktor „Hepatocyte Growth Factor“ (HGF), antifibrotische Faktoren wie Adrenomedullin und Makrophagen-stimulierende-Zytokine [55-57].

1.3.2 Hämatopoetische Stammzellen

Die zweite große multipotente Stammzellpopulation neben den MSC sind die Stammzellen der hämatopoetischen Zelllinie. Sie bilden die zelluläre Grundlage der Hämatopoese aus der in einem kontinuierlichen Prozess neue Blutzellen hervorgehen. Wie die MSC sind auch die HSC hauptsächlich im Knochenmark angesiedelt, wo sie etwa 0,05% der Zellen ausmachen [58]. Die Nische, in der die Hämatopoese stattfindet, ist ein fein gegliederter Raum zu dessen elementarer Ausstattung eine Vielzahl an Stromazellen (MSC), unterstützenden Zellen, Wachstumsfaktoren und eine spezielle, fein kapillarisierte extrazelluläre Matrix (ECM) gehören [59, 60].

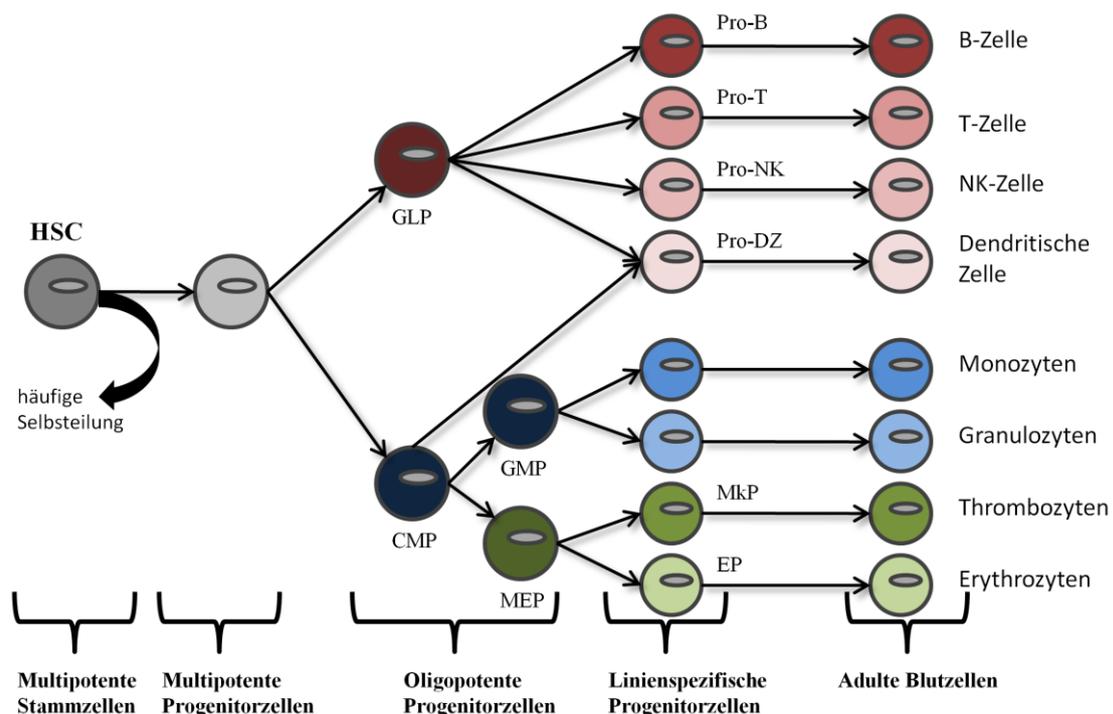


Abbildung 6: Grundlage der Hämatopoese, modifiziert nach Weissmann [61]

Die Abb. verdeutlicht die Hämatopoese ausgehend von den multipotenten HSC, welche sich fortlaufend teilen. Durch Fortschreiten der Differenzierung verlieren sie die Fähigkeit zur langfristigen Zellteilung und werden zu multipotenten Progenitorzellen. Die weitere Differenzierung zu immer spezialisierteren Progenitorzellen führt zur Ausbildung von adulten Blutzellen. GLP = gemeinsame lymphatische Progenitorzelle, CMP = gemeinsame myeloopoetische Progenitorzelle, GMP = granulozytäre-monozytäre Progenitorzelle, MEP = megakaryozytäre-erythrozytäre Progenitorzelle, Mk = Megakaryozyten, EP = erythrozytäre Progenitorzelle.

Die HSC zeigen ein relativ typisches Expressionsmuster. Jedoch scheint es innerhalb dieser Stammzellgruppe auch Untergruppen mit verändertem Expressionsmuster zu geben.

Typische Marker für HSC sind c-kit und sca-1, wobei sca-1 bisher nur bei der Maus nachgewiesen wurde [58]. Ein zu sca-1 homologes Protein ist beim Menschen oder Schwein bis jetzt nicht bekannt. Darüber hinaus wird von vielen hämatopoetischen Stammzelluntergruppen der Oberflächenmarker CD34 exprimiert.

Positiv	Negativ
c-kit [62, 63]	Lin [62]
Sca-1 [62]	CD3 [63]
CD34 [64]	CD16 [63]
CD45 [65]	CD21 [63]
	CD34 [64, 66]

Tabelle 2: Marker der HSC

Der HSC-Marker CD34 ist ein Glykoprotein, das in seiner humanen Form in drei verschiedenen Splicevarianten, in einer kompletten transmembranären Form, in einer „Truncated Form“, welche in ihrem zytoplasmatischen Teil verkürzt ist und in einer Form, deren gesamter zytoplasmatischer Teil fehlt, vorkommt [67].

Nach heutigem Kenntnisstand wird CD34 jedoch als nicht mehr ganz spezifisch für HSC angesehen, weil es auch von einem geringen Prozentsatz an ausgereiften hämatopoetischen und endothelialen Zellen exprimiert wird [68, 69]. Zudem wird CD34 von 1-3% der Knochenmarkzellen exprimiert [70], wobei jedoch schätzungsweise nur 0,05% der Knochenmarkzellen HSC sind. Allerdings scheint es auch Stammzellpopulationen im Bereich der HSC zu geben, welche CD34^{negativ} sind und trotzdem als funktionelle Stammzellen gesehen werden [70, 71]. Wie sein Ligand, ist auch die genaue Funktion von CD34 unbekannt. Es wird spekuliert, ob CD34 essentiell für die Bindung der Stammzelle an die hämatopoetische Stammzellnische im Knochenmark ist [69, 72].

Es gibt jedoch auch Hinweise, dass der CD34-Expressionsgrad den Aktivitätszustand der HSC wider spiegelt [72, 73]. Danach soll CD34 nicht permanent von HSC exprimiert werden und auch nicht essentiell für die Zelladhäsion der HSC an ihre „hämatopoetische Nische“ zu sein. Vielmehr soll CD34 primär am „Homing“ von im Blut zirkulierenden Stammzellen in periphere Gewebe beteiligt sein [72]. Ist das „Homing“ der zirkulierenden Zellen in das periphere Zielorgane erfolgt, wird CD34 herunter reguliert [72]. Ein Switch von CD34^{negativen} HSC zu CD34^{positiven} HSC konnte ebenso nachgewiesen werden, wie die Fähigkeit von CD34^{positiven} HSC zum „re-switch“ [73].

Der zweite bedeutende hämatopoetische Stammzellmarker ist c-kit. C-kit wird nicht nur von HSC, sondern u.a. auch von Mastzellen, Keimzellen und Melanozyten exprimiert [58]. Etwa 7,8% der gesamten Knochenmarkzellen (von adulten C57BL/6 Mäuse) exprimieren c-kit [74]. C-kit übernimmt, ähnlich wie man es für CD34 annimmt, wichtige Funktionen in der Zelladhäsion an der ESC, welche die hämatopoetische Nische auskleidet [75]. Des weiteren

ist c-kit an der Entwicklung von Mastzellen, Melanozyten und an der Differenzierung von spermatogonialen Stammzellen beteiligt [76]. Der Ligand von c-kit, der „Stem Cell Factor“ (SCF), kommt in einer löslichen und einer membrangebundenen Form vor, die durch unterschiedliches Splicen [77] entstehen. Die lösliche Form von SCF scheint eine Rolle in der Zellmigration und Zellmobilisierung der HSC zu spielen sowie eine Proliferationssteigerung primitiver CD34^{positiver} HSC zu bewirken [75, 78]. Somit nimmt SCF in löslicher Form auch die Funktion eines hämatopoetischen Wachstumsfaktors wahr [79, 80]. Aufgrund seiner Adhäsionsfunktion ist der membrangebundene SCF elementar für die Hämatopoese [75]. Obwohl SCF chemotaktische Wirkungen auf HSC zeigt, ist es nicht am „Homing“ von im Blut zirkulierenden HSC in das Knochenmark beteiligt [75]. Dagegen ist SCF offenbar am „Homing“ von zirkulierenden HSC in die peripheren Organe beteiligt [81].

Ähnlich wie CD34 ist auch c-kit offenbar ein Aktivitätsmarker, der nach erfolgter Differenzierung herunter reguliert wird. So konnte gezeigt werden, dass c-kit von CSC während ihrer Differenzierung zu frühen Kardiomyozyten exprimiert wird. Jedoch wird bei Erreichen der Enddifferenzierung c-kit wieder terminiert [76].

Auch im Schwein scheint c-kit ein wichtiger Marker für HSC und Progenitorzellen zu sein. Studien zeigen, dass es bei der Transplantation von porcinen c-kit^{positiven} Knochenmarkzellen in einen murinen Organismus zu einer langfristigen Hämatopoese mit porcinen Blutzellen kommt. Im Gegensatz dazu kam es bei der Verwendung von c-kit^{negativen} Zellen nicht dazu [63].

Phänotypische Analysen der porcinen c-kit^{positiven} Knochenmarkzellen zeigten, dass diese CD3^{negativ}, CD16^{negativ} und CD21^{negativ} waren und ansonsten ähnliche phänotypische Merkmale aufwiesen wie c-kit^{positive} Zellen in Mäusen, Hunden und Affen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass porcine c-kit^{positive} Knochenmarkzellen ebenfalls HSC und Progenitorzellen repräsentieren [63].

Neben ihrer Fähigkeit zur Aufrechterhaltung der Hämatopoese verfügen HSC über ein, die hämatopoetischen Zelllinien übersteigendes, Differenzierungspotential. So wurde u.a. gezeigt, dass HSC in Tubuluszellen der Niere [82] und in neuronale Stützgewebe [83] differenzieren. Eine neuronale Differenzierung von c-kit^{positiven} HSC konnte jedoch nicht beobachtet werden [62]. Ebenso wenig scheinen HSC in Kardiomyozyten differenzieren zu können [84]. Diese Plastizität verlieren HSC möglicherweise mit steigendem Lebensalter [85], was jedoch primär auf einer altersbedingten Veränderung der Differenzierungsnische zu beruhen scheint [86].

1.3.3 Kardiale Stamm- / Progenitorzellen

Bis vor einigen Jahren wurde angenommen, das Herz sei ein postmitotisches Organ, in dem es zu keiner Kardiomyozytendifferenzierung mehr kommen würde. Dieses Verständnis änderte sich als im Herzen eigene, gewebeständige Stamm- / Progenitorzellen identifiziert werden konnten [87]. Heute ist bekannt, dass auch im Herzen ein eigener Zellpool vorhanden ist, der nicht nur Kardiomyozyten [4, 88] sondern auch glatte Muskelzellen und Endothelzellen der Koronargefäße ersetzen kann [4].

Die CSC können wieder in den Zellzyklus eintreten und sind multipotent. Die CSC bei Säugetieren sind eine sehr heterogene Gruppe, die sich durch unterschiedliche Oberflächenmarker und Differenzierungseigenschaften voneinander abgrenzen lassen (siehe Tabelle 3). Humane CSC (hCSC), die aus Biopsien isoliert wurden, ließen sich *in vitro* leicht kultivieren und konnten in Kardiomyozyten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen differenziert werden. Diese hCSC sind c-kit^{pos}, MDR-1^{pos} und für hämatopoetische Marker (CD34, CD45, CD31) negativ [89]. Jedoch wurde bis heute ein wesentlich breiteres Expressionsmuster beobachtet.

Die Häufigkeit von hCSC wird mit einer Zelle pro 1000 Kardiomyozyten, bzw. 50.000 hCSC pro Gramm Herzgewebe angegeben [90]. Bislang ist unbekannt, ob die CSC seit der Embryonalzeit im Herzen persistieren oder ob die CSC von zirkulierenden Knochenmarkstammzellen abstammen und dadurch einer anhaltenden Regeneration unterworfen sind. Für letzteres spricht, dass GFP-markierte Knochenmarkzellen aus infarziertem Herzgewebe isoliert werden konnten und dass diese isolierten Zellen ein, den CSC entsprechendes Oberflächenprofil und Differenzierungseigenschaften aufwiesen [91].

Die Plastizität der CSC spricht dafür, dass ihre Aufgabe die Sicherstellung der kardialen Zellhomöostase sein könnte. So konnte gezeigt werden, dass es unter pathologischen Belastungen wie einer Aortenstenose nicht nur zur Hypertrophie der Herzmuskelzellen kommt sondern auch zur Hyperplasie [92]. In Anbetracht dieser Ergebnisse ist es unklar, warum die CSC nicht auch nach abgelaufenem Herzinfarkt differenzieren und so den nekrotischen Bereich revitalisieren. Tatsächlich ist die Anzahl der CSC nach einem ischämischen Ereignis erhöht, jedoch scheinen diese ihre Teilungs- und Differenzierungseigenschaften verloren zu haben [93]. Damit könnte auch die Zellhomöostase der Herzmuskelzellen beeinträchtigt sein, so dass pathophysiologische Kardiomyozytenverluste nicht mehr ausreichend ersetzt werden können. Nachfolgend käme es zu einem fortschreitenden fibrotischen Umbau, zur Verschlechterung der Kontraktilität und damit zur Progression der Herzinsuffizienz [89]. Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen einem

insuffizienten kardialen Stammzellpool und den in Abschnitt 1.2 beschriebenen Prozessen des kardialen Postinfarktremodelings hin.

Marker	Plastizität	Beschrieben durch
Lin ^{neg} CD45 ^{neg} CD34 ^{neg} c-kit ^{pos}	Kardiomyozyten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen, <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	Beltrami et al. [4]
Sca1 ^{pos} Lin ^{neg} c-kit ^{neg} CD45 ^{neg} CD34 ^{neg} CD31 ^{pos}	Kardiomyozyten, <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	Oh et al. [87]
Sca1 ^{pos} CD45 ^{pos} CD34 ^{pos} c-kit ^{pos}	Kardiomyozyten, Osteozyten, Adipozyten, <i>in vitro</i>	Matsuura et al. [88]
c-kit ^{pos} Sca1 ^{pos} CD34 ^{pos} KDR / Flk-1 ^{pos} CD31 ^{pos}	Kardiomyozyten und Endothelzellen, <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	Messina et al. [20]
Isl1 ^{pos} Sca1 ^{neg} c-kit ^{neg} CD31 ^{neg} Nkx2.5 ^{pos} GATA4 ^{pos}	Kardiomyozyten, <i>in vitro</i>	Laugwitz et al. [21]
CD31 ^{neg} Sca1 ^{pos} CD45 ^{low/neg} CD34 ^{low/neg} CD44 ^{low/neg} c-kit ^{low/neg} Nkx2.5 ^{pos} GATA4 ^{pos} SMA ^{pos} Desmin ^{pos}	Kardiomyozyten, <i>in vitro</i>	Pfister et al. [94]
CD11b ^{neg} CD13 ^{neg} CD45 ^{neg} Ter119 ^{neg} CD29 ^{pos} CD44 ^{pos} CD34 ^{pos} c-Kit ^{pos} Flk-1 ^{pos} Sca-1 ^{pos} nestin ^{pos}	Kardiomyozyten, <i>in vitro</i>	Tomita et al. [95]

Tabelle 3: Marker und Plastizität bisher bekannter kardialer Stammzellen, modifiziert nach Torella [89]

1.4 Kurativer Therapieansatz: Stammzellmobilisation

Die meisten Stammzellen befinden sich im blutbildenden Knochenmark. Allerdings ist seit den 1970er-Jahren bekannt, dass ein gewisser Teil der Stammzellen auch mit dem regulären Blutfluss zirkuliert [96]. Die Vorstellung ist, dass Teile der (hämatopoetischen) Stammzellen das Knochenmark verlassen („Escaping“), an der Blutzirkulation teilnehmen, um teilweise über noch ungeklärte Mechanismen wieder in das Knochenmark einzutreten („Homing“) [97, 98].

Fraglich ist, welche Aufgabe die zirkulierenden Stammzellen erfüllen. Interessanterweise ist der Teil der zirkulierenden (hämatopoetischen) Stammzellen unter anderem bei Stress (aufgrund von Schlaganfall oder Herzinfarkt) und bei regelmäßiger sportlicher Aktivität gesteigert [99, 100]. Pathophysiologische Bedingungen, wie arterielle Hypertonie oder Adipositas, führen jedoch zu einer Reduktion der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen (EPC) [101, 102]. Ebenso fällt in den ersten Tagen nach akutem Myokardinfarkt die Menge der zirkulierenden MSC, vor allem bei ausgeprägtem Infarkt, stark ab [103]. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass zwischen der Anzahl der zirkulierenden Stammzellen und dem Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen ein Zusammenhang besteht [104], der auf eine potentielle reparative Funktion der zirkulierenden Stammzellen hindeutet [105].

Gegenwärtig wird versucht, diesen Mechanismus im Hinblick auf eine kurative Herzinfarkttherapie zu optimieren. Dabei sollen knochenmarkständige Stammzellen in die Blutzirkulation mobilisiert werden um so ein vermehrtes „Homing“ der Stammzellen in das Infarktgebiet zu erreichen. Die Hoffnung ist, dass die migrierten Stammzellen entsprechend dem organspezifischen Milieu differenzieren und nekrotisches Herzmuskel- und Gefäßgewebe ersetzen.

Allerdings sind für diesen therapeutischen Ansatz einige Grundannahmen nötig [106]. Erstens muss eine ausreichende Stammzellmobilisation erreichbar sein. Zweitens müssen die zirkulierenden Stammzellen in das Infarktgebiet migrieren, was nachgewiesen werden konnte [107]. Drittens muss im Infarktgebiet eine Differenzierung der migrierten Zellen in Herzmuskelgewebe und Gefäßstrukturen erfolgen. Eine solche Differenzierung scheint jedoch bis heute strittig [108]. Viertens ist eine elektrophysiologisch Integration des neu entstandenen Myokards in vorbestehende Herzmuskelverbände sowohl für ein hämodynamisch optimales Kontraktionsverhalten nötig als auch um ausreichende Sicherheit vor Ektopien zu gewährleisten [109, 110].

Erste experimentelle Ansätze zeigen, dass die Stammzellmobilisierung bei Herzinfarktpatienten zu günstigen Effekten mit einer reduzierter Infarktgröße, verbesserten hämodynamischen Parametern sowie einer verminderten Arrhythmie-Gefahr führen kann [111-113]. Von einigen Autoren wurden diese Ergebnisse auf eine vermehrte Stammzellendifferenzierung im Infarktgrenzbereich zurückgeführt [114]. Die mobilisierten Zellen waren (teilweise) positiv für Troponin I und Myosin-schwere-Kette [114] sowie für Connexin-43 [111]. Allerdings ist die beobachtete Differenzierung von Stammzellen in Kardiomyozyten nicht unumstritten und wird häufig eher als Zellfusion der mobilisierten Stammzellen mit adulten Kardiomyozyten interpretiert. Somit wären die beobachteten Differenzierungen nur als Artefakte zu werten.

Die nachgewiesenen positiven Effekte einer Stammzellmobilisation könnten somit auf einer direkten Wirkung der verwendeten Wachstumsfaktoren beruhen. Tatsächlich hat G-CSF auch eine direkte Wirkung auf Kardiomyozyten. So zeigt G-CSF eine zellprotektive Funktion, die über eine Reduktion der Apoptose vermittelt zu werden scheint [115]. Dies führt nachfolgend zu einer positiven Beeinflussung des Infarkt- Remodeling [113]. Ebenso zeigte sich unter G-CSF Behandlung eine Zunahme des Kardiomyozytendurchmessers und eine verstärkte Angiogenese [111]. Da G-CSF somit direkt als auch indirekt Einfluss auf das Infarktgeschehen nimmt, ist bis heute noch ungeklärt, welcher der beiden Mechanismen, Stammzellmobilisierung oder direkte G-CSF-Wirkung, primär zu den nachgewiesenen verbesserten Postinfarkt-Ergebnissen unter CSF-Gabe führt.

Im Bereich der Hämato-/Onkologie wird bereits heute Einfluss auf die Menge an zirkulierenden Stammzellen genommen. Diese zumeist durch die Gabe entsprechender Wachstumsfaktoren erreichte Mobilisierung von knochenmarkständigen Stammzellen wird u.a. genutzt, um die Gewinnung von Stammzellen aus dem peripheren Blut zu maximieren. Die isolierten HSC werden dem Empfänger nach erfolgter Hochdosis-Chemotherapie appliziert. Damit wird versucht, eine Wiederherstellung des eliminierten patienteneigenen Knochenmarks und der Hämatopoese zu erreichen. Weltweit wird dieses Konzept bei ca. 45.000 Personen pro Jahr durchgeführt [116]. Dabei ist der Erfolg der Wiederherstellung allerdings von der Menge der transplantierten CD34^{positiven} Zellen abhängig [117]. Für die klinische Mobilisierung werden hauptsächlich die hochpotenten Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF eingesetzt [116]. Jedoch gibt es offensichtlich keinen großen Unterschied zwischen der Freisetzungsrate von GM-CSF und G-CSF [118]. Die Freisetzungsrate, die durch G-CSF in Mäuseversuchen erreicht wurde, betrug etwa 20% der knochenmarkständigen HSC [97]. Es wurde allerdings beobachtet, dass unterschiedliche Individuen mit sehr

unterschiedlichen Freisetzungsraten auf die Applikation dieser Wachstumsfaktoren reagieren [119].

Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Stimuli, die teilweise bekannten Mechanismen sowie über die Zeitdauer bis zur maximalen Mobilisierung.

Stimulus	Zeitdauer bis zur max. Mobilisierung	Beispiel	Mechanismus
Chemokine	15 min bis wenige Stunden	Chemokin- Ligand 3, Chemokin (C-X-C motif) Ligand 2/8	direkte Granulozytenaktivierung
Stress	1-2 h	Adrenocorticotropin	Granulozytenaktivierung (fraglich)
Wachstumsfaktoren	4-6 d	G-CSF, SCF GM-CSF, Thrombopoietin, Erythropoietin, VEGF	CXCL12/CXCR4-Signalweg [120]

Tabelle 4: Stammzellmobilisation, modifiziert nach Winkler [64]

Die Tab. listet einige Mobilisationsstimuli, deren Wirkmaxima, Beispiele sowie den angenommenen Wirkmechanismus auf.

Durch G(M)-CSF wird neben HSC auch der Anteil der zirkulierenden Granulozyten gesteigert.

Obwohl in der klinischen Anwendung primär die Mobilisierung von HSC und Granulozyten im Vordergrund stehen, zeigt die Stimulation mit entsprechenden Wachstumsfaktoren auch nebeneffektiv eine Mobilisation von MSC und EPC in das periphere Blut [40, 121]. Interessanterweise wird unter Stimulation auch eine erhöhte Zahl an MSC im Knochenmark beobachtet [122].

1.5 Kurativer Therapieansatz: Stammzellinjektionstherapie

Die Stammzellinjektionstherapie versucht über eine direkte Injektion von zuvor isolierten Stammzellen eine vermehrte Zelldifferenzierung im Infarktgebiet zu erreichen. Vorteile einer solchen Zellinjektion wären eine hohe und zielgenaue Stammzellpräsenz im Infarktareal. Außerdem bestünde im Gegensatz zum TE keine Notwendigkeit, gezüchtete Gewebestrukturen an Stelle des geschädigten Myokards implantieren zu müssen.

Das injizierte Zellspektrum erstreckt sich von knochenmarkständigen (hämatopoetischen und mesenchymalen) Stammzellen [2, 66, 123, 124], kardialen Stammzellen [125], skelettalen Myoblasten [126] bis zu ESC [127]. Die jeweiligen Zellsuspensionen wurden entweder in das Narbengewebe [66, 123], direkt in das vitale Myokard oder in den Blutkreislauf [2] bzw. die Koronargefäße [124] injiziert oder als Monolayer auf das Narbengewebe transplantiert [128]. Obwohl das benötigte Differenzierungspotential in Kardiomyozyten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen für viele Stammzellen *in vitro* nachgewiesen wurde, ergeben sich bei den *in-vivo*-Zellinjektionen recht widersprüchliche Ergebnisse.

Einige tierexperimentelle Studien zeigten sich vielversprechend. So konnten Shake et al. nachweisen, dass transplantierte MSC offenbar im Infarktbereich herzmuskelspezifische Markerproteinen (Alpha-Actinin, Tropomyosin, Troponin T, Myosin-schwere-Kette, Phospholamban) exprimieren, welche auch noch sechs Monate nach Stammzellgabe nachweisbar waren [123]. Darüber hinaus erzielten einige Arbeitsgruppen eine erhöhte Gefäßdichte im Infarkt- und Infarktgrenzbereich [124, 128]. Klinisch konnte nach vier Wochen eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion nachgewiesen werden [124, 128]. Diese Ergebnisse sind jedoch gegenwärtig Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen. Fragwürdig ist, ob die beobachteten Veränderungen Folgen einer reinen Differenzierung der MSC sind oder ob es sich bei den beschriebenen Ergebnissen, wie schon bei der Stammzellmobilisation, um Artefakte, bedingt durch Zellfusionen von MSC mit ausdifferenzierten Zellen oder parakrine Wirkungen der MSC, handelt [129, 130].

Im Gegensatz zu den verwendeten MSC scheint die Applikation von HSC nicht zur Expression von (Kardio-)Myozytenmarkern oder Endothelzellmarkern zu führen [66]. Insbesondere ließen sich drei Monate nach Injektion keine applizierten Zellen mehr nachweisen. Auch die klinischen Parameter zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Verbesserung, was sich histologisch durch ein unverändertes Remodeling bestätigte [2].

Dagegen ist der positive Nutzen einer Injektion von skelettalen Myoblasten gut dokumentiert [61]. Skelettale Myoblasten können einfach isoliert werden und sind aufgrund ihrer ausgeprägten Ischämietoleranz gut für eine Injektionstherapie geeignet [131]. Histologisch zeigt sich die Ausbildung von gestreiften Myotuben im Narbenbereich [61]. Myoblasten bilden zudem mit adulten Kardiomyozyten *in vitro* Zell-Zell-Kontakte, was jedoch in den *in-vivo*-Studien zu gehäuften Arrhythmien führte [96, 103].

Auch die Injektion von ESC in infarziertes Myokard scheint ein vielversprechender Ansatz zu sein. So konnte sowohl die kardiomyozytäre Differenzierung von injizierten ESC *in vivo* als auch eine verbesserte kardiale Funktion im Rattenmodell nachgewiesen werden [132]. Dieses

konnte jedoch bei Verwendung humaner ESC, die in infarziertes Rattenmyokard injiziert wurden, nicht bestätigt werden. Dort zeigten sich lediglich einige unorganisierte Muskelbündel und wenige neu gebildete Kapillaren bei sogar reduzierter kardialer Funktion im Vergleich zur Kontrollgruppe [127].

Nachdem sich im tierexperimentellen Bereich wenigstens die Injektionen von MSC, ESC und Myoblasten erfolgsversprechend zeigten, wurden bis heute ca. 40 klinisch-humane Studien publiziert [102].

In der randomisierten placebokontrollierten MAGIC (Myoblast Autologous Crafting in Ischemic Cardiomyopathy)-Studie wurden erstmals autologe Myoblasten epikardial transplantiert [133]. Jedoch zeigte sich keine klinische Verbesserung der vorbestehenden LV-Dysfunktion. Im Gegenteil, die Studie musste aufgrund einer erhöhten Rate an Arrhythmieereignissen vorzeitig beendet werden.

Dagegen konnte in der randomisierten BOOST (BOne MarrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration)-Studie nach intrakoronarer Injektion von autologen Knochenmarkzellen initial eine verbesserte LV-Funktion beobachtet werden, welche jedoch nach 18 monatiger Nachuntersuchung nicht mehr nachweisbar war [101, 105].

Im Vergleich dazu zeigte die TOPCARE-AMI (Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction)-Studie eine verbesserte LV-EF, eine gesteigerte koronare Flussreserve sowie eine optimierte Wandbewegung im Infarktarea bei Verwendung von Knochenmarkzellen bzw. zirkulierenden Progenitorzellen [134]. Zwischen der Verwendung von Knochenmarkzellen bzw. zirkulierenden Progenitorzellen zeigte sich kein Unterschied [104]. Auch nach einem Jahr waren die Ergebnisse der beiden Stammzellgruppen signifikant besser als die der randomisierten Kontrollgruppe. Zu ähnlichen Ergebnissen kommt die placebokontrollierte, doppelblinde REPAIR-AMI (Autologous Stem cell Transplantation in Acute Myocardial Infarction)-Studie [135].

Trotz aller dieser nachgewiesenen positiven Effekte der Stammzellinjektionstherapie, konnte bis heute in keiner Studie ein kurativer Effekt durch klinisch relevanten Myokardersatz dokumentiert werden.

1.6 Kurativer Therapieansatz: Tissue Engineering

Im Gegensatz zu den rein zelltherapeutischen Ansätzen wird beim TE versucht, *in vitro* eine Züchtung von Ersatzgeweben zu erreichen, welche als Gewebeersatz implantiert werden sollen.

Die drei Grundpfeiler des TE bilden (Stamm-) Zellen, Scaffoldssysteme sowie Zytokine, die allerdings nicht in jedem experimentellen Ansatz alle zusammen verwendet werden [136]. Für den Erfolg des TE ist es allerdings unabdingbar, eine optimale Zusammensetzung dieser drei Komponenten zu finden.

Generell können beim TE autologe, homologe oder xenogene Zellen eingesetzt werden. Auch im Bereich des Scaffolds gibt es eine Vielzahl von verwendbaren Materialien, die teils synthetischen Ursprungs, teils autologen / biologischen Ursprungs sind. Das Scaffold soll den Zellen durch biologische oder synthetische Polymere Leitstrukturen bieten, in denen sie sich organisieren und differenzieren können.

So sollen sich Gewebestrukturen bilden, die dem ursprünglichen Gewebe nahekommen und als Gewebeersatz implantiert werden können. Das Zell-Scaffold-System kann entweder *in vitro* zur Ausdifferenzierung gebracht und so als adultes Ersatzgewebe in den Organismus implantiert werden oder das Zell-Scaffold-System wird im undifferenzierten Stadium implantiert und unterliegt *in vivo* der physiologischen Steuerung.

Dabei ist wichtig zu beachten, dass die Eigenschaften des umgebenden Gewebes (Nische) eine herausragende Bedeutung für die Differenzierung der Stammzellen und das Organisationsverhalten von Zellen haben [137]. Beispielweise ist für die Hämatopoese eine spezielle Nische notwendig, die von unterschiedlichen Zellen und Zytokinen gebildet wird [138]. Zudem reagieren MSC auf ein unterschiedliches (Zytokin-) Milieu mit der Differenzierung u.a. in Adipozyten, Chondrozyten oder Osteoblasten [139, 140]. Daraus ergibt sich, dass ein erfolgreiches TE erst durch genaue Kenntnis der Differenzierungsprozesse ermöglicht wird.

In einem idealen TE-Konzept sollten dabei vor allem Zellen und Substanzen mit autologem Charakter Verwendung finden, da somit keine komplikationsreiche, immunsuppressive Therapie nötig wäre. Ebenso wäre eine optimale Integration dieses Ersatzgewebes in das bestehende Gewebe erstrebenswert um ein Mitwachsen zu ermöglichen, was insbesondere bei pädiatrischen Patienten wichtig ist.

Seitdem das Konzept des TE in den achtziger Jahren entwickelt wurde, ist bis heute versucht worden, eine Vielzahl von Geweben durch TE zu ersetzen. Große Fortschritte gab es vor

allem im orthopädischen Bereich der Stütz- und Strukturgewebe [141, 142], des Nervengewebes [143, 144], den Geweben des Gastrointestinaltraktes [145] und der Haut [146].

So kam es in den letzten Jahren auch im kardiovaskulären Bereich zu Entwicklungen von autologem Ersatzmaterial, vor allem im Bereich der Herzklappen [147-149] und eines klappentragenden Aortenconduits [150], ohne jedoch einen klaren Durchbruch zu erreichen.

Im kardiovaskulären Bereich scheint die Verwendung eines Bioreaktors, in dem das Scaffold zusammen mit den Zellen inkubiert wird recht erfolgversprechend, denn die rhythmische Dehnung und Stauchung von frühen Kardiomyozyten scheint Bedeutung bei der Kardiogenese zu haben [151].

Trotz aller Bemühungen gelang es bis heute jedoch nicht, Herzgewebe in der Form eines funktionierenden Patches zu züchten, der es bis zu einer klinischen Reife gebracht hat. Zum einen scheint das benötigte Differenzierungsmilieu noch zu unbekannt, zum anderen ist die unzureichende Vaskularisation des Ersatzgewebes ein limitierender Faktor. So darf der Abstand von Kapillare zu Kapillare nicht länger als 200 μm sein, um die Nekrose der Zellen zu verhindern [152].

1.7 Die typische Fremdkörperreaktion

Ein mögliches Problem des TE stellt die Reaktion des Organismus auf eingebrachtes Fremdmaterial dar. Denn jedes vom Immunsystem als fremd erkannte Material, das in den Körper eingebracht wird, führt zu Entzündungsprozessen. Auch die von uns implantierten PVC-Membranen und Scaffoldssysteme stellen für das porcine Immunsystem stimulierende Reize dar. Dieser Entzündungsprozess gliedert sich typischer Weise in drei Phasen. Eine akute, eine progredient-chronische und eine finale Phase [153]. In der akuten Phase, die ungefähr eine Woche dauert, kommt es zunächst zu einer Initialisierung des unspezifischen Immunsystems durch die Aktivierung des Gerinnungs- und des Komplementsystems und damit zur Fibrinbildung und Komplementbindung an das Fremdmaterial. In der wenige Wochen dauernden progredient-chronischen Phase wandern nach und nach Entzündungszellen ein und werden aktiviert. Mastzellen, Makrophagen und zytotoxische T-Lymphozyten formen zusammen mit Fibrin und den Komplementfaktoren eine organische Kapsel, die das Fremdgewebe umschließt. Sind die Entzündungszellen in der Lage, den Fremdkörper zu zersetzen, so wird dieser phagozytiert. Handelt es sich um nicht-phagozytierbare große Materialpartikel, wandeln sich Makrophagen zu mehrkernigen „Fremdkörperriesenzellen“, die das Fremdkörpergewebe dauerhaft umschließen und so vor weiteren Immunreaktionen abschotten [154]. Dieser „Riesenzellsaum“ wird nachfolgend von migrierenden (Myo-) Fibroblasten und Endothelzellen besiedelt. Sie bilden ein Granulationsbindegewebe, das durch eine kollagenreiche ECM und vereinzelte Kapillarstrukturen gekennzeichnet ist [155]. Interessanterweise scheint jedoch die Fremdkörperreaktion in Abhängigkeit von der Lokalisation im Organismus unterschiedlich zu verlaufen [156].

2 Zielsetzung und Fragestellungen

Die myokardiale Ischämie ist heutzutage noch immer mit einer hohen Mortalität und Morbidität verbunden. Bisherige Versuche einer stammzellvermittelten Therapie zeigten *in vivo* untereinander widersprüchliche Ergebnisse, die teilweise auch von *in vitro* Beobachtungen abweichen. Offenbar ist für den effektiven Einsatz von Stammzellen als Therapieoption bislang noch zu wenig über deren Physiologie bekannt. Deshalb wurde in einem Großtiermodell das physiologische Differenzierungspotential von zirkulierenden Stammzellen untersucht. Dies wurde erreicht, in dem zirkulierenden Stammzellen im gesunden kardialen Milieu eine neutrale Differenzierungsnische angeboten wurde. Dabei wurde die Einflussnahme auf die Stammzelldifferenzierung durch eine bereits existente ECM oder direkte Zell-Zell-Kontakte mit präexistierenden Zellen verhindert. Das entstandene Gewebe wurde auf das „Homing“ von Stammzellen, auf Differenzierungsprozesse und auf Gewebeorganisation hin untersucht. Darüber hinaus wurden die Auswirkungen einer Stimulation mit GM-CSF geprüft.

Es wurden folgende Fragestellungen in dieser Arbeit untersucht:

- Kommt es auf den implantierten Membranen nur zu einer Entzündungsreaktion oder bildet sich ein funktionelles, differenziertes Gewebe aus?
- Ist das Ausmaß der Gewebeentstehung abhängig von der Implantationsdauer?
- Welche Zelltypen lassen sich auf den Membranen nachweisen?
- Erfolgt ein Gefäßwachstum und wie ist es organisiert?
- Zeigt sich ein „Homing“ von Stammzellen auf den Membranen?
- Lässt sich zeigen, welche Stammzellen in welche Gewebezellen differenzieren?
- Welche Veränderungen ergeben sich durch die Gabe von GM-CSF im Hinblick auf Stammzellbesiedelung und -differenzierung?

Durch die Beantwortung dieser Fragen, kann geklärt werden, ob ASC *in vivo* in der physiologischen kardialen Umgebung fähig sind ein differenziertes Gewebe zu bilden. Dies wäre die Grundvoraussetzung für eine stammzellvermittelte Kurativtherapie des Myokardinfarktes.

3 Material und Methoden

Im nachfolgenden Teil erfolgt die Beschreibung aller im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten tierexperimentellen, molekulargenetischen und immunhistologischen Methoden sowie der In-Situ-Hybridisierung (ISH). Protokolle, die nicht genauer erklärt werden, erfolgten nach gängiger Laborpraxis [157] oder, wenn kommerziell erhältliche Kits benutzt wurden, nach den Angaben der Hersteller. Dasselbe gilt für Puffer und Lösungen, deren genaue Zusammensetzung nicht näher erwähnt wird. Eine Auflistung aller verwendeten Materialien, Geräte und Lösungen befindet sich im Anhang.

3.1 Methoden

3.1.1 Tierexperimentelle Methoden

Ethische Grundlagen

Alle Tierexperimente erfolgten unter strikter Einhaltung der Leitsätze der Gesellschaft für Versuchstierkunde sowie des Leitfadens für den Umgang und den Schutz von Labortieren [158]. Das Versuchsvorhaben war zuvor vom Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt worden.

Fremdkörperbau

Der Fremdkörper bestand aus einem Scaffold und der untersuchten Membran. Das Scaffold wurde aus einem 10 cm langen Stück eines 5 F Angiographiekatheters hergestellt. Durch das Lumen des Katheters wurde ein 0,2 mm dicker Edelstahldraht gezogen. An den beiden freien Drahtenden wurde eine Mersilenemembran eingespannt und verknotet. Um ein Ausfasern zu verhindern, wurden die Enden der Mersilenemembran abgeflammt. Die Fremdkörper wurden in 80%igem Ethanol desinfiziert und aufbewahrt. Vor der Implantation wurden die Fremdkörper mit 0,9%igem NaCl gespült.

Implantation der Fremdkörper

Einen Tag vor der Implantation der Fremdkörper wurde den Schweinen oral eine „Loading Dose“ von 300 mg Clopidogrel verabreicht. Zur Implantation wurden die Schweine mit Ketamin (20 mg/kg KG), Azaperon (4 mg/kg KG) und Atropin (0,5 mg) i.m. sediert und in den OP gebracht. Die Narkose-Einleitung erfolgte mit Dipidolor (0,2 mg/kg KG), Propofol (1,5 mg/kg KG) und Pancuronium (2 mg). Nachfolgend wurden die Schweine orotracheal intubiert und maschinell über einen 6,5 mm Tubus beatmet. In die rechte A. femoralis wurde eine 9 F-Schleuse eingebracht. Zeitgleich erfolgte eine Heparinisierung mit 180 I.E./kg KG. Ein 0,035 Inch hydrophiler J-Kurven Draht wurde in den LV vorgeschoben. Unter Durchleuchtung wurde ein Fremdkörper unter Zuhilfenahme eines 8 F Katheters in den LV vorgeschoben und dort abgesetzt. Draht und Katheter wurden vorsichtig in die Aorta abdominalis zurückgezogen. Dort wurde ein baugleicher Fremdkörper platziert. Nach Entfernung von Draht und Katheter wurde die A. femoralis mit einem Angio-Seal-System verschlossen. Echokardiographisch wurde erneut die korrekte linksventrikuläre Lage sichergestellt.

Postoperativ wurden die Schweine analgetisch mit einem Transdermalen Therapeutischen System (Fentanyl, 25 µg/h) und antibiotisch durch viertägige Gabe von Cefquinom 2 mg/kg i.m. versorgt. Zur Prophylaxe thromboembolischer Komplikationen nach Fremdkörperimplantation erhielten die Schweine eine tägliche Medikation von 75 mg Clopidogrel und 100 mg Aspirin per os.

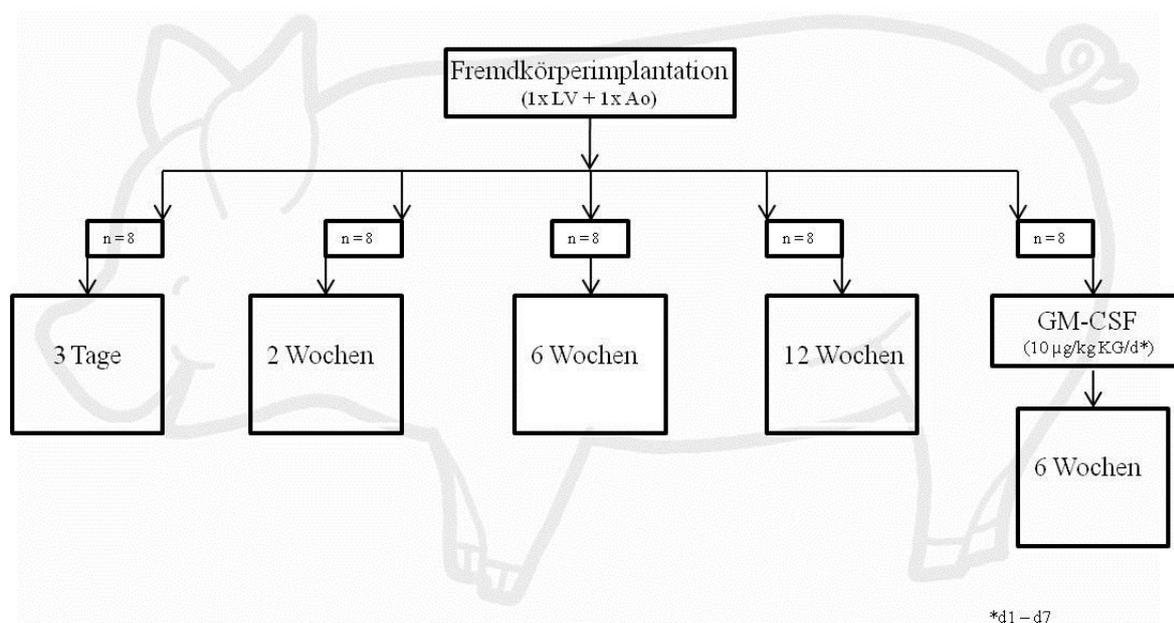


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Studiendesigns

Die Fremdkörperimplantation erfolgte in den linken Ventrikel (LV) und in die Aorta (Ao). Die Explantation der Fremdkörper erfolgte nach fester zeitlicher Vorgabe. Einer fünften Gruppe wurde nach Implantation GM-CSF appliziert (n = Anzahl der Tiere pro Gruppe, d = Tage, KG = Körpergewicht).

Um mögliche zeitabhängige Prozesse untersuchen zu können, wurden Versuchsgruppen von drei Tagen, zwei, sechs und zwölf Wochen mit einer jeweiligen Gruppenstärke von $n = 8$ Tieren gebildet.

Einer weiteren Sechs-Wochen-Gruppe ($n = 8$) wurde GM-CSF appliziert, um die Auswirkungen einer Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut zu untersuchen. Ziel war es, eine Steigerung des Stammzellanteils im peripheren Blut zu bewirken und so zu testen, ob dadurch auch eine erhöhte Zellmigration und Gewebekonstruktion auf den Membranen erreicht werden kann. Abbildung 7 verdeutlicht das Studiendesign.

Applikation von GM-CSF

Acht Schweinen wurde an den ersten sieben Tagen nach Fremdkörperimplantation täglich eine Dosis von $10 \mu\text{g/kg}$ KG GM-CSF subkutan verabreicht.

Euthanasie der Schweine und Explantation der Fremdkörper

Am Ende des Versuchszeitraums (drei Tage, zwei, sechs und zwölf Wochen) wurden die Tiere erneut narkotisiert (siehe oben). Die korrekte Lage der Fremdkörper wurde radiologisch dokumentiert. Anschließend wurden die Tiere in tiefer Narkose mit 50 mval Kaliumchlorid i.v. euthanasiert. Nach zügiger Sternotomie wurde die linksventrikuläre Membran (LV-M) dargestellt, entnommen, in vier ca. $1,5 \text{ cm}$ lange Stücke geteilt und umgehend in flüssigem Stickstoff konserviert. Nachfolgend wurde das Abdomen mit einem medianen Schnitt eröffnet, die aortale Membran (Ao-M) aufgesucht, ebenfalls in vier $1,5 \text{ cm}$ lange Stücke geschnitten und in flüssigem Stickstoff konserviert. Die Lagerung der Präparate erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Einschlusskriterien für diese Studie

In diese Studie wurden nur Membranen eingeschlossen, deren korrekte Lage durch radiologische und sonographische Kontrolle sichergestellt werden konnte. Ebenso wurden nur Membranen eingeschlossen, die keinen Kontakt zu umgebenden Gewebestrukturen hatten.

3.1.2 Molekularbiologische Methoden

RNA-Isolierung aus Gewebe

Zur Isolation der Gesamt-RNA wurden die Gewebe durch Verwendung einer Schwingmühle von den Membranen getrennt und homogenisiert. Die Gesamt-RNA wurde mit dem QiaGen RNeasy Micro bzw. Mini Kit isoliert. Anschließend erfolgte ein DNase-Verdau (Turbo DNA free DNaseI), welcher durch Verwendung einer herstellereigenen Inaktivierungsreagenz beendet wurde. Die Konzentration der isolierten Gesamt-RNA wurde photometrisch bestimmt (NanoDrop) und eine Qualitätskontrolle der RNA durch mikrokapillar-elektrophoretische Analysen (Bioanalyser) durchgeführt. Eine Ausbeute von mindestens 30 ng/ μ l und ein Quotient OD_{260/280} von mindestens 1,8 waren Voraussetzung für die weitere Verwendung.

Reverse Transkription

Die Reverse Transkription ermöglicht die Herstellung von komplementärer DNA (cDNA) aus zuvor isolierter RNA. Dafür wurden 100 ng „Random Primer“ mit 0.3-2 μ g RNA ad 12 μ l ddH₂O vermischt. Das Primer Annealing erfolgt bei 65°C für 5 min. Nachfolgend wurden 4 μ l Reaktionspuffer (First-Strand Puffer), 2 μ l DTT (0,1 M), 0,5 mM dNTPs und 1 μ l RNaseOUT (RNase-Inhibitor, 40 U/ μ l) zugesetzt. Die Ansätze werden vorsichtig gemischt und für 2 min bei 42°C inkubiert. Dann wurden 200 U SuperScript II-Transcriptase zugegeben und für 50 min bei 42°C inkubiert. Zur Inaktivierung wurden die Ansätze anschließend 15 min lang auf 70°C erhitzt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20°C aufbewahrt.

Primerauswahl / Synthese

Die Auswahl der sequenzspezifischen Primer erfolgte mithilfe des Programms FastPCR, anhand der über PubMed ermittelten cDNA-Sequenzen. Es wurde neben der Transkriptspezifität darauf geachtet, dass die Größe des PCR Produkts für die quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) zwischen 100 und 180 bp lag.

Dagegen wurde bei den Primern, deren Produkt für die Synthese der ISH-Sonden benutzt werden sollte, auf ein längeres Transkript (> 500 bp) geachtet.

Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion („Polymerase Chain Reaction“ = PCR) wurde zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten verwendet. Für Endpunkt-PCR wurde eine Taq-DNA-Polymerase verwendet. Dagegen wurde zur Herstellung von ISH-Sonden eine Proof-Reading-DNA-Polymerase verwendet (Pfu-Polymerase). Nach Herstellerangaben hat diese eine Fehlerrate von $1,3 \times 10^{-6}$. Dagegen weist die Taq-Polymerase eine erhöhte Fehlerrate von $8,0 \times 10^{-6}$ auf. Durch die Verwendung des „proof-reading“-Enzyms sollte die Fehlerrate während der PCR-Sequenzierung minimiert werden.

Die PCR-Ansätze wurden in einer Reinbank auf Eis pipettiert. Um Pipettierfehler zu vermeiden, wurde zunächst ein Mastermix angesetzt.

Für eine Endpunkt-PCR wurde folgender 25 μ l Ansatz verwendet:

2,5	μ l	10 x PCR-Puffer
0,5	μ l	10 mM dNTP Mix
0,6	μ l	50 mM MgCl ₂
0,5	μ l	Primer 1
0,5	μ l	Primer 2
1	μ l	cDNA-Template (1:10)
0,5	μ l	Taq-Polymerase
ad 25	μ l	ddH ₂ O

Die Ansätze wurden durchmischt, kurz abzentrifugiert und in den PCR-Cycler gestellt. Die verwendete, optimale Annealingtemperatur wurde für jedes Primerpaar an Hand einer Gradienten-PCR ermittelt.

Der PCR-Cycler wurde mit folgendem Standard-Programm gestartet:

Initiale Denaturierung der DNA	94 °C	5 min	1 Zyklus
Denaturierung der DNA	94 °C	30 s	30 Zyklen
Annealing bei Optimaltemperatur	X °C	30 s	30 Zyklen
Elongation / Synthese	72 °C	30 s	30 Zyklen

Für eine PFU-PCR wurde folgender Ansatz gewählt:

2,5	µl	10 x PCR-Puffer
0,5	µl	10 mM dNTP Mix
0,5	µl	50 mM MgCl ₂
0,5	µl	forward Primer
0,5	µl	reverse Primer
1	µl	cDNA-Template (1:10)
0,5	µl	Pfu-Polymerase
ad 25	µl	ddH ₂ O

Der PCR-Cycler wurde mit folgendem Programm gestartet:

Initiale Denaturierung der DNA	94 °C	5 min	1 Zyklus
Denaturierung der DNA	94 °C	30 s	40 Zyklen
Annealing bei Optimaltemperatur	X °C	30 s	40 Zyklen
Elongation / Synthese	72 °C	60 s	40 Zyklen

Zur Herstellung der PCR-Produkte, die zur ISH-Sondentranskription benötigt wurden, wurde die Elongationszeit der Pfu-Polymerase auf 60 s erhöht. Die PCR-Produkte wurden bei – 20 °C gelagert.

Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (oder quantitative real-time PCR, qRT-PCR) beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR und ermöglicht die Quantifizierung des replizierten DNA-Fragmentes. Die Quantifizierung erfolgt dabei über Fluoreszenz-Messungen. Dazu wird dem qRT-PCR-Ansatz neben den sequenzspezifischen Primern ein fluoreszierender Reporterfarbstoff (hier: SYBR Green) zugegeben, der nur nach seiner Bindung an doppelsträngige DNA Fluoreszenzsignale emittiert. Dabei ist die Fluoreszenzzunahme dem Zuwachs des PCR-Amplifikats direkt proportional. Die Messung erfolgt am Ende jedes PCR-Zyklus. Je häufiger die Matrizen-DNA am Anfang der Reaktion vorhanden ist, desto weniger PCR-Zyklen sind notwendig, um den Punkt zu erreichen, an dem das Fluoreszenzsignal signifikant höher ist als der Fluoreszenzhintergrund. Dieser Punkt wird als Ct-Wert (Threshold-Cycle) bezeichnet und ermöglicht die Konzentrationsbestimmung der spezifischen

mRNA in der Probe. Vor jedem qRT-PCR-Lauf wurde die Effizienz der verwendeten Primer und der dynamischer Bereich der PCR-Reaktion ermittelt, indem die cDNA über vier Zehnerpotenzen verdünnt und in der qRT-PCR eingesetzt wurde. Jede qRT-PCR wurde als Triplikat durchgeführt, um experimentelle Schwankungen zu vermeiden. Die PCR-Ansätze wurden in einer Reinbank auf Eis pipettiert.

Für eine qRT-PCR wurde folgender 25 µl Ansatz gewählt:

350	ng	cDNA
0,5	µl	forward Primer
0,5	µl	reverse Primer
12,5	µl	IQ SYBR Green Super Mix
ad 25	µl	ddH ₂ O

Der IQ SYBR Green Super Mix enthält neben der Taq-Polymerase Reaktionspuffer, Nukleotid-Mix und SYBR Green. Die PCR-Reaktion erfolgt in 96-Well-Mikrotiterplatten. Die Ansätze wurden durchmischt, kurz abzentrifugiert und die Amplifikation in dem qRT-PCR-Cycler nach genspezifischem Thermoprofil durchgeführt. Um eine spezifische Bindung der Primer zu überprüfen und Fluoreszenzartefakte zu identifizieren, erfolgte nach jedem PCR-Lauf eine Schmelzpunktanalyse. Die relative Menge an mRNA des Zielgens wurde gegenüber einem konstitutiv exprimiertem Gen normalisiert (hier 18S RNA). Die relative Quantifizierung der mRNA wird als relativer “Foldchange” gegenüber der Kontroll-RNA ausgedrückt [108]. Dabei werden die gemessenen Fluoreszenzsignale der Kontrolle in der Regel auf 1 gesetzt und die Fluoreszenzsignale der Probe als Vielfaches von 1 ausgedrückt.

Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese erfolgte zur analytischen Auftrennung der DNA-Fragmentlängen einer Taq-PCR, einer Pfu-PCR oder eines Restriktionsverdaus. In der Gelelektrophorese wird die DNA (oder RNA) einem elektrischen Feld ausgesetzt. Aufgrund ihrer Phosphatgruppen, die als Protonendonatoren dienen, sind die Nukleinsäuren negativ geladen. Dadurch wandern sie in einer Matrix aus Agarose im elektrischen Feld in Richtung Anode entsprechend ihrer Länge mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Durch Anfärben mit Ethidiumbromid kann die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Die verwendete Agarosekonzentration richtete sich nach der zu erwartenden Länge der DNA-Fragmente. Standardmäßig wurden primär 1%ige Gele verwendet, bei sehr kleinen PCR-Produkten, 2%ige Gele. TBE-Puffer wurde mit der entsprechenden Agarosemenge aufgeköcht, mit Ethidiumbromid versetzt, in die Elektrophoresekammer gegossen und ein Taschenkamm in der Kammer platziert. Nach Aushärten des Gels wurde der Kamm entfernt und die Kammer mit TBE befüllt. DNA-Proben wurden mit Laufpuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte unter einer Spannung von 75 V und einer Stromstärke von 110 mA. Zur Bestimmung der Fragmentlänge wurde ein DNA-Standard, welcher Fragmente bestimmter Längen enthielt, verwendet.

Die Auswertung der Gelelektrophorese wurde unter Verwendung eines digitalen Imagersystems (ChemiDoc XRS) mittels UV-Licht durchgeführt.

Aufreinigung von PCR- und Restriktions-Produkten

PCR- und Restriktions-Produkte, welche als Template zur Herstellung von ISH-Sonden verwendet werden sollten, wurden über eine Säulenaufreinigung aufgereinigt (QIA Quick PCR Purification Kit). Dieses Kit eignet sich zur Aufreinigung von PCR-Produkten mit einer Länge von 100 bp–10 kb.

Die Aufreinigung wurde nach dem Prinzip der Anionenaustauschersäulen durchgeführt. Die Anionenaustauschersäulen eignen sich zur Isolierung von DNA aus DNA-RNA-Proteingemischen, weil die DNA durch ihre Phosphatgruppen bei einem pH von 2 negativ geladen ist und so bei Verwendung des entsprechenden Puffers an der Säule haften bleibt. Nach Auftragen der Probe, dem Waschen mittels Waschpuffer und Zentrifugation (60 s bei 10.000 x g) wurde die Säule mit einem entsprechenden Volumen an ddH₂O höheren pHs (7,0–8,5) eluiert.

Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen schneiden aufgrund ihrer Sequenzspezifität sehr genau. Die Restriktion wurde nach dem entsprechenden Herstellerprotokoll durchgeführt. 1 µg DNA wurde mit 2 µl RE-Puffer (10x), 0,2 µl BSA (10 µg/µl), 0,5 Enzym (10 U/µl) ad 20 µl ddH₂O versetzt, vorsichtig durchmischt und für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Der Restriktionsverdau wurde anhand einer Gelelektrophorese analysiert und dokumentiert.

Ligation

Die Ligasereaktion ermöglicht mittels einer enzymatischen Reaktion den Einbau eines Restriktionsproduktes in ein bakterielles Plasmid (= bakterieller Vektor). Die Ligation wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt (Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit). Dazu wurde 1 µl aufgereinigtes PCR-Produkt mit 1 µl Vektor, 1 µl Puffer und 3 µl ddH₂O versetzt und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

Transformation

Die Transformation diente der Aufnahme der zuvor durch Ligation hergestellten Plasmide in Bakterien.

Für diese Doktorarbeit wurden ausschließlich E. coli-Bakterien des Stammes Top10, die bereits durch chemische Behandlung zur Aufnahme von fremder DNA vorbereitet worden waren, verwendet.

Nach dem Auftauen der Bakterien wurden diese mit 6 µl Ligationsansatz beimpft, für 30 min auf Eis inkubiert, 30 s einer Temperatur von 42 °C (Hitzeschock) ausgesetzt und mit 250 µl SOC-Medium versetzt. Die Inkubation erfolgte schwenkend für 1 h bei 37 °C. Die mit den Plasmiden transformierten Bakterien wurden auf vorgewärmte Kanamyzin-Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht (ü. N.) inkubiert.

Minipräparation von Plasmid-DNA aus E. coli

Für Vorkulturen wurden einzelne Bakterienkolonien mit einem Holzstocher von den Agar-Agar-Platten gelöst und in 3 ml vorgewärmtes Kanamyzin-LB-Medium überführt. Die Inkubation dieser Vorkulturen erfolgte ü. N. bei 37 °C.

Die Minipräparation („Minilyse“) diente analytischen Untersuchungen der E. coli-Vorkulturen und erfolgte mit dem QiaGen Plasmid Maxi Kit.

Für die Minilyse wurden 2 ml der Vorkultur bei 8.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das verbleibende Bakterienpellet in 200 µl Resuspensionslösung (P1) aufgenommen und für 5 min bei RT inkubiert. Die gelösten Bakterien wurden mit 200 µl Lysepuffer (P2) versetzt und für weitere 5 min inkubiert. Die alkalische Lyse wurde nach der Inkubation durch Zugabe eines Neutralisationspuffers (P3) beendet. Das Reaktionsgemisch wurde bei 13.000 rpm 5 min zentrifugiert um Zelltrümmer und Fragmente der chromosomalen DNA abzusondern. Die Plasmid-DNA wurde mit dem Überstand entnommen, mit 1,2 ml 100%igem Ethanol versetzt und nach 5 min Inkubation bei RT für 10 min zentrifugiert (13.000 rpm). Die Zugabe von Ethanol absolut führte zum Ausfallen der

Plasmid-DNA. Es folgte ein Waschschriff mit 1 ml 70%igem Ethanol. Nach Zentrifugation (5 min; 13.000 rpm) wurde der Überstand entfernt und das DNA-Pellet für 10 min bei 37 °C getrocknet und mit 50 µl ddH₂O resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der DNA.

Nach der Restriktion des Plasmids mit BamHI und XhoI und der nachfolgenden Gelelektrophorese wurden Plasmide, die sich für das Insert positiv zeigten, sequenziert.

Mit der Sequenzierung wurde die Firma GATC-BIOTEC AG, Konstanz, beauftragt. Die Sequenzanalysen wurden mit der Insert-Sequenz verglichen und bei Übereinstimmung von 99% akzeptiert. Die Vorkultur, deren Stamm die größte Übereinstimmung zeigte, wurde weiter verwendet.

Maxipräparation von Plasmid-DNA aus E. coli

Zur Maxipräparation wurden 100 ml LB-Medium mit 200 µl Kanamycin (50 mg/ml) versetzt und mit 1 ml Vorkultur beimpft. Der Ansatz wurde bei 37 °C ü. N. inkubiert.

Die Maxipräparation erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die Minilyse, jedoch nach dem Herstellerprotokoll „Plasmid or Cosmid DNA Purification Using QIAGEN Plasmid Midi and Maxi Kits“.

100 ml Bakterienkultur wurden für 15 min bei 4 °C bei 6.000 g zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Bakterienpellet in 10 ml Resuspensionspuffer (P1) resuspendiert. Nach erfolgter Resuspension wurden die Bakterien mittels 10 ml Lysepuffer (P2) lysiert und für 5 min bei RT inkubiert. Dem verwendeten Lysepuffer wurden vor Verwendung 10 µl LyseBlue zugefügt, um durch einen optischen Farbumschlag den optimalen Lysezeitpunkt zu bestimmen. Die Lyse wurde durch Zugabe eines Neutralisationspuffers (P3) beendet und für 20 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation (20.000 g, 30 min, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und erneut zentrifugiert (20.000 g, 15 min, 4 °C). Der Überstand wurde mit QC-Puffer auf eine, mit QBT-Puffer befeuchtete, Säule gegeben. Nach Durchfluss der Lösung wurde die Säule mit 2 x 30 ml QC-Puffer gewaschen. Die Plasmide wurden mit 15 ml QF-Puffer eluiert. Anschließend wurden 10,5 ml Isopropanol zugesetzt. Nach erneuter Zentrifugation (15.000 g, 30 min, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen und zentrifugiert (15.000 g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet getrocknet, in 500 µl ddH₂O aufgenommen und die Konzentration photometrisch gemessen. Die Lagerung erfolgte bei - 20 °C.

In-vitro-Transkription zur Herstellung der ISH-Sonden

Zunächst wurden die aus der Maxilyse isolierten Plasmide linearisiert. Die Linearisierung erfolgte für Sense- und Antisense-Matrize mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen (Sense: XhoI; Antisense: BamHI).

Die In-vitro-Transkription diente der Umschreibung der DNA-Matrize (Sense oder Antisense) in RNA (Sense oder Antisense). Dabei wurde DIG-markiertes Uracil in die RNA-Sequenz eingebaut.

Für die In-vitro-Transkription wurde folgender 20 µl Ansatz verwendet:

1	µg	Plasmid (Sense oder Antisense)
4	µl	Puffer (5x)
2	µl	DTT
1	µl	RNase Inhibitor
2	µl	Nukleotidmix (inkl. DIG)
2	µl	entsprechender Polymerase (Sense: SP6; Antisense: T7)
Ad 20	µl	RNase freiem Wasser

Der Ansatz wurde durchmischt, abzentrifugiert und 2 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurde 1 µl für eine nachfolgende Gelelektrophorese abgenommen. Der restliche Ansatz wurde mit 2 µl DNase bei 37 °C für 15 min inkubiert und nachfolgend mit dem QIA RNeasy-Kit nach dem Protokoll „RNeasy Mini Protocol for RNA Cleanup“ aufgereinigt. Zunächst wurde der In-vitro-Transkriptionsansatz mit DEPC-H₂O auf 100 µl aufgefüllt und mit 350 µl RLT-Puffer versetzt. Nach Zugabe von 250 µl Ethanol absolut wurde der Ansatz auf eine RNeasy Mini-Säule aufgebracht und für 15 s bei 8.000 g zentrifugiert. Die Säulen wurden zwei Mal mit jeweils 500 µl RPE-Puffer gewaschen und die RNA-Sonden mit jeweils 50 µl RNase freiem Wasser eluiert. Zur Qualitätskontrolle erfolgten eine Gelelektrophorese und eine photochemische Konzentrationsbestimmung. Die verbleibende ISH-Sonde wurde aliquotiert und bei - 20 °C aufbewahrt.

3.1.3 Histologische Methoden

Anfertigung der Gefrierschnitte

Die ca. 1,5 cm langen Membranstücke wurden mit Tissue-Tek auf Aluminiumzylinder aufgeblickt. Im Kryostat wurden von jedem Gewebeblock unter Verwendung einer Schnittstrecker-Platte 6 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und auf Glasobjektträger gezogen. Die Arbeitstemperatur im Kryostat lag bei – 28 °C. Nach 10 min Trocknungszeit bei RT wurden die Schnitte für 5 min in 4%igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

Hämalaun-Eosin-Färbung

Zur vorläufigen Beurteilung der Gewebeerhaltung und -beschaffenheit wurden vor der Immunhistochemie von allen Gewebeproben zunächst Hämalaun-Eosin-Färbungen (HE) angefertigt:

- | | | |
|----|--|--------|
| 1. | Hämalaun nach Mayer | 10 min |
| 2. | Bläuen in fließendem Leitungswasser | 5 min |
| 3. | Abspülen mit Aqua dest. | |
| 4. | wässriges Eosin (2%ig) | 5 min |
| 5. | Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (95%ig, 100%ig, 100%ig) | |
| 6. | in Xylol klären | 1 min |
| 7. | Eindeckeln der Objektträger mit Entellan® | |

Zur Beurteilung der HE-Präparate wurden diese bei 1,6-, 10- und 20facher Vergrößerung betrachtet.

Methacrylat-Einbettung

Die Methacrylat-Einbettung wurde zur Einbettung des Scaffoldsystems benutzt, um daraus histologische Präparate anfertigen zu können.

Die Einbettung erfolgte nach Vorgaben des Herstellers. Das Scaffold wurde in 4%igem PFA ü. N. fixiert, mit PBS gespült und mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 96%) für jeweils 3 x 10 min entwässert. Die Präinfiltration wurde über 2 h in der Präinfiltrationslösung durchgeführt. Zur Infiltration wurde das Scaffold in purer aktivierter Basislösung ü. N. bei 6 °C inkubiert. Das Scaffold wurde nachfolgend über eine Aufhängung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß schwebend befestigt und luftblasenfrei mit Polymerisationslösung umschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Reaktionsgefäß

entfernt, das eingebettete Scaffold senkrecht auf einen Probenträger geklebt und mit einer Diamant-Innenlochsäge geschnitten (Einstellung 450 µm; Schnittdicke ca. 200 µm). Die Schnitte wurden auf Objektträger gebracht, mit HE gefärbt und mit Histofluid eingedeckelt. Zur Beurteilung wurden die Präparate bei 10- und 20facher Vergrößerung betrachtet.

Immunhistochemie Untersuchung der Membranen

Antigene Strukturen in Zellen und Geweben können mit immunhistochemischen Methoden detektiert werden. Hierfür verwendet man spezifische mono- bzw. polyklonale Antikörper, die an das gesuchte Antigen binden. Der histologische Nachweis der so entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe im Gewebe erfolgt durch direkte oder indirekte Markierungsverfahren. Bei der direkten Markierung ist der Antikörper, der gegen das Antigen im Gewebe gerichtet ist, markiert. Bei der indirekten Markierung hingegen bindet ein Sekundäntikörper an den nicht-markierten Primäntikörper. Die Sekundäntikörper tragen entweder den Marker kovalent gebunden oder sie dienen als Brücke zu anderen signalgebenden Komplexen. Hier wurde die Biotin-Streptavidin-Methode verwendet, bei der biotinylierte Sekundäntikörper über eine Komplexbildung an Cy-markiertes Streptavidin binden.

Die Detektionen der spezifischen Antikörperbindungen und damit die Lokalisation der Antigen-Antikörper-Komplexe im Gewebe, erfolgten über die Anregung der verwendeten Fluorochrome mit UV-Licht. Um verschiedene Antigene in einem Gewebeschnitt darzustellen, wurden Mehrfachmarkierungen mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen angefertigt.

Die immunhistochemische Färbung wurde, wie in Tabelle 5 beschrieben, durchgeführt.

– Färbeprotokolle

Arbeitsschritt	Reagenz	Dauer	Temperatur
Fixation	PFA 4%ig	10 min	RT
Waschen	PBS	3 x 3 min	RT
Inkubation	(Primär-)Antikörper	60 min	RT
Waschen	PBS	3 x 3 min	RT
Inkubation*	Sekundärantikörper	60 min	RT
Waschen	PBS	3 x 3 min	RT
Inkubation*	Cy-konjugiertes Streptavidin	1 h	RT
Inkubation	Kernfarbstoffe	20 min	RT
Waschen	PBS	3 x 3 min	RT
Eindecken	Mowiol		RT
lichtgeschützte Lagerung der Objektträger			4 °C

Tabelle 5: Färbeprotokoll für die Immunhistochemie

* Nur bei Verwendung der indirekten / Biotin-Streptavidin-Methode

Bei jedem Färbedurchgang wurde an jeweils einem Gefrierschnitt eine Negativkontrolle durchgeführt, um falsch-positive Markierungen auszuschließen und das Maß der unspezifischen Hintergrundfärbung zu ermitteln. Hierzu wurde der Inkubationspuffer anstelle des Primärantikörpers aufgetragen, während alle anderen Schritte des Protokolls wie beschrieben erfolgten.

Die PFA-fixierten Präparate wurden drei Mal gewaschen und der Antikörper anschließend auf den trockenen Objektträger pipettiert. Für die ki67-Färbung wurden die Schnitte in einer Zitratpufferlösung (pH 6,0) für 9 min einer Mikrowellenstrahlung (600 W) ausgesetzt.

Antikörper und Farbstoffe wurden mit PBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt und jeweils 50 µl pro Gefrierschnitt aufgetragen. Die Inkubation der Membranschnitte erfolgte in einer feuchten Kammer unter Lichtausschluss.

Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Objektträger mehrmals in PBS gewaschen. Alle Inkubationen erfolgten bei RT. Zum Eindecken wurden Deckgläschen mit Mowiol bestrichen und vorsichtig auf die feuchten Objektträger gedrückt. Die Präparate wurden bei 4 °C gelagert.

Kernfarbstoffe

Um eine optimale Detektion der Zellkerne sowohl mit dem Fluoreszenzmikroskop als auch mit der konfokalen Lasermikroskopie zu gewährleisten, wurde eine Kombinationsfärbung mit DAPI und DRAQ 5™ mit einer Verdünnung von je 1:1000 durchgeführt.

Fluoreszenzmikroskopie

Die Präparate wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop im Auflichtverfahren bei 40facher Vergrößerung analysiert. Entsprechende Farbfilter dienten zur Erzeugung von kurzwelligem Licht geeigneter Wellenlänge, um das jeweilige Fluorophor zu einer längerwelligen Emissionsstrahlung anzuregen. Nach der Erstellung digitaler Bilder mit dem Leica Kamerasystem erfolgte die Auswertung mit Image J.

Konfokale Lasermikroskopie

Um immunhistologisch markierte Strukturen mit dem Lasermikroskop sichtbar zu machen, wurden Laserstrahlen mithilfe eines Prismas und einer Lochblende auf einen bestimmten Wellenbereich eingegrenzt. Das vom beleuchteten Areal emittierte Licht wird auf die Öffnung einer weiteren brennpunktgleich (konfokal) ausgerichteten Lochblende fokussiert und so das zu Unschärfe führende Streulicht abgefangen. Das konfokale Lasermikroskop wurde für eine optimale Bilddokumentation eingesetzt. Hierzu wurden bei 40facher Vergrößerung im Rasterverfahren Bilderserien eines Gewebeschnittes erstellt, digitalisiert und mit dem Softwareprogramm Imaris 4.2.0 Bitplane zusammengefügt.

Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie (EM) wurde freundlicherweise von Herrn Sawa Kostin, Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim, durchgeführt. Dafür wurden zunächst Membranstücke in Eponharz eingebettet. Davon wurden Semidünnschnitte (500 nm) hergestellt, welche mit Periodsäure-Leukofuchsin (PAS) gefärbt wurden. Die PAS-gefärbten Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Von ausgewählten Membranblöcken wurden nachfolgend Ultradünnschnitte (70 nm) hergestellt, die mit Uranylacetat gefärbt und mit Bleicitrat gegengefärbt wurden. Die so gefärbten Schnitte wurden mit dem Elektronenmikroskop untersucht.

3.1.4 In-situ-Hybridisierung

Anfertigung von Gefrierschnitten

Für die ISH wurden ausschließlich Gefrierschnitte verwendet. Von den Membranen wurden im Kryotom 12 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger aufgenommen und kurz bei RT getrocknet. Anschließend wurden die Präparate umgehend für die ISH verwendet.

In-situ-Hybridisierung mit DIG-gelabelten Sonden

Durch die ISH kann eine sequenzspezifische mRNA-Expression im Gewebe dargestellt werden. Dazu wurden die in den vorherigen Schritten hergestellten DIG-markierten RNA-Sonden auf Gewebeschnitte aufgebracht und immunhistochemisch detektiert.

Jeder Arbeitsschritt (Fixierung, Andauung, Prähybridisierung etc.) wurde in gläsernen Färbeküvetten und entsprechenden Objektträgergestellen durchgeführt. Alle Materialien wurden vor Benutzung 3 h bei 180 °C sterilisiert. Ebenso wurden alle verwendeten Puffer und Spüllösungen, die bis zur Hybridisierung verwendet wurden, mit DEPC-behandeltem und autoklaviertem Wasser angesetzt. Wenn nicht anders vermerkt, wurden die einzelnen Schritte bei RT ausgeführt. Die Beurteilung der Präparate erfolgte mit 1,6facher und 10facher Vergrößerung.

– Gewebevorbereitung

Bevor die Sonde für die Hybridisierung auf die Schnitte aufgebracht wurde, erfolgte eine Vorbehandlung, um das Gewebe für die Sonde optimal zu permeabilisieren, zu fixieren und unspezifische Sondenbindungen zu verhindern.

– Fixierung

Die Fixierung der Kryoschnitte erfolgte unmittelbar nach dem Schneiden, um eine Zellyse und eine Degeneration der mRNA zu vermeiden. Dazu wurden die auf Objektträger aufbrachten Kryoschnitte in einer Färbewanne für 15 min bei RT in 4%igem PFA fixiert. Nachfolgend wurden die Schnitte 5 min in PBS gewaschen.

– Proteinase-K-Verdau

Nach der Fixierung erfolgte der Andau der Schnitte durch eine Proteinase-K-Lösung. Dadurch wurden die Zellmembranen permeabilisiert (um die Penetration der Sonde zu verbessern) und Ribosomen, die u.U. an der mRNA adhärerten, proteolysiert.

Die Schnitte wurden für 2 min in der Proteinase-K-Lösung (10 µg/ml) bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung erfolgte durch Inkubation in einem PBS-Glycin-Gemisch und zweimaliges Waschen mit PBS.

– Erneute Fixierung

Da es durch das Einwirken der Proteinase zu einem teilweisen Aufbrechen der PFA-Fixierung kommen kann, wurden die Präparate erneut für 15 min in 4%igem PFA fixiert.

– Acetylierung

Durch eine Inkubation in einem Essigsäureanhydrid-TEA-Gemisch werden intrazelluläre RNasen inaktiviert sowie das Hintergrundsignal der Sonden durch Blockierung von positiv geladenen Ionen in den Geweben und auf den Objektträgern reduziert [159].

Essigsäureanhydrid wurde erst kurz vor Verwendung der TEA-Lösung zugefügt und kräftig geschüttelt. Die Schnitte wurden 10 min in der Lösung inkubiert und nachfolgend zweimal für 5 min in PBS gewaschen.

– Prähybridisierung

Die Prähybridisierung der Objekte dient dem Blockieren freier Bindungsstellen, um eine unspezifische Bindung der Sonde an DNA und / oder RNA zu verhindern. Die Prähybridisierung erfolgte durch Zugabe von Hybridisierungspuffer für 15 min bei der für die Sonde optimalen Hybridisierungstemperatur (55°C) in einer feuchten Kammer.

– Hybridisierung

Die für die Hybridisierung verwendete Sonde wurde mit Hybridisierungspuffer auf eine Konzentration von 500 ng/ml gebracht und anschließend bei 70 °C 1 min denaturiert. Die Objektträger wurden vorsichtig vom Prähybridisierungspuffer befreit und mit Fixogum Rubber Cement umrandet. Auf jeden Objektträger wurden 150 µl Sonde gegeben. Teilweise wurden die Objektträger mit einem Deckgläschen abgedeckt und mit Fixogum Rubber Cement verschlossen. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer für 16-20 h bei 55 °C.

– Posthybridisierungswaschen

Das Fixogum wurde von den Objektträgern entfernt und, falls vorhanden, die Deckgläser von den Objektträgern durch Eintauchen in Waschlösung 1 abgehoben.

Das Waschen erfolgte unter stringenten Bedingungen bei 55 °C nach folgendem Protokoll:

- | | | |
|----|---------------|--------|
| 1. | Waschlösung 1 | 15 min |
| 2. | Waschlösung 1 | 30 min |
| 3. | Waschlösung 2 | 15 min |
| 4. | Waschlösung 2 | 30 min |

– Immunhistochemischer Sondennachweis

Die Präparate wurden nachfolgend für 3 x 10 min mit TBST, dem Levamisol zur Phosphatasen-Inaktivierung zugefügt war, inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit einer Blockinglösung für 30 min. Jeder Objektträger wurde mit Fixogum umrandet und mit 150 µl Antikörperlösung (1:500) ü. N. bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Das Fixogum wurde von den Objektträgern entfernt und, falls vorhanden, die Deckgläser unter TBST abgehoben.

Es erfolgten Waschschrte nach folgendem Protokoll:

- | | | |
|----|----------------------|-----------|
| 1. | 2 x TBST + Levamisol | je 30 min |
| 2. | 3 x NTMT | je 10 min |

Für die Färbereaktion wurde eine Mischung von NBT / BCIP und NTMT verwendet. Jeder Objektträger wurde mit 150 µl NBT / BCIP – Lösung lichtgeschützt inkubiert, bis unter histologischer Kontrolle ein deutliches Färbesignal detektiert werden konnte.

– Fixierung und Eosin Gegenfärbung

Die Farbreaktion wurde durch Inkubation für 3 min in PBS gestoppt. Die Präparate wurden für 6-8 h bei 4 °C nachfixiert, 15 min in PBS gewaschen und anschließend mit Eosin gegengefärbt.

3.1.5 Statistische Methoden

Die Datenaufbereitung erfolgte mit Microsoft Excel 2007. Die statistische Auswertung wurde mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism für Windows (Version 4.02) vorgenommen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardfehler (mean \pm SEM) angegeben. Die Normalverteilung nach Gauss wurde durch den Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Die statistischen Untersuchungen der GM-CSF-Gruppe und der Kontrollgruppe wurden bei Normalverteilung mit einem T-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. In Fällen, in denen keine Normalverteilung vorlag, erfolgte die Analyse mit einem Mann-Whitney-U-Test. Vergleiche zwischen den Gruppen wurden mit ANOVA und nachfolgendem Bonferroni-Holms-Test durchgeführt.

Als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ($p < 0,05$) gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Effizienz des Tiermodells

Bei allen untersuchten Membranen wurde die korrekte Lage der Membranen vor der Entnahme in der Durchleuchtung dokumentiert. Zwei Fremdkörper hatten sich aus dem LV gelöst und waren in die Aorta abgerutscht. Diese dislozierten Fremdkörper wurden verworfen. Ein Tier verstarb im postinterventionellen Verlauf infolge eines Perikarderguss, nachdem der Fremdkörper den Ventrikel perforiert hatte. Bei zehn Tieren ($n = 10$) war die Membran an einer Seite vom Katheter disloziert und hatte Kontakt zum Ventrikel ($n = 3$) oder zur Aorta ($n = 7$). Diese Membranen wurden ebenfalls verworfen. Embolische Komplikationen, insbesondere neurologische Ausfallerscheinungen, konnten nicht beobachtet werden.

Die Scaffolds und Membranen wurden nach der Explantation einer makroskopischen Musterung unterzogen. Jedes Scaffold, dessen Membran in die Studie eingeschlossen wurde, war makroskopisch frei von Gewebebildungen. Dagegen zeigte sich auf den Membranen (besonders in der Sechs-, der Zwölf-Wochen- und der GM-CSF-Gruppe) ein makroskopisch erkennbar dünnes Gewebe. Um diese makroskopischen Beobachtungen weiter zu evaluieren, wurden auch die Scaffolds aufgearbeitet. Abbildung 8 A zeigt einen Scaffold im Querschnitt. Der äußere Rand des Scaffold stellt sich scharf begrenzt und frei von Zellen dar. Das Lumeninnere löste sich während des Schneidens heraus und ist in Abbildung 8 B dargestellt. Dort zeigte sich ein homogenes Material, welches ebenfalls zellfrei war (keine Zellkerne, keine Zellgrenzen erkennbar).

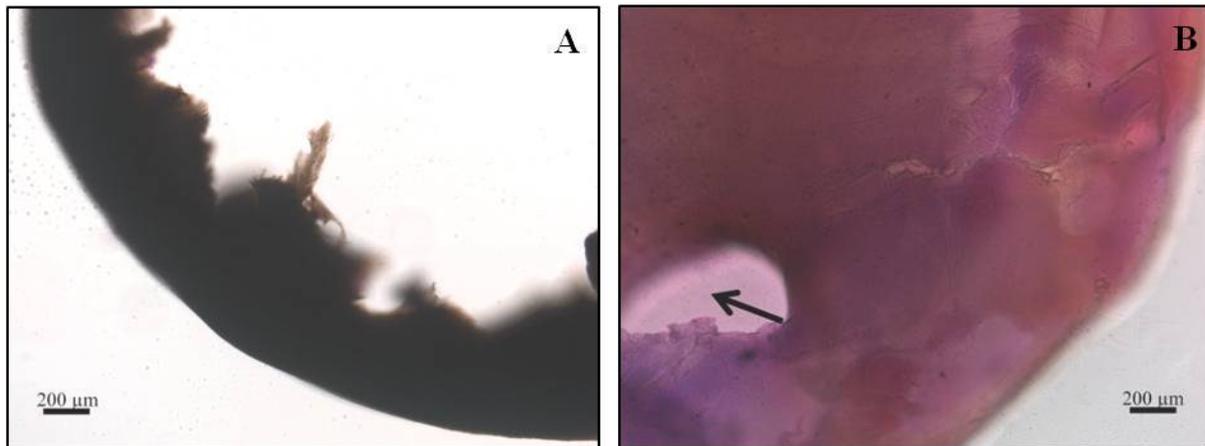


Abbildung 8: histologische Aufarbeitung des Scaffoldsystems

A: HE-gefärbter repräsentativer Querschnitt eines in Methacrylat eingebetteten Scaffolds der Sechs-Wochen-Gruppe. Das Scaffoldäußere zeigte sich dabei vollständig zellfrei. **B:** HE-Färbung des aus dem Scaffoldlumen (A) herausgelösten Materials. Dabei zeigt sich in der HE-Färbung die Darstellung einer zellfreien Substanz. Das freie Lumen (Pfeil) beinhaltet *in vivo* den Edelstahlraht, auf dem das Scaffold aufgespannt war. Dieser wurde jedoch in der hier dargestellten Präparation herausgelöst.

4.2 Entzündungsprozesse

Die Aktivierung von Entzündungsprozessen ist eine physiologische Reaktion auf den Kontakt mit Fremdmaterial. Die Entzündungsaktivität, gemessen an der Relation von $CD45^{\text{positiv}}$ und $CD45^{\text{negativ}}$ Zellen, war in den ersten Tagen (Abb. 9 A) am stärksten ausgeprägt, trat aber mit der Zeit (Abb. 9 B) in den Hintergrund.

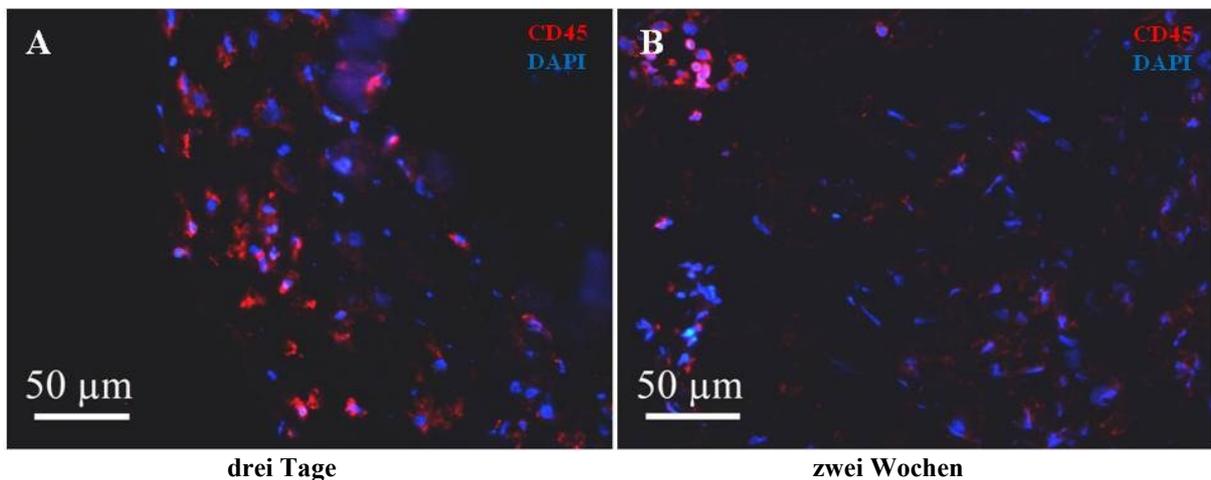


Abbildung 9: Immunfärbung von CD45

Immunfärbung des Panleukozytenmarkers CD45 (rot). Nach drei Tagen (**A**) zeigten sich viele Zellen $CD45^{\text{positiv}}$, während nach zwei Wochen (**B**) nur noch wenige Zellen CD45 exprimierten. Kernfärbung mit DAPI (blau)

4.3 Gewebepbildungsprozesse

Mit Zunahme der Implantationsdauer zeigte sich eine Zunahme des entstehenden Gewebedurchmessers. Nach drei Tagen umgaben nur wenige Zellen die Membranen, nach zwei Wochen wuchs dieses Gewebe auf $0,43 \pm 0,06$ mm an, während nach sechs Wochen ein Gewebedurchmesser von $1,32 \pm 0,18$ mm erreicht wurde. Dieser steigerte sich bis zur zwölften Woche auf $1,88 \pm 0,22$ mm. Zwischen Ao-M und LV-M zeigten sich keine Unterschiede im Gewebedurchmesser. Abbildung 10 zeigt typische HE-Schnitte explantierter Membranen.

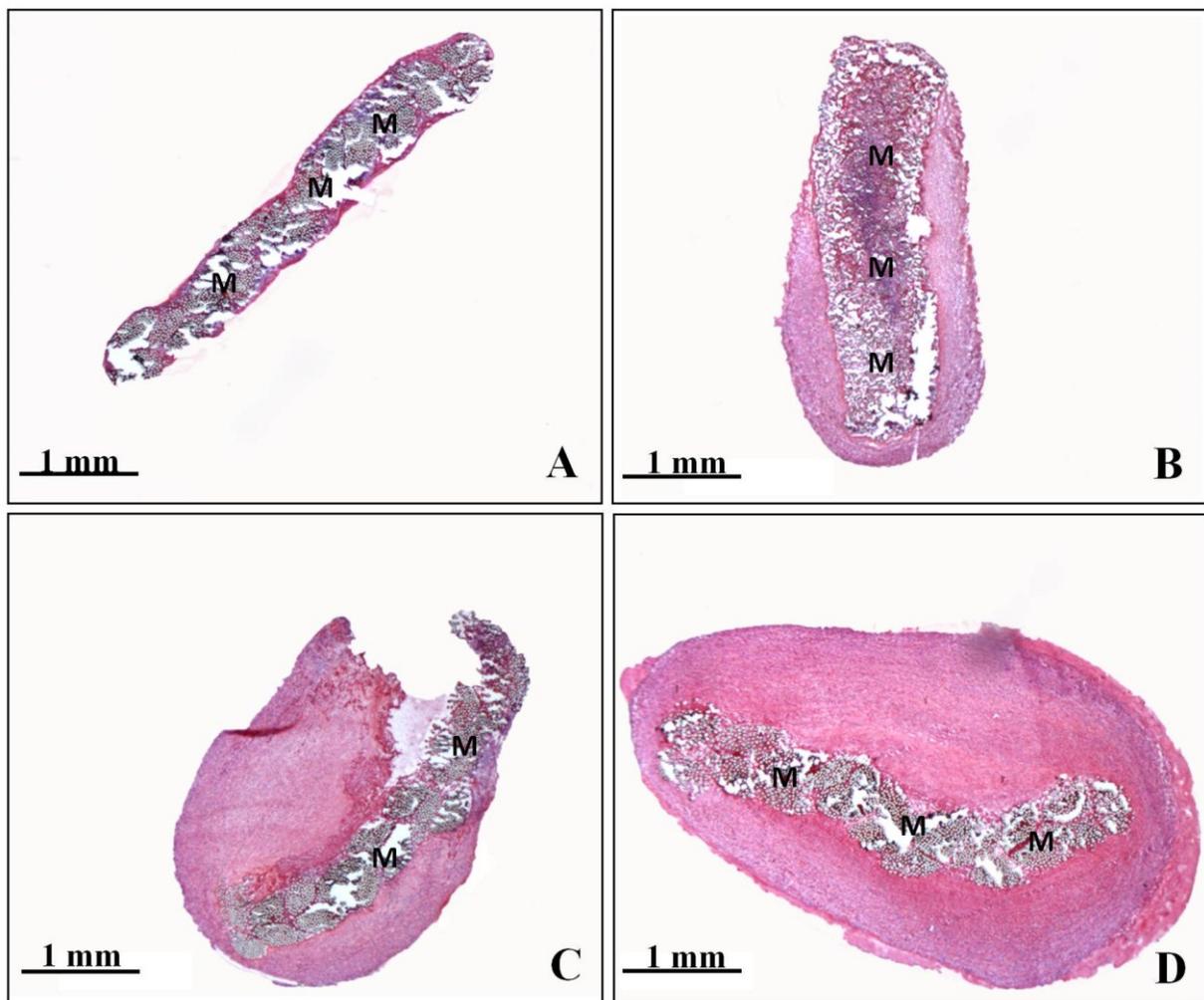


Abbildung 10: HE-Färbungen

Dargestellt sind HE-Färbungen von explantierten Membranen. Membran nach drei Tagen (A), nach zwei Wochen (B), nach sechs Wochen (C) und nach zwölf Wochen (D). M = angeschnittene Membran

4.3.1 Nachweis von Endothelzellen und Kapillaren

Der Nachweis von Endothelzellen wurde immunhistologisch durch BS1 und von Willebrand Faktor (vWF) sowie durch elektronenmikroskopische Untersuchungen erbracht. Auf den Membranen, die nach sechs bzw. zwölf Wochen entnommen worden waren, zeigten sich im Inneren zahlreich BS1^{positive} Zellen (Abb. 11 A). Die den jeweiligen Lumina (von Aorta bzw. LV) zugewandte äußere Membranseite zeigte einen durchgehend vWF^{positiven} Endothelzellsaum (Abb. 11 B).

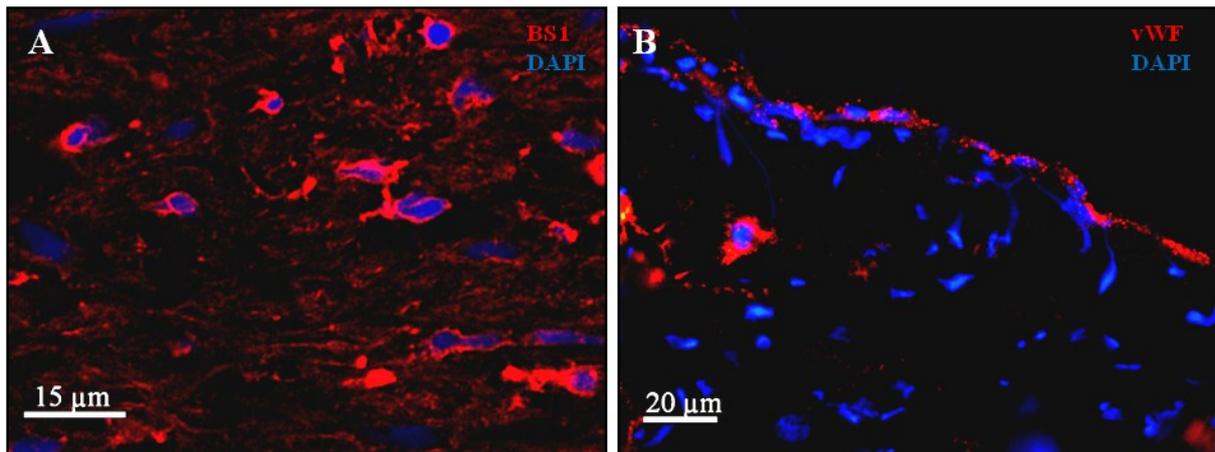


Abbildung 11: Immunhistologische Lokalisation von BS1 und vWF

A: Die Lokalisation von BS1 (rot) in den inneren Schichten einer Sechswochen-Membran als Hinweis auf die stattfindende Kapillarbildung; **B:** Die Immunfärbung des vWF (rot) an der Außenseite einer Membran zeigt eine vollständige Umhüllung der Membran mit vWF^{positiven} Endothelzellen. Kernfärbung mit DAPI (blau)

Darüber hinaus zeigten sich ein CD146^{positives} Kapillarnetz sowie ein geschlossener CD146^{positiver} Endothelzellsaum (Abb. 12).

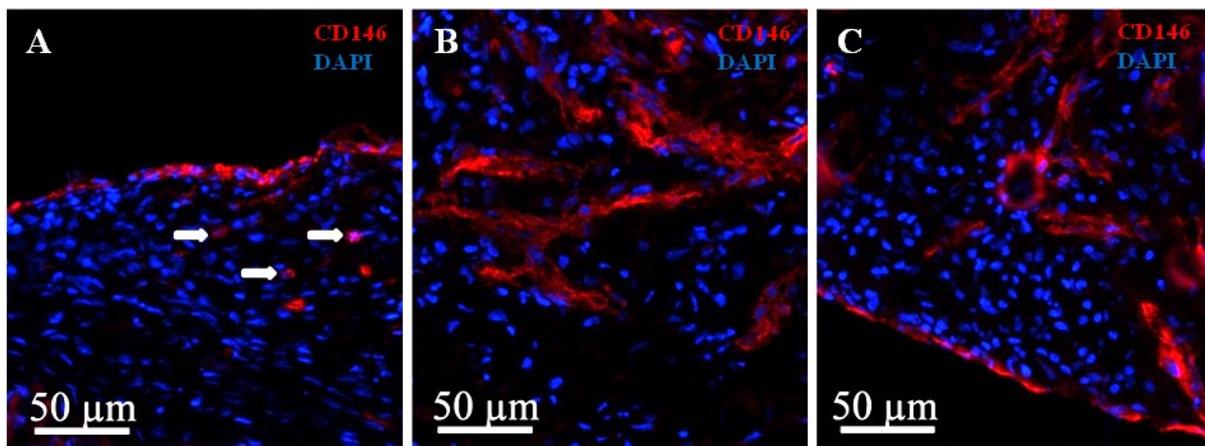


Abbildung 12: Immunhistologische Lokalisation von CD146

A: Quer angeschnittene Kapillaren (CD146, rot) (Pfeile); **B/C:** Längs angeschnittene Kapillaren (CD146, rot) Kernfärbung mit DAPI (blau)

Elektronenmikroskopisch konnten diese Kapillaren ebenfalls detektiert werden (Abb. 13). Die Kapillaren zeigten sich bereits auf Membranen, die nach sechs Wochen entnommen worden waren. Das Endothel der Kapillaren zeigte Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten (Abb. 14).

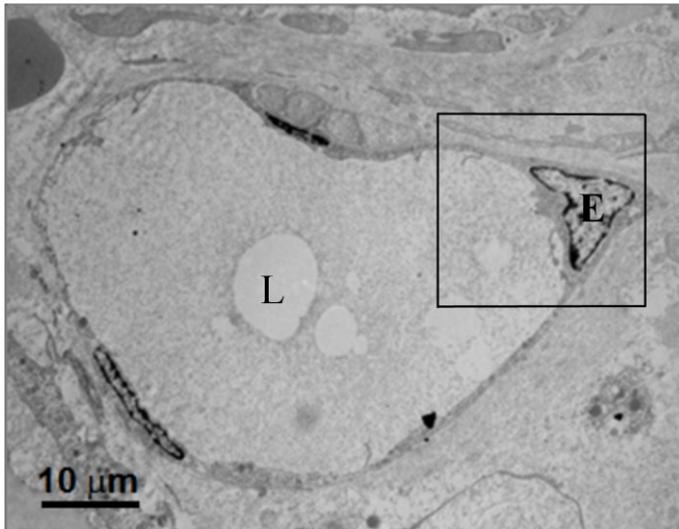


Abbildung 13: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Kapillare

EM-Aufnahme einer vollständig ausgebildeten Kapillare in der Innenschicht einer entnommenen Membran (L: Lumen; E: Zellkern einer Endothelzelle; Rahmen: Ausschnitt der in Abb. 14 dargestellten Vergrößerung)

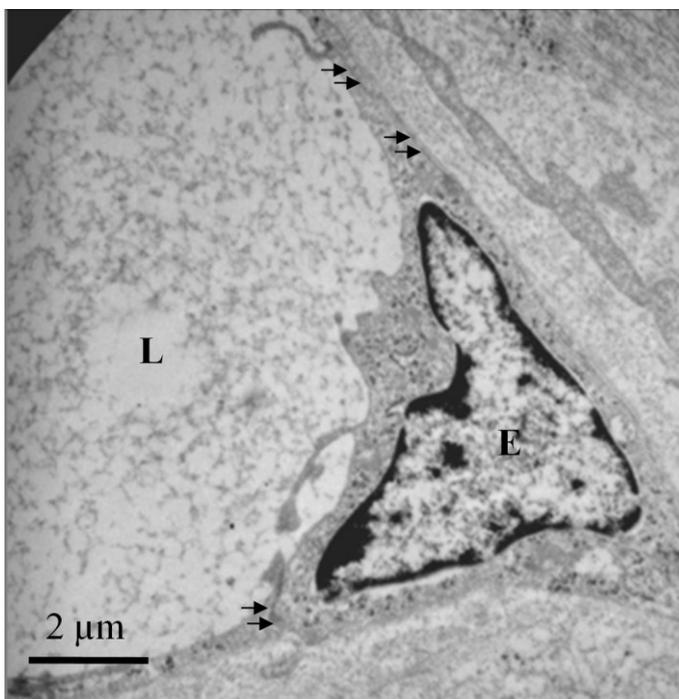


Abbildung 14: EM-Vergrößerung einer Kapillarendothelzelle

Vergrößerung des Rahmens in Abb. 13. Deutlich werden die ausgebildeten Zell-Zell-Kontakte (kleine Pfeile). L: Lumen, E: Zellkern der Endothelzelle

4.3.2 Nachweis von glatten Muskelzellen

Der Nachweis von glatten Muskelzellen und Myofibroblasten wurde anhand der Marker alpha Smooth Muscle Actin (α SMA) und Vimentin erbracht (Abb. 15 A/B). Beobachtet wurde, dass die zur Membran hin inneren Zellschichten hauptsächlich aus α SMA^{positiven} glatten Muskelzellen bestanden, wohingegen die äußeren Schichten nur für Vimentin positiv waren (Fibroblasten, mesenchymale [Stamm-]Zellen) und sich so deutlich von der inneren Zellschicht abhoben. Myofibroblasten waren Vimentin^{positiv} und α SMA^{positiv} (orange).

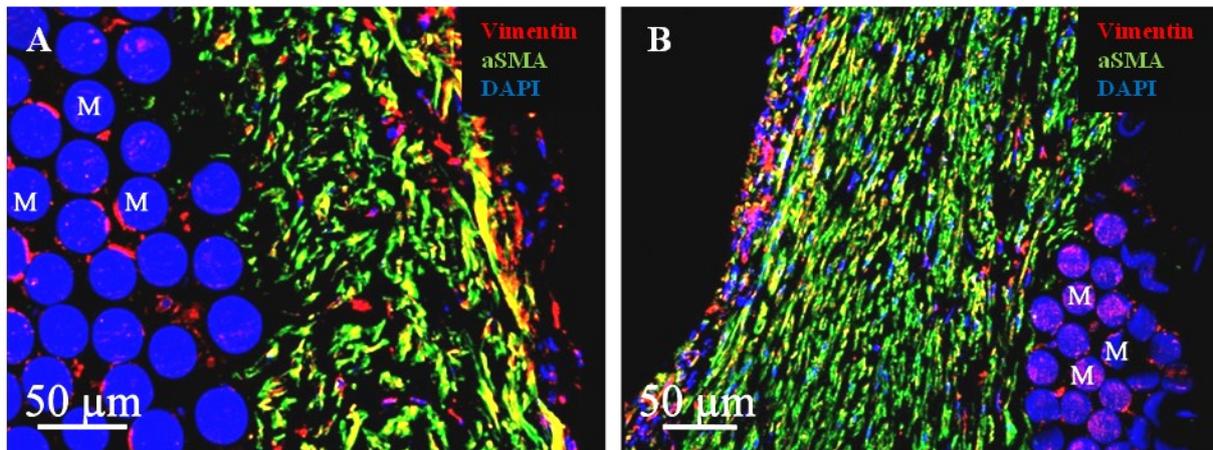


Abbildung 15: Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin und α SMA

A/B: Immunhistochemisch zeigt sich eine deutliche Gliederung des neu entstandenen Gewebes in einen α SMA^{positiven} inneren Bereich (grün), während der äußere Randbereich nur Vimentin^{positiv} (rot) ist. Vereinzelter Nachweis von Vimentin und α SMA^{positiven} Zellen (orange). M: angeschnittene Membran; Kernfärbung mit DAPI (blau)

Auch durch EM zeigten sich glatte Muskelzellen und Fibroblasten sowie organisierte Kollagenbündel (Abb. 16 A/B). Ebenfalls bestätigte sich, dass das neu gebildete Gewebe eine deutliche Orientierung aufwies (Abb. 16 C).

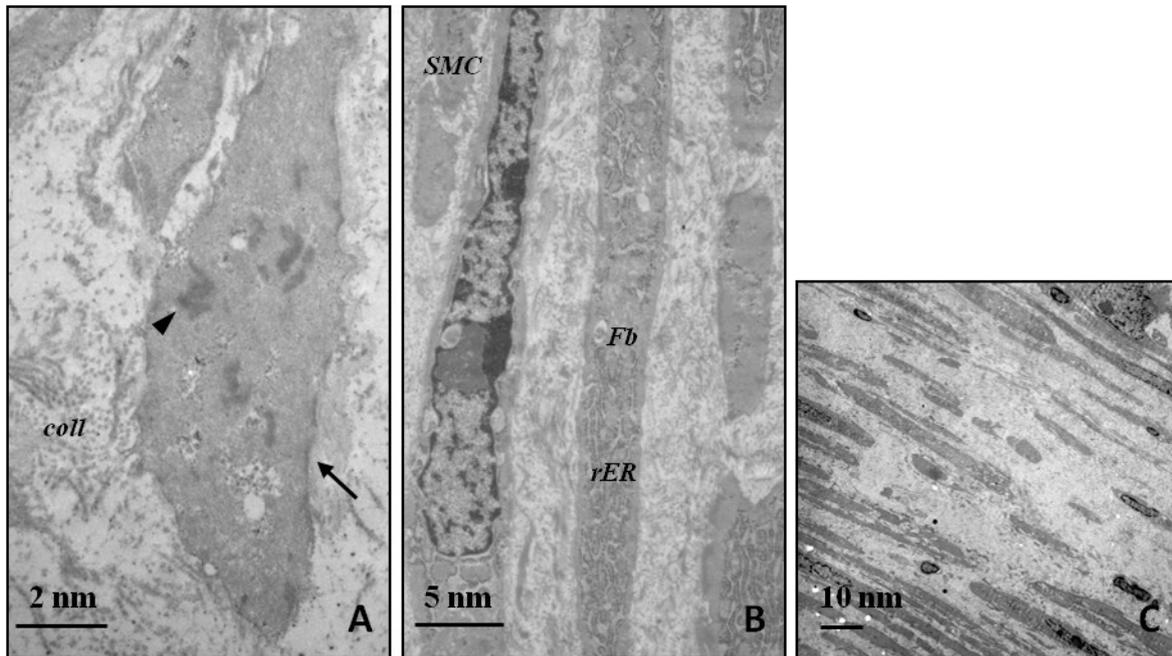


Abbildung 16: Elektronenmikroskopischer Nachweis von glatten Muskelzellen

A: Glatte Muskelzelle mit typischen zytoplasmatischen „Corpuscula densa“ (Pfeilspitze) und membranständigen „Area densa“ (kompletter Pfeil) sowie extrazelluläre Kollagenfasern (coll) **B:** Fibroblasten (Fb) zeigten ein ausgeprägtes raues Endoplasmatisches Retikulum (rER) **C:** Deutliche Ausrichtung und Organisation der gebildeten Zellschichten

4.4 Stammzell-Nachweis

4.4.1 Chemotaxine

Als möglicherweise auf Stammzellen chemotaktisch wirkende Substanzen wurden das High Mobility Group Protein B1 (HMGB1, Abb 17) und SCF untersucht.

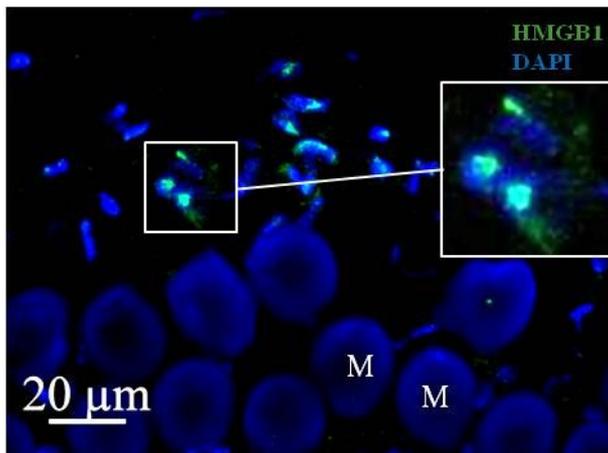


Abbildung 17: Nachweis von HMGB1 mittels Immunhistologie

Immunhistochemisch zeigt sich eine deutliche Färbung von HMGB1 (grün). Kernfärbung mit DAPI (blau), M = Membran

SCF, dessen chemotaktische Wirkung auf Stammzellen nachgewiesen ist, wurde anhand einer qRT-PCR untersucht (siehe Abb. 27). Dabei zeigte sich, dass auf den untersuchten Membranen das SCF-Transkript vorlag.

4.4.2 Nachweis von HSC-typischen Markern

Die für HSC typischen Marker CD34 und c-kit wurden durch eine qRT-PCR im zeitlichen Verlauf quantifiziert. Die mRNA von CD34 konnte sowohl auf den Ao-M wie auch auf den LV-M ohne signifikanten Unterschied nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein zeitlicher signifikanter Anstieg der Expressionsrate bis zur zwölften Woche (Abb. 18).

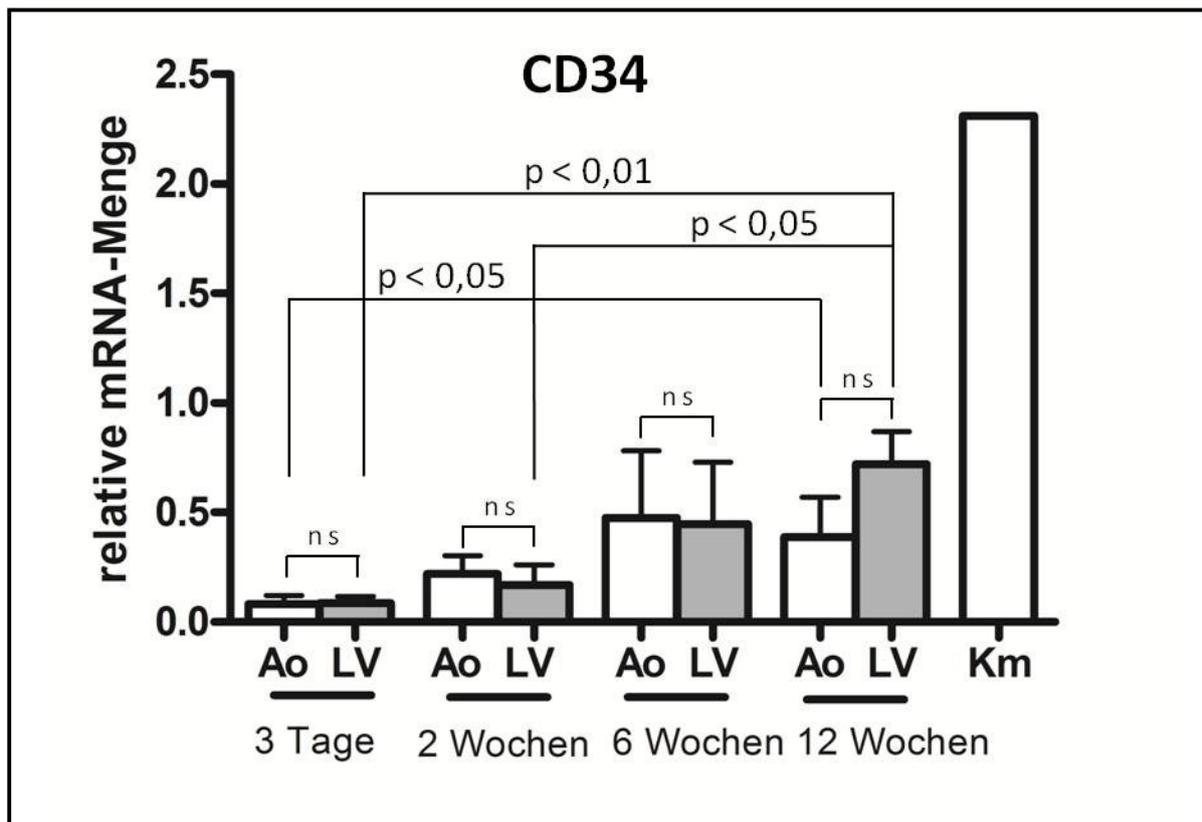


Abbildung 18: qRT-PCR von CD34

Zeitverlauf der mRNA-Expression des HSC-Markers CD34 auf den Ao-M (Ao) und auf den LV-M (LV) im Vergleich zur CD34-Expression im Knochenmark (Km). Die Menge der mRNA-Transkripte wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM, ns = nicht signifikant.

Ebenso wie CD34 wurde das Transkript von c-kit auf den Ao-M wie auch auf den LV-M gefunden (Abb. 19).

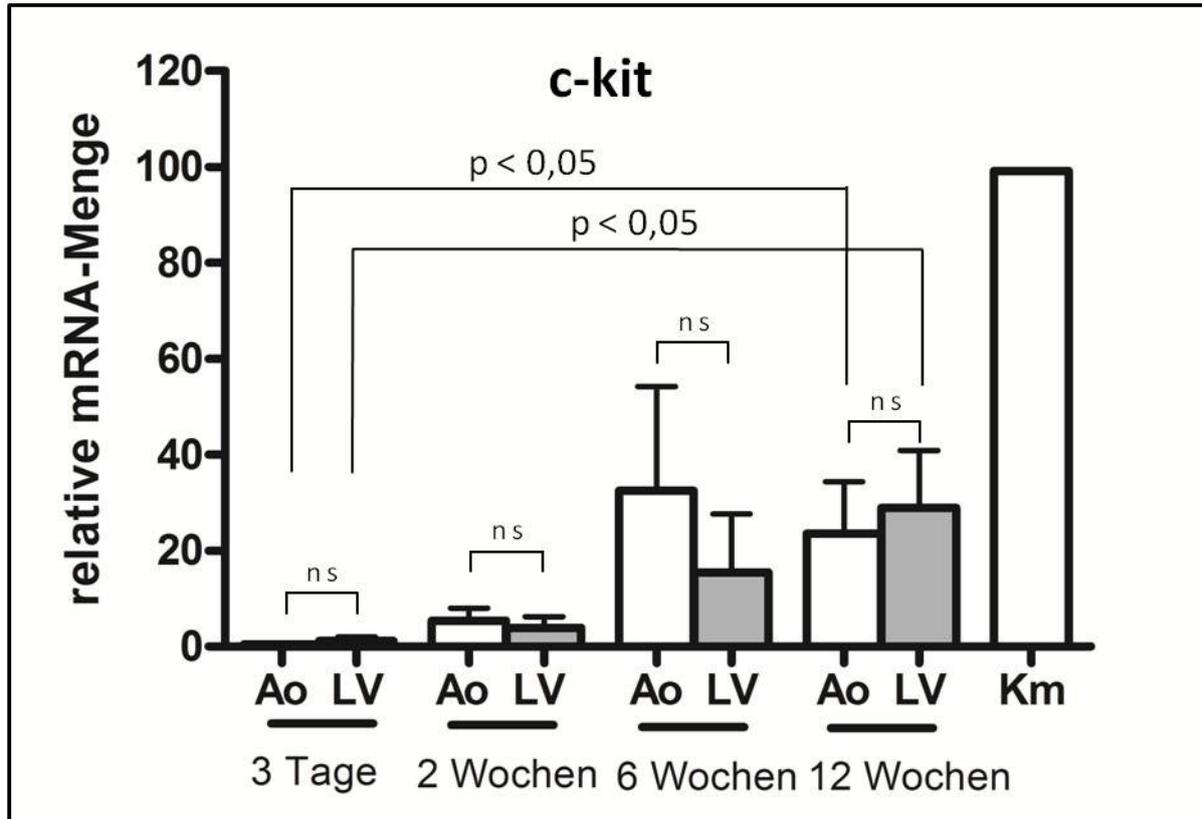


Abbildung 19: qRT-PCR von c-kit

Zeitverlauf der mRNA-Expression des HSC-Markers c-kit auf den Ao-M (Ao) und auf den LV-M (LV) im Vergleich zur c-kit Expression im Knochenmark (Km). Die Menge der mRNA-Transkripte wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM.

Die zelluläre Lokalisation der Expression von c-kit erfolgte mittels ISH. Die Färbungen zeigen (Abb. 20), dass c-kit primär in den äußeren Zellschichten exprimiert wurde, während die innen liegenden Zellen c-kit^{negativ} waren.

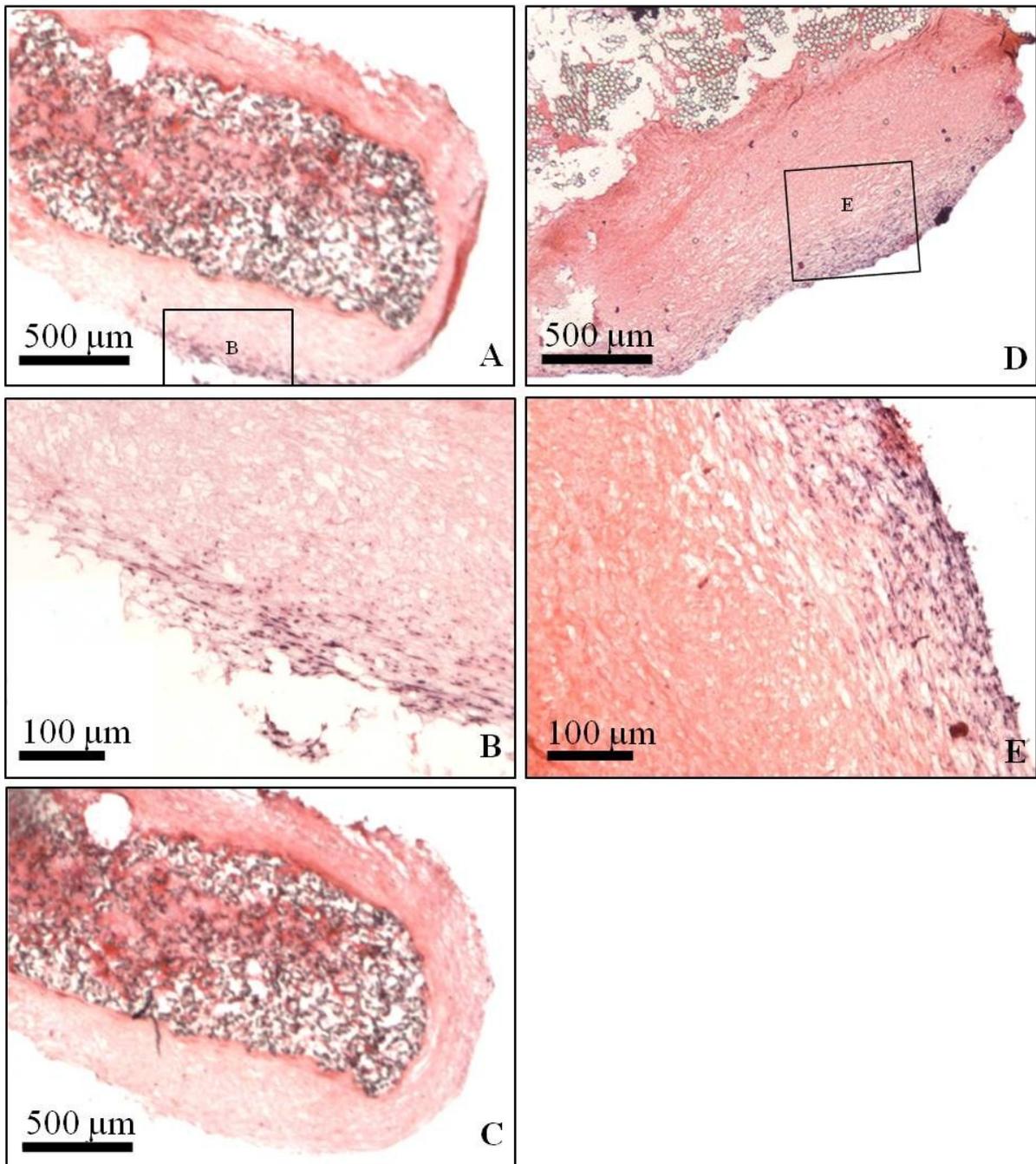


Abbildung 20: In-situ-Hybridisierung mit c-kit spezifischer Sonde

A/D: Die Hybridisierung mit einer für c-kit spezifischen Anti-Sense-Sonde zeigt eine deutliche Färbung der äußeren Zellschichten. B/E: Vergrößerung von A/D. C: Typische Negativkontrolle (hier von A), hybridisiert mit der Sense-Sonde. SONDENSIGNAL: blau (NBT/BCIP), Eosin Gegenfärbung

4.4.3 Nachweis von MSC-typischen Markern

Wir konnten MSC anhand eines typischen Oberflächenmarkerprofils auf den Membranen nachweisen. Abbildung 21 zeigt eine Kofärbung von CD44 mit Vimentin. MSC exprimieren beide Marker. MSC-typische Kofärbungen ließen sich sowohl auf den Ao-M wie auch auf den LV-M der Gruppen zwei bis zwölf Wochen nachweisen. Insbesondere lumennahe Zellen waren als MSC identifizierbar.

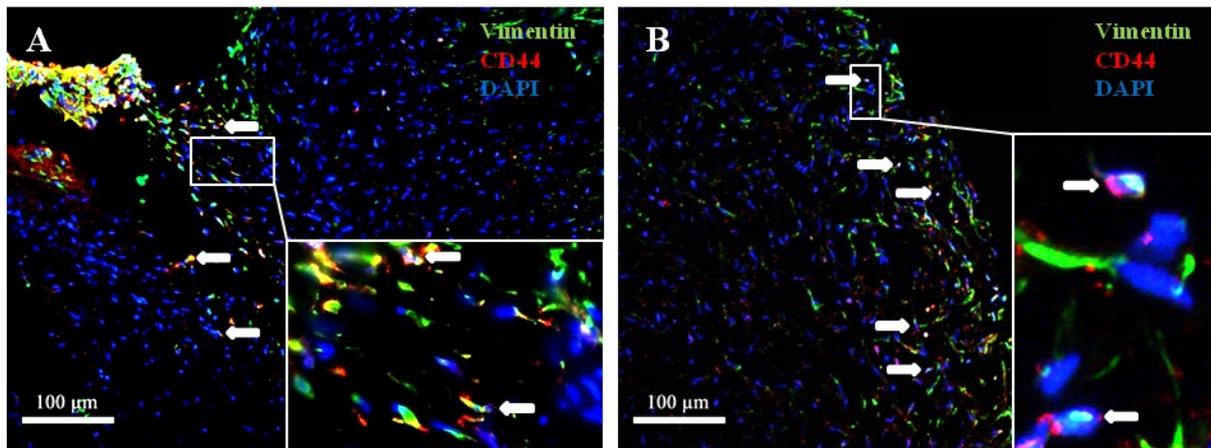


Abbildung 21: Immunhistochemischer Nachweis von CD44 und Vimentin

A/B: Kofärbungen von Vimentin (grün) und CD44 (rot) deuten auf MSC hin (Pfeile), während $CD44^{\text{positive}}$, $Vimentin^{\text{negative}}$ Zellen eher für Entzündungszellen sprechen. Kernfärbung mit DAPI (blau)

Zur weiteren Identifizierung von MSC, insbesondere in den frühen Gruppen (drei Tage und zwei Wochen), wurde eine Kofärbung von CD45 und CD44 durchgeführt (Abb. 22). Koexpression dieser beiden Moleküle weisen hämatopoetische Entzündungszellen nach (Makrophagen und Lymphozyten), während MSC nur CD44 exprimieren. Nach drei Tagen (Abb. 22 A) überwogen $CD45^{\text{positive}}$, $CD44^{\text{positive}}$ inflammatorische Zellen. Vereinzelt ließen sich jedoch auch MSC nachweisen. In der zwei Wochen Gruppe (Abb. 22 B) zeigten sich deutlich weniger $CD45^{\text{positive}}$ Entzündungszellen, bei weiter nachweisbaren MSC.

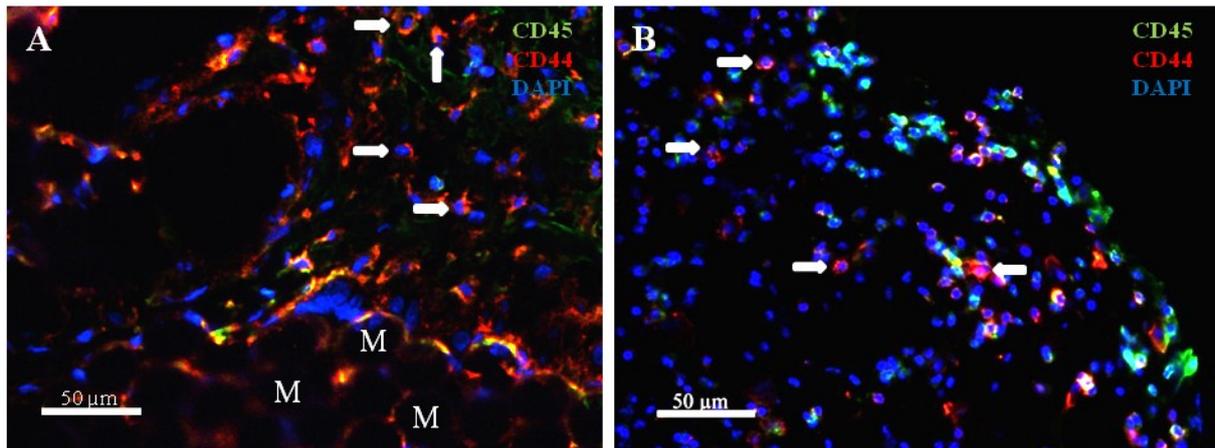


Abbildung 22: Immunhistochemischer Nachweis von CD44 und CD45

Nach drei Tagen (A) überwiegen $CD45^{\text{positive}}$, $CD44^{\text{positive}}$ Entzündungszellen, während nach zwei Wochen (B) nur vereinzelte inflammatorische Zellen nachweisbar waren. Vermehrt zeigten sich hier $CD45^{\text{negative}}$, $CD44^{\text{positive}}$ MSC (Pfeile). CD44 (rot), CD45 (grün), Kernfärbung mit DAPI (blau)

Darüber hinaus wurde untersucht, ob die nachgewiesenen MSC auch entlang einer endothelialen bzw. myozytären Zelllinie differenzieren. Dafür wurde CD44 mit CD31 (Abb. 23) sowie CD44 mit α SMA (Abb. 24) kofärbt.

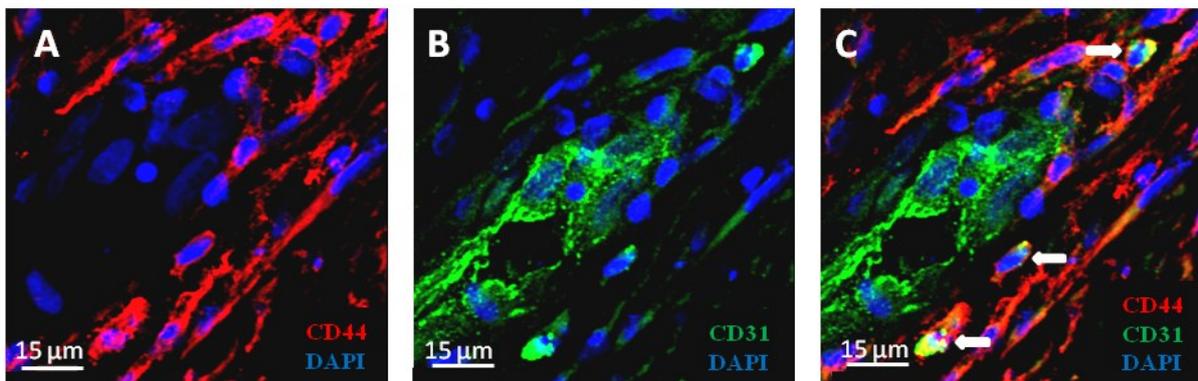


Abbildung 23: Immunhistochemische Kofärbung von CD44 und CD31

A: Färbung von CD44 (rot). B: Färbung von CD31 (grün). C: Überlagerung von A und B. Kofärbungen sind mit Pfeilen markiert. Kernfärbung mit DAPI (blau)

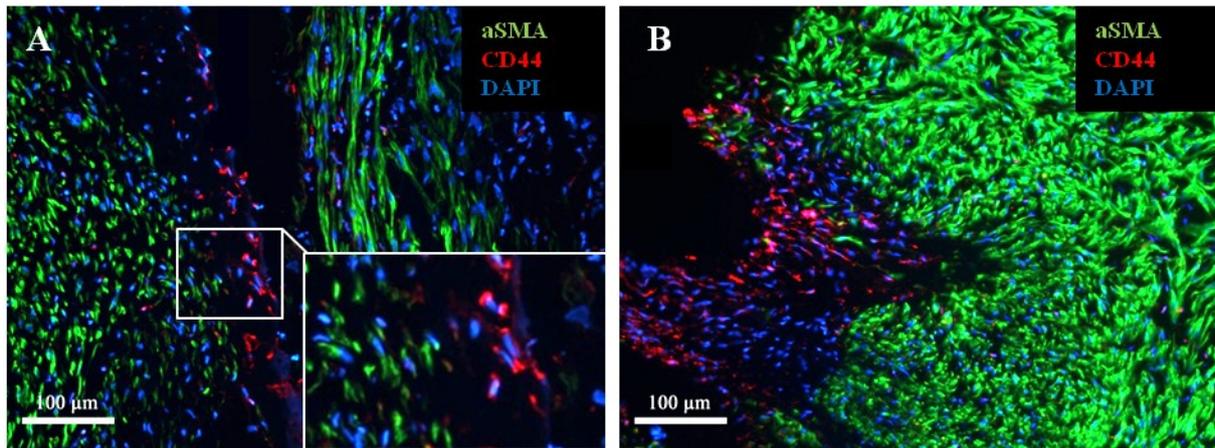


Abbildung 24: Immunhistochemische Kofärbung von α SMA und CD44

A/B: In keinem der untersuchten Schnitte zeigte sich eine Kofärbung von CD44 (rot) mit α SMA (grün). Vielmehr waren deutliche Grenzen von CD44^{positiven} und α SMA^{positiven} Zellen sichtbar. Kernfärbungen mit DAPI (blau)

4.4.4 Nachweis von EPC / CEC-typischen Markern

EPC wurden immunhistologisch anhand von CD133 detektiert. Dabei ließen sich auf den Membranen nur wenige CD133^{positive} Zellen detektieren. Darüber hinaus wurden die Membranen auf CD146^{positive} Zellen untersucht (siehe auch Abschnitt 4.3.1). Dieser Marker wird u.a. von zirkulierenden Endothelzellen (CEC) exprimiert. Abbildung 25 zeigt repräsentative Schnitte der immunhistologischen Färbung von CD133 sowie von CD146. CD133^{positive} EPC wurden nur vereinzelt nachgewiesen (Abb. 25 A). Dagegen zeigten CD146^{positive} Endothelzellen eine komplexere Orientierung, die kapillären Strukturen ähnelt (Abb. 25 B). Zwischen Ao-M und LV-M bestanden keine Unterschiede.

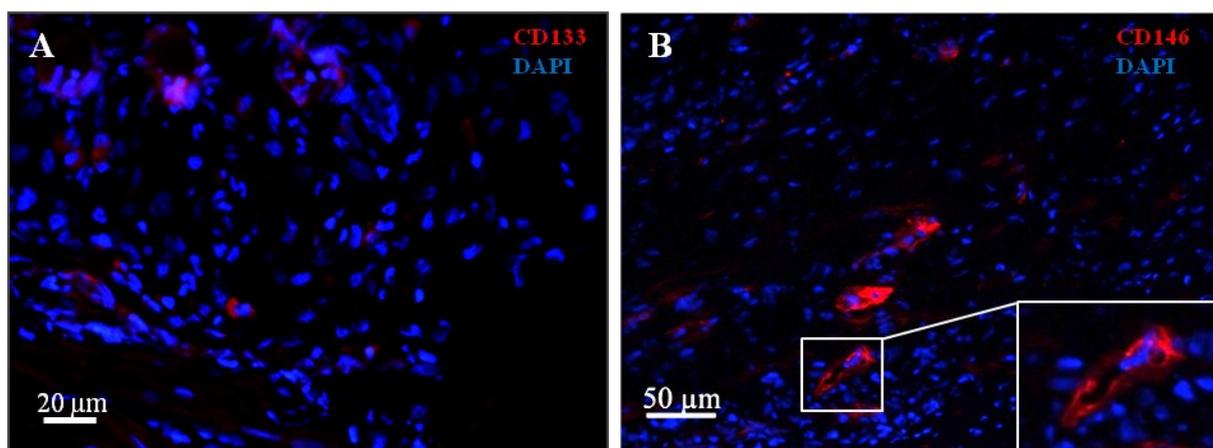


Abbildung 25: Immunfärbung von CD133 und von CD146

A: Die Abb. zeigt wenige CD133^{positive} Zellen (rot), während die Mehrzahl CD133^{negativ} ist. B: Die immunhistochemische Färbung von CD146 (rot) zeigt einige positive Zellen, die sich scheinbar zu komplexeren Strukturen formieren (siehe auch Abb. 12). Kernfärbung mit DAPI (blau)

4.5 GM-CSF Stimulation

Zur Mobilisation knochenmarkständiger Stammzellen wurde einer Sechs-Wochen-Gruppe GM-CSF über einen Zeitraum von sieben Tagen appliziert. Alle nachfolgend gezeigten Ergebnisse sind Vergleichswerte der mit GM-CSF behandelten Gruppe (sechs Wochen) mit der nicht behandelten Gruppe (sechs Wochen).

4.5.1 Nachweis der GM-CSF-Wirksamkeit

Die gemessenen Blutwerte zeigten einem signifikanten Anstieg der Leukozyten nach Gabe von GM-CSF (Abb. 26, $p < 0,05$). Dabei wurde das Blut vor der Stimulation mit dem Blut einen Tag nach Stimulationsende verglichen.

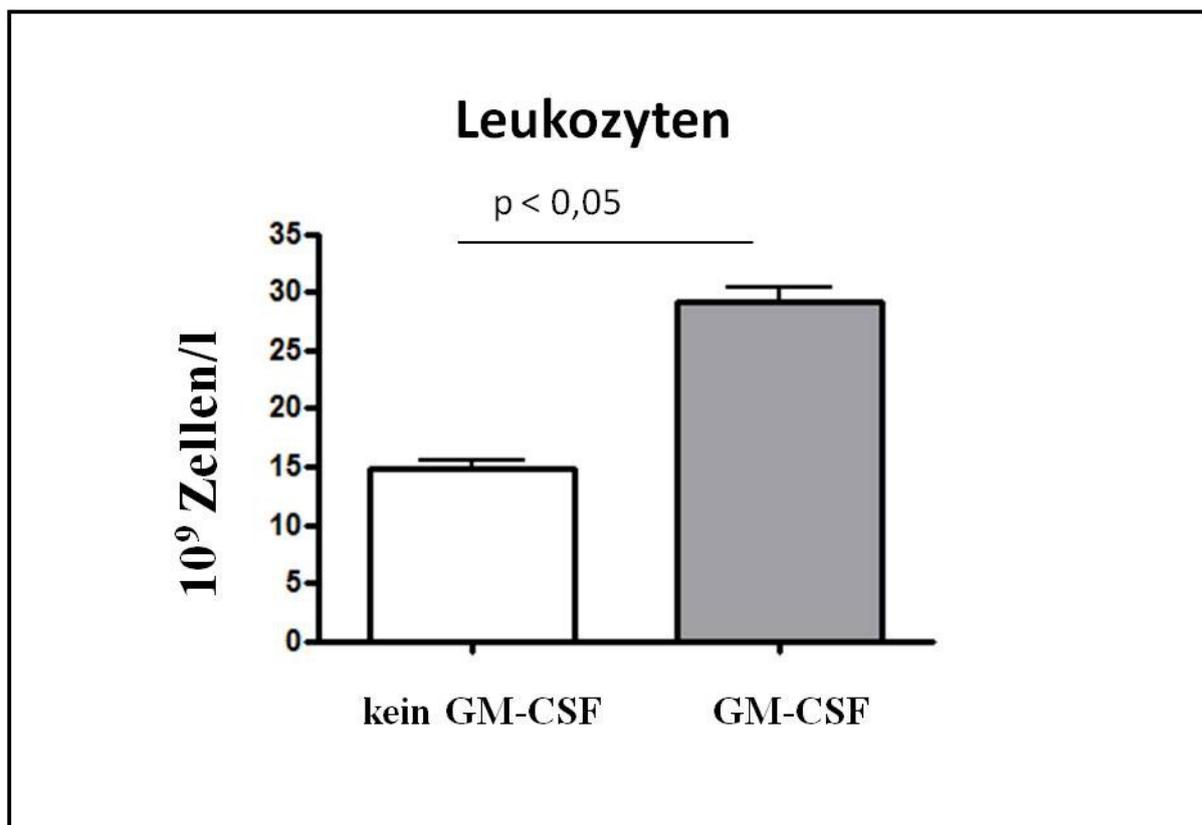


Abbildung 26: Leukozytenwerte vor und nach Stimulation mit GM-CSF

Die Leukozytenwerte nach Stimulation mit GM-CSF zeigten höhere Blutwerte als vor Applikationsbeginn. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

4.5.2 Nachweis der vermehrten Bildung von chemotaktischen Mediatoren

Der auf Stammzellen chemotaktisch wirkende SCF wurde anhand einer qRT-PCR untersucht. Dabei zeigte sich in der GM-CSF behandelten Gruppe eine gesteigerte Expression von SCF im Vergleich zur Kontrollgruppe, die jedoch nicht signifikant (Abb. 27, $p > 0,05$) war.

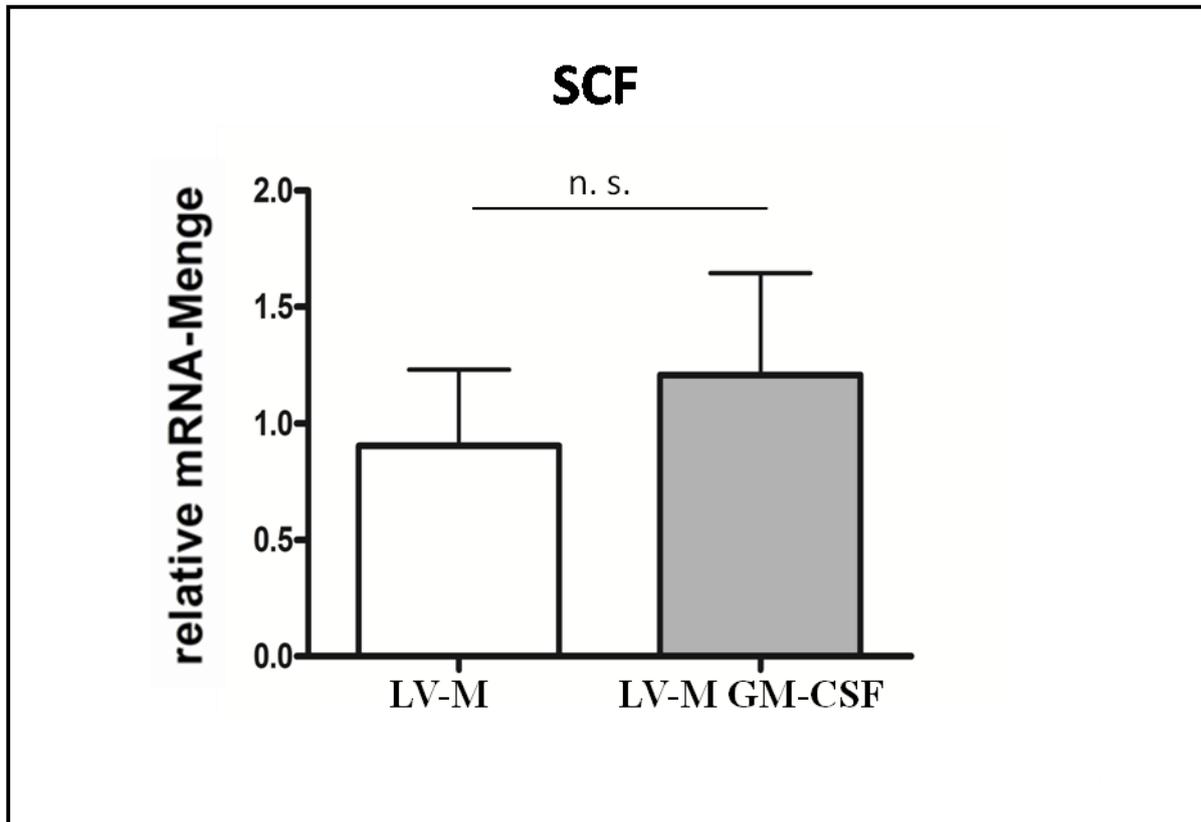


Abbildung 27: qRT-PCR von SCF sechs Wochen GM-CSF und Kontrollgruppe

mRNA-Expression des chemotaktischen SCF auf den LV-M sechs Wochen ohne GM-CSF (LV-M) und auf den LV-M sechs Wochen mit GM-CSF (LV-M GM-CSF). Die Menge der mRNA-Transkripte wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

4.5.3 Nachweis der vermehrten Stammzellbesiedelung

Der HSC-Marker c-kit zeigte in quantitativen mRNA-Expressionsuntersuchungen einen signifikanten Anstieg ($p < 0,05$) in der GM-CSF-Gruppe im Vergleich zu der nicht stimulierten Kontrollgruppe (Abb. 28).

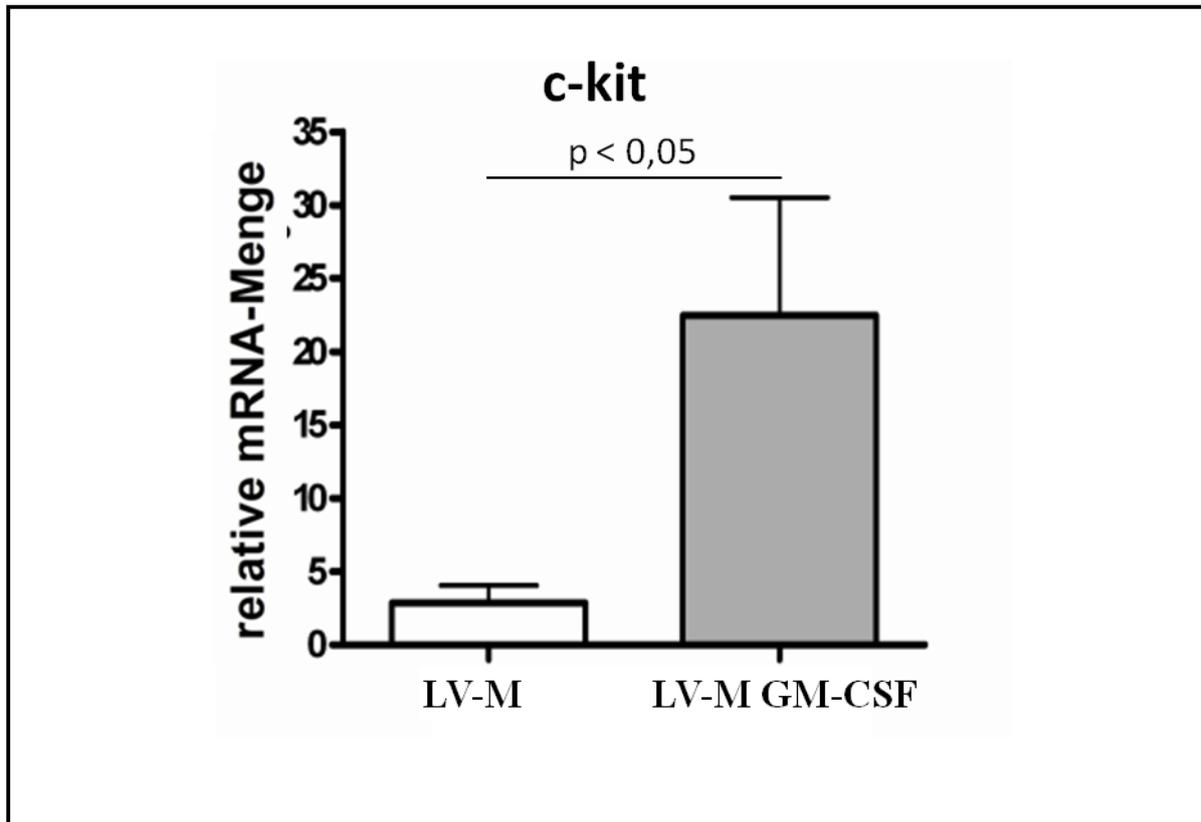


Abbildung 28: qRT-PCR von c-kit sechs Wochen mit GM-CSF und Kontrollgruppe

mRNA-Expression des HSC-Markers c-kit auf den LV-M sechs Wochen ohne GM-CSF (LV-M) und auf den LV-M sechs Wochen mit GM-CSF (LV-M GM-CSF). Die Menge der mRNA-Transkripte wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

Ebenso wie der Stammzellmarker c-kit zeigte auch der Proliferationsmarker ki67 einen signifikanten Anstieg ($p < 0,05$) nach GM-CSF-Stimulation. Abbildung 29 zeigt exemplarische Immunfärbung des Proliferationsfaktors ki67 aus der Kontrollgruppe (A) und der GM-CSF Gruppe (B).

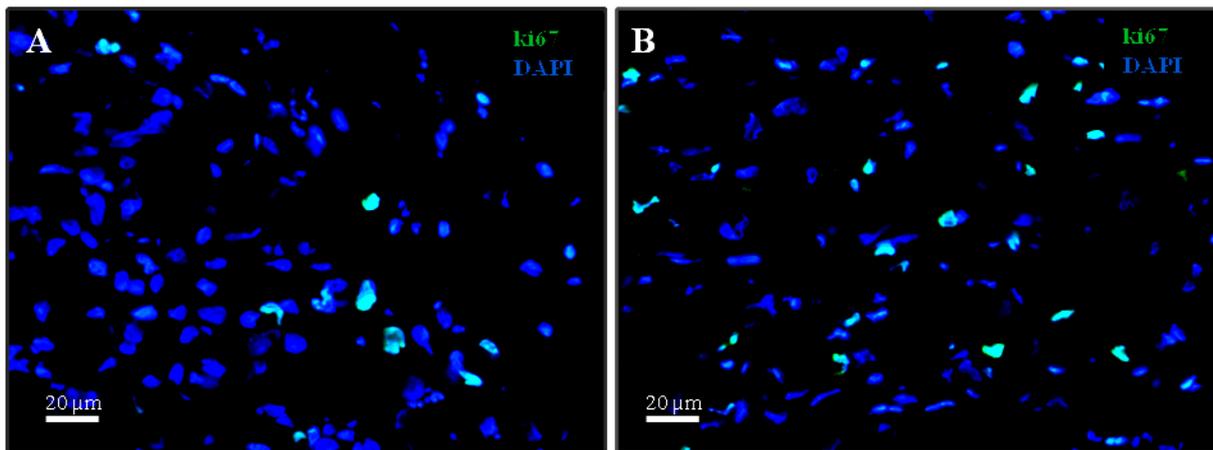


Abbildung 29: Immunhistochemische Färbung von ki67

A: Repräsentative ki67-Immunfärbung (grün) der Kontrollgruppe. Es zeigten sich nur vereinzelt proliferationsaktive ki67^{positive} Zellen. **B:** Dagegen ist in der GM-CSF-Gruppe ist eine größere Zahl ki67^{positiver} Zellen zu erkennen. Kernfärbung mit DAPI (blau)

Durch Auszählung der Schnitte zeigte sich eine die Verdopplung der ki67^{positiven} Zellen ($p < 0,05$) in der GM-CSF-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 30).

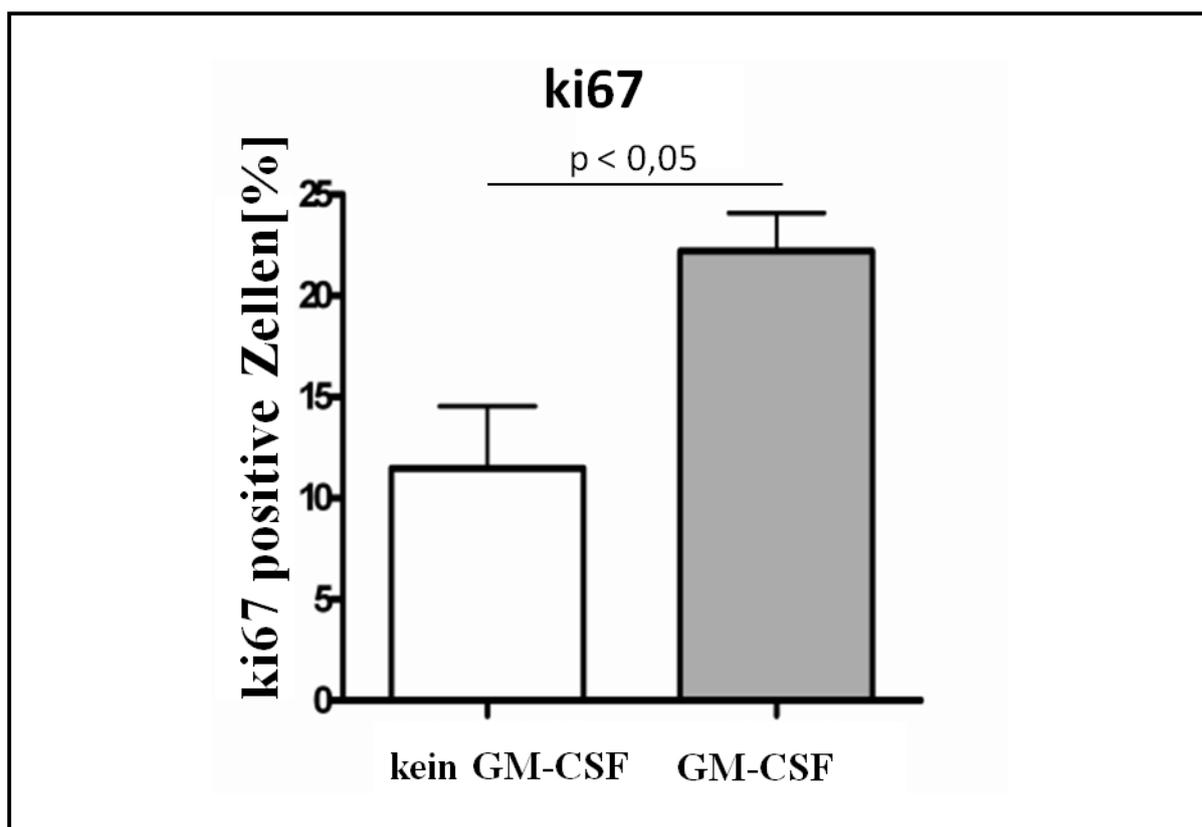


Abbildung 30: Anzahl der ki67-positiven Zellen (in Prozent)

Auswertungen von ki67 gefärbten Schnitten ergaben signifikant mehr ki67^{positive} Zellen in der mit GM-CSF behandelten Gruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM.

4.5.4 Nachweis der vermehrten Stammzellendifferenzierung

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass es (isoliert) auf den LV-M zur Bildung von typischen früh-kardiomyozytären Markern (BNP, GATA4, Nkx2.5) kam (siehe dazu [160]). Der Vergleich zwischen der GM-CSF Gruppe und der Kontrollgruppe zeigt eine signifikante Expressionssteigerung ($p < 0,05$) des myokardialen Markers GATA4 auf den LV-M (Abb. 31).

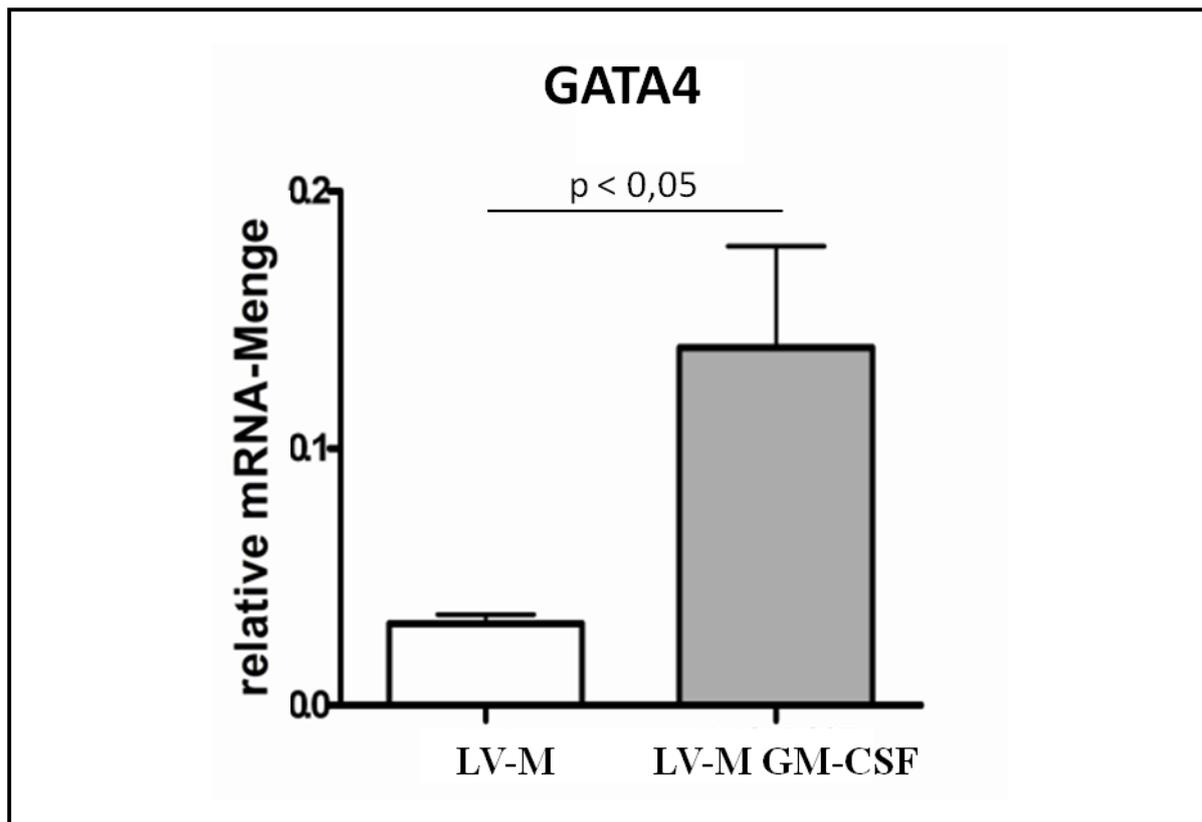


Abbildung 31: qRT-PCR von GATA4 mit und ohne GM-CSF

mRNA-Expression von GATA4, einem Marker der frühen Kardiogenese, auf den LV-M sechs Wochen ohne GM-CSF (LV-M) und auf den LV-M sechs Wochen mit GM-CSF (LV-M GM-CSF). Die Menge der mRNA-Transkripte wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

4.5.5 Nachweis der gesteigerten Gewebebildung

Der Gewebedurchmesser zeigte sich in der GM-CSF-Gruppe signifikant erhöht ($p < 0,05$).

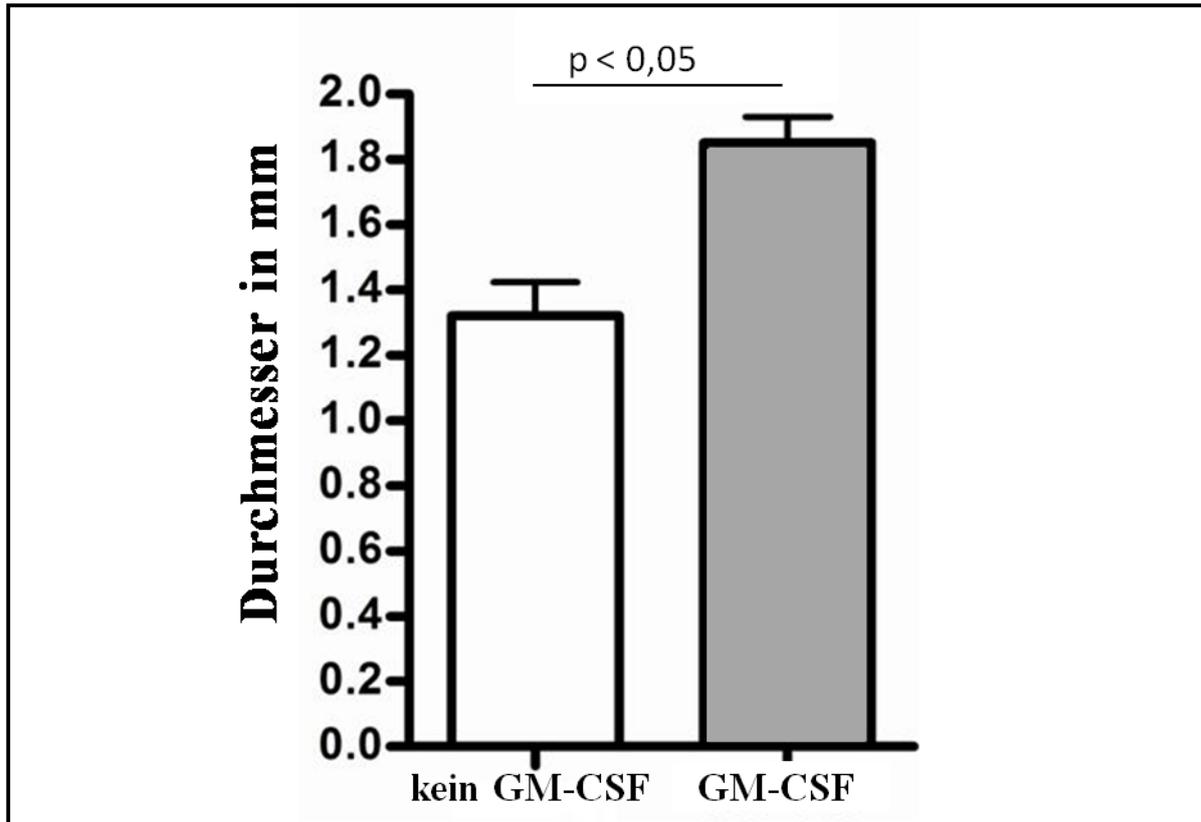


Abbildung 32: Durchmesser des Gewebes der GM-CSF Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe

Die erreichten Gewebedurchmesser unter GM-CSF-Stimulation zeigten eine signifikante Zunahme im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM.

Zellart	Untersuchte Marker	Methode	Nachgewiesen?
Leukozyten	CD45	IHC	JA
Kapillarentstehung	BS1	IHC	JA
Endothelzellen	vWF, Morphologisch	IHC / EM	JA
CEC	CD146	IHC	JA
EPC	CD133	IHC	JA
Glatte Muskelzellen	aSMA	IHC / EM	JA
Fibroblasten	Vimentin	IHC / EM	JA
Myofibroblasten	aSMA + Vimentin	IHC	JA
HSC	CD34 c-kit	qRT-PCR qRT-PCR / ISH	JA
MSC	Vimentin + CD44	IHC	JA
Differenzierung von MSC zu Endothelzellen	CD31 + CD44	IHC	JA
Differenzierung von MSC zu Muskelzellen	CD44 + aSMA	IHC	NEIN
Kardiale Vorläuferzellen*	GATA4	qRT-PCR	JA

Tabelle 6: Zusammenfassung über die nachgewiesenen Zelltypen

*Der Nachweis kardialer Differenzierungsmarker ist Gegenstand einer anderen Doktorarbeit. Hier erfolgte die Auflistung des GATA4-Nachweises lediglich zur Darstellung einer vermehrten Differenzierung unter GM-CSF-Gabe.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde das physiologische (d.h. ohne pathologische Einflüsse) in-vivo-Differenzierungspotential zirkulierender Stammzellen untersucht. Dafür wurde in einem Schweinemodel eine im Blutstrom frei flottierende Membran implantiert, die von allen zirkulierenden Blutzellen als „Siedlungsfläche“ genutzt werden konnte. Die sich auf der Membran abspielenden (Differenzierungs-) Prozesse wurden analysiert und auf eine mögliche Stammzellenbeteiligung hin untersucht. Darüber hinaus erfolgte die Untersuchung des möglichen Einflusses von GM-CSF auf die Stammzellmobilisierung und die sich daraus möglicher Weise ergebenden Proliferations- und Differenzierungsveränderungen.

5.1 Tiermodell

Die verwendete perkutane Implantationsprozedur ermöglichte ein zügiges und komplikationsloses Einbringen der Fremdkörper in den LV und die Aorta. Lediglich die Fixierung des Fremdkörpers am gewünschten Implantationsort erwies sich als problematisch. So waren zwei Fremdkörper aus dem LV in die Aorta abgerutscht. Ebenfalls kam es in zehn Fällen zu einer einseitigen Lösung der Membran vom tragenden Scaffold. Da in diesen Fällen eine Berührung der Membran mit umgebenden Geweben sehr wahrscheinlich war, wurden die Membranen verworfen. Das Tiermodell zeichnete sich durch eine niedrige Mortalität aus. So verstarb lediglich ein Tier im postinterventionellen Verlauf.

Die spezielle Konstruktion der Fremdkörper sollte ein Anlegen der Membran an umgebende Strukturen und damit eine Migration von adulten Zellen verhindern. Jedoch lässt sich ein Kontakt nicht vollständig ausschließen. Allerdings sprechen die Untersuchungsergebnisse klar gegen eine Kontamination:

So zeigten die Untersuchungen auf den LV-M (nicht jedoch auf den AO-M) frühe Kardiomyozytenvorläuferzellen (GATA4, Nkx2.5, BNP). Marker adulter Kardiomyozyten, wie SERCA2a, Connexin 43 oder Troponin I konnten nicht nachgewiesen werden [160]. Diese Beobachtungen lassen deshalb den Schluss zu, dass es sich bei allen beobachteten Gewebebildungsprozessen nicht um Kontaminationen der Membran mit adulten Zellen aus den jeweilig umgebenden Geweben handelt, denn bei einer Kontamination wären auch Marker adulter Kardiomyozyten nachweisbar gewesen. Das Vorkommen von Markern früher

Kardiomyozytenformen (GATA4, Nkx 2.5 und BNP) bei gleichzeitigem Fehlen adulter Marker, deutet daher auf das Ergebnis eines Differenzierungsprozesses hin und spricht gegen das Einwandern adulter ausdifferenzierter Zellen. Diese Interpretation wird darüber hinaus durch die Beobachtungen von Stammzellmarkern (vgl. Abb. 18-21) sowie den Proliferationsnachweis (vgl. Abb. 29/30) gestützt, die ebenfalls für den Prozess der Gewebeneubildung aus Stamm- / Progenitorzellen sprechen.

Um abschließende Sicherheit zu erhalten, dass mögliche Zellen nicht *per continuitatem* über das Scaffold auf die Membran eingewandert waren, wurden die Scaffolds histologisch untersucht. Dabei bestätigten sich nach HE-Färbung der Schnitte die Annahmen (vgl. Abb. 8). Weder auf den Scaffoldaußenseiten waren Zellen zu eruieren, noch zeigten sich die Lumina der Scaffolds zellpositiv. Stattdessen waren die Scaffoldlumina von einer kernlosen, homogenen Substanz ausgefüllt bei der es sich vermutlich um Fibrin, Gerinnungsfaktoren und Komplement- / Antikörperproteine handelten.

Diese Daten ergeben zusammenfassend, dass es sich bei dem beobachteten Gewebe nicht um eine Kontamination mit ausdifferenzierten Zellen handelt. Vielmehr sprechen die Ergebnisse für eine Gewebeentstehung, deren Ursache das „Homing“ im Blut zirkulierender Zellen darstellt. Somit eignet sich das verwendete Tiermodell zur Beantwortung der Fragestellungen dieser Dissertation.

5.2 Gewebeentstehung

Die Haupteckennis dieser Arbeit ist der Nachweis, dass im Blutstrom zirkulierende Stammzellen fähig sind, *in vivo* ein vollständig differenziertes Gewebe auf einer synthetischen Membran zu bilden. Das sich bildende Gewebe bestand aus Fibroblasten, Myofibroblasten und glatten Muskelzellen sowie Endothelzellen und kapillären Strukturen. Darüber hinaus waren auf den LV-M Marker früher Kardiomyozyten nachweisbar (vgl. [160]).

Über Steigerung der Anzahl zirkulierender (Stamm-) Zellen mittels GM-CSF Stimulation ließ sich ein verstärktes Gewebewachstum erzielen. Diese beobachtete Gewebeentstehung lässt sich nicht mit einer klassischen Fremdkörperreaktion erklären wie sie typischerweise bei Kontakt mit Fremdgewebe auftritt. Für eine Fremdkörperreaktion ist eine rasche Ummantelung des Fremdmaterials innerhalb von zwei bis vier Wochen durch Fremdkörperriesenzellen typisch [155]. Solche aus der Fusion von Makrophagen

entstandenen Riesenzellen konnten jedoch sowohl auf den LV- als auch auf den Ao-M ausgeschlossen werden. Auch andere Entzündungszellen wurden hauptsächlich in den ersten drei Tagen beobachtet, danach nur noch vereinzelt (vgl. Abb. 9). Stattdessen zeigte sich nach dieser Entzündungsphase ein zirkulär um die Membran entstehendes Gewebe, dessen Zellen in deutlich organisierten Schichten gegliedert waren. Die inneren Zellschichten zeigten sich deutlich α SMA^{positiv} und waren nur vereinzelt auch Vimentin^{positiv} (vgl. Abb. 15). Dagegen zeigte sich in den Außenbereichen ein Vimentin^{positiver} Bereich, der α SMA^{negativ} war. Glatte Muskelzellen exprimieren je nach Herkunft unterschiedliche Level dieser beiden Marker während Fibroblasten nur Vimentin^{positiv} sind. Unter Bedingungen eines Geweberemodelings bilden Fibroblasten zudem α SMA, so dass die α SMA^{positiven} Vimentin^{positiven} Zellen als Myofibroblasten zu werten sind [92]. Dagegen entsprechen die α SMA^{positiven} Vimentin^{negativen} Zellen glatten Muskelzellen, welche auch elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden konnten (vgl. Abb. 16). Bekannt ist, dass im Rahmen von Gefäßverletzungen dem Wiederaufbau einer suffizienten Schicht glatter Muskelzellen eine besondere Bedeutung für den Erhalt der Gefäßstabilität zukommt. So ist zu beobachten, dass es nach Ballondilatation und Stentimplantation im Rahmen einer Koronarintervention zu einer Neointimabildung kommt, welche v.a. durch Zunahme der glatten Muskelzellen bedingt ist [161]. Dieser Prozess wird u.a. durch zirkulierende Stammzellen vermittelt [162].

Im Vergleich zu dem inneren Zellverband aus glatten Muskelzellen zeigte sich die zum Gefäßlumen bzw. zur Herzhöhle hin äußerste Zellschicht positiv für den Endothelzellmarker vWF (vgl. Abb. 11 B). Diese klare Ausrichtung der vWF^{positiven} Zellen lässt sich als dichter Endothelzellverband interpretieren, der das auf den Membranen entstandene Gewebe umschließt. Ein ähnlicher Prozess konnte *in vivo* auch an experimentellen fibrinbasierenden Herzklappen beobachtet werden [11]. Darüber hinaus gelang der Nachweis, dass es in den neu entstehenden Geweben auch zu einer regelhaften Kapillarbildung kam. Anhand von BS1-Färbungen konnte diese Kapillarbildung dokumentiert werden (vgl. Abb. 11 A) [163]. Das entstandene, verzweigte Kapillarnetzwerk wurde zusätzlich durch eine immunhistochemische Färbung von CD146 nachgewiesen (vgl. Abb. 12 B/C). Von CD146 ist u.a. bekannt, dass es eine entscheidende Rolle in der Vaskulogenese von Zebrafischen spielt [161]. Dabei zeigte sich in den CD146-Färbungen, dass diese Kapillarstrukturen offenbar über die lumennahe Seite Anschluss an die Blutzirkulation im LV bzw. AO hatten (vgl. Abb. 12 C).

Die entstandenen Kapillaren zeigten in der EM eine regelrechte physiologische Organisation (vgl. Abb. 13/14). Da vor der Implantation auf den Membranen kein vaskuläres System existent war, kann davon ausgegangen werden, dass es zu einer De-novo-Formierung des

Kapillarnetzwerkes kam. Diese, durch Stammzellen bedingte, Vaskulogenese ist jedoch *in vivo* eher von frühen embryonalen Entwicklungsstadien bekannt, während für den adulten Organismus ein Aussprossen bereits existenter Gefäße (Angiogenese) typisch ist [93]. Unsere Daten bestätigen jedoch, dass auch adulte (Stamm-) Zellen *in vivo* (unter Expression von CD34, c-kit sowie von vWF) auch zur Vaskulogenese fähig sind [93].

Aufgrund der physikalisch begrenzten Diffusionskapazität von etwa 200 µm wären ohne entsprechende Kapillardichte die gemessenen Gewebedurchmesser nicht erreichbar, so dass der beobachteten Vaskulogenese eine essentielle Bedeutung in der Gewebeentstehung zukommt [164]. Erst durch die Entwicklung eines suffizienten Kapillarnetzwerkes wurde die Durchmesserzunahme des neu entstehenden Gewebes ermöglicht. Dabei zeigte sich, dass die Gewebedicke mit der Implantationsdauer korrelierte. Nach drei Tagen war primär eine dünne, fast zellulose Schicht (wahrscheinlich Proteine wie Fibrin und Komplementfaktoren) auf den Membranen zu finden. Die wenigen nachweisbaren Zellen waren CD45^{positive} inflammatorische Zellen (vgl. Abb. 9). Dagegen zeigte sich nach zwei ($0,43 \pm 0,06$ mm) und sechs ($1,32 \pm 0,18$ mm) Wochen eine Steigerung des Durchmessers, welche nach zwölf Wochen ($1,88 \pm 0,22$ mm) ihr Maximum aufwies (vgl. Abb. 10).

Bei den Ergebnissen ist jedoch zu beachten, dass aufgrund des Versuchsaufbaus kein Entwicklungsprozess auf einzelnen Membranen beobachtet werden konnte, sondern lediglich eine Momentaufnahme an zuvor spezifizierten Entnahmezeitpunkten (drei Tagen, zwei, sechs und zwölf Wochen) möglich war. Auf den Zeitverlauf kann deshalb nur geschlossen werden. Etwaige Rückschlüsse auf den Zeitverlauf werden darüber hinaus durch mögliche, nicht messbare interindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsschweinen erschwert. Aufgrund der für ein Großtiermodell sehr großen n-Zahlen pro Gruppe sind diese möglichen Interpretationsfehler jedoch weitgehend ausgeschlossen worden.

5.3 Stammzellbeteiligung und -differenzierung

Wie in Abschnitt 5.1 beschrieben, kann ausgeschlossen werden, dass die Gewebeentstehung durch ausdifferenzierte Zellen geschah. Um weitere Hinweise auf die Herkunft des neuen Gewebes zu erhalten, wurden die Membranen auf das Vorkommen von typischen Stammzellmarkern hin untersucht. Dabei fanden sich auf den Membranen des LV als auch der Aorta die HSC-Marker CD34 und c-kit auf mRNA-Ebene, bzw. die für MSC typische Markerkombinationen (CD44^{positiv}, Vimentin^{positiv}, CD45^{negativ}) auf Proteinebene (vgl. Abb. 18 - 20 und Abb. 21/22).

5.3.1 Hämatopoetische Stammzellen

CD34 und c-kit gelten als wichtige Marker der hämatopoetischen Stammzelllinie. Bereits nach zwei Wochen konnte eine c-kit-Expression auf den Membranen in der qRT-PCR nachgewiesen werden (vgl. Abb. 19). Nach sechs und zwölf Wochen stieg die Expression von c-kit an. Scheinbar erreichte die Expression nach sechs Wochen jedoch ein Plateau, so dass es zwischen der sechsten und der zwölften Woche zu keinem weiteren Anstieg mehr kam. Ähnlich verhielt sich die Expression von CD34 (vgl. Abb. 18). Bei beiden HSC-Markern zeigte sich in der qRT-PCR kein signifikanter Unterschied zwischen den Ao-M und den LV-M. Aufgrund einer mangelhaften Spezifität entsprechender Antikörper für porcines CD34 / c-kit wurde eine ISH etabliert, um HSC auch histologisch nachweisen und deren Verteilung im Gewebe klären zu können.

Trotz des fragilen Gewebes gelang es, die Membran zu untersuchen. Die ISH ergab, dass sich c-kit^{positive} Zellen primär in den äußeren Zellschichten, also den lumennäheren Bereichen, auffinden ließen (vgl. Abb. 20). Dies kann als deutlicher Hinweis gewertet werden, dass die inneren Zellschichten als erste entstanden und deshalb am weitesten ausdifferenziert waren und die äußeren Zellschichten dementsprechend noch jünger und weniger differenziert waren. Somit ließen sich die Beobachtungen, dass die c-kit^{positiven} Zellen primär im äußeren Zellbereich angesiedelt waren, damit erklären, dass sie am wenigsten differenziert waren, weil sie gerade erst auf der Membran migrierten und noch c-kit exprimierten. Nach Abschluss der Differenzierung (innere Zellschichten) kam es zur Terminierung der c-kit-Expression, wie es für Stammzellendifferenzierungen typisch ist [165-168].

Leider war es technisch nicht möglich eine Koexpression von CD34 und c-kit zu dokumentieren, so dass nicht nachgewiesen werden konnte, dass beide HSC-Marker von den gleichen Zellen exprimiert werden.

5.3.2 Mesenchymale Stammzellen

Im Gegensatz zu typischen HSC-Markern ist bis heute kein MSC-spezifischer Oberflächenmarker beschrieben. Somit wurden MSC über den Nachweis für sie typischer Markerkombinationen dokumentiert. Der Literatur zufolge exprimieren MSC ähnlich wie Lymphozyten den Marker CD44 [32]. Sie sind aber für den hämatopoetischen Marker CD45, für den Lymphozyten positiv sind, negativ [169]. Darüber hinaus sind MSC Vimentin^{positiv} [40].

Immunhistochemisch konnten sowohl CD44^{positive}, Vimentin^{positive} Zellen als auch CD44^{positive}, CD45^{negative} Zellen identifiziert werden. Insbesondere für porcine, zirkulierende CD44^{positive}, Vimentin^{positive} Zellen, konnte ein MSC-typisches Differenzierungsmuster nachgewiesen werden [170].

Bei Betrachtung des Verteilungsmusters der CD44^{positiven}, Vimentin^{positiven} Zellen fällt auf, dass diese ähnlich wie die c-kit^{positiven} Zellen vor allem in den außen liegenden Zellschichten vorkommen. Beide Marker, Vimentin / CD44 und c-kit, werden zum Gewebeinneren hin seltener. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass Vimentin / CD44, ebenso wie c-kit, im differenzierten Zustand nicht mehr exprimiert wird. Dies könnte in der Funktion von Vimentin begründet sein. So konnte gezeigt werden, dass Vimentin außerordentlich wichtig für die Diapedese von peripheren mononukleären Blutzellen durch die Endothelzellschicht ist [171]. Vimentin könnte somit in den äußeren Zellschichten des entstandenen Gewebes auch an der Diapedese der zirkulierenden Stammzellen beteiligt sein.

5.3.3 Endotheliale Vorläuferzellen

Neben HSC und MSC typischen Markern wurde das Vorkommen von EPC- und CEC-typischen Zellmarkern untersucht. Zum Nachweis von EPC wurde ein gegen CD133 gerichteter Antikörper verwendet [172]. Dabei zeigten sich immunhistochemisch nur wenige positive Zellen (vgl. Abb. 25 A). Dagegen konnte, neben dem CD146^{positiven} Kapillarnetzwerk, auch eine größere Anzahl einzelner CD146^{positiver} Zellen immunhistochemisch detektiert werden (vgl. Abb. 25 B). Dieses vereinzelt Vorkommen CD146^{positiver} Zellen kann als Nachweis von CEC interpretiert werden [172]. Möglich wäre allerdings auch, dass diese

vereinzelt Zellen im Querschnitt angetroffene Kapillaren dokumentieren (vgl. Vergrößerung in Abb. 25 B).

5.3.4 Progenitorzellen

Neben zirkulierenden Stammzellen wäre auch eine Beteiligung von nicht knochenmarkständigen Stammzellen / Progenitorzellen, wie etwa von CSC, möglich. CSC scheinen *in vitro* und *in vivo* unter anderem in Kardiomyozyten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen differenzieren zu können [173, 174]. Dieses Differenzierungsspektrum deckt das beobachtete Zellspektrum gut ab. Da CSC zudem auch c-kit^{positiv} sind, liegt die Vermutung nahe, dass auch CSC an der Membranbesiedlung beteiligt sein könnten. Da ein Kontakt zwischen Membran und LV ausgeschlossen ist, könnten die CSC jedoch nur über das Blut auf die LV-M übertreten. Jedoch ist, soweit ersichtlich, eine Migration von CSC in die Blutzirkulation bis heute nicht beschrieben. Zudem müssten die CSC aufgrund der sehr geringen kardialen Kontaktzeit zwischen Blut und LV-M sehr effektiv über das Blut auf die Membran migrieren. Noch unwahrscheinlicher wird die Beteiligung von CSC, wenn die LV-M mit den Ao-M verglichen werden. Dort zeigt sich, dass der Implantationsort scheinbar keinen Einfluss auf die Ausgestaltung des neuen Gewebes hat (abgesehen von der Expression früher kardiomyozytärer Marker) [160]. Beide Membranen (AO und LV) sind für die gleichen Stammzellmarker positiv, wurden von ähnlichen Zellen besiedelt, gleichen sich in der Gewebedicke und zeigen einen vergleichbaren strukturellen Aufbau. Daher müsste davon ausgegangen werden, dass CSC auf Ao-M ähnlich stark vertreten sind wie auf den LV-M. Dies erscheint unter Beachtung der oben genannten Argumente jedoch unwahrscheinlich.

5.3.5 Zytokine

Fraglich scheint erscheint jedoch, über welchen Mechanismus zirkulierende Stammzellen auf die Membranen migrieren. Denkbar wäre eine chemotaktische Wirkung eines auf der Membran sezernierten Zytokins. Eines dieser Zytokine könnte SCF, der Ligand von c-kit, sein [81]. Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigen, dass SCF von Zellen der Membran gebildet wird (vgl. Abb. 27). Die lösliche Form von SCF scheint ein vermehrtes „Homing“ und eine gesteigerte Mobilisation von c-kit^{positiven} Zellen zu bewirken, während eine Adhäsion dieser Zellen über Membran gebundenes SCF möglich ist [75, 175-177]. Ob jedoch die gebildete Menge von SCF hinreichend ist, um an der Migration zirkulierender HSC ausschlaggebend beteiligt zu sein, kann nur spekulativ beantwortet werden. Die Interaktion von SCF und c-kit

könnte auch für die Organisation der Kapillarbildung, wie sie auf den Membranen beobachtet wurde, von wesentlicher Bedeutung zu sein [178].

Als weiteren, auf Stammzellen potentiell chemotaktischen Faktor, konnte HMGB1 auf den Membranen nachwiesen werden (vgl. Abb. 17) [179]. HMGB1 wird von nekrotischen Zellen und von aktivierten Makrophagen sezerniert [180, 181]. Es ist jedoch wahrscheinlicher, dass das auf den Membranen nachgewiesene HMGB1 vor allem von aktivierten Makrophagen freigesetzt wurde. Eine Freisetzung von HMGB1 durch nekrotische Zellen erscheint dagegen unwahrscheinlich, da davon auszugehen ist, dass zwar zu Beginn des Gewebewachstums, wenn noch keine ausreichenden Kapillarisation erfolgt ist, Zelluntergänge auftreten, diese aber nicht durch Nekrose, sondern durch Apoptose ablaufen. Da für apoptotische Zellen eine Freisetzung von HMGB1 nicht nachgewiesen werden konnte, scheint das auf den Membranen nachgewiesene HMGB1 primär von Makrophagen zu stammen [182].

5.3.6 Differenzierung in glatte Muskelzellen und (Myo-) Fibroblasten

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse konnte eine Beteiligung mehrerer zirkulierender Stamm- und Progenitorzellarten (MSC, HSC, EPC und CEC) an der Gewebeentstehung nachgewiesen werden.

Überaus interessant ist die Frage, welche dieser Zellarten welchen Differenzierungsprozess durchläuft und in welcher Weise diese Zellen somit an der Gewebebildung beteiligt sind. Diese Fragen lassen sich aufgrund des Versuchsaufbaus jedoch nur sehr schwer beantworten. Eine Differenzierung von MSC in glatte Muskelzellen ist vielfach publiziert [183, 184]. Darum erscheint es zunächst wahrscheinlicher, dass die nachgewiesenen glatten Muskelzellen mesenchymalen Stammzellursprungs sind. So konnte für MSC *in vivo* gezeigt werden, dass diese eine dünne Gefäßmedia nachbilden, wenn sie auf einer Gefäßprothese ausgesät werden [185]. Vergleichbare Prozesse zeigen sich auch auf den untersuchten Membranen, wo vor allem der innere Bereich (im Sinne einer Media) von glatten Muskelzellen gebildet wurde.

Um den mesenchymalen Ursprung der glatten Muskelzellen zu überprüfen, wurden die Membranen auf die Koexpression eines MSC-Markers (hier CD44) und des glatte-Muskelzellmarkers α SMA untersucht. Jedoch konnten in keinem der angefärbten Schnitte Zellen identifiziert werden, die sowohl CD44 als auch α SMA exprimierten (vgl. Abb. 24). Folglich erscheint es zunächst unwahrscheinlich, dass die hier dokumentierten glatten Muskelzellen aus MSC differenziert sind. So kann geschlussfolgert werden, dass es in unseren Experimenten *in vivo* zu keiner myogenen MSC-Differenzierung gekommen ist, obwohl MSC *in vitro* in glatte Muskelzellen differenzieren können. Möglicherweise liegt dies

an einem mangelnden Differenzierungsstimulus, denn *in vitro* konnte gezeigt werden, dass MSC nur in direktem Zell-Zell-Kontakt mit glatten Muskelzellen zu glatten Muskelzellen differenzieren können. Eine indirekte Zellkultur, in der nur ein Austausch von Zytokinen möglich war, führte in diesen Untersuchungen zu keiner entsprechenden Differenzierung [186]. Somit scheint die nicht zu beobachtende Differenzierung von MSC in glatte Muskelzellen erklärbar, denn aufgrund des Versuchsaufbaus war eine Besiedlung der Membranen durch ausdifferenzierte glatte Muskelzellen ausgeschlossen. Somit konnte es zu keiner Kokultur von undifferenzierten MSC mit adulten glatten Muskelzellen kommen.

Jedoch muss bei dieser Interpretation beachtet werden, dass eine Differenzierung aufgrund des unbekanntem zeitlichen Prozesses, in dem die Differenzierung abläuft, möglicherweise unbeobachtet bliebe. Wenn frühzeitig der MSC-Marker CD44 herunter reguliert, d.h. zu Beginn der glatten-Muskelzell-Differenzierung, der Marker von glatten Muskelzellen α SMA aber erst sehr spät exprimiert wird, könnten die Untersuchungen keine CD44^{positiven} und zeitgleich α SMA^{positiven} Zellen zeigen, obwohl MSC in diesem Fall in glatte Muskelzellen differenziert wären. Somit könnte es zu der fehlerhaften Interpretation kommen, MSC seien nicht in glatte Muskelzellen differenziert.

Die nachgewiesenen HSC können darüber hinaus einen weiteren zellulären Ursprung der glatten Muskelzellen darstellen. Jedoch scheint dies nach Recherche der publizierten Literatur unwahrscheinlich. Eine myogene Differenzierung von HSC ist im Vergleich zu MSC sehr viel seltener beschrieben. Allerdings wiesen Orlandi et. al *in vivo* kurze Zeit nach einer Gefäßverletzung vereinzelte c-kit^{positive} glatten Muskelzellen nach [187].

Im Gegensatz zu den glatten Muskelzellen scheint es allerdings für die nachgewiesenen Myofibroblasten wahrscheinlicher zu sein, dass sie sich aus HSC differenzieren können [188, 189]. Allerdings zeigen auch MSC die Fähigkeit der Myofibroblastendifferenzierung [190].

5.3.7 Differenzierung in Endothelzellen / Kapillarbildung

Die Herkunft der nachgewiesenen Endothelzellen erscheint, im Vergleich zu den anderen beschriebenen differenzierten Geweben, noch uneinheitlicher. Diese Annahme basiert auf etlichen Untersuchungen, die zeigten, dass Endothelzellen sowohl aus MSC [191] wie aus HSC [192] oder auch aus EPC [193] hervorgehen können. Darüber hinaus zirkulieren auch ausdifferenzierte Endothelzellen (CEC) im Blut, welche ebenfalls die Grundlage für die nachgewiesene Endothelialisierung bilden können [24, 194].

Recht unwahrscheinlich erscheint, dass EPC die primäre Zellgrundlage der ausgeprägten Endothelialisierung und Kapillarisierung bildeten, weil der typische EPC-Marker CD133 nur

von wenigen Zellen exprimiert wurde (vgl. Abb. 25 A). Jedoch muss auch hier bedacht werden, dass EPC ihre Stammzellmarker rasch herunter regulieren, wenn sie in Endothelzellen differenzieren [195]. Aufgrund des großen Abstandes zwischen den Entnahmezeitpunkten der einzelnen Gruppen wäre es durchaus vorstellbar, dass zum Zeitpunkt der Entnahme die meisten EPC schon in Endothelzellen differenziert waren und somit ihre Stammzellmarker bereits „verloren“ hatten.

Eine endotheliale Differenzierung aus zirkulierenden HSC und / oder MSC ist ebenfalls möglich und konnte von uns dokumentiert werden, indem CD44^{positive} CD31^{positive} Zellen nachgewiesen wurden (vgl. Abb. 23). Die Mehrzahl der CD31^{positiven} Endothelzellen war jedoch CD44^{negativ}. Somit ist davon auszugehen, dass MSC nur zu einem gewissen Grad an der Endothelzell- und Kapillarbildung beteiligt sind. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass auch CD44 während der Differenzierung schnell herunter reguliert werden kann, so dass ausdifferenzierte Endothelzellen als CD44^{negativ} erscheinen würden [196].

Die rasche und dichte Organisation der Endothelzellen an der Außenseite der Membran lässt vermuten, dass sie nicht erst aus Vorstufen differenzieren mussten, sondern bereits als ausdifferenzierte Endothelzellen über die Zirkulation auf der Membran ansiedelten [194]. So konnte CD146, ein Marker für CEC, zahlreich nachgewiesen werden (vgl. Abb. 12/25 B).

Wie die kapillären Strukturen war auch das Gewebeäußere von einem einschichtigen CD146^{positiven} Zellverband umgeben (vgl. Abb. 12 C). Auffällig war die örtliche Nähe von äußerem Endothelzellsaum und kapillären Strukturen, so dass davon auszugehen ist, dass die neu entstandenen Kapillaren über den Endothelzellsaum Anschluss an die periphere Blutzirkulation haben.

Die nachgewiesenen Kapillaren können somit über Migrationsbewegungen von den außen aufliegenden vWF / CD146^{positiven} Endothelzellen in das Gewebeinnere entstanden sein. Dabei kann den nachgewiesenen MSC eine gewichtige Bedeutung zukommen. Sie bereiten über die Sekretion von Matrix-Metallo-Proteinasen den nachfolgenden Endothelzellen den Weg durch die ECM und würden so über die Endothelzellmigration die Kapillarbildung im Inneren ermöglichen [197]. Des Weiteren scheinen MSC die Angiogenese / Vaskulogenese zu steigern, indem sie VEGF und Angiopoietin 1 sezernieren und so die nachfolgenden Endothelzellen zur Proliferation anregen [198].

5.4 Stammzellmobilisation

Mit dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Mobilisation von knochenmarkständigen (Stamm-) Zellen in die periphere Blutzirkulation durch GM-CSF zu einer signifikant höheren Stammzellbeteiligung an den Membranbesiedlungen führte. Dabei zeigten sich in der GM-CSF-Gruppe signifikant höhere Werte für den Stammzellmarker c-kit, den chemotaktischen SCF und den Proliferationsmarker ki67, ein erhöhter Gewebedurchmesser sowie im LV eine erhöhte Expression des frühen Kardiomyozytenmarkers GATA4 (vgl. Abb. 27-32).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Applikation von GM-CSF im Blut zu einer signifikanten Erhöhung der Leukozytenwerte im Vergleich zu nicht stimulierten Tieren führte. Damit konnte die Wirksamkeit von GM-CSF bei jedem Tier dokumentiert werden (vgl. Abb. 26) [199]. Dies stellte sicher, dass alle Tiere, die in die Studie eingeschlossen wurden, GM-CSF-Responder waren. Der Leukozytenanstieg ist durch eine direkte Wirkung von GM-CSF auf die im Knochenmarkkompartiment residenten Zellen bedingt. Es wurde versucht, über FACS-Analysen von peripherem Blut auch den Anstieg von HSC direkt zu dokumentieren. Dazu wurde ein Antikörper gegen CD34 und c-kit verwendet. Dabei kam es jedoch, wie auch in der Immunhistologie, zu vielen falsch-positive Zählungen. Jedoch ist die stammzellmobilisierende Wirkung von GM-CSF in zahlreichen Publikationen beschrieben [200, 201].

Die Ergebnisse der untersuchten GM-CSF-Membranen zeigten im Vergleich zu der unbehandelten Sechs-Wochen-Kontrollgruppe einheitlich höhere Werte für Stammzellmarker, Zellproliferation und Zelldifferenzierung. So zeigten die GM-CSF Tiere signifikant höhere c-kit-Expressionswerte als die Kontrolltiere (vgl. Abb. 28). Dies deutet darauf hin, dass die GM-CSF Stimulation nicht nur eine Erhöhung der zirkulierenden Stammzellen bewirkte, sondern auch zu einer gesteigerten (Stamm-) Zellmigration auf die Membran führte.

Diese Beobachtung in der GM-CSF Gruppe wird durch die Ergebnisse der ki67-Zellzählungen gestützt (vgl. Abb. 29/30). Die anhand von ki67 gemessene und signifikant gesteigerte Proliferationsrate verdeutlichte sich auch morphologisch durch schnelleres Wachstum und einen erhöhten Durchmesser der GM-CSF-Membranen im Vergleich zu der nicht behandelten Kontrollgruppe (vgl. Abb. 32).

Dieses widerspricht (theoretisch möglichen) direkten Effekten von GM-CSFs auf das Membrangewebe. Eine solche Interpretation erscheint weiterhin unzulässig, weil eine langanhaltende Wirkung von GM-CSF bei einer Serum-Halbwertszeit von ca. acht Stunden

unwahrscheinlich erscheint [202]. So liegt zwischen der GM-CSF-Gabe und der Explantation der Membranen, an denen die c-kit und GATA4-Expression bestimmt wurde, fünf Wochen, was der 105fachen Halbwertszeit entspricht.

Ferner wird die Interpretation, dass eine gesteigerte c-kit-Expression auch eine erhöhte Stammzellmigration bedeutet, zusätzlich auch durch den Nachweis der gesteigerten Expression des c-kit Liganden SCF gestützt (vgl. Abb. 27). So kann in der GM-CSF-Gruppe eine Verstärkung der SCF-c-kit-Achse angenommen werden und folglich scheint auch die Proliferation auf den GM-CSF-Membranen erhöht zu sein. Damit scheint recht sicher, dass die GM-CSF-Gabe zu einer erhöhten Zellzahl auf den Membranen geführt hat.

Die unter GM-CSF Gabe gesteigerte Differenzierung konnte, neben dem ki67-Anstieg und der Durchmesserzunahme, anhand der quantitativen Analyse des frühen Kardiomyozytenmarkers GATA4 gezeigt werden (vgl. Abb. 31). Jedoch konnte GATA4 nur in Membranen des LV nachgewiesen werden, während auf aortalen Membranen kein GATA4-Transkript dokumentiert werden konnte. (Zur weiteren Diskussion der GATA4 Ergebnisse sei auf unsere Publikation verwiesen [160].) GATA4 wies in der GM-CSF-Gruppe eine signifikant höhere Expression auf als in der Kontrollgruppe. Dies verdeutlicht, dass die GM-CSF-Stimulation über eine vermehrte Mobilisation von Stammzellen nicht zu einer reinen Erhöhung von Fibroblasten und ECM führte, sondern über eine verstärkte Stammzellendifferenzierung auch zu einer vermehrten Anzahl an spezialisierten Zellen, wie z.B. frühen Kardiomyozytenvorläufern. Die Beeinflussung komplexer Differenzierungsprozesse durch GM-CSF wurde auch von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen. So ließ sich die Kapillardichte und die damit verbundene verbesserte Ischämietoleranz durch GM-CSF-Gabe steigern [203].

Diese Ergebnisse zeigen, dass GM-CSF über eine Mobilisation von knochenmarkständigen (Stamm-) Zellen zu einer vermehrten Besiedlung und damit auch zu einer gesteigerten Gewebekonstruktion geführt hat. Sie stehen in Einklang mit einigen Arbeiten, die zeigen konnten, dass durch Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark eine vermehrte Migration dieser Zellen in infarziertes Gewebe erreichbar war [204, 205].

5.5 Klinische Bedeutungen

Mit dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob zirkulierende Stammzellen *in vivo* im gesunden Organismus fähig sind, ein funktionelles Gewebe auszubilden. Dies wäre eine Grundvoraussetzung für die kurative, stammzellvermittelte Therapie kardialer Erkrankungen. *In vitro* konnte hinreichend gezeigt werden, dass ASC über eine ausreichende Plastizität verfügen, um in Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Kardiomyozyten differenzieren zu können. Jedoch scheinen sie *in vivo* dieses Potential im pathologischen Umfeld nicht zu entfalten. Durch die Verwendung einer Membran wurde in dieser Arbeit den zirkulierenden Stammzellen eine Nische geboten, die trotz ihrer intrakorporalen Lage nicht von ausdifferenzierten Zellen beeinflusst war. Durch die Implantation in gesunde Tiere konnten auch weitgehend pathologische Einflüsse ausgeschlossen werden. Lediglich zu Beginn, d.h. bis zur zweiten Woche, waren in nennenswerten Ausmaß Entzündungszellen auf den Membranen zu detektieren. Damit stand die „Differenzierungs-nische“ auf den Membranen sehr viel weniger unter dem Einfluss entzündlicher Zytokine und Zellvorgänge als in einem (frischen) Infarktgebiet.

Das Milieu auf den LV-M ähnelt letztlich Bedingungen der ischämischen Kardiomyopathie, in deren Stadium die Narbenbildung abgeschlossen ist und keine inflammatorische Stimulation mehr vorliegt. Die in einigen Studien untersuchten Effekte einer Stammzellgabe auf die ischämische Kardiomyopathie ergaben eine verbesserte Vaskularisation der „Border Zone“ sowie eine verbesserte linksventrikuläre Pumpfunktion. Eine Veränderung der kardialen Fibrose konnte in dieser Studie jedoch ebenso wenig wie eine kardiale Differenzierung nachgewiesen werden [42]. Trotz mangelnder kardialer Differenzierung ließ sich in den stammzellbehandelten Gruppen eine verkleinerte Infarkt-narbe mit verbesserter Kontraktilität und gesteigerter EF nachweisen [1, 172, 206]. Dieses bestätigt sich durch unsere Ergebnisse. Zwar ließ sich eine kardiale Differenzierung nachweisen, jedoch war diese nur von begrenztem Ausmaß [160]. Vielmehr war eine ausgeprägte angiogenetische Potenz dokumentierbar. Somit sind die bis heute nachgewiesenen positiven Effekte einer Stammzelltherapie auf den Progress eines Myokardinfarktes bzw. einer ischämischen Kardiomyopathie am ehesten auf die vaskularisationsbedingte Reaktivierung eines „Hibernating Myocardium“ der „Border Zone“ zu erklären [3]. Um diese Ergebnisse weiter zu optimieren, entwickelten Zhou et al. einen Omentum majus basierten Patch, der mit MSC besiedelt zu einem signifikant verbesserten Postinfarktremodeling und einer deutlich verbesserten linksventrikulären Pumpfunktion führte als eine alleinige

Stammzelltransplantation ohne Patch [207]. Diese Beobachtungen bestätigen unsere Ergebnisinterpretation, dass adulte Stammzellen erst in einem neutralen, unbesiedelten Milieu ihre vollständige Plastizität entfalten. So zeigen unsere Ergebnisse, im Gegensatz zu den Stammzelltherapiestudien, dass adulte Stammzellen *in vivo* im gesunden Organismus zur de-novo-Gewebebildung fähig sind, was eine Grundvoraussetzung für erfolgreiches Tissue Engineering darstellt.

Es stellt sich jedoch die grundlegende Frage, inwieweit sich unsere Ergebnisse auf den humanen Bereich übertragen lassen. Grundsätzlich ist dabei zu beachten, dass in dieser Studie junge Schweine verwendet wurden. Im Gegensatz dazu sind die meisten kardiovaskulären erkrankten Patienten höheren Lebensalters. Dies wirft die Frage nach einem möglichen Zusammenhang zwischen Alter und Funktionalität der Stammzellen auf.

Von der Knochenmarkarchitektur ist bekannt, dass sie mit zunehmendem Alter strukturelle Veränderungen aufweist [208]. Während in der Kindheit rotes Knochenmark auch noch in den Röhrenknochen vorkommt, kommt es im Alter nur noch in den platten Knochen vor und ist in den Röhrenknochen durch Fettmark ersetzt worden. Mit steigendem Alter nimmt vor allem die Menge an Stammzellen ab, während deren Teilungsfähigkeit noch erhalten bleibt [209]. Dazu passen Beobachtungen, dass in der Kindheit mehr EPC und HSC im Blutfluss zirkulieren als im Erwachsenenalter [186]. Plastizität und Expression von Zellmarkern scheinen (bei den MSC) mit zunehmendem Alter unverändert [100, 210]. Allerdings zeigen andere Studien, dass (bei Mäusen) die Anzahl und Plastizität der MSC zwischen dem 3. und 18. Lebensmonat am größten ist und nachfolgend stark abfällt [135]. Ebenfalls ist die kardiomyozytäre Differenzierbarkeit von bmMSC im Alter reduziert, aber offenbar nicht aufgrund einer reduzierten Plastizität, sondern aufgrund veränderter parakriner Einflüsse [14]. Infolge dessen ließen sich die vorliegenden Ergebnisse, die an jungen Versuchstieren gewonnen haben, nach heutigem Wissenstand nur bedingt auf ältere Patienten übertragen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass die bisher durchgeführten Stammzellstudien noch nicht das volle Potential adulter Stammzellen erfassen konnten. Offenbar ermöglicht erst die Ausschaltung der inflammatorischen Infarktnische den Ansatz einer erfolgreichen Stammzelltherapie. Hierfür wären noch weitere Studien nötig, um die optimale kardiomyozytäre Differenzierungsnische zu finden. Mit einer derart optimierten Stammzelltherapie wäre ein Behandlungserfolg erreichbar, der die Ergebnisse der heutigen Stammzellstudien übertreffen würde.

6 Zusammenfassung / Summary

Trotz aller Bemühungen ist bis heute keine kurative Therapie des abgelaufenen Myokardinfarktes verfügbar. Verschiedene Studien haben darauf hingedeutet, dass die Injektion von Stammzellen das klinische Outcome verbessern kann. Dieses wird jedoch nicht von allen Studien bestätigt, weshalb das Benefit einer Stammzelltherapie kontrovers diskutiert wird.

Ursächlich für die positiven Beobachtungen scheinen jedoch nicht Stammzell-differenzierungen sondern viel mehr parakrine Effekte der transplantierten Zellen zu sein. So zeigten diese *in-vivo*-Studien wider Erwarten keine Wiederherstellung des Myokards, obwohl *in vitro* Stammzellen offenbar in Kardiomyozyten differenzieren können.

Um grundlegend zu klären, in welchem Ausmaß zirkulierende Stammzellen *in vivo* in der kardialen Umgebung differenzieren können, wenn sie keinem pathologischen Milieu ausgesetzt sind, wurde ein Schweinmodell entwickelt. In diesem Modell wurden Membranen im linken Ventrikel und als Kontrolle in der Aorta abdominalis über ein perkutanes Vorgehen implantiert. Aufgrund der speziell konstruierten Membranaufhängung flottierten die Membranen frei im Blutfluss, ohne dabei Kontakt zu den umgebenden Geweben zu bekommen. So konnten lediglich im Blut zirkulierende Zellen auf die Membranen migrieren. Die Membranen wurden nach drei Tagen, zwei, sechs und zwölf Wochen (n=8 Schweine) entnommen und umfassend mittels Real-Time-PCR, Immunhistochemie, Elektronenmikroskopie und In-situ-Hybridisierung untersucht. Einer weiteren Gruppe wurde GM-CSF (10µg/kg KG für sieben Tage, n=8 Schweine) appliziert und die Membranen nach sechs Wochen entnommen.

In den ersten drei Tagen zeigten sich primär Entzündungszellen auf den Membranen. Zeitabhängig kam es zur Zunahme des Gewebedurchmessers, zur Ausbildung einer dichten Innenschicht α SMA^{positiver} Zellen und einer Vimentin^{positiven} Außenschicht. Zum Lumen hin abgeschlossen wurde das Gewebe von einem vWF^{positiven} Monolayer. Durch CD146-Färbungen und Elektronenmikroskopie ließ sich ein ausgeprägtes Kapillarnetzwerk nachweisen. Auf den Membranen konnten Stammzellmarker der hämatopoetischen (CD34 / c-kit) und der mesenchymalen Stammzellreihe (CD44 / Vimentin), sowie von endothelialen Progenitorzellen (CD133 / 146) nachgewiesen werden. Durch die Applikation von GM-CSF konnte eine signifikante Zunahme der Zellproliferation, Stammzellmarkerexpression und Marker früher Kardiomyozyten (GATA4 isoliert im linken Ventrikel) erreicht werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass adulte zirkulierende Schweinestammzellen *in vivo* fähig sind, in kardialer Umgebung vielfältig zu differenzieren und dabei ein fein kapillarisiertes spezialisiertes Gewebe ausbilden. Dieser stammzellvermittelte Prozess ließ sich durch die Injektion von GM-CSF weiter steigern. Die hier erstmals im gesunden Organismus nachgewiesene umfangreiche Stammzellplastizität innerhalb kardialer / vaskulärer Umgebungsnischen spricht daher eindeutig für die Erfolgswahrscheinlichkeit einer Weiterentwicklung regenerativer Therapieansätze durch Stammzellmobilisation und Tissue Engineering.

It is widely known, that circulating stem cells take part in the physiological development after myocardial infarction. In clinical trials differentiation capacity of stem cells were widely used to enhance myocardial infarct therapy. But only little effects were achieved which were mainly explained by cell fusion of arrived stem cells with present, adult myocardial cells or paracrine effects. Cardiomyocytes derived by stem cell differentiation were not observed although *in vitro* experiences showed their cardiomyocyte potential. We suspected the ischemic-necrotic infarct milieu to prevent a more distinct differentiation of circulating stem cells. The aim of the present study was to evaluate this hypothesis and to investigate the physiological differentiation and transdifferentiation potential of circulating stem cells in the healthy cardiac environment. Therefore, we developed an animal model using pigs in which a freely floating membrane was inserted into the left ventricle and the descending aorta by a catheter approach. Membranes were removed after 3 days and 2, 6 and 12 weeks. Another group of pigs was treated with granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; 10µg/kg KG BW) early after implantation. Membranes were removed after 6 weeks. The explanted membranes were evaluated using quantitative RT-PCR, immunohistochemistry and in situ hybridization. Typical markers of hematopoietic stem cells (HSC; CD34 / c-kit) and mesenchymal stem cells (MSC; CD44 / Vimentin) were detected. We demonstrated a time-dependent generation of a fully differentiated tissue composed of fibroblasts, myofibroblasts, smooth muscle cells, endothelial cells and new blood vessels derived by differentiation of homing stem cells. Stem cell mobilization with GM-CSF led to more rapid tissue growth and differentiation. In conclusion circulating stem cells contributed to the development of a fully differentiated tissue on membranes placed within the left ventricle or descending aorta under physiological conditions.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ao-M	Aortale Membran
ASC	adulte Stammzellen
ATSC	adipose-tissue-derived-stromal cells
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BNP	Brain Natriuretic Peptide
bmMSC	Knochenmark-MSC
CCD	Charge-coupled Device
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEC	zirkulierende Endothelzellen
CSC	kardiale Stammzellen
DAPI	4,6-diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DRAQ 5 TM	[1,5-Bis[[2-(dimethylamino)ethyl]amino]-4,8-dihydroxyanthracene-9,10-dion
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix
EF	Ejektionsfraktion
EM	Elektronenmikroskopie
EPC	endotheliale Progenitorzellen
ESC	embryonale Stammzellen
FACS	fluorescence activated cell sorting
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-Stimulierender-Faktor
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor
H ₂ O	Wasser
hCSC	humane, kardiale Stammzellen

HE	Hämalaun-Eosin
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HMGB1	High Mobility Group Protein B1
HSC	hämatopoetische Stammzellen
ISH	In-situ-Hybridisierung
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
LB-Medium	Lysogeny Broth-Medium
LV	Linker Ventrikel
LV-M	Linksventrikuläre Membran
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor
MEK	Methylethylketon
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSC	mesenchymale Stammzellen
n	Anzahl der Tiere einer Versuchsgruppe
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NTMT	Alkalische Phosphatase Puffer
PAS	Periodsäure-Leukofuchsin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PVC	Polyvinylchlorid
qRT-PCR	quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SCF	Stem cell factor
SDS	Natriumlaurylsulfat
SEM	Standard Error of the Mean
SOC-Medium	Super Optimal Broth-Medium
SSC	Standard Salzcitrat

Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepuffert Salzlösung
TBST	Tris-gepuffertes Salz Tween-20
TE	Tissue Engineering
TEA	Triethylamin
ü. N.	über Nacht
UV	Ultra-Violett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vol	Volumen
vWF	von Willebrand Faktor
wt	Gewicht
α SMA	alpha Smooth Muscle Actin

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fremdkörper im nicht implantierten Zustand	- 8 -
Abbildung 2: Lagekontrolle eines Fremdkörpers im linken Ventrikel	- 9 -
Abbildung 3: In-situ-Darstellung eines in den LV implantierten Fremdkörpers.....	- 9 -
Abbildung 4: Abnahme der Stammzellplastizität	- 12 -
Abbildung 5: Differenzierungsschema von mesenchymalen Stammzellen	- 14 -
Abbildung 6: Grundlage der Hämatopoese, modifiziert nach Weissmann [61]	- 15 -
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Studiendesigns	- 30 -
Abbildung 8: histologische Aufarbeitung des Scaffoldsystems	- 49 -
Abbildung 9: Immunfärbung von CD45	- 49 -
Abbildung 10: HE-Färbungen	- 50 -
Abbildung 11: Immunhistologische Lokalisation von BS1 und vWF	- 51 -
Abbildung 12: Immunhistologische Lokalisation von CD146.....	- 51 -
Abbildung 13: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Kapillare.....	- 52 -
Abbildung 14: EM-Vergrößerung einer Kapillarendothelzelle.....	- 52 -
Abbildung 15: Immunhistochemischer Nachweis von Vimentin und α SMA	- 53 -
Abbildung 16: Elektronenmikroskopischer Nachweis von glatten Muskelzellen.....	- 54 -
Abbildung 17: Nachweis von HMGB1 mittels Immunhistologie.....	- 55 -
Abbildung 18: qRT-PCR von CD34	- 56 -
Abbildung 19: qRT-PCR von c-kit	- 57 -
Abbildung 20: In-situ-Hybridisierung mit c-kit spezifischer Sonde	- 58 -
Abbildung 21: Immunhistochemischer Nachweis von CD44 und Vimentin	- 59 -
Abbildung 22: Immunhistochemischer Nachweis von CD44 und CD45	- 60 -
Abbildung 23: Immunhistochemische Kofärbung von CD44 und CD31	- 60 -
Abbildung 24: Immunhistochemische Kofärbung von α SMA und CD44.....	- 61 -
Abbildung 25: Immunfärbung von CD133 und von CD146.....	- 61 -
Abbildung 26: Leukozytenwerte vor und nach Stimulation mit GM-CSF.....	- 62 -
Abbildung 27: qRT-PCR von SCF sechs Wochen GM-CSF und Kontrollgruppe.....	- 63 -
Abbildung 28: qRT-PCR von c-kit sechs Wochen mit GM-CSF und Kontrollgruppe	- 64 -
Abbildung 29: Immunhistochemische Färbung von ki67	- 65 -
Abbildung 30: Anzahl der ki67positiven Zellen (in Prozent)	- 65 -
Abbildung 31: qRT-PCR von GATA4 mit und ohne GM-CSF.....	- 66 -
Abbildung 32: Durchmesser des Gewebes der GM-CSF Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe	- 67 -

9 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Marker der MSC</i>	- 13 -
<i>Tabelle 2: Marker der HSC</i>	- 16 -
<i>Tabelle 3: Marker und Plastizität bisher bekannter kardialer Stammzelle</i>	- 19 -
<i>Tabelle 4: Stammzellmobilisation</i>	- 22 -
<i>Tabelle 5: Färbeprotokoll für die Immunhistochemie</i>	- 42 -
<i>Tabelle 6: Zusammenfassung über die nachgewiesenen Zelltypen</i>	- 68 -
<i>Tabelle 7: verwendete Medikamente</i>	- 101 -
<i>Tabelle 8: verwendete OP-Geräte</i>	- 101 -
<i>Tabelle 9: verwendete OP-Verbrauchsmaterialien</i>	- 102 -
<i>Tabelle 10: für die Fremdkörper verwendete Materialien</i>	- 102 -
<i>Tabelle 11: Laborgeräte</i>	- 103 -
<i>Tabelle 12: Laborverbrauchsmaterialien</i>	- 104 -
<i>Tabelle 13: Molekularbiologische, immunologische und Färbungs-Kits</i>	- 104 -
<i>Tabelle 14: Enzyme</i>	- 105 -
<i>Tabelle 15: Oligonukleotide / Primer</i>	- 105 -
<i>Tabelle 16: Reagenzien und Chemikalien</i>	- 106 -
<i>Tabelle 17: Antikörper</i>	- 107 -
<i>Tabelle 18: Puffer und Lösungen</i>	- 108 -
<i>Tabelle 19: EDV-Programme</i>	- 108 -
<i>Tabelle 20: Bakterien und Vektoren</i>	- 109 -

10 Literaturverzeichnis

1. Turan, R.G., et al., *Improved functional activity of bone marrow derived circulating progenitor cells after intra coronary freshly isolated bone marrow cells transplantation in patients with ischemic heart disease*. Stem Cell Rev. 7(3): p. 646-56.
2. Deten, A., et al., *Hematopoietic stem cells do not repair the infarcted mouse heart*. Cardiovasc Res, 2005. 65(1): p. 52-63.
3. Schneider, C., et al., *Transplantation of bone marrow-derived stem cells improves myocardial diastolic function: strain rate imaging in a model of hibernating myocardium*. J Am Soc Echocardiogr, 2009. 22(10): p. 1180-9.
4. Beltrami, A.P., et al., *Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration*. Cell, 2003. 114(6): p. 763-76.
5. Vrijisen, K., et al., *Stem cell therapy for end-stage heart failure: indispensable role for the cell?* Curr Opin Organ Transplant, 2009.
6. Fukuda, K., *Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering*. Artif Organs, 2001. 25(3): p. 187-93.
7. Au, P., et al., *Small blood vessel engineering*. Methods Mol Med, 2007. 140: p. 183-95.
8. Elsasser, A., et al., *Transcatheter closure of a ruptured ventricular septum after myocardial infarction using a venous approach*. Z Kardiol, 2005. 94(10): p. 684-9.
9. Mollmann, H., et al., *Images in cardiovascular medicine. Natural tissue engineering inside a ventricular septum defect occluder*. Circulation, 2006. 113(16): p. e718-9.
10. Allender, P., *European Cardiovascular Disease Statistics 2008 Edition*. 2008.
11. Jessup, M. and S. Brozena, *Heart failure*. N Engl J Med, 2003. 348(20): p. 2007-18.
12. Bujak, M. and N.G. Frangogiannis, *The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling*. Cardiovasc Res, 2007. 74(2): p. 184-95.
13. Beltrami, A.P., et al., *Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction*. N Engl J Med, 2001. 344(23): p. 1750-7.
14. Morrison, S.J., N.M. Shah, and D.J. Anderson, *Regulatory mechanisms in stem cell biology*. Cell, 1997. 88(3): p. 287-98.
15. Graf, T., *Differentiation plasticity of hematopoietic cells*. Blood, 2002. 99(9): p. 3089-101.
16. Hennessy, B., M. Korbling, and Z. Estrov, *Circulating stem cells and tissue repair*. Panminerva Med, 2004. 46(1): p. 1-11.
17. Mansilla, E., et al., *Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine*. Transplant Proc, 2006. 38(3): p. 967-9.
18. Mendez-Ferrer, S., et al., *Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations*. Nature, 2008. 452(7186): p. 442-7.
19. McKinney-Freeman, S. and M.A. Goodell, *Circulating hematopoietic stem cells do not efficiently home to bone marrow during homeostasis*. Exp Hematol, 2004. 32(9): p. 868-76.
20. Messina, E., et al., *Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart*. Circ Res, 2004. 95(9): p. 911-21.
21. Laugwitz, K.L., et al., *Postnatal isll+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages*. Nature, 2005. 433(7026): p. 647-53.

22. Khmelewski, E., et al., *Tissue resident cells play a dominant role in arteriogenesis and concomitant macrophage accumulation*. *Circ Res*, 2004. 95(6): p. E56-64.
23. Malouf, N.N., et al., *Adult-derived stem cells from the liver become myocytes in the heart in vivo*. *Am J Pathol*, 2001. 158(6): p. 1929-35.
24. Dome, B., et al., *Circulating endothelial cells, bone marrow-derived endothelial progenitor cells and proangiogenic hematopoietic cells in cancer: From biology to therapy*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2009. 69(2): p. 108-24.
25. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. *Cell*, 2006. 126(4): p. 663-76.
26. Pedemonte, E., et al., *The molecular signature of therapeutic mesenchymal stem cells exposes the architecture of the hematopoietic stem cell niche synapse*. *BMC Genomics*, 2007. 8: p. 65.
27. Brunt, K.R., et al., *Endothelial progenitor cell and mesenchymal stem cell isolation, characterization, viral transduction*. *Methods Mol Med*, 2007. 139: p. 197-210.
28. Markov, V., et al., *Identification of cord blood-derived mesenchymal stem/stromal cell populations with distinct growth kinetics, differentiation potentials, and gene expression profiles*. *Stem Cells Dev*, 2007. 16(1): p. 53-73.
29. Erices, A.A., et al., *Human cord blood-derived mesenchymal stem cells home and survive in the marrow of immunodeficient mice after systemic infusion*. *Cell Transplant*, 2003. 12(6): p. 555-61.
30. Battula, V.L., et al., *Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation*. *Differentiation*, 2007. 75(4): p. 279-91.
31. Jo, Y.Y., et al., *Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues*. *Tissue Eng*, 2007. 13(4): p. 767-73.
32. Lee, R.H., et al., *Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue*. *Cell Physiol Biochem*, 2004. 14(4-6): p. 311-24.
33. Ukai, R., et al., *Mesenchymal stem cells derived from peripheral blood protects against ischemia*. *J Neurotrauma*, 2007. 24(3): p. 508-20.
34. Jin, J.G., et al., *[The effect of MSC on cytokine production by naive T cell differentiated in vitro]*. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 2005. 26(6): p. 339-41.
35. Luan, X.Y., et al., *[Effects of MSC on cell cycle, phenotype and cytokine secretion of T cells activated by PHA]*. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2007. 23(5): p. 402-5.
36. Caplan, A.I., *Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine*. *J Cell Physiol*, 2007. 213(2): p. 341-347.
37. Stolzing, A., et al., *Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies*. *Mech Ageing Dev*, 2008. 129(3): p. 163-73.
38. Rochefort, G.Y., et al., *Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia*. *Stem Cells*, 2006. 24(10): p. 2202-8.
39. Tropel, P., et al., *Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow*. *Exp Cell Res*, 2004. 295(2): p. 395-406.
40. Kassis, I., et al., *Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads*. *Bone Marrow Transplant*, 2006. 37(10): p. 967-76.
41. Battula, V.L., et al., *Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1 (MSCA-1)*. *Haematologica*, 2008.

42. Sato, T., et al., *Coronary vein infusion of multipotent stromal cells from bone marrow preserves cardiac function in swine ischemic cardiomyopathy via enhanced neovascularization*. *Lab Invest*, 1991. 91(4): p. 553-64.
43. Buhring, H.J., et al., *Novel markers for the prospective isolation of human MSC*. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. 1106: p. 262-71.
44. Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. *Tissue Eng*, 2001. 7(2): p. 211-28.
45. Young, H.E., et al., *Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors*. *Anat Rec*, 2001. 264(1): p. 51-62.
46. Erices, A., P. Conget, and J.J. Minguell, *Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood*. *Br J Haematol*, 2000. 109(1): p. 235-42.
47. Gronthos, S., et al., *Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells*. *J Cell Physiol*, 2001. 189(1): p. 54-63.
48. Alviano, F., et al., *Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro*. *BMC Dev Biol*, 2007. 7: p. 11.
49. Gang, E.J., et al., *Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood*. *Stem Cells*, 2004. 22(4): p. 617-24.
50. Forte, G., et al., *Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration, and differentiation*. *Stem Cells*, 2006. 24(1): p. 23-33.
51. Strem, B.M., et al., *Expression of cardiomyocytic markers on adipose tissue-derived cells in a murine model of acute myocardial injury*. *Cytotherapy*, 2005. 7(3): p. 282-91.
52. Majumdar, M.K., et al., *Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages*. *J Hematother Stem Cell Res*, 2000. 9(6): p. 841-8.
53. Li, N., et al., *Human mesenchymal stem cells improve ex vivo expansion of adult human CD34+ peripheral blood progenitor cells and decrease their allostimulatory capacity*. *Exp Hematol*, 2007. 35(3): p. 507-15.
54. Nakanishi, C., et al., *Activation of cardiac progenitor cells through paracrine effects of mesenchymal stem cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. 374(1): p. 11-6.
55. Wang, Y., et al., *Nitric oxide suppresses the secretion of vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor from human mesenchymal stem cells*. *Shock*, 2008. 30(5): p. 527-31.
56. Li, L., et al., *Paracrine action mediate the antifibrotic effect of transplanted mesenchymal stem cells in a rat model of global heart failure*. *Mol Biol Rep*, 2009. 36(4): p. 725-31.
57. Chen, L., et al., *Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing*. *PLoS ONE*, 2008. 3(4): p. e1886.
58. Bradfute, S.B., T.A. Graubert, and M.A. Goodell, *Roles of Sca-1 in hematopoietic stem/progenitor cell function*. *Exp Hematol*, 2005. 33(7): p. 836-43.
59. Tavassoli, M., *Studies on hemopoietic microenvironments. Report of a workshop held in La Jolla, California, August 8-9, 1974*. *Exp Hematol*, 1975. 3(4): p. 213-26.
60. Wolf, N.S., *The haemopoietic microenvironment*. *Clin Haematol*, 1979. 8(2): p. 469-500.
61. Dib, N., et al., *Safety and feasibility of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy: four-year follow-up*. *Circulation*, 2005. 112(12): p. 1748-55.

62. Roybon, L., et al., *Failure of transdifferentiation of adult hematopoietic stem cells into neurons*. Stem Cells, 2006. 24(6): p. 1594-604.
63. Le Guern, A.C., et al., *Stem cell activity of porcine c-kit⁺ hematopoietic cells*. Exp Hematol, 2003. 31(9): p. 833-40.
64. Okuno, Y., et al., *Differential regulation of the human and murine CD34 genes in hematopoietic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(9): p. 6246-51.
65. Lynch, L., et al., *Detection and characterization of hemopoietic stem cells in the adult human small intestine*. J Immunol, 2006. 176(9): p. 5199-204.
66. Norol, F., et al., *GFP-transduced CD34⁺ and Lin⁻ CD34⁻ hematopoietic stem cells did not adopt a cardiac phenotype in a nonhuman primate model of myocardial infarct*. Exp Hematol, 2007. 35(4): p. 653-61.
67. Fehse, B., et al., *CD34 splice variant: an attractive marker for selection of gene-modified cells*. Mol Ther, 2000. 1(5 Pt 1): p. 448-56.
68. Krause, D.S., et al., *CD34: structure, biology, and clinical utility*. Blood, 1996. 87(1): p. 1-13.
69. Lanza, F., L. Healy, and D.R. Sutherland, *Structural and functional features of the CD34 antigen: an update*. J Biol Regul Homeost Agents, 2001. 15(1): p. 1-13.
70. Nakauchi, H., et al., *Further characterization of CD34-low/negative mouse hematopoietic stem cells*. Ann N Y Acad Sci, 1999. 872: p. 57-66; discussion 66-70.
71. Osawa, M., et al., *Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell*. Science, 1996. 273(5272): p. 242-5.
72. Lange, C., et al., *CD34 modulates the trafficking behavior of hematopoietic cells in vivo*. Stem Cells Dev, 2007. 16(2): p. 297-304.
73. Sato, T., J.H. Laver, and M. Ogawa, *Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells*. Blood, 1999. 94(8): p. 2548-54.
74. Ogawa, M., et al., *Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells*. J Exp Med, 1991. 174(1): p. 63-71.
75. Driessen, R.L., H.M. Johnston, and S.K. Nilsson, *Membrane-bound stem cell factor is a key regulator in the initial lodgment of stem cells within the endosteal marrow region*. Exp Hematol, 2003. 31(12): p. 1284-91.
76. Li, M., et al., *c-kit Is Required for Cardiomyocyte Terminal Differentiation*. Circ Res, 2008.
77. Flanagan, J.G., D.C. Chan, and P. Leder, *Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the Sld mutant*. Cell, 1991. 64(5): p. 1025-35.
78. Broudy, V.C., et al., *Interaction of stem cell factor and its receptor c-kit mediates lodgment and acute expansion of hematopoietic cells in the murine spleen*. Blood, 1996. 88(1): p. 75-81.
79. Bodine, D.M., et al., *In vivo administration of stem cell factor to mice increases the absolute number of pluripotent hematopoietic stem cells*. Blood, 1993. 82(2): p. 445-55.
80. Harrison, D.E., K.M. Zsebo, and C.M. Astle, *Splenic primitive hematopoietic stem cell (PHSC) activity is enhanced by steel factor because of PHSC proliferation*. Blood, 1994. 83(11): p. 3146-51.
81. Lutz, M., et al., *Local injection of stem cell factor (SCF) improves myocardial homing of systemically delivered c-kit + bone marrow-derived stem cells*. Cardiovasc Res, 2008. 77(1): p. 143-50.
82. Lin, F., et al., *Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice*. J Am Soc Nephrol, 2003. 14(5): p. 1188-99.

83. Koshizuka, S., et al., *Transplanted hematopoietic stem cells from bone marrow differentiate into neural lineage cells and promote functional recovery after spinal cord injury in mice*. J Neuropathol Exp Neurol, 2004. 63(1): p. 64-72.
84. Ramirez, M.L., et al., *Lack of cardiac differentiation in c-kit-enriched porcine bone marrow and spleen hematopoietic cell cultures using 5-azacytidine*. Cells Tissues Organs, 2005. 180(4): p. 195-203.
85. Lansdorp, P.M., et al., *Age-related decline in proliferative potential of purified stem cell candidates*. Blood Cells, 1994. 20(2-3): p. 376-80; discussion 380-1.
86. Wagner, W., et al., *Aging of hematopoietic stem cells is regulated by the stem cell niche*. Exp Gerontol, 2008. 43(11): p. 974-80.
87. Oh, H., et al., *Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(21): p. 12313-8.
88. Matsuura, K., et al., *Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes*. J Biol Chem, 2004. 279(12): p. 11384-91.
89. Torella, D., et al., *Resident cardiac stem cells*. Cell Mol Life Sci, 2007. 64(6): p. 661-73.
90. Torella, D., et al., *Resident human cardiac stem cells: role in cardiac cellular homeostasis and potential for myocardial regeneration*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2006. 3 Suppl 1: p. S8-13.
91. Thiele, J., et al., *Mixed chimerism of cardiomyocytes and vessels after allogeneic bone marrow and stem-cell transplantation in comparison with cardiac allografts*. Transplantation, 2004. 77(12): p. 1902-5.
92. Urbanek, K., et al., *Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(18): p. 10440-5.
93. Urbanek, K., et al., *Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(24): p. 8692-7.
94. Pfister, O., et al., *CD31- but Not CD31+ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation*. Circ Res, 2005. 97(1): p. 52-61.
95. Tomita, Y., et al., *Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart*. J Cell Biol, 2005. 170(7): p. 1135-46.
96. Fernandes, S., et al., *Autologous myoblast transplantation after myocardial infarction increases the inducibility of ventricular arrhythmias*. Cardiovasc Res, 2006. 69(2): p. 348-58.
97. Abkowitz, J.L., et al., *Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure*. Blood, 2003. 102(4): p. 1249-53.
98. Wright, D.E., et al., *Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells*. Science, 2001. 294(5548): p. 1933-6.
99. Paczkowska, E., et al., *Human hematopoietic stem/progenitor-enriched CD34(+) cells are mobilized into peripheral blood during stress related to ischemic stroke or acute myocardial infarction*. Eur J Haematol, 2005. 75(6): p. 461-7.
100. Van Craenenbroeck, E.M., et al., *A maximal exercise bout increases the number of circulating CD34+/KDR+ endothelial progenitor cells in healthy subjects. Relation with lipid profile*. J Appl Physiol, 2008. 104(4): p. 1006-13.
101. Wollert, K.C., et al., *Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial*. Lancet, 2004. 364(9429): p. 141-8.
102. Mollmann, H., et al., *Stem cells in myocardial infarction: from bench to bedside*. Heart, 2009. 95(6): p. 508-14.

103. Formigli, L., et al., *Morphofunctional integration between skeletal myoblasts and adult cardiomyocytes in coculture is favored by direct cell-cell contacts and relaxin treatment*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. 288(4): p. C795-804.
104. Schachinger, V., et al., *Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial*. J Am Coll Cardiol, 2004. 44(8): p. 1690-9.
105. Meyer, G.P., et al., *Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial*. Circulation, 2006. 113(10): p. 1287-94.
106. Forrester, J.S., M.J. Price, and R.R. Makkar, *Stem cell repair of infarcted myocardium: an overview for clinicians*. Circulation, 2003. 108(9): p. 1139-45.
107. Sheikh, A.Y., et al., *Molecular imaging of bone marrow mononuclear cell homing and engraftment in ischemic myocardium*. Stem Cells, 2007. 25(10): p. 2677-84.
108. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. 29(9): p. e45.
109. Kehat, I., et al., *Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2004. 22(10): p. 1282-9.
110. Xue, T., et al., *Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes: insights into the development of cell-based pacemakers*. Circulation, 2005. 111(1): p. 11-20.
111. Kuhlmann, M.T., et al., *G-CSF/SCF reduces inducible arrhythmias in the infarcted heart potentially via increased connexin43 expression and arteriogenesis*. J Exp Med, 2006. 203(1): p. 87-97.
112. Gibson, C.L., P.M. Bath, and S.P. Murphy, *G-CSF reduces infarct volume and improves functional outcome after transient focal cerebral ischemia in mice*. J Cereb Blood Flow Metab, 2005. 25(4): p. 431-9.
113. Harada, M., et al., *G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes*. Nat Med, 2005. 11(3): p. 305-11.
114. Fukuhara, S., et al., *G-CSF promotes bone marrow cells to migrate into infarcted mice heart, and differentiate into cardiomyocytes*. Cell Transplant, 2004. 13(7-8): p. 741-8.
115. Takano, H., et al., *Effects of G-CSF on left ventricular remodeling and heart failure after acute myocardial infarction*. J Mol Med, 2006. 84(3): p. 185-93.
116. Winkler, I.G. and J.P. Levesque, *Mechanisms of hematopoietic stem cell mobilization: when innate immunity assails the cells that make blood and bone*. Exp Hematol, 2006. 34(8): p. 996-1009.
117. Siena, S., et al., *Therapeutic relevance of CD34 cell dose in blood cell transplantation for cancer therapy*. J Clin Oncol, 2000. 18(6): p. 1360-77.
118. Klingebiel, T., et al., *Autologous transplantation with peripheral blood stem cells in children and young adults after myeloablative treatment: nonrandomized comparison between GM-CSF and G-CSF for mobilization*. J Hematother, 1995. 4(4): p. 307-14.
119. Roberts, A.W., et al., *Broad inter-individual variations in circulating progenitor cell numbers induced by granulocyte colony-stimulating factor therapy*. Stem Cells, 1995. 13(5): p. 512-6.
120. Duan, D., et al., *Mobilization efficiency of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor to bone marrow mononuclear cells and mechanisms*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 30(4): p. 477-81.
121. Takahashi, T., et al., *Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization*. Nat Med, 1999. 5(4): p. 434-8.

122. Tatsumi, K., et al., *Granulocyte-colony stimulating factor increases donor mesenchymal stem cells in bone marrow and their mobilization into peripheral circulation but does not repair dystrophic heart after bone marrow transplantation*. *Circ J*, 2008. 72(8): p. 1351-8.
123. Shake, J.G., et al., *Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects*. *Ann Thorac Surg*, 2002. 73(6): p. 1919-25; discussion 1926.
124. Yang, Z.J., et al., *Neovascularization and cardiomyocytes regeneration in acute myocardial infarction after bone marrow stromal cell transplantation: comparison of infarct-relative and noninfarct-relative arterial approaches in swine*. *Clin Chim Acta*, 2007. 381(2): p. 114-8.
125. Dawn, B., et al., *Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(10): p. 3766-71.
126. Menasche, P., *Myoblast-based cell transplantation*. *Heart Fail Rev*, 2003. 8(3): p. 221-7.
127. Leor, J., et al., *Human embryonic stem cell transplantation to repair the infarcted myocardium*. *Heart*, 2007. 93(10): p. 1278-84.
128. Miyahara, Y., et al., *Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction*. *Nat Med*, 2006. 12(4): p. 459-65.
129. Terada, N., et al., *Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion*. *Nature*, 2002. 416(6880): p. 542-5.
130. Ying, Q.L., et al., *Changing potency by spontaneous fusion*. *Nature*, 2002. 416(6880): p. 545-8.
131. Vazquez, M.E., et al., *Cellular cardiomyoplasty: development of a technique to culture human myoblasts for clinical transplantation*. *Cell Tissue Bank*, 2005. 6(2): p. 117-24.
132. Min, J.Y., et al., *Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats*. *J Appl Physiol*, 2002. 92(1): p. 288-96.
133. Menasche, P., et al., *The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation*. *Circulation*, 2008. 117(9): p. 1189-200.
134. Assmus, B., et al., *Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI)*. *Circulation*, 2002. 106(24): p. 3009-17.
135. Schachinger, V., et al., *Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial*. *Eur Heart J*, 2006. 27(23): p. 2775-83.
136. Ikada, Y., *Challenges in tissue engineering*. *J R Soc Interface*, 2006. 3(10): p. 589-601.
137. Walker, M.R., K.K. Patel, and T.S. Stappenbeck, *The stem cell niche*. *J Pathol*, 2009. 217(2): p. 169-80.
138. Kopp, H.G., et al., *The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization*. *Physiology (Bethesda)*, 2005. 20: p. 349-56.
139. Jaiswal, R.K., et al., *Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase*. *J Biol Chem*, 2000. 275(13): p. 9645-52.
140. Ringe, J., et al., *Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages*. *Cell Tissue Res*, 2002. 307(3): p. 321-7.

141. Vacanti, C.A. and J. Upton, *Tissue-engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices*. Clin Plast Surg, 1994. 21(3): p. 445-62.
142. Shenaq, S.M. and E. Yuksel, *New research in breast reconstruction: adipose tissue engineering*. Clin Plast Surg, 2002. 29(1): p. 111-25, vi.
143. Evans, G.R., *Approaches to tissue engineered peripheral nerve*. Clin Plast Surg, 2003. 30(4): p. 559-63, viii.
144. Chalfoun, C.T., G.A. Wirth, and G.R. Evans, *Tissue engineered nerve constructs: where do we stand?* J Cell Mol Med, 2006. 10(2): p. 309-17.
145. Grikscheit, T.C., et al., *Tissue-engineered large intestine resembles native colon with appropriate in vitro physiology and architecture*. Ann Surg, 2003. 238(1): p. 35-41.
146. Larouche, D., et al., *Regeneration of skin and cornea by tissue engineering*. Methods Mol Biol, 2009. 482: p. 233-56.
147. Flanagan, T.C., et al., *The in vitro development of autologous fibrin-based tissue-engineered heart valves through optimised dynamic conditioning*. Biomaterials, 2007. 28(23): p. 3388-97.
148. Mol, A., et al., *Autologous human tissue-engineered heart valves: prospects for systemic application*. Circulation, 2006. 114(1 Suppl): p. I152-8.
149. Steinhoff, G., et al., *Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue*. Circulation, 2000. 102(19 Suppl 3): p. III50-5.
150. Jockenhoevel, S., et al., *Tissue engineering: complete autologous valve conduit--a new moulding technique*. Thorac Cardiovasc Surg, 2001. 49(5): p. 287-90.
151. Schmelter, M., et al., *Embryonic stem cells utilize reactive oxygen species as transducers of mechanical strain-induced cardiovascular differentiation*. Faseb J, 2006. 20(8): p. 1182-4.
152. Morrison, W.A., *Progress in tissue engineering of soft tissue and organs*. Surgery, 2009. 145(2): p. 127-30.
153. Luttkhuizen, D.T., M.C. Harmsen, and M.J. Van Luyn, *Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction*. Tissue Eng, 2006. 12(7): p. 1955-70.
154. Honma, T. and T. Hamasaki, *Ultrastructure of multinucleated giant cell apoptosis in foreign-body granuloma*. Virchows Arch, 1996. 428(3): p. 165-76.
155. Anderson, J.M., A. Rodriguez, and D.T. Chang, *Foreign body reaction to biomaterials*. Semin Immunol, 2008. 20(2): p. 86-100.
156. Luttkhuizen, D.T., et al., *The correlation between difference in foreign body reaction between implant locations and cytokine and MMP expression*. Biomaterials, 2006. 27(34): p. 5763-70.
157. Ausubel, M.F., Brentt, R., Kingston, R., E., Moore, D., D., Seidman, J., G., Smith, J., A., Struhl, K., *Current Protocols In Molecular Biology*. Vol. 1. 2007: John Wiley & Sons, Inc.
158. Institute of Laboratory Animal Resources (U.S.). *Guide for the care and use of laboratory animals*. 1996; [7th:[xii, 125 p.]. Available from: <http://www.nap.edu/catalog/5140.html#toc> Connect to 1996
159. Hayashi, S., et al., *Acetylation of chromosome squashes of Drosophila melanogaster decreases the background in autoradiographs from hybridization with [125I]-labeled RNA*. J Histochem Cytochem, 1978. 26(8): p. 677-9.
160. Mollmann, H., et al., *Stem cell-mediated natural tissue engineering*. J Cell Mol Med, 2009.
161. Christen, T., et al., *Mechanisms of neointima formation and remodeling in the porcine coronary artery*. Circulation, 2001. 103(6): p. 882-8.

162. Kumar, A.H., et al., *Bone marrow-derived CX3CR1 progenitors contribute to neointimal smooth muscle cells via fractalkine CX3CR1 interaction*. *Faseb J.* 24(1): p. 81-92.
163. Research, I.F.L.A., *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 1996.
164. Pardue, E.L., S. Ibrahim, and A. Ramamurthi, *Role of hyaluronan in angiogenesis and its utility to angiogenic tissue engineering*. *Organogenesis*, 2008. 4(4): p. 203-14.
165. Schrans-Stassen, B.H., et al., *Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia*. *Endocrinology*, 1999. 140(12): p. 5894-900.
166. Dooner, G.J., et al., *Gene expression fluctuations in murine hematopoietic stem cells with cell cycle progression*. *J Cell Physiol*, 2008. 214(3): p. 786-95.
167. Danet, G.H., et al., *Dissociation between stem cell phenotype and NOD/SCID repopulating activity in human peripheral blood CD34(+) cells after ex vivo expansion*. *Exp Hematol*, 2001. 29(12): p. 1465-73.
168. Torihashi, S., S.M. Ward, and K.M. Sanders, *Development of c-Kit-positive cells and the onset of electrical rhythmicity in murine small intestine*. *Gastroenterology*, 1997. 112(1): p. 144-55.
169. Moscoso, I., et al., *Differentiation "in vitro" of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cell transplantation*. *Transplant Proc*, 2005. 37(1): p. 481-2.
170. Perin, E.C., et al., *A randomized study of transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells and cell function analysis in ischemic heart failure (FOCUS-HF)*. *Am Heart J.* 161(6): p. 1078-87 e3.
171. Nieminen, M., et al., *Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration*. *Nat Cell Biol*, 2006. 8(2): p. 156-62.
172. Williams, A.R., et al., *Intramyocardial stem cell injection in patients with ischemic cardiomyopathy: functional recovery and reverse remodeling*. *Circ Res.* 108(7): p. 792-6.
173. Guilak, F., et al., *Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix*. *Cell Stem Cell*, 2009. 5(1): p. 17-26.
174. Sata, M., et al., *Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis*. *Nat Med*, 2002. 8(4): p. 403-9.
175. Pesce, M., A. Di Carlo, and M. De Felici, *The c-kit receptor is involved in the adhesion of mouse primordial germ cells to somatic cells in culture*. *Mech Dev*, 1997. 68(1-2): p. 37-44.
176. Lapidot, T., A. Dar, and O. Kollet, *How do stem cells find their way home?* *Blood*, 2005. 106(6): p. 1901-10.
177. Nakamura, Y., et al., *Soluble c-kit receptor mobilizes hematopoietic stem cells to peripheral blood in mice*. *Exp Hematol*, 2004. 32(4): p. 390-6.
178. Matsui, J., et al., *Stem cell factor/c-kit signaling promotes the survival, migration, and capillary tube formation of human umbilical vein endothelial cells*. *J Biol Chem*, 2004. 279(18): p. 18600-7.
179. Palumbo, R., et al., *Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation*. *J Cell Biol*, 2004. 164(3): p. 441-9.
180. Rossini, A., et al., *HMGB1-stimulated human primary cardiac fibroblasts exert a paracrine action on human and murine cardiac stem cells*. *J Mol Cell Cardiol*, 2008. 44(4): p. 683-93.
181. Lolmede, K., et al., *Inflammatory and alternatively activated human macrophages attract vessel-associated stem cells, relying on separate HMGB1- and MMP-9-dependent pathways*. *J Leukoc Biol*, 2009.
182. Palumbo, R., et al., *Cells migrating to sites of tissue damage in response to the danger signal HMGB1 require NF-kappaB activation*. *J Cell Biol*, 2007. 179(1): p. 33-40.

183. Gong, Z., et al., *Influence of Culture Medium on Smooth Muscle Cell Differentiation from Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells*. Tissue Eng Part A, 2008.
184. Gong, Z. and L.E. Niklason, *Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs)*. Faseb J, 2008. 22(6): p. 1635-48.
185. Mirza, A., et al., *Undifferentiated mesenchymal stem cells seeded on a vascular prosthesis contribute to the restoration of a physiologic vascular wall*. J Vasc Surg, 2008. 47(6): p. 1313-21.
186. Wang, T., et al., *Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell*. Int J Cardiol, 2006. 109(1): p. 74-81.
187. Orlandi, A., et al., *Stem cell marker expression and proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells*. Cell Cycle, 2008. 7(24): p. 3889-97.
188. Fujita, J., et al., *Administration of granulocyte colony-stimulating factor after myocardial infarction enhances the recruitment of hematopoietic stem cell-derived myofibroblasts and contributes to cardiac repair*. Stem Cells, 2007. 25(11): p. 2750-9.
189. Hallberg, D., et al., *Donor-derived myofibroblasts in the ocular surface after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation*. Acta Ophthalmol Scand, 2006. 84(6): p. 774-80.
190. Hoerstrup, S.P., et al., *Tissue engineering of functional trileaflet heart valves from human marrow stromal cells*. Circulation, 2002. 106(12 Suppl 1): p. I143-50.
191. Yue, W.M., et al., *Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, reduce neointimal formation, and enhance endothelial function in a rat vein grafting model*. Stem Cells Dev, 2008. 17(4): p. 785-93.
192. Bailey, A.S., et al., *Transplanted adult hematopoietic stems cells differentiate into functional endothelial cells*. Blood, 2004. 103(1): p. 13-9.
193. Rookmaaker, M.B., et al., *Endothelial progenitor cells: mainly derived from the monocyte/macrophage-containing CD34- mononuclear cell population and only in part from the hematopoietic stem cell-containing CD34+ mononuclear cell population*. Circulation, 2003. 108(21): p. e150; author reply e150.
194. Zeng, L., et al., *Endothelial injury, an intriguing effect of methotrexate and cyclophosphamide during hematopoietic stem cell transplantation in mice*. Transplant Proc, 2008. 40(8): p. 2670-3.
195. Avci-Adali, M., et al., *Porcine EPCs downregulate stem cell markers and upregulate endothelial maturation markers during in vitro cultivation*. J Tissue Eng Regen Med, 2009.
196. Liu, J., et al., *Down-regulation of CD44 contributes to the differentiation of HL-60 cells induced by ATRA or HMBA*. Cell Mol Immunol, 2007. 4(1): p. 59-63.
197. Ghajar, C.M., et al., *Mesenchymal stem cells enhance angiogenesis in mechanically viable prevascularized tissues via early matrix metalloproteinase upregulation*. Tissue Eng, 2006. 12(10): p. 2875-88.
198. Zacharek, A., et al., *Angiopoietin1/Tie2 and VEGF/Flk1 induced by MSC treatment amplifies angiogenesis and vascular stabilization after stroke*. J Cereb Blood Flow Metab, 2007. 27(10): p. 1684-91.
199. Steward, W.P., et al., *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) after high-dose melphalan in patients with advanced colon cancer*. Br J Cancer, 1990. 61(5): p. 749-54.
200. Sohn, S.K., et al., *GM-CSF-based mobilization effect in normal healthy donors for allogeneic peripheral blood stem cell transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2002. 30(2): p. 81-6.

201. Deng, Z., et al., *Effects of GM-CSF on the stem cells mobilization and plasma C-reactive protein levels in patients with acute myocardial infarction*. Int J Cardiol, 2006. 113(1): p. 92-6.
202. Burgess, A.W. and D. Metcalf, *Serum half-life and organ distribution of radiolabeled colony stimulating factor in mice*. Exp Hematol, 1977. 5(6): p. 456-64.
203. Sacramento, C.B., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene based therapy for acute limb ischemia in a mouse model*. J Gene Med, 2009. 11(4): p. 345-53.
204. Orlic, D., et al., *Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(18): p. 10344-9.
205. Misao, Y., et al., *Importance of recruitment of bone marrow-derived CXCR4+ cells in post-infarct cardiac repair mediated by G-CSF*. Cardiovasc Res, 2006. 71(3): p. 455-65.
206. Schuleri, K.H., et al., *Autologous mesenchymal stem cells produce reverse remodelling in chronic ischaemic cardiomyopathy*. Eur Heart J, 2009. 30(22): p. 2722-32.
207. Zhou, Q., et al., *A novel vascularized patch enhances cell survival and modifies ventricular remodeling in a rat myocardial infarction model*. J Thorac Cardiovasc Surg. 140(6): p. 1388-96 e1-3.
208. Blebea, J.S., et al., *Structural and functional imaging of normal bone marrow and evaluation of its age-related changes*. Semin Nucl Med, 2007. 37(3): p. 185-94.
209. Garvin, K., et al., *Does the number or quality of pluripotent bone marrow stem cells decrease with age?* Clin Orthop Relat Res, 2007. 465: p. 202-7.
210. Flanagan, T.C., et al., *In vivo remodeling and structural characterization of fibrin-based tissue-engineered heart valves in the adult sheep model*. Tissue Eng Part A, 2009. 15(10): p. 2965-76.
211. Zhang, N., et al., *Blood-borne stem cells differentiate into vascular and cardiac lineages during normal development*. Stem Cells Dev, 2006. 15(1): p. 17-28.

11 Anhang

11.1 Operatives Zubehör

11.1.1 Medikamente

Medikament	Hersteller
Acetylsalicylsäure (ASS-ratiopharm® 100 mg TAH)	Ratiopharm GmbH, Ulm
Azaperon (Stresnil®)	Janssen-Cilag, Neuss
Cefquinom (Cobactan® 2,5%ig)	Intervet GmbH, Unterschleißheim
Cephazolin (2 g)	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg
Clopidogrel (Plavix® 75 mg)	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt a.M.
Fentanyl (Durogesic® 25 µg/h)	Janssen-Cilag GmbH, Neuss
GM-CSF (rekombinantes-Schweine-GM-CSF, Kat.Nr. PSC2011)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Heparin-Natrium (Liquemin® N 25000)	Hoffman-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen
Iomeprol (Imeron® 350)	Bracco Altana Pharma GmbH, Konstanz
Isotone Kochsalzlösung (0,9%ig)	B. Braun AG, Melsungen
Kaliumchlorid (1 M)	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg
Ketaminhydrochlorid (Ketamin® 10%ig)	Medistar GmbH, Holzwickede
Midazolam	Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe
Pancuroniumbromid (Pancuronium duplex®)	Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe
Pritramid (Dipidolor®)	Janssen-Cilag GmbH, Neuss
Propofol (2%ig)	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg
Thiopental-Natrium (Trapanal® 2,5 g)	Altana Pharma GmbH, Konstanz

Tabelle 7: verwendete Medikamente

11.1.2 Geräte

Gerät	Hersteller (Typ)
Beatmungsgerät	Dräger Medical GmbH, Lübeck (Oxylog 3000)
C-Bogen	Siemens AG, München (Siremobil Compact)
Elektrokauter	Bovie Medical Corp., St. Petersburg, Russland (Aaron 1250™)
Kapnograph mit Pulsoximeter	Medlab GmbH, Karlsruhe (Capnox)
Monitoring-System	Siemens AG, München (Siemens Sirecust 1281)
Perfusor	Ken Scientific Corp., CT, USA ("GENIE" syringe Pump)

Tabelle 8: verwendete OP-Geräte

11.1.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller (Typ)
Gefäßverschlussystem	St. Jude Medical, St. Paul, Minnesota, USA (Angio-Seal™)
EKG-Elektroden	Tyco Healthcare GmbH, Neustadt (Kendall ARBO®)
Führungsdraht	Terumo Deutschland GmbH, Eschborn (0,035 Inch hydrophiler J-Kurve)
Hautdesinfizienz	Bode Chemie GmbH, Hamburg (Cutasept®)
HME-Beatmungsfilter	Medisize, Vantaa, Finnland (Medisize® Hygrovent S)
Katheter	verschiedene Hersteller (8 F)
Nahtmaterial	Ethicon GmbH, Norderstedt (Prolene 2-0, 4-0)
Schleuse	Cordis Corp., NJ, USA (9 F)
Trachealtubus mit Cuff	Rüsch GmbH, Kernen (Gr. 6,5 – 7,5)

Tabelle 9: verwendete OP-Verbrauchsmaterialien

11.1.4 Fremdkörper

Fremdkörperteil	Firma (Typ)
Katheter	Cordis Corp., NJ, USA (5F Koronarangiographie)
Membran	Ethicon GmbH, Norderstedt (Mersilene® Band)
Edelstahldraht	No-name (0,2 mm rostfrei)

Tabelle 10: für die Fremdkörper verwendete Materialien

11.2 Laborzubehör

11.2.1 Geräte

Geräteart	Hersteller (Typ)
Autoclav	Systec GmbH, Wettenberg (VX-95)
Bakterienbank	Clean Air Deutschland GmbH, Hilden (DCF / BSS4, NSF49)
Bakterieninkubator	Sarorius GmbH, Göttingen (Certomat HK)
Bioanalyser	Agilent Technologies, Waldbronn (2100 Bioanalyzer)
CCD-Imagersystem	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (ChemiDoc XRS)
Diamant-Innenlochsäge	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (SP1600)
Digitalkamera	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (DFC 300 FX)
Elektronenmikroskop	Koninklijke Philips Electronics N.V., Eindhoven, Niederlande (CM 10)
Feinwaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen (ALJ 160-4NM)
Gelelektrophoresekammer	Owl Separations Systems Inc., NH, USA (EasyCast™ B1)
Heizblock	Eppendorf AG, Hamburg (Thermomixer compact)
Heizplatte + Magnetrührer	IKA Labortechnik GmbH & Co. KG, Staufen (TCT basic)
Inkubationsschrank	New Brunswick Scientific, NJ, USA (Innova 4200)
Konfokales Lasermikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (TCS SP)

Geräteart	Hersteller (Typ)
Lichtmikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (DM 1000 LED)
Lichtmikroskop mit Fluoreszenzvorrichtung	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (DM-RB)
Mikrotom	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (CM 1950)
Mikrowellengerät	SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Sundern (MW 800)
Nukleotidkonzentrationsmesser	Thermo Fisher Scientific Inc, MA, USA (ND-1000)
Objektive	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (PL Fluotar 10x, 20x PH2, HI Plan 4x, HI Plan 10x, HI Plan 100x Öl, 25x Öl)
PCR-Cycler	SensoQuest GmbH, Göttingen (Labcycler)
pH-Meter	Nova Analytics Corp., MA, USA (pH 526)
Pipetten	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim (1000, 100, 10 µl) Eppendorf Research AG, Hamburg, (1000, 100, 10, 2,5 µl)
Pipettierhilfe	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald (PipetBoy)
Real Time PCR System	iCycler RT-PCR system, BioRad, Hercules, CA, USA
Rollenmischer	Karl Hecht KG, Sandheim (Assistent RM5)
Schüttelwasserbad	Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Burgwedel (1083)
Schwenktisch	Grant Instruments Ltd, Großbritannien (PMR 30)
Schwingmühle	Retsch GmbH, Haan (MM 301)
Spannungsquelle	PEQLab GmbH, Erlangen (Consort E143)
Spülmaschine	Miele & Cie. KG, Gütersloh (Mielabor G7783)
Sterilbank	Erlab D.F.S S.A.S , Köln (Biocap DNA/RNA)
Sterilisator	Heraeus Holding GmbH, Hanau (T6060)
Thermoblock für PCR-Cycler	SensoQuest GmbH, Göttingen (Thermoblock 96)
Ultra-Violet (UV)-Schirm	VICBER Laurmat, Marne La Vallee, Frankreich (TFX-35 C)
Vortex	IKA® Werke GmbH & CO. KG, Staufen (K MS2 MINISHAKER)
Waage	Mettler-Toledo GmbH, Gießen (PE3600 Delta Range)
Wasseraufbereiter	Millipore GmbH, Schwalbach (Milli-Q Plus)
Zentrifugen	Eppendorf Research AG, Hamburg (5415C/D) Du Pont Instruments Corp., MA USA (Sorvall RC-5B) Heraeus Holding GmbH, Hanau (Multige 3S-R) Heraeus Holding GmbH, Hanau (Fesco 17)
Zentrifugenrotor	Du Pont Instruments Corp., MA, USA (Sorvall SS 34) Heraeus Holding GmbH, Hanau (6445)

Tabelle 11: Laborgeräte

11.2.2 Verbrauchsmaterialien

Materialart	Hersteller (Typ)
96-Well-PCR-Platten	Thermo Scientific Inc., Dreieich (Thermo-Fast® 96 Detection Plate)
Abschlussfolie	American National Can™, WI, USA (Parafilm M)
Deckgläser	Carl-Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe (24x50 mm)
Einbettharz	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, NL (Tissue-Tek)
Einfrierröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (Cryo.S)

Materialart	Hersteller (Typ)
Einmalpipetten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (Cell-star 5, 10, 25, 50 ml)
Filterpapier	Schleier & Schuel GmbH, Dassel (Folded Filters 185mm)
Fixogum Rubber Cement	Marabu GmbH & Co. KG, Bietigheim-Bissingen
Glasflaschen	Schott AG, Mainz (200, 500, 1000, 2000 ml)
Kleber	Henkel KGaA, Düsseldorf (Patex Blitzkleber)
Messbecher	BRAND GMBH + CO KG , Wertheim (50, 100, 250, 500 ml)
Mikrotom-Messer	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Objektträger	Menzel GmbH, Braunschweig (Menzel-Superfrost)
Gewebekulturschale	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (100,00/20 mm mit Nocken)
Pipettenspitzen	Eppendorf Research AG, Hamburg (1 , 10, 100, 1000 µl)
Reaktionsgefäße	Eppendorf Research AG, Hamburg (Safe-Lock Tubes PCR Clean, 0,5, 1,5, 2 ml)
Reaktionsgefäße (15, 50 ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Wägeschälchen	Carl-Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe (Rotilabo® verschiedene Größen)
Zentrifugenröhrchen	Krackeler Scientific, Inc., NY, USA (Corex® 30ml)

Tabelle 12: Laborverbrauchsmaterialien

11.2.3 Molekularbiologische und histologische Kits

Bezeichnung	Hersteller
QIA Gen Plasmid Maxi Kit 25	QIAGEN GmbH, Hilden
QIA Gen RNeasy Micro bzw. Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIA Quick PCR Purification Kit 50	QIAGEN GmbH, Hilden
Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
IQ SYBR Green Super Mix	BioRad, Hercules, CA, USA
Technovit 7100	Heraeus Kulzer GmbH, Werheim/Ts

Tabelle 13: Molekularbiologische, immunologische und Färbungs-Kits

11.2.4 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
BamH1	Promega Corp., WI, USA
DNase-I (Turbo DNA free)	Ambion, TX, USA
rekombinante Pfu-DNA-Polymerase	Stratagene, CA, USA
Proteinase K	Promega Corp., WI, USA
rekombinante Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNaseOUT™ rekombinanter Ribonuklease-Inhibitor	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
SP-6 Polymerase	Promega Corp., WI, USA
Superscript II Reverse Transcriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
T7-Polymerase	Promega Corp., WI, USA
XHOI	Promega Corp., WI, USA

Tabelle 14: Enzyme

11.2.5 Oligonukleotide

Die benötigten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma Aldrich, MO, USA, bezogen.

Name und Anwendung	Sequenz
CD34 (qRT-PCR) antisense	AGGCTGGACAGAAGAGTTCAC
CD34 (qRT-PCR) sense	AACCACACCAGATGCTTTCG
c-kit (ISH) antisense	TTACCACATCCTCTCCATCGTTT
c-kit (ISH) sense	AGCCTCAGCCATCTGTGAGTCCA
c-kit (qRT-PCR) antisense	GGTGGTTGTGACATTTGCAG
c-kit (qRT-PCR) sense	CAGGGAGAACAGCCAGACT
GATA4 (qRT-PCR) antisense	GCCGGCTGATGCCATTCATC
GATA4 (qRT-PCR) sense	TGATGACTTCTCGGAAGGCAG
SCF (qRT-PCR) sense	AAGCGAAATGGTGGAAACAAC
SCF (qRT-PCR)antisense	TTCCACGAGGTCATCAACAA

Tabelle 15: Oligonukleotide / Primer

11.2.6 Sonstige Reagenzien und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller (Typ)
3-Aminopropyltriethoxysilane	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, (Biozym LE Agarose)
IQ SYBR Green Supermix	BioRad, München
Dapi P.A.	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Destilliertes Wasser	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl-Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe
Dithiotreitol (DTT)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DNA-Leitern	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot (FastRuler™DNA Ladders, Low Range, Middle Range)
Entellan®	Merck KGaA, Darmstadt

Bezeichnung	Hersteller (Typ)
Eosin	WALDECK GmbH & Co Division Chroma, Münster
Essigsäureanhydrid	Carl-Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe
Ethanol vergällt mit 1% MEK (>99,8%ig)	Carl-Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Formamid (> 99%ig)	Carl-Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe
Gellaufpuffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot (6x MassRuler™ Loading Dye Solution)
Hämalaun	WALDECK GmbH & Co Division Chroma, Münster
Heparin Natriumsalz	Carl-Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe
Histofluid	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl-Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe
Natrium-Di-Hydrogenphosphat Dihydrat	Carl-Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe
Random primer (Hexaoligonukleotide d(N)6)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
First-Strand Puffer, 5x	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Mowiol	Carl-Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe
SOC-Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Triethylamin 99,5% (TEA)	Carl-Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Carl-Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt

Tabelle 16: Reagenzien und Chemikalien

11.2.7 Antikörper und Kernfarbstoffe

Antikörper	Host	Verdünnung	Hersteller
AB Fab Fragment Anti-Digoxigenin	-	1:500	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
BS-1	-	1:500	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Biotin-SP-conjugated Anti-Rabbit IgG	Esel	1:100	Dianova GmbH, Hamburg
Biotin-SP-conjugated Anti-Mouse IgG	Esel	1:100	Dianova GmbH, Hamburg
Biotin-SP-conjugated Anti-Rat IgG	Esel	1:100	Dianova GmbH, Hamburg
CD146	Kaninchen	1:300	Abcam Inc., MA, USA
CD133	Maus	1:100	Milteny Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
CD44	Ratte	1:100	Calbiochem Merck KGaA, Darmstadt
CD45	Maus	1:100	Antibodies-online GmbH, Aachen
DAPI	-	1:1000	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Antikörper	Host	Verdünnung	Hersteller
DRAQ 5	-	1:1000	Axxora Deutschland, Lörrach
HMGB1	Maus	1:50	Acris Antibodies GmbH, Herford
ki67 clone MIB 1	Maus	1:50	DAKO Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Streptavidin-Cy2	-	1:100	Rockland, Gilbertsville, PA, USA
Streptavidin-Cy3	-	1:300	Rockland, Gilbertsville, PA, USA
Vimentin clone V9	Maus	1:300	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
von Willebrand factor	Kaninchen	1:300	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
α -smooth muscle actin clone IA4	Maus	1:300	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Tabelle 17: Antikörper

11.2.8 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
10fach PBS	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 14,7 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
10fach TBE	0,89 M Tris-Base, 0,89 M Borsäure, 0,1 M EDTA in H ₂ O
10fach Tris-gepuffertes Salz (TBS)	2 M NaCl, 25 mM KCl, 250 mM Tris, pH 7,5
20%iges Natrium Dodecyl Sulfat (SDS)	20% (wt/vol) SDS in ddH ₂ O, pH 7,2
20fach Standard Salzcitrat (SSC)	3 M NaCl, 0,3 M Na ₃ Citrat, pH 4,5
4%iges PFA	4% (wt/vol) PFA in PBS, pH 7,5 bei 60 °C
Aktivierte Basislösung	100 ml Technovit7100-Lösung, 1g HärterI
Alkalische Phosphatase Puffer (NTMT)	100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂ , 100 mM Tris pH 9,5, 0,1% (vol/vol) Tween 20, 2 mM, Levamisol
Blockinglösung	1faches TBS, 1% (vol/vol) Tween 20, 5% (vol/vol) inaktiviertes Schafserum, 0,5% (wt/vol) Levamisol
Citratpuffer	10 mmol Tri-Na-Citrat-Dihydrat in ddH ₂ O, pH 6,0
DEPC-H ₂ O	1l ddH ₂ O, 4 ml DEPC, ü. N. unter Rühren inkubieren, autoklavieren
Essigsäureanhydrid in TEA	125 mM TEA, 25 mM Essigsäureanhydrid in DEPC H ₂ O
Glycin	2 mg/ml PBS
Hybridisierungspuffer	50% (vol/vol) Formamid (deionisiert), 5faches SSC pH 7,0, 50 µg/ml Hefe RNA, 1% SDS (vol/vol), 50 µg/ml Heparin, 10% (wt/vol) Dextransulfat, pH 6,0 bei 60°C
LB-Medium flüssig	1% (wt/vol) Trypton/Pepton, 0,5% (wt/vol) Hefeextrakt, 1% (wt/vol) NaCl in ddH ₂ O (bei Bedarf 25 µg/ml Kanamycin)
LB-Medium für Agar-Agar Platten	1% (wt/vol) Trypton/ epton, 0,5% (wt/vol) Hefe-Extrakt, 1% (wt/vol) NaCl, 1,8% (wt/vol) Agar-Agar, in ddH ₂ O (bei Bedarf 25 µg/ml Kanamycin)

Bezeichnung	Zusammensetzung
Waschlösung 1	50% Formamid, 5fach SSC, 1% (vol/vol) SDS
Waschlösung 2	50% Formamid, 2fach SSC
NBT/BCIP in NTMT	4,5 µl/ml NBT, 3,5 µl/ml BCIP
Polymerisationslösung	Aktivierte Basislösung + HärterII (Verhältnis 15:1)
Präinfiltrationslösung	96% Ethanol + aktivierte Basislösung (Verhältnis 1:2)
Proteinase K	10 µg/ml in PBS
Schafserum in TBST	5% (vol/vol) Schafserum in TBST
TBST + Levamisol	1fach TBS, 1% (vol/vol) Tween 20, 2 mM Levamisol
Tris-gepuffertes Salz Tween-20 (TBST)	1fach TBS, 1% Tween 20
Vorbehandlung des DIG-Antikörpers	6 mg pulverisiertes Mausgewebe und 1 ml TBST für 30 min bei 70 °C inkubieren, auf Eis abkühlen + 10 µl Schafserum (inaktiv) + 2 µl Anti-DIG Antikörper 1h bei 4 °C schütteln, 10 min bei 4°C mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren, Überstand auf 4 ml mit TBST auffüllen.

Tabelle 18: Puffer und Lösungen

11.2.9 EDV-Programme

Bezeichnung	Typ, Version (Hersteller)
Bildbearbeitung	IM 500 Basis (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) Image J, Version 1.35j (http://rsbweb.nih.gov/ij/) Imaris 4.2.0 Bitplane (Bitplane AG, Zürich, Schweiz)
Blast	BLAST® (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)
Imager-Software	QuantityOne, Version 4.6.5 (BioRad Laboratories GmbH, München)
Primer-Erstellung	FastPCR 5.4 Professional (http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/download.htm)
Restriktionsanalyseprogramm	NEB-CUTTER V 2.0 (http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php) WEB-Cutter 2.0 (http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html)
RT-Software	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt (Software 7500 v2.0.2)
Statistik	GraphPadPrism 4 (GraphPad Software, Inc., CA, USA)

Tabelle 19: EDV-Programme

11.2.10 Bakterien & Vektoren

Bezeichnung	Hersteller
pCR-II-TOPO	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Top10 E. coli	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (aus dem Zero Blunt TOPO PCR Cloning)

Tabelle 20: Bakterien und Vektoren

11.3 Schweine

Die für die Tierversuche verwendeten Schweine wurden von einem, für medizinische Forschung zugelassenen, Züchter erworben. Es wurden insgesamt 53 männliche, kastrierte Schweine (Masthybride aus dt. Landrasse und Edelfrasse) mit einem Körpergewicht von 27,2 +/- 1,9 kg Körpergewicht verwendet.

12 Erklärung

Ich erkläre:

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

Bad Nauheim, den 12.03.2012

Matthias Willmer

13 Danksagungen

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. H. Möllmann und bei Herrn PD Dr. med. H. Nef für das Überlassen dieses einzigartigen Themas. Danke für die stets freundschaftlich-kollegiale Stimmung sowie alle Möglichkeiten und Perspektiven, die Ihr mir ermöglicht habt. Helge, einen ganz herzlichen Dank für das akribische Korrigieren meiner Dissertation! Ich hoffe, ich werde die begonnene Arbeit erfolgreich fortsetzen. Herrn Prof. Dr. med. A. Elsässer und Herrn Prof. Dr. med. C. Hamm danke ich für die herausragende Forschungssituation an der Kerckhoff-Klinik und die verlässliche Unterstützung. Ganz herzlicher Dank gilt unserer Tierärztin Frau Dr. vet. med. S. Voß für die vielen angenehmen Gespräche zwischen Büro, Schweinstall, OP und Kaffee und für die fachlich herausragende Arbeit in OP und Histolabor. Sandra, es war immer eine wahre Freude mit Dir zu operieren. Herrn Dr. rer. nat. C. Troidl danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei allen anfallenden Problemen. Ohne Deine Hilfe hätte ich wahrscheinlich spätestens nach der 100ertsten frustranen In-Situ aufgegeben. In diesem Zusammenhang danke ich ebenfalls Frau Dr. K. Troidl, die mich in die Geheimnisse der ISH eingewiesen hat. Herrn Dr. S. Kostin danke ich für die Durchführung der EM. Bei unseren TA Frau S. Sass, Frau M. Rieschel, Frau O. Bechtgoldt und Frau A. Kirchhof bedanke ich mich herzlich für die gesamte fachliche Hilfe und das freundschaftliche Miteinander während der täglichen Arbeit. Es war und ist mir eine große Freude mit Euch zusammen zu arbeiten! Meinen damaligen „Dokorandenkollegen“ Herrn P. Hilpert und Herrn F. Masselli danke ich für die wirklich tolle Zeit, die Feierabendbierchen und die fachlich anspruchsvollen Diskussionen. Besonders möchte ich mich aber bei Frau M. Klement bedanken – Melli, ich hoffe Dir geht es gut. Meiner guten Freundin Frau P. Görges danke ich ganz herzlich für all die Unterstützung und die stets offenen Ohren. Der Dank an Frau N. Krause kann gar nicht hoch genug ausfallen. Nicola, es war eine tolle Zeit! Die Gespräche mit Dir waren eine wirkliche Bereicherung und Wohltat. Danke! Frau J. Frey habe ich persönlich vieles zu verdanken – einen ganz herzlichen Dank dafür!

Frau D. Yavuz – Deniz, Du bist die Quelle der Kraft. Ich danke Dir. Teşekkür ederim!!

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie. Insbesondere meinen Eltern. Renate, Klaus. Ohne Euch wäre all dies nicht möglich gewesen. Ihr wart immer mein Rückhalt, mein Ansporn. Danke!