

Die parakrine Wirkung kardialer Progenitorzellen auf die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten

ANDREA MÜLLER



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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2010

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

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

**Die parakrine Wirkung kardialer Progenitorzellen
auf die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten**

INAUGURALDISSERTATION

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

vorgelegt von

Andrea Christiane Müller

aus Bonn

Gießen 2010

Aus dem Physiologischen Institut des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Gutachter: Prof. Dr. Schlüter

Gutachter: Prof. Dr. Dill

Tag der Disputation: 15.11.2010

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	6
1.1 Herzinsuffizienz	6
1.2 Stammzellen	8
1.2.1 Embryonale Stammzellen	9
1.2.2 Adulte Stammzellen	10
1.2.3 Kardiale Progenitorzellen (CPC)	11
1.2.4 Marker zur Charakterisierung kardialer Progenitorzellen	14
1.3 Aufgabenstellung	16
2. Material	18
2.1 Chemikalien	18
2.2 Antikörper	21
2.3 Primer	21
2.4 Geräte und Laborbedarf	22
2.4.1 Zellkultur	22
2.4.2 System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Kontraktion	23
2.4.3 Blutdruckmessung	23
2.4.4 RT-PCR	23
2.4.5 SDS-Gelelektrophorese	23
2.4.6 Sonstige Geräte	24
2.4.7 Verbrauchsmaterialien	24
2.5 Auswertung	24
3. Methoden	26
3.1 Isolierung und Kultivierung residenter kardialer Progenitorzellen aus seneszenten Rattenherzen	26
3.2 Reverse Transkriptase - PCR (RT - PCR)	30
3.2.1 Präparative RNA-Isolierung (Chomczynski et al., 1987)	30
3.2.1.1 Zellernte	30
3.2.2 Messung des RNA-Gehaltes	31
3.2.3 Herstellung von cDNA (Reverse Transkription)	31
3.2.4 Polymerase Kettenreaktion (Mullis et al., 1986)	32
3.2.5 DNA-Gelelektrophorese	35
3.3 Protein-Gelelektrophoretische Methoden	36
3.3.1 Probenvorbereitung	36
3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
3.3.3 Western Blot-Verfahren	40
3.3.4 Immunologische Nachweisverfahren	41
3.4 Isolierung von Herzmuskelzellen	43
3.4.1 Versuchstiere	43

3.4.2	Präparation von Herzmuskelzellen adulter Ratten (Piper et al., 1982).....	44
3.5	Zellkultur von isolierten Kardiomyozyten.....	46
3.5.1	Vor- und Ausplattieren der Zellkulturschalen	46
3.5.2	Anlegen von Kurzzeitkulturen isolierter Kardiomyozyten	47
3.6	Messung von Myokardzell-Kontraktionen im elektrischen Feld	47
3.6.1	Probenvorbereitung	47
3.6.2	Elektrische Stimulation und Steuerung der Myokardzell-Kontraktion	48
3.6.3	Messung der Kontraktionsparameter.....	49
3.6.4	Messprotokoll	51
3.6.5	Statistik.....	51
3.7	Isolierung von Herzmuskelzellen aus druckbelasteten Herzen	52
3.7.1	Herzmuskelzellen aus Ratten mit L-NAME induzierter Hypertonie und nach antihypertensiver Therapie.....	52
3.7.2	Herzmuskelzellen aus spontan hypertensiven Ratten und nach antihypertensiver Therapie.....	53
4.	Ergebnisse	56
4.1	Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung residenter kardialer Progenitorzellen aus seneszenten Rattenherzen.....	56
4.1.1	Bilder	56
4.1.2	RT-PCR	57
4.1.3	Immunoblots	59
4.2	Etablierung eines Nachweissystems zur Charakterisierung der Wirkung von Progenitorzellüberständen auf die Funktion von Herzmuskelzellen	60
4.2.1	Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten Tag 0 vs. Tag 1	60
4.3	Wirksamkeit der gewonnenen Progenitorüberstände auf die Herzmuskelzellen in Abhängigkeit von der Differenzierung	62
4.3.1	Chronische Wirkung	62
4.3.1.1	Wirkung der Differenzierungsüberstände aus drei Monate alten, weiblichen Wistar-Ratten	62
4.3.1.2	Wirkung der Auswuchsüberstände aus drei Monate alten, weiblichen Wistar-Ratten	65
4.3.1.3	Wirkung der Differenzierungsüberstände aus einer 18 Monate alten, weiblichen Wistar-Ratten	66
4.3.1.4	Wirkung der Auswuchsüberstände aus einer 18 Monate alten, weiblichen Wistar-Ratten	67
4.3.1.5	Wirkung der Differenzierungsüberstände in Gegenwart von Isoprenalin.....	69
4.3.1.6	Wirkung der Überstände adulter Kardiomyozyten	70
4.4	Mechanismus der Wirkung von Progenitorzellüberständen	71
4.4.1	Wirkung unter Hemmung der Translation	71
4.4.2	Wirkung unter Hemmung der Transkription.....	72
4.5	Vergleich der Wirksamkeit von Progenitorzellüberständen aus Maus und vom Menschen	73
4.5.1	Wirkung der Differenzierungsüberstände aus Maus und vom Menschen	73
4.5.2	Wirkung der Auswuchsüberstände aus Maus und vom Menschen.....	76

4.6	Wirkung von Progenitorzellüberständen auf Kardiomyozyten aus druckbelasteten Herzen	78
4.6.1	Wirkung auf Herzmuskelzellen aus Ratten mit L-NAME induzierter Hypertonie und nach antihypertensiver Therapie.....	78
4.6.2	Wirkung auf Herzmuskelzellen aus spontan hypertensiven Ratten und nach antihypertensiver Therapie.....	81
5.	Diskussion.....	85
5.1	Hauptbefunde	86
5.2	Beurteilung der PCR- und Western Blot-Untersuchungen	86
5.3	Wirkung von Progenitorzellüberständen aus Rattenherzen in Abhängigkeit vom Alter auf die Funktion von isolierten Herzmuskelzellen	87
5.4	Wirkmechanismus der Progenitorzellüberstände	90
5.5	Vergleich der Wirksamkeit von Progenitorzellüberständen aus Ratte, Maus und Mensch 91	
5.6	Abhängigkeit der Wirkung der Progenitorzellüberstände vom Grad der Differenzierung.....	93
5.7	Wirkung der Progenitorzellüberstände auf Kardiomyozyten aus druckbelasteten Herzen 94	
5.8	Schlussfolgerung	94
6.	Zusammenfassung	96
7.	Summary	98
8.	Literaturverzeichnis.....	99
9.	Erklärung	108
10.	Danksagung	109

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
% (vol/vol)	Volumenprozent
% (wt/vol)	Gewichtsprozent
Δ L/L (delta L/L)	relative Zellverkürzung
AA/BAA	Acrylamid / Bisacrylamid
Abb.	Abbildung
ADH	Anti-diuretisches-Hormon
AHA	American Heart Association
ANOVA	analysis of variance
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
aqua bidest. (aqua bidestillata)	zweifach destilliertes Wasser
Az.	Aktenzeichen
β -MHC	beta-Myosin Heavy Chain
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat
bFGF	basic fibroblast growth factor
BNP	Brain Natriuretic Peptide
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Kontrolle
$^{\circ}$ C	Grad Celcius
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCT	Creatin-Carnitin-Taurin

cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEM	complete explant medium
CGM	cardiosphere-growing medium
c-kit	CD117, Stammzellfaktor-Rezeptor
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPC	cardiac progenitor cells
d.h.	das heißt
dL/L (delta L/L)	relative Zellverkürzung
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid- Synthase
FCS	Fetales Kälberserum
fw	forward
g	Gramm
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2- ethanolsulfonsäure
HGF	Hepatocyte growth factor
HPRT	Hypoxanthin-Guanin- Phosphoribosyltransferase
HSC	hämatopoetische Stammzelle

Hz	Hertz
IE	Internationale Einheit
IGF	Insulin-like growth factor
IMDM	Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium
ISL-1	Insulin gene enhancer protein
ISO	Isoprenalin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzerkrankung
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
L-NAME	N ^G -Nitro-L-Arginin-methyl-ester
mA	Milliampere
MAPC	multipotente adulte Progenitozelle
MCP	Monocyte chemoattractant protein
MSC	mesenchymale Stammzelle
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mmol	Millimol
MMP	Matrix metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
ms	Millisekunde

μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol
n	Stichprobenumfang
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NO	Stickstoffmonoxid
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NYHA	New York Heart Association
Oligo dt	Oligo-desoxy-Thymidin
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Relaxation
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-sin	RNAse Inhibitor
RT	Reverse Transkriptase
sca-1	Stem-cell-antigen-1
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunde

SHR	Spontan hypertensive Ratte
SPcells	side population cells
s.u.	siehe unten
sVCAM	soluble vascular cell adhesion molecule
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Tris Buffered Saline
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β	Transforming growth factor beta
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
TTP	Time-to-peak
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	Unit
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultra Violett
Ü	Überstand
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vgl.	vergleiche
vs.	versus
W1	Detergenz
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören zu den häufigsten schwerwiegenden Erkrankungen in den Industrienationen. Nach Angaben der World Health Organization (WHO, 2009) sind kardiovaskuläre Erkrankungen auch weltweit betrachtet die häufigste Todesursache. Dabei stellt die Herzinsuffizienz den Endzustand vieler kardiovaskulärer Erkrankungen dar. Sie war im Jahr 2006 in Deutschland der häufigste Grund für einen stationären Krankenhausaufenthalt (Statistisches Bundesamt Deutschland). Unter Herzinsuffizienz versteht man eine Herzmuskelschwäche mit der kardialen Unfähigkeit, eine den Anforderungen entsprechende Förderleistung zu erbringen (Pschyrembel, 261. Auflage, 2007). Die Ursachen einer Herzinsuffizienz sind unterschiedlich, sie kann im Gefolge der meisten Herzerkrankungen auftreten. In den USA und Westeuropa ist allerdings die koronare Herzerkrankung für drei Viertel der Fälle verantwortlich. An zweiter Stelle der Häufigkeit liegen Kardiomyopathien. Weitere Ursachen einer Herzinsuffizienz sind hypertensive und angeborene oder erworbene valvuläre Herzerkrankungen, hämodynamisch relevante Herzrhythmusstörungen, Myo- oder Perikarditiden, sowie die Einnahme kardiotoxischer Medikamente. Klinisch zeigt sich ein unterschiedlich ausgeprägtes Bild aus Kreislaufstauung, Luftnot, Erschöpfung und Schwäche (Harrisons Innere Medizin, 16. Auflage, 2005). Die Herzinsuffizienz wird nach ihrer Lokalisation in eine Links-, Rechts- oder Globalherzinsuffizienz unterteilt, wobei die Linksherzinsuffizienz die häufigste Form darstellt. Weiter kann eine Einteilung entsprechend dem Schweregrad erfolgen, die zum einen anhand der Klassifikation der New York Heart Association (NYHA) beschrieben werden kann, zum anderen anhand der Klassifikation der American Heart Association (AHA). Die NYHA-Klassifikation unterteilt die Herzinsuffizienz in vier Schweregrade (I-IV) und orientiert sich dabei an der Leistungsfähigkeit des Patienten. Die Klassifikation der American Heart Association unterscheidet ebenfalls vier Stadien (A-D), berücksichtigt im Vergleich zur NYHA-Klassifikation allerdings mehr die Entstehung und Progredienz der Erkrankung. Weiterhin unterscheidet man klinisch zwischen kompensierter, asymptomatischer und dekomensierter, symptomatischer Herzinsuffizienz.

Schließlich kann man nach dem zeitlichen Verlauf zwischen akuter und chronischer Herzinsuffizienz unterscheiden (Pschyrembel, 261. Auflage, 2007). Mit verschiedenen Kompensationsmechanismen versucht der Körper, den Blutdruck und das zirkulierende Blutvolumen trotz verminderter Pumpleistung aufrechtzuerhalten. Durch die Aktivierung des sympathischen Nervensystems, des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und die Vasopressin (ADH)-Freisetzung ist eine vorübergehende Steigerung der Herzleistung möglich, die aber auf längere Sicht durch einen *circulus vitiosus* zu einer weiteren Beeinträchtigung der Pumpfunktion führt und die Progression der Herzinsuffizienz begünstigt (Cohn et al., 2000). Weitere Kompensationsmechanismen bestehen in der Freisetzung der natriuretischen Peptide ANP und BNP. Das atriale natriuretische Peptid (ANP) wird durch eine Dehnung der Vorhöfe, BNP (brain natriuretic peptide) dagegen durch Dehnung der Herzkammern freigesetzt. Die anhaltende Belastung des Herzens führt auf Dauer zu strukturellen Umbauprozessen, dem sogenannten Remodeling sowie zur Hypertrophie des Herzens. Bei akuter Herzinsuffizienz kommt es zu einer zunehmenden Dilatation des Herzens während sich bei einer chronischen Herzinsuffizienz eine exzentrische Hypertrophie im Falle einer vorwiegenden Volumenbelastung oder eine konzentrische Hypertrophie bei vorherrschender Druckbelastung entwickelt.

Die Behandlung der Herzinsuffizienz beinhaltet im Idealfall eine kausale Therapie, also die Beseitigung der zugrunde liegenden Ursache, wie beispielsweise die operative Therapie einer Herzklappenerkrankung, die Behandlung einer Herzrhythmusstörung oder Myokarditis. Dies ist allerdings nur bei einem kleinen Teil der Patienten möglich. Neben Allgemeinmaßnahmen wie der Reduktion kardiovaskulärer Risikofaktoren und Vermeidung akuter physischer und psychischer Belastungen kann dann durch eine medikamentöse Therapie versucht werden, das Herz zu entlasten und den langfristig nachteilig wirkenden Kompensationsmechanismen des Körpers entgegenzuwirken. Als nachweislich prognoseverbessernde Medikamente stehen hier ACE-Hemmer, AT1-Rezeptorblocker, Betablocker und Aldosteronantagonisten zur Verfügung. Insbesondere ACE-Hemmer haben eine zentrale Stellung in der Therapie der Herzinsuffizienz und sind unter anderem in der Lage, den Prozess des Remodelings zu verzögern und die myokardiale Hypertrophie zu verringern. Die ebenfalls bei Herzinsuffizienz eingesetzten Diuretika und Herzglykoside haben dagegen keine prognoseverbessernde Wirkung sondern verringern lediglich die Symptomatik.

Weitere Therapiemöglichkeiten sind die kardiale Resynchronisationstherapie und die Implantation eines Kardioverter-Defibrillator. Bei einem Teil der Patienten mit irreversibler Myokardschädigung und progredienter, therapierefraktärer Herzinsuffizienz bleibt nach Ausschöpfen aller verfügbaren Therapiemöglichkeiten als ultima ratio jedoch nur die Herztransplantation. Die Prognose der Herzinsuffizienzpatienten hängt somit primär von der zugrunde liegenden Herzerkrankung ab sowie von deren Behandelbarkeit. Die Langzeitprognose ist deutlich besser, wenn die Herzinsuffizienz kausal behandelt werden kann, wenn also eine beispielsweise zugrunde liegende Herzklappenerkrankung operativ therapiert werden kann. (Harrisons Innere Medizin, 16. Auflage, 2005)

1.2 Stammzellen

Stammzellen sind undifferenzierte und unbegrenzt teilungsfähige Zellen, aus denen durch Teilung jeweils wiederum eine Stammzelle und eine zur Differenzierung fähige Zelle entstehen (Pschyrembel, 261. Auflage, 2007). Durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in unterschiedlichste Zelltypen gelten Stammzellen als eine potentielle Quelle für Ersatzgewebe bei Krankheiten, denen ein Zelluntergang zugrunde liegt. Dazu gehören beispielsweise neurologische Erkrankungen wie Alzheimer und Morbus Parkinson, bei denen es zu einem Absterben von Nervenzellen kommt, aber auch Volkskrankheiten wie Diabetes mellitus und die koronare Herzerkrankung (KHK). Insbesondere die KHK gilt mit etwa drei Viertel der Fälle als eine der Hauptursachen für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz (Harrisons Innere Medizin, 16. Auflage, 2005). Durch die unangemessene Durchblutung des Myokards kommt es zu einer Unterversorgung des Gewebes mit Sauerstoff und schließlich zum Zelluntergang. Durch das Fehlen eines adäquaten endogenen Reparaturmechanismus werden die zugrunde gegangenen Kardiomyozyten nach einem Myokardinfarkt lediglich durch fibrotisches Gewebe ersetzt, was bei entsprechender Größe dieser Narbe zu einer Beeinträchtigung der Herzfunktion und schließlich zur Herzinsuffizienz führen kann (Smits et al., 2005). Aber auch die nicht-ischämischen Ursachen der Herzinsuffizienz wie Hypertonie, Myokarditis, Arrhythmien, Herzklappenerkrankungen und Medikamenten-induzierte Kardiotoxizität führen über Apoptose, Nekrose und Hypertrophie der Kardiomyozyten, interstitielle Fibrose, Entzündungsprozesse,

oxidativen Stress und beeinträchtigte Neovaskularisation zum Endzustand der Herzinsuffizienz (Burchfield et al., 2008). Bislang wurde vor allem durch medikamentöse Therapie versucht, das Fortschreiten der Erkrankung zu limitieren, da in den wenigsten Fällen eine kausale Therapie möglich ist. Keine der bisherigen Therapien ist allerdings in der Lage, das bereits geschädigte Gewebe zu ersetzen und so den Krankheitsverlauf gänzlich aufzuhalten oder zu verbessern. Oft bleibt als letzte therapeutische Möglichkeit der terminalen Herzinsuffizienz nur noch die allogene Herztransplantation, die allerdings mit der Gefahr einer Abstoßungsreaktion sowie mit Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie verbunden ist. Der mögliche therapeutische Einsatz von Stammzellen in der regenerativen Medizin hat daher in der Vergangenheit immer mehr an Bedeutung gewonnen. Durch ihr Potential, sich zu verschiedenen Zelltypen zu entwickeln ist die Stammzell-basierte Therapie zu einer realistischen Option geworden, geschädigte Zellen in Geweben mit niedrigem Selbsterneuerungspotential, wie dem Myokardgewebe, zu ersetzen (Smits et al., 2005).

1.2.1 Embryonale Stammzellen

Grundsätzlich unterscheidet man embryonale von adulten Stammzellen. Embryonale Stammzellen sind pluripotent und haben das Potential, sich in Zellen aller drei Keimblätter (Entoderm, Ektoderm und Mesoderm) zu differenzieren sowie in Zellen der Keimbahn. Sie werden aus der inneren Zellmasse von Embryos im Entwicklungsstadium der Blastozyste gewonnen (Smits et al., 2005). Embryonale Stammzellen können sich also auch zu funktionsfähigen Kardiomyozyten differenzieren, was sie theoretisch zu einer unbegrenzten Zellquelle für die Regeneration von geschädigtem Myokardgewebe macht. Ihr Einsatz wird allerdings durch ihre potentiell immunogene und arrhythmogene Wirkung und insbesondere auch durch ethische Bedenken limitiert (Messina et al., 2004). Zur Gewinnung von menschlichen embryonalen Stammzellen ist die Zerstörung von frühen menschlichen Embryonen erforderlich und ihr allogener Ursprung kann zu einer Abstoßungsreaktion des Empfängerorganismus führen. Zudem sind undifferenzierte embryonale Stammzellen per Definition tumorigen (Smits et al., 2005). Sie können nach Transplantation in Versuchstieren Teratome bilden (Thomson et al., 1998),

sodass sichergestellt werden müsste, dass die eingesetzten Transplantate keine undifferenzierten Zellen mehr enthalten.

1.2.2 Adulte Stammzellen

Adulte (somatische) Stammzellen sind multipotent. Sie haben verglichen mit embryonalen Stammzellen ein geringeres Selbsterneuerungsvermögen und ein eingeschränkteres Differenzierungspotential. Progenitor- oder Vorläuferzellen sind wiederum Abkömmlinge einer solchen multipotenten adulten Stammzelle, sie sind also im Vergleich zu adulten Stammzellen noch etwas weiter differenziert. Adulte Stammzellen umfassen mindestens drei verschiedene Zellgruppen: Stammzellen aus dem Knochenmark, den zirkulierenden Pool aus Stamm- und Progenitorzellen, der sich zum Teil auch aus Zellen aus dem Knochenmark ableitet, sowie gewebeständige Stammzellen. Das Knochenmark wiederum beinhaltet die hämatopoetischen Stammzellen (HSCs), sogenannte „side population“ - Zellen (SPcells), mesenchymale Stammzellen (MSCs) und multipotente adulte Progenitorzellen (MAPCs), eine Subpopulation der mesenchymalen Stammzellen (Burchfield et al., 2008). Diese somatischen Stammzellen sind notwendig für die Erneuerung sämtlicher Blutzellen sowie die zeitlebens ablaufenden Umbau- und Reparaturvorgänge der Gewebe. In der Vergangenheit wurden in immer mehr Geweben des Organismus nach Abschluss der Embryonalentwicklung adulte Stammzellen gefunden, wobei in Organen mit hoher Erneuerungsrate wie dem Blut oder Darm mehr Stammzellen zu finden sind als in anderen, weniger teilungsaktiven Organen. Ursprünglich ging man davon aus, dass adulte Stammzellen sich lediglich zu Zellen des jeweiligen Organs differenzieren können, aus dem sie stammen. Neuere Erkenntnisse weisen jedoch darauf hin, dass sie außerdem in der Lage sind, sich zu Zellen zu differenzieren, die nicht den Zellen des Ursprungsgewebes entsprechen (Smits et al., 2005). Diese Plastizität der Zellen könnte von großem Nutzen für die regenerative Medizin sein. Ein entscheidender Vorteil des Einsatzes adulter Stammzellen besteht darin, dass sie in jedem Individuum verfügbar sind, sodass die Möglichkeit des körpereigenen, autologen Zellersatzes besteht und somit keine Gefahr der Abstoßung des Transplantats gegeben ist. Zudem sind adulte Stammzellen aufgrund ihrer Gewinnung aus adulten Geweben im Gegensatz zu

embryonalen Stammzellen ethisch unbedenklich. Auch konnte eine Entartung des Transplantats bei der klinischen Verwendung von adulten Stammzellen bisher nicht beobachtet werden. Nachteilig ist allerdings ihr im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen eingeschränkteres Differenzierungspotential (Smits et al., 2005). Die am meist erforschten adulten Stammzellen sind die hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark sowie die mesenchymalen Stammzellen. Aufgrund ihrer relativ einfachen Gewinnung und Isolation haben sie viele Vorteile gegenüber anderen Zelltypen. Hämatopoetische Stammzellen werden schon seit Jahrzehnten erfolgreich im Rahmen der Knochenmarkstransplantation bei Leukämiepatienten eingesetzt. Mesenchymale Stammzellen konnten *in vitro* zu Kardiomyozyten differenzieren (Heng et al., 2004). Auch *in vivo* scheinen mesenchymale Stammzellen im Rahmen von Tierversuchen kardiomyogene Eigenschaften zu besitzen (Smits et al., 2005). In den meisten bereits durchgeführten klinischen Studien, in denen Patienten nach Myokardinfarkt mit Stammzellen behandelt wurden, wurden Stammzellen aus dem Knochenmark eingesetzt (Schächinger et al., 2006; Wollert et al., 2004; Perin et al., 2003; Dimmeler et al., 2008). Die Studien zeigten einen Rückgang der Infarktnarbe, eine Verbesserung der Ejektionsfraktion und ein verringertes linksventrikuläres endsystolisches Volumen. Unklar ist bisher allerdings, welche Subpopulation der Knochenmarkstammzellen zu diesen positiven Effekten führt und welcher Mechanismus dieser Wirkung zugrunde liegt.

1.2.3 Kardiale Progenitorzellen (CPC)

Das Herz galt bis vor wenigen Jahren als terminal differenziertes Organ ohne eigene Reparaturmechanismen, bis man, wie mittlerweile auch in zahlreichen anderen Organen, im Herzen eine Zellpopulation fand mit den Eigenschaften adulter Stammzellen, wie der Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Multipotenz (Beltrami et al., 2003). Diese kardialen Progenitorzellen konnten sowohl aus Tierherzen als auch aus menschlichen Herzen gewonnen werden. Ebenso wie die in 1.2.2 erwähnten adulten Stammzellen aus dem Knochenmark gelten die kardialen Progenitorzellen als mögliche Therapieoption des insuffizienten Herzens. Entscheidende Vorteile liegen auch hier in der Möglichkeit des autologen Einsatzes der Zellen und ihrer ethischen Unbedenklichkeit. In verschiedenen Studien wurde bereits ihre Fähigkeit untersucht, die kardiale Funktion beispielsweise nach myokardialer Ischämie zu

verbessern. Beltrami et al. (2003) isolierten kardiale Progenitorzellen aus adulten Rattenherzen und injizierten diese fünf Stunden nach myokardialem Infarkt wiederum in Rattenherzen, was zu einer Regeneration des infarzierten Myokards führte. Bearzi et al. (2007) zeigten ähnliche Ergebnisse mit humanen kardialen Stammzellen, die immundefizienten Mäusen und immunsupprimierten Ratten lokal in das infarzierte Myokard injiziert wurden. Urbanek et al. (2005) und Linke et al. (2005) zeigten ebenfalls in Tierversuchen nach induziertem Myokardinfarkt, dass auch durch intramyokardiale Injektion der Wachstumsfaktoren HGF (hepatocyte growth factor) und IGF-1 (insulin-like growth factor 1), durch deren Bindung an die entsprechenden Rezeptoren residenter kardialer Progenitorzellen und deren Aktivierung die Bildung von Kardiomyozyten und Koronargefäßen innerhalb des Infarktgebietes gefördert wird. Anderson et al. (2008) zeigten im Rattenmodell eine Verringerung der Infarktgröße und eine Erhöhung der linksventrikulären Ejektionsfraktion, wenn HGF direkt nach akutem Myokardinfarkt appliziert wurde. Kardiale Progenitorzellen sowie die intramyokardiale Injektion von HGF und IGF-1 führten auch noch 20 Tage nach induziertem Myokardinfarkt in Rattenherzen zur Regeneration des Infarktgebietes durch Ersatz des fibrotischen Narbengewebes durch neu gebildetes Myokardgewebe (Rota et al., 2008), Ergebnisse die vor allem für die Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz von Bedeutung sein können. Auch eine erste klinische Studie wird derzeit schon durchgeführt (CADUCEUS, CARDiosphere-Derived aUtologous stem CElls to Reverse ventricUlar dySfunction), in der untersucht wird, ob der Einsatz von kardialen Stammzellen bei Patienten mit verminderter Herzfunktion und/oder nach Myokardinfarkt sicher ist und ob diese Behandlung zudem die Größe des verletzten Myokards verringern und/oder die Herzfunktion nach Herzinfarkt verbessern kann. Die Ergebnisse dieser Studie werden für Mai 2011 erwartet.

Welcher Mechanismus den beschriebenen Effekten zugrunde liegt, ist allerdings noch nicht ausreichend verstanden. Zunächst vermutete man, die kardialen Progenitorzellen oder ihre Abkömmlinge könnten direkt das verletzte Herzgewebe beispielsweise nach einem Myokardinfarkt ersetzen (Beltrami et al., 2003). In letzter Zeit setzte sich allerdings immer mehr die Vorstellung durch, die kardialen Progenitorzellen könnten durch die Freisetzung bestimmter Faktoren über einen parakrinen Mechanismus zu einer Verbesserung der Herzfunktion und Remodelingprozessen führen (Chimenti et al., 2010; Anderson et al., 2008). Chimenti et al. (2010) konnten nachweisen, dass humane kardiale Progenitorzellen sowohl

VEGF (vascular endothelial growth factor) als auch HGF und IGF-1 sezernieren, nachdem sie immundefizienten Mäusen nach akutem Myokardinfarkt transplantiert wurden. Markel et al. (2008) wiesen VEGF zudem eine entscheidende Rolle im Rahmen der Stammzell-vermittelten kardioprotektiven Wirkung zu. Doyle et al., (2008) zeigten im Tiermodell an Schweinen nach akutem Myokardinfarkt eine durch endotheliale Progenitorzellen vermittelte kardiale Hypertrophie im Infarktgebiet mit günstigem Effekt auf die Herzfunktion und identifizierten TGF- β 1 als einen der möglichen Hypertrophie-vermittelnden Faktoren. In anderen Studien wurden weitere Faktoren nachgewiesen, die für die Vermittlung der kardioprotektiven Effekte mitverantwortlich sein könnten, darunter auch sVCAM-1 (Matsuura et al., 2009) und Interleukin-10 (Burchfield et al., 2008). Es zeigte sich zudem, dass adulte Stammzellen und insbesondere mesenchymale Stammzellen eine ganze Reihe weiterer Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren produzieren und sezernieren, zu denen unter anderem auch MMPs, TIMPs, MCP-1, VEGF und Interleukine gehören (Gnecchi et al., 2008). Für MCP-1 wurde gezeigt, dass eine kardiale Überexpression in Mäusen zu einer Reduktion des Infarktareals und der Narbenbildung und zu einer Verbesserung der linksventrikulären Dysfunktion und des Remodelings nach Myokardinfarkt führt (Morimoto et al., 2006). Untersuchungen an mesenchymalen Stammzellen zeigten zudem eine deutliche Freisetzung von VEGF und IGF-1, die anti-apoptotische und angiogenetische Effekte vermitteln und so einen kardioprotektiven Effekt ausüben (Sadat et al., 2007).

Vermutlich wirken nicht alle freigesetzten Faktoren begünstigend auf die Herzfunktion. Für einige Zytokine wurden sogar kardiodepressive Wirkungen beschrieben (Joulin et al., 2007). Für andere Faktoren wurden dagegen wie bereits erwähnt kardioprotektive Wirkungen diskutiert.

G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) wurde bereits in verschiedenen Studien eingesetzt, um zu untersuchen, ob dieser zu einer Mobilisation von Stammzellen führt und so einen positiven Einfluss auf die kardiale Regeneration nach akutem Myokardinfarkt ausüben kann. Die subkutane Gabe von G-CSF wäre weniger invasiv als beispielsweise die intramyokardiale oder intrakoronare Gabe von Progenitorzellen. Es zeigte sich zwar eine erfolgreiche Mobilisation von Stammzellen durch G-CSF, aber weder ein günstiger Effekt auf die linksventrikuläre Funktion, noch eine Reduktion der Infarktgröße bei Patienten nach Herzinfarkt und Reperfusion (Zohlhöfer et al., 2008).

Trotz aller bisherigen Untersuchungen zu diesem Thema ist der genaue Mechanismus, der der kardioprotektiven Wirkung der Progenitorzellen zugrunde liegt noch weitgehend unverstanden. Da es im in vivo-Modell nicht möglich ist, zwischen einer Verbesserung der Herzfunktion durch eine direkte Wirkung auf die Kardiomyozyten oder durch Effekte auf beispielsweise Neovaskularisierung und Remodeling zu unterscheiden, konnte durch die Etablierung eines in vitro-Systems in der vorliegenden Arbeit unter Ausschluss anderer möglicher zugrundeliegender Mechanismen die Wirkung der Progenitorzellen bzw. deren Überstände auf die Funktion isolierter Kardiomyozyten untersucht werden.

Die Prävalenz der Herzinsuffizienz nimmt mit höherem Alter zu. Es wird diskutiert, ob mit zunehmendem Alter auch die Funktion von Stammzellen beeinträchtigt wird (Ballard, 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde daher auch die Wirkung von Progenitorzellüberständen aus unterschiedlich alten Rattenherzen untersucht, um eine Aussage über einen etwaigen Funktionsverlust treffen zu können.

1.2.4 Marker zur Charakterisierung kardialer Progenitorzellen

Zur Charakterisierung der kardialen Progenitorzellen wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene herzspezifische Marker sowie Stammzellmarker untersucht.

Die in dieser Arbeit untersuchten Stammzellmarker sind Isl-1, c-kit, Sca-1 sowie GATA-4:

Isl-1 (Islet-1) ist ein Transkriptionsfaktor, der eine Zellpopulation kennzeichnet, die einen wesentlichen Anteil am embryonalen Herz darstellt. Die Isl-1-Expression wird herunterreguliert, sobald die Zellen einen differenzierten Phänotyp annehmen, was darauf hindeutet, dass dieser Transkriptionsfaktor eine kardiogene Progenitorzellpopulation beschreibt (Moretti et al., 2007; Moretti et al., 2006). Durch diesen Marker war es Moretti et al. auch möglich, im postnatalen Herz kardiale Progenitorzellen zu identifizieren, die in der Lage sind, sich zu Kardiomyozyten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen zu differenzieren.

C-kit oder Stammzellfaktor-Rezeptor ist ein Protein aus der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinase und wird insbesondere in hämatopoetischen Stammzellen gebildet. Es kommt aber auch in anderen Vorläuferzellen vor und spielt eine entscheidende Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Stammzellen (Lev et al., 1992). Er wird ebenfalls als Stammzellmarker genutzt.

Das Stammzell-Antigen Sca-1 wird wie c-kit in hämatopoetischen Stammzellen exprimiert und ist ebenfalls ein häufig genutzter Stammzellmarker (Van de Run et al., 1989).

GATA-4 ist ein kardialer Transkriptionsfaktor und Marker kardialer Progenitorzellen. Er spielt eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung des Herzens (Durocher et al., 1997). Die Hemmung der GATA-4-Expression führte in Untersuchungen zu einer Hemmung der terminalen Differenzierung von Kardiomyozyten (Grépin et al., 1995). Als kardiale Marker wurden ANP, BNP, Cardiotrophin, α -Actin, β -MHC und eNOS untersucht:

ANP und BNP gelten als herzspezifische Marker, zu deren Hauptfunktionen die Reduktion des Plasmavolumens und die Senkung des Blutdrucks gehören. Sie sind die wichtigsten Gegenspieler des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. (Pschyrembel, 261. Auflage, 2007). ANP ist ein Polypeptid und wird im adulten, gesunden Herz fast ausschließlich in den Kardiomyozyten des Atriums synthetisiert, bei Ventrikel-Hypertrophie auch in den Ventrikeln. Durch Vorhofdehnung, Hypoxie oder erhöhte Plasmaosmolarität wird ANP in das zirkulierende Blut sezerniert. BNP ist ein ebenfalls ein Polypeptid und wird vor allem in den Ventrikeln, aber auch im Atrium synthetisiert (Pschyrembel, 261. Auflage, 2007). Die Freisetzung von BNP erfolgt insbesondere bei Dehnung der Herzkammern durch Überlastung und Überfüllung des Herzens. Sowohl ANP als auch BNP gelten daher auch als herzspezifische Hypertrophiemarker.

Cardiotrophin-1 ist ein Zytokin und Mitglied der Interleukin-6-Familie. Es wird vor allem in Herz, Skelettmuskel, Prostata und Ovarien exprimiert, ist aber auch in Lungen, Nieren, Pankreas, Thymus, Testis und Dünndarm zu finden, allerdings mit geringerer Expression. An Mäusen wurde gezeigt, dass Cardiotrophin-1 während der Embryogenese hauptsächlich im sich entwickelnden Herz nachweisbar ist und erst später auch in vielen anderen Geweben zu finden ist. (Sheng et al., 1996). Asai et al. (2000) zeigten, dass das menschliche Herz Cardiotrophin-1 über den Koronarsinus in die periphere Zirkulation sezerniert.

Das Protein α -Actin kommt in Muskelgewebe vor und ist dort Hauptbestandteil des kontraktiven Apparates. Somit kann α -Actin wie in der vorliegenden Arbeit auch als Marker für Muskelzellen bzw. Herzmuskelzellen untersucht werden.

β -MHC (beta-Myosin Heavy Chain) kommt im adulten Herzen vor und bildet dort einen Bestandteil des Proteins Myosin und somit auch des kontraktiven Apparates.

Im Herzmuskel wird neben β -MHC auch noch eine weitere Isoform der schweren Myosinkette exprimiert: α -MHC (Mahdavi et al., 1982). In der vorliegenden Arbeit wurde β -MHC als kardialer Marker untersucht.

Das Protein eNOS oder endotheliale NO-Synthase gehört zu der Enzymfamilie der NO-Synthasen. Es katalysiert die Bildung von Stickstoffmonoxid aus der Aminosäure L-Arginin und ist so unter anderem an der Regulation des Blutdrucks beteiligt. eNOS wurde zunächst in Endothelzellen nachgewiesen, wurde später aber auch in Kardiomyozyten, Thrombozyten und im Gehirn entdeckt (Michel et al., 1997).

In der RT-PCR wurde HPRT als Referenzgen verwendet. Die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase ist Enzym im Purinstoffwechsel und wird daher auf relativ konstantem Niveau unabhängig von anderen Einflüssen in allen Körperzellen exprimiert.

Im Western Blot diente β -Actin als loading control. Als Bestandteil des Zytoskeletts ist es ebenfalls in allen Körperzellen zu finden.

1.3 Aufgabenstellung

Die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit war es, die Hypothese zu überprüfen, dass kardiale Progenitorzellen über die Freisetzung von verschiedenen Faktoren auf parakrinem Weg die Zellfunktion von Kardiomyozyten verbessern. Dazu erfolgte zunächst:

- 1) Die Isolierung und Kultivierung residenter kardialer Progenitorzellen aus seneszenten Rattenherzen sowie ihre Charakterisierung mithilfe von RT-PCR sowie Western-Blot-Verfahren.
- 2) Im Anschluss erfolgte die Etablierung eines in vitro – Systems zur Bestimmung der parakrinen Funktion kardialer Progenitorzellen. Mithilfe dieses Systems sollten folgende weitere Fragestellungen untersucht werden:
- 3) Inwiefern ist die Wirkung der Progenitorzellüberstände abhängig vom Grad der Differenzierung der Progenitorzellen sowie vom Alter der Gewebe, aus denen die Progenitorzellen gewonnen wurden.

- 4) Welche Auswirkungen auf die Wirkung der Progenitorzellüberstände hat eine Hemmung der Translation bzw. Transkription? Welche Rückschlüsse lassen die Ergebnisse auf den Wirkmechanismus der Progenitorzellüberstände zu?
- 5) Inwiefern ist die Wirksamkeit der Progenitorzellüberstände aus Rattenherzen mit denen aus Mäuse- und Menschenherzen vergleichbar?
- 6) Welche Wirkung haben Progenitorzellüberstände auf Kardiomyozyten aus druckbelasteten Herzen vor und nach antihypertensiver Therapie?

2. Material

2.1 Chemikalien

100bp DNA Ladder	New England BioLabs, Frankfurt/Main
5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat	Calbiochem, Schwalbach i.T.
5 x RT-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
6-Aminohexansäure	Merck, Darmstadt
Actinomycin D	Sigma, Taufkirchen
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	qbiogene, Heidelberg
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
B27	Invitrogen, Karlsruhe
Benzonase	Merck, Darmstadt
bFGF	Invitrogen, Karlsruhe
Bisacrylamid	Merck, Darmstadt
Bovines Serum-Albumin	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Carbogen	Linde, Pullach
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Cycloheximid	Sigma, Taufkirchen
Cytosin- β -Arabinofuranosid	Sigma, Taufkirchen
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Dithiotreitol	Sigma, Taufkirchen
DMEM	PAA, Cölbe
dNTP`s	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA-Natrimsalz	Sigma, Taufkirchen
EGF	Invitrogen, Karlsruhe

Ethanol	Roth, Karlsruhe
FCS	PAA, Cölbe
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Glukose	Merck, Darmstadt
Glutamine	PAA, Cölbe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Hydralazin	Sigma, Taufkirchen
IMDM	Biochrom, Berlin
Isoprenalin	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Karnitin	Sigma, Taufkirchen
KH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe
Kollagenase Typ CLSII	Biochrom, Berlin
Kreatin	Sigma, Taufkirchen
L-NAME	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Medium 199/Earl`s Salts	Biochrom, Berlin
Mercaptopropandiol	Merck-Suchard, Hohenbrunn
Methanol	Roth, Karlsruhe
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Molekulargewichtsmarker	GE Healthcare, Freiburg
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe

NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Roth, Karlsruhe
Natrium-ortho-Vanadat	Merck, Darmstadt
Nitro Blue Tetrazolium	Roche, Mannheim
Oligo-dt	Roche, Mannheim
Penicillin-Streptomycin Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Poly-l-lysine	Sigma, Taufkirchen
peqGOLD TriFast™	peqlab, Erlangen
RNA-sin	Promega, Mannheim
SDS	Merck, Darmstadt
SYBR® Safe DNA Gel stain	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-Polymerase (Thermus aquaticus)	Invitrogen, Karlsruhe
Taurin	Sigma, Taufkirchen
Temed	Serva, Heidelberg
Thrombin	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris/HCl	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin	Serva, Heidelberg
Tween 20	Sigma, Taufkirchen

Die übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Roche Diagnostics (Mannheim), Invitrogen (Karlsruhe), Calbiochem (Bad Soden), Merck (Darmstadt), und Sigma (Taufkirchen) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen. Alle verwendeten Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

2.2 Antikörper

Primäre Antikörper:

anti-ANP	Santa Cruz Biotechnology, INC.
anti-Cardiotrophin	R&D Systems, Wiesbaden
anti- β -Actin	Sigma, Taufkirchen
anti-ISL-1	Santa Cruz Biotechnology, INC.
anti-Gata-4	Sigma, Taufkirchen
anti-c-kit	Abcam, Cambridge, UK
anti-Sca-1	BD Biosciences, Heidelberg

Sekundäre Antikörper:

anti-rabbit IgG	Sigma, Taufkirchen
anti-mouse IgG	Sigma, Taufkirchen

2.3 Primer

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

HPRT	forward	CCA GCG TCG TGA TTA GTG AT
	reverse	CAA GTC TTT CAG TCC TGT CC
C-KIT	forward	AAA TGG GCA CTT GGT TTG AG
	reverse	GGG GAT CAT TGT GAT GGT TC
Sca-1	forward	GCT CCT CGA CAG ACA TCA CA
	reverse	CGA GCC ACC TTT GAC TCT TC

ISL-1	forward	CCA TCA TGT CTC TCC GGA CT
	reverse	AAG GAC AAG AAA CGC AGC AT
ANP	forward	ATG GGC TCC TTC TCC ATC AC
	reverse	TCT TCG GTA CCG GAA GCT G
BNP	forward	ATG ATT CTG CTC CTG CTT TTC C
	reverse	TCT GCA TCG TGG ATT GTT CTG
eNOS	forward	AGC CCG GGA CTT CAT CAA TCA G
	reverse	GCC CCA AAC ACC AGC TCA CTC TC
α -Actin	forward	CAC GGC ATT ATC ACC AAC
	reverse	ATA CAT GGC AGG CAC ATT GA
β -MHC	forward	TGG CAC CGT GGA CTA CAA TA
	reverse	TAC AGG TGC ATC AGC TCC AG

2.4 Geräte und Laborbedarf

2.4.1 Zellkultur

Präparationsbesteck	Aesculap, Tuttlingen
Langendorff-Apparatur	Eigenbau, Physiologisches Institut, Universität Gießen
Tissue Chopper	Harvard Apparatus, HSE, March- Hugstetten
Nylonnetz (Polyamid, 200 μ m)	NeoLab, Heidelberg
Zentrifuge	Heraeus, Hanau
Sterilbank	Kendro, Hanau
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Mikroskop	TMS-F von Nikon, Japan
Kulturschalen	Typ: Falcon 3001, 3004, 3803 Becton Dickinson, Heidelberg

2.4.2 System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Kontraktion

Interface INT4	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Mikroskop	TSM-F von Nikon, Japan
Monitor	Philips
One Dimensional Camera ZK4	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Oszillograph	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Stimulator	Physiologisches Labor des Physiologischen Institutes der Universität Gießen

2.4.3 Blutdruckmessung

Messplattform	TSE-Systems, Bad Homburg
Steuereinheit	TSE-Systems, Bad Homburg
Auswertungsprogramm	TSE-Systems, Bad Homburg
Blutdruckmanschetten	TSE-Systems, Bad Homburg

2.4.4 RT-PCR

Thermocycler (MyCycler™)	BioRad, München
Elektrophoresekammer	GE Healthcare, Freiburg
Zentrifuge	Beckmann

2.4.5 SDS-Gelelektrophorese

Hoefler-Elektrophoresekammer	GE Healthcare, Freiburg
Hoefler-Glasplatten	GE Healthcare, Freiburg
Hoefler-Plattenklemmen	GE Healthcare, Freiburg
Hoefler-Profilformer	GE Healthcare, Freiburg

Hofer-Spacer	GE Healthcare, Freiburg
PVDF-Blotmembran	Millipore, Eschborn
Netzgerät	Biometrische Analytik, Göttingen
Elektroblotkammer	Biometra, Göttingen
Filterpapier	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Hamiltonspritze (50 µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz

2.4.6 Sonstige Geräte

Digitale Analysenwaage	Mettler Toledo, Gießen
Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
Mikrowelle	Lunik 850N, Unirop GmbH
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Photometer	Pharmacia Biotech, Freiburg
pH-Meter	WTW, Weilheim
Vortexer	Heidolph, Kelheim
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn

2.4.7 Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Einweg-Zellschaber	Typ: Falcon 3087 Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter (0,2 µm Porenweite)	Sartorius, Göttingen

2.5 Auswertung

Flachbettscanner	Typ: Scan jet 4c Hewlett Packard, Eschborn
------------------	---

Software

Image Quant® Molecular Dynamics,
Krefeld

Microsoft® Excel

Mucell, Scientific Instruments GmbH
Heidelberg

3. Methoden

3.1 Isolierung und Kultivierung residenter kardialer Progenitorzellen aus seneszenten Rattenherzen

Zur Isolierung und Kultivierung residenter kardialer Progenitorzellen wurde zunächst das Myokardgewebe einer ca. 18 Monate alten weiblichen Wistar-Ratte gewonnen. Dazu wurde die Ratte für ca. 1-2 Minuten mit Diethylether narkotisiert und anschließend durch Genickbruch getötet. Nach der Eröffnung des Thorax konnten Lunge und Herz entnommen und in eine Petrischale mit 4°C kalter physiologischer Kochsalzlösung gelegt werden. Das Herz wurde von noch anhängendem Mediastinal- und Pulmonalgewebe befreit, die Aorta ascendens freipräpariert und mit physiologischer Kochsalzlösung blutfrei perfundiert.

Das weitere Vorgehen erfolgte nach dem Protokoll von Messina et al. (2004): Das Myokardgewebe wurde mit einem Gewebehacker (Tissue Chopper) in etwa 1-2 mm³ große Stücke zerkleinert. Daraufhin folgte ein Waschvorgang mit 1xPBS.

1 x PBS:

NaCl	137 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,5 mmol/l
Na ₂ HPO ₄	1,0 mmol/l
KCl	2,7 mmol/l

Auf pH 7,3 titriert

Die Gewebestücke wurden auf drei Kulturschalen vom Typ Falcon 3803 verteilt und dreimal für jeweils fünf Minuten bei 37°C mit Trypsin(0,2%)/Kollagenase(0,1%) verdaut. Nach dem letzten Verdauungsschritt wurden die Gewebestückchen mit ca. 10 ml des sogenannten Auswuchsmediums (Complete explant medium, CEM) pro Schale gewaschen und anschließend an den Waschvorgang wurden in jede der drei Schalen jeweils 30 ml CEM gefüllt und die Gewebestücke bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

100 ml CEM:

FCS	10 ml
Penicillin/Streptomycin	2 ml
Glutamine	1 ml
1:1 Mercaptopropandiol	1,4 µl
+ IMDM	auf 100 ml aufgefüllt

Als Abänderung zum Protokolls von Messina et al., 2004, wurde dieses Auswuchsmedium (CEM) eine Woche nach Anlegen der Kulturen alle zwei bis drei Tage teilweise erneuert, indem pro Kulturschale jeweils 15 ml des Mediums abpipettiert und die gleiche Menge neu angesetztes CEM hinzupipettiert wurde. Bei jedem dieser Waschvorgänge wurden sowohl ein Teil des neu angesetzten Auswuchsmediums als auch jeweils 10 ml des abpipettierten Mediums aller drei Schalen, die sogenannten Auswuchsüberstände, für den späteren Gebrauch tiefgefroren.

Nach vierwöchiger Kultivierung war eine Schicht fibroblastenartiger Zellen entstanden, über der kleine, hell leuchtende Zellen lagen, die sogenannten cardiosphere-bildenden Zellen. Unter dem Mikroskop konnten diese Zellen abfotografiert werden, bevor sie durch Trypsinisierung (mit 0,5 g Trypsin + 0,2 g EDTA in 1xPBS) vom Schalenboden gelöst wurden und in Poly-l-lysine-beschichtete Kulturschalen vom Typ Falcon 3001 (1 ml-Schalen für Western Blot) und 3004 (2 ml-Schalen für PCR) überführt wurden. Zur Beschichtung dieser Schalen wurden in jede der Kulturschalen zunächst 500 µl Poly-l-lysine auf dem Schalenboden verteilt, das nach fünf Minuten wieder abgesaugt wurde. Anschließend wurde in jede Schale jeweils 1 ml aqua ad iniectabilia pipettiert, welches direkt im Anschluss wieder abgesaugt wurde. Schließlich wurden die geöffneten Kulturschalen für zwei Stunden unter der Sterilbank getrocknet. In diesen Schalen sollten die Zellen durch ein spezielles Medium (Differenzierungsmedium, cardiosphere-growing medium) zu Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen differenzieren.

Zum Trypsinisieren der Zellen wurden die Kulturschalen zunächst vollständig abgesaugt, sodass lediglich die am Boden haftenden Zellen und Gewebestücke in den Schalen verblieben. Im Anschluss an den fünfminütigen Trypsinisiervorgang konnten die Zellen aus den Schalen herauspipettiert werden und in das bereits vorbereitete Differenzierungsmedium gegeben werden, wodurch auch die Verdauung durch Trypsin gestoppt wurde.

75 ml Differenzierungsmedium (CGM):

IMDM	26,25 ml
DMEM	48,75 ml
B27	1,5 ml
1 :1 Mercaptopropandiol	1,06 µl
bFGF	75 µl
Thrombin	75 µl
Cardiotrophin-1	75 µl
EGF	75 µl
Glutamine	750 µl
Penicillin/Streptomycin	1,5 ml
FCS	4,98 ml

Im Medium wurden die geernteten Zellen und Gewebestücke nun mehrmals auf- und abpipettiert, um diese zu vermischen, sodass sie sich anschließend gleichmäßig auf die vorbereiteten Kulturschalen verteilen ließen. Je nach Kulturschale wurden nun jeweils 2 ml (Falcon Typ 3004) oder 1 ml (Falcon Typ 3001) dieser in Medium verteilten Zellen und Gewebestücke auf die zuvor mit Poly-l-lysine-beschichteten Kulturschalen überführt.

Auch das Differenzierungsmedium wurde alle zwei bis drei Tage teilweise erneuert, indem pro Schale Typ Falcon 3004 je 1 ml Überstand abpipettiert und durch 1 ml neu angesetztes Differenzierungsmedium ersetzt wurde. Bei den Kulturschalen Typ Falcon 3001 wurden entsprechend jeweils 500 µl Überstand abpipettiert und durch 500 µl neu angesetztes Differenzierungsmedium ersetzt. Alle sogenannten

Differenzierungsüberstände und ebenso ein Teil des bei jedem Waschvorgang neu angesetzten Differenzierungsmediums wurden zur späteren Verwendung eingefroren.

Nach zweiwöchiger Kultivierung wurden wiederum Aufnahmen der Kulturschalen unter dem Mikroskop gemacht und es folgte die weitere Verarbeitung der Zellen wie in den nachfolgenden Kapiteln dargestellt mit dem Ziel der Charakterisierung mittels RT-PCR und Western Blot-Verfahren.

Im Rahmen der Isolierung und Kultivierung kardialer Progenitorzellen aus Rattenherzen wurden wie beschrieben verschiedene Kulturmedien eingesetzt und Überstände gewonnen. Zum einen wurde in der ersten, vierwöchigen Phase der Kultivierung das sogenannte Auswuchsmedium oder complete explant medium (CEM) verwendet. Bei den zwei- bis dreitägigen Waschvorgängen wurde dann der sogenannte Auswuchsüberstand gewonnen.

In der sich anschließenden zweiwöchigen Kultivierungsphase sollten die Zellen durch ein weiteres spezielles Medium zu Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen differenzieren. Dieses Medium wurde als Differenzierungsmedium oder cardiosphere-growing medium (CGM) bezeichnet. Analog zum Auswuchsüberstand wurde hier bei den Waschvorgängen der sogenannte Differenzierungsüberstand gewonnen.

Diese Kulturmedien und Überstände wurden später, wie in den entsprechenden Kapiteln des Ergebnisteils beschrieben, in verschiedenen Versuchen eingesetzt.

Für einen Teil der Versuche wurde mit Mäuseherzen sowie im Rahmen von chirurgischen Eingriffen gewonnenen Gewebeproben humaner Herzen gearbeitet. Die hierzu erforderliche Genehmigung der Ethik-Kommission des Fachbereichs Medizin liegt vor (Az. 123/06 vom 22.11.2006).

3.2 Reverse Transkriptase - PCR (RT - PCR)

3.2.1 Präparative RNA-Isolierung (Chomczynski et al., 1987)

3.2.1.1 Zellernte

Zur RNA-Isolierung wurde das Kulturmedium aus den Zellkulturschalen vom Typ Falcon 3004 abgesaugt und eine der Schalen mit 600µl 1xPBS versetzt. Die Zellen wurden nun mithilfe eines Zellschabers vom Boden dieser Kulturschale entfernt und anschließend von Schale zu Schale zu einer Zellsuspension zusammengeführt.

Diese Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Um eine ausreichende Menge an RNA zu gewährleisten, wurde dieser Vorgang noch einmal wiederum mit 600µl 1xPBS wiederholt und die erhaltene Zellsuspension ebenfalls in das erwähnte Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde nun für fünf Minuten bei 3500 upm (Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das so gewonnene Zellpellet zur sofortigen Weiterverarbeitung auf Eis gestellt oder zur späteren Verarbeitung bei -80°C tiefgefroren.

1 x PBS:

NaCl	137 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,5 mmol/l
Na ₂ HPO ₄	1,0 mmol/l
KCl	2,7 mmol/l

Auf pH 7,3 titriert

Das gewonnene Zellpellet wurde mit 1 ml peqGOLD TriFast™ resuspendiert und mithilfe eines Vortex-Schüttlers vermischt. Anschließend wurde die Suspension mit 100 µl Chloroform versetzt und erneut gut durchmischt, bis eine milchige Trübung eintrat. Die folgende Zentrifugation bei 4°C für 15 Minuten bei 12000 upm trennte die gesamte RNA von DNA und Proteinen, erkennbar an der Bildung von insgesamt drei

Phasen. Die obere, klare Phase enthielt die gesamte RNA, in der unteren, rosa Phase war die DNA und in der mittleren, dünnen Phase waren die Proteine gelöst. Die obere Phase wurde nun vorsichtig abpipettiert (ca. 150 µl) und in ein neues, steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Zur Fällung der RNA wurden dem Eppendorfgefäß nun dem Verhältnis 1:1 entsprechend 150 µl Isopropanol zugesetzt, die Lösung kurz vermischt und anschließend für mindestens 20 Minuten bei -20°C aufbewahrt. Nach anschließender Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 12000 upm konnte die gefällte RNA nach Absaugen des Überstandes in einem Pellet gewonnen werden. Anschließend wurde die RNA mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und wiederum für 15 Minuten bei 4°C und 12000 upm zentrifugiert. Die im Pellet enthaltene RNA wurde luftgetrocknet und abschließend in 10 µl sterilem aqua bidest. resuspendiert.

3.2.2 Messung des RNA-Gehaltes

Im Anschluss an die RNA-Isolierung wurde die RNA-Menge photometrisch bestimmt. Dazu wurden 3 µl der RNA-enthaltenden Lösung in 1 ml aqua bidest. gelöst und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Um die Reinheit der RNA-Präparation zu überprüfen, wurde die Probe zusätzlich bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Das errechnete Verhältnis der beiden Extinktionswerte (260 nm/280 nm) sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen, um eine möglichst reine RNA-Suspension vorliegen zu haben. Die benötigte Menge an RNA für die Reverse Transkription betrug 1 µg, sodass anschließend das Volumen ausgerechnet werden musste, in dem diese Menge RNA gelöst war.

3.2.3 Herstellung von cDNA (Reverse Transkription)

Bei der Reversen Transkription wurde je 1 µg RNA pro Ansatz zur cDNA-Synthese eingesetzt. Diese Menge wurde mit sterilem aqua bidest. auf ein Gesamtvolumen von 5 µl aufgefüllt. Anschließend wurden diese Proben 10 Minuten bei 60°C im Thermocycler denaturiert.

Währenddessen konnte der Mix angefertigt werden. Für einen Ansatz setzte sich dieser Mix wie folgt zusammen:

Reaktionsmix:

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

Die Proben wurden nun auf Eis gestellt und zu jeder Probe 5 µl Mix pipettiert. Die Reverse Transkription erfolgte bei 37°C für eine Stunde im Thermocycler. Abschließend wurde die gebildete cDNA bei 95°C für fünf Minuten denaturiert. Bis zur späteren Verwendung konnten die Proben bei -20°C tiefgefroren werden.

3.2.4 Polymerase Kettenreaktion (Mullis et al., 1986)

Die cDNA-Proben wurden nun in der Polymerase Kettenreaktion amplifiziert. 1,5 µl cDNA und 8,5 µl des PCR-Reaktionsmix wurden hierzu in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt. Als Laufkontrolle diente der Reaktionsmix ohne Probe. Jede Probe wurde im Doppelansatz eingesetzt.

PCR-Reaktionsmix:

10 x PCR-Puffer	1,0 µl
aqua bidest.	5,8 µl
Primergemisch (fw+rev)	(100 µM) 0,3 µl
dNTP`s	10 µM 0,4 µl
MgCl ₂	50 mM 0,3 µl
1% W1	0,5 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl

Folgende Primer wurden gewählt:

Tabelle 1:

Primer	Annealing-Temperatur	Produktgröße
HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) fw CCA GCG TCG TGA TTA GTG AT rev CAA GTC TTT CAG TCC TGT CC	63,0°C	132 bp
C-KIT fw AAA TGG GCA CTT GGT TTG AG rev GGG GAT CAT TGT GAT GGT TC	61,0°C	285 bp
Sca-1 fw GCT CCT CGA CAG ACA TCA CA rev CGA GCC ACC TTT GAC TCT TC	61,0°C	275 bp
ISL-1 fw CCA TCA TGT CTC TCC GGA CT rev AAG GAC AAG AAA CGC AGC AT	56,0°C	122 bp
ANP fw ATG GGC TCC TTC TCC ATC AC rev TCT TCG GTA CCG GAA GCT G	58,0°C	456 bp
BNP fw ATG ATT CTG CTC CTG CTT TTC C rev TCT GCA TCG TGG ATT GTT CTG	58,0°C	100 bp

eNOS		56,0°C	144 bp
fw	AGC CCG GGA CTT CAT CAA TCA G		
rev	GCC CCA AAC ACC AGC TCA CTC TC		
α -Actin			
fw	CAC GGC ATT ATC ACC AAC	61,0	183 bp
rev	ATA CAT GGC AGG CAC ATT GA		
β -MHC			
fw	TGG CAC CGT GGA CTA CAA TA	61,0	145 bp
rev	TAC AGG TGC ATC AGC TCC AG		

Die PCR wurde nun mit einem Thermocycler unter folgenden Konditionen durchgeführt:

Zyklus 1 (1x):

94°C für 5 Minuten

Zyklus 2 (35x):

94°C für 45 Sekunden (Denaturierung)

X°C für 45 Sekunden (Annealing)

72°C für 45 Sekunden (Amplifikation)

Zyklus 3 (1x)

72°C für 7 Minuten

Für jeden Primer wurde die für ihn optimale Annealing-Temperatur eingestellt (siehe Tabelle 1).

Der prinzipielle Ablauf der PCR beruhte somit auf drei Schritten, die sich bei jedem Zyklus wiederholten: Denaturierung, Annealing und Amplifikation.

Zunächst wurden die komplementären DNA-Stränge durch das Erhitzen auf 94°C in DNA-Einzelstränge aufgeschmolzen (Denaturierung). Durch das anschließende Absenken der Temperatur auf die individuelle Annealingtemperatur wurde die Hybridisierung der Primer an die einzelsträngige DNA ermöglicht. Durch das erneute

Erhitzen auf 72°C, der optimalen Arbeitstemperatur der Taq-Polymerase, konnte diese die auf der DNA hybridisierten Primer verlängern, bis eine genaue Kopie des gewünschten Genabschnitts entstanden war. Durch die Wiederholung dieser drei Schritte wurde bei jedem Zyklus die Menge des untersuchten Genabschnitts verdoppelt, sodass die Syntheserate einem exponentiellen Wachstum entsprach.

3.2.5 DNA-Gelelektrophorese

Zur Auswertung der RT-PCR wurden die vervielfältigten PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wurde durch Kochen von 3 g Agarose in 150 ml 1xTAE-Puffer in der Mikrowelle hergestellt.

10xTAE-Puffer:

Tris-Acetat	40 mmol/l
EDTA	1 mmol/l

Anschließend wurden 10 µl SYBR® Safe hinzugegeben. Das Gemisch wurde nun in eine Plastikwanne gegossen. Eingesetzte Plastikämme dienen zur Aussparung der Probenaschen. Nach dem Erkalten und Aushärten des Gels konnten die Kämmen entfernt, das Gel in eine Elektrophoresekammer überführt und mit 1xTAE-Puffer übergossen werden. Anschließend wurden jeweils in die 1. Taschen 10 µl 100bp-Marker pipettiert. Jede Probe wurde nun mit jeweils 2 µl Auftragspuffer gemischt. In die übrigen Taschen wurden nun jeweils 10 µl der mit Auftragspuffer vermischten Proben pipettiert.

100bp-Marker:

100bp DNA-Ladder	5 µl
TAE-Auftragspuffer	10 µl
1xTAE	58µl

TAE-Auftragspuffer:

10xTAE-Puffer	0,5 ml
Glycerin	0,5 ml
Bromphenolblau	1/10 Spatelspitze

Die Gelelektrophorese wurde bei ca. 96 Volt für etwa 25 Minuten durchgeführt. Anschließend konnten die DNA-Banden durch UV-Licht der Wellenlänge 366 nm sichtbar gemacht und abfotografiert werden.

3.3 Protein-Gelelektrophoretische Methoden

3.3.1 Probenvorbereitung

Als erster vorbereitender Schritt erfolgte das Waschen der Zellen mit kaltem 1 x PBS. Hierdurch wurden die intrazellulären Reaktionen abgestoppt. Zur Auflösung der Zellmembran wurden die Zellen anschließend mit 200 µl Lysispuffer pro 3001-Schale versetzt und für 10 Minuten geschüttelt.

Lysispuffer:

Tris/HCl	50 mmol/l (pH 6,7)
SDS	2% (wt/vol)
Mercaptopropandiol	2% (wt/vol)
Natrium-ortho-Vanadat	1 %

SDS (Natriumdodecylsulfat) lagert sich an die Proteine an, denaturiert diese und verleiht ihnen durch die Sulfatgruppen eine negative Ladung. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Proteine nur in Abhängigkeit von ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt wurden und die SDS-Protein-Komplexe zur Anode wanderten. Die Disulfidbrücken zwischen Cysteinen wurden durch das reduzierende

Mercaptopropandiol aufgespalten und durch Natrium-ortho-Vanadat wurde die Aktivität der Protein-Tyrosin-Phosphatasen gehemmt.

Zum Verdau der Nukleinsäuren erfolgte für weitere 5 Minuten die Zugabe von Benzonase (Endkonzentration 50 U/ml: Benzonase 30:1 verdünnen, dann 10 µl pro Schale). Anschließend wurden die Zellbestandteile mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgekratzt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Pro Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden nun 20 µl Probenpuffer hinzugegeben. Das darin enthaltene Glycerin diente der Beschwerung der Proben. Der ebenfalls im Probenpuffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau diente als Marker für die Dauer der Elektrophorese.

Probenpuffer:

Aqua bidest. (80%)/Glycerin(20%)	5:1
Bromphenolblau	1 Spatelspitze auf 10 ml

Abschließend wurden die Proben zur Denaturierung der Proteine für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Dabei wurden die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspaltung der Wasserstoffbrücken und Streckung der Moleküle aufgelöst.

3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Es wurde eine Gelelektrophorese in Form einer SDS-Page durchgeführt. Dazu wurden zunächst die Glasplatten der Gelkammern mit Ethanol entfettet. Beidseits wurden nun Abstandshalter (Spacer) zwischen den Glasplatten fixiert. Zwischen die Glasplatten wurde nun bis auf 2/3 der Höhe das Trenngel gegossen. Für diese Versuche wurden entsprechend der Molekulargewichte 4 verschiedene Trenngel verwendet: ein 7,5%iges, ein 12,5%iges, ein 15%iges und ein 18,5%iges Trenngel.

Die Mengenangaben im folgenden Abschnitt beziehen sich auf ein Trenn- bzw. Sammelgel.

Trenngel	7,5%	12,5%	15%	18,5%
AA/BAA (30:1)	7,5 ml	11,25 ml	15 ml	18,5 ml
Trenngelpuffer (pH 8,8)	7,5 ml	6,75 ml	7,5 ml	7,5 ml
Aqua bidest.:	15 ml	9 ml	7,5 ml	4 ml
SDS 10% (wt/vol)	300 µl	270 µl	300 µl	300 µl
APS 10% (wt/vol)	200 µl	180 µl	200 µl	200 µl
TEMED	25 µl	22,5 µl	25 µl	25 µl

Trenngelpuffer:

Tris/ HCl 1,5 mol/l (pH 8,6)

Um eine Polymerisation unter Luftausschluss zu gewährleisten, wurde das Trenngel mit Wasser überschichtet. Somit wurde verhindert, dass die obersten Schichten komplett polymerisieren und eine harte Grenze zum Sammelgel bilden. Nach mindestens einer Stunde Polymerisation wurde das Wasser entfernt und die Gelkammer bis zur Oberkante mit dem Sammelgel gefüllt.

Sammelgel:

AA/BAA (30:1)	1,2 ml
Sammelgelpuffer pH 6,8	2,5 ml
Aqua bidest.	6,4 ml

SDS 10% (wt/vol)	50 μ l
APS 10% (wt/vol)	100 μ l
TEMED	12 μ l

Sammelgelpuffer:

Tris/ HCl 0,5 mol/l (pH 6,8)

Außerdem wurde sofort der Profilformer für die Taschen eingesetzt. Nach weiteren 30 Minuten war das Sammelgel ebenfalls polymerisiert. Der Kamm konnte nun herausgezogen und der Probenraum mit Laufpuffer gespült und aufgefüllt werden.

Laufpuffer:

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

Anschließend wurden die Proben in die Taschen pipettiert. Sie sanken durch das im Probenpuffer enthaltene, beschwerende Glycerin auf den Boden der Taschen und verdrängten den Laufpuffer nach oben. Die Elektrophoresekammer wurde anschließend in einem mit Laufpuffer gefüllten Behälter gesetzt. Die Elektrophorese lief bei einer Spannung von 200 Volt über einen Zeitraum von 3-4 Stunden. Pro Gel wurde ein Molekulargewichtsmarker, der sogenannte Rainbow-Marker, ein Proteingemisch mit bekannter Größe, mit aufgetrennt. Dieser Marker ermöglichte schließlich anhand der Markerbanden die Ermittlung des Molekulargewichtes der Proteine.

3.3.3 Western Blot-Verfahren

Die Proteine, die in der SDS-Page aufgetrennt wurden, wurden anschließend im „Semi-dry-blotting-Verfahren“ nach Kyhse-Andersen (1984) elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran transferiert. Hierbei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Auch wird dabei das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen, sodass die Proteine renaturieren können und teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen. Dies ermöglicht später ihre Erkennung durch Antikörper.

Zunächst erfolgte das Zusammensetzen der Blotkammer. Jeweils drei Filterpapiere wurden in konzentriertem bzw. nicht-konzentriertem Anodenpuffer getränkt und luftblasenfrei auf die Anode der Blotkammer gelegt. Darüber wurde die Blotmembran positioniert, die zuvor in 100%igem Methanol sowie nicht-konzentriertem Anodenpuffer geschwenkt wurde. Auf die Blotmembran wurde vorsichtig das Polyacrylamidgel aufgelegt, sowie drei weitere, zuvor in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere. Abschließend wurde die Kathode der Blotkammer aufgesetzt.

Zusammensetzung der Blotpuffer:

Kathodenpuffer (A):

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

Anodenpuffer (B):

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

Konzentrierter Anodenpuffer (C):

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

Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei Raumtemperatur und bei konstanten 90 mA bei einem Gel pro Kammer bzw. 180 mA bei zwei Gelen pro Kammer für 30 – 240 Minuten (entspricht 0,9 mA/cm²) in Abhängigkeit von der Proteingröße (je größer das Protein, desto länger).

3.3.4 Immunologische Nachweisverfahren

Nach dem elektrophoretischen Transfer von Protein auf PVDF müssen zunächst die freien Bindungsstellen der Membran mit Blocking Puffer abgesättigt werden. Als Blocking Puffer wurde 2% BSA (bovine serum albumin = Albumin aus Rinderserum) verwendet. Dieses bindet an sämtliche freie Bindungsstellen der Membran und ist selber für die später eingesetzten Antikörper nicht erkennbar. Somit wird der spezifische Nachweis von Antigenen ermöglicht.

Zunächst wurde die Blotmembran für eine Stunde in einer Färbewanne mit ausreichend Blocking Puffer überschichtet. Der Blocking Puffer wurde anschließend abgegossen und die Membran einmal für fünf Minuten mit 1xTBS gewaschen.

1 x TBS-Puffer:

Tris/HCl	10 mmol/l
NaCl	150 mmol/l
pH 7,4	

Nach dem Waschvorgang erfolgte die zweistündige Inkubation mit dem Primärantikörper.

Als Primärantikörper wurden folgende Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet:

ANP	17 kDa	1:200
Cardiotrophin	21 kDa	1:250
β -Actin	42 kDa	1:1000
ISL-1	39 kDa	1:200
Gata-4	44,6 kDa	1:1000
Sca-1	18 kDa	1:500
c-kit	145 kDa	1:500

Nach jeweils zwei 5minütigen Waschschritten mit 1xTBS + 0,1% (vol/vol) Triton erfolgte die einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper, an den das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt war. Hierfür wurden Maus- und Hase-Antikörper in einer Verdünnung von jeweils 1:1000 verwendet. Darauf folgte ein weiterer Waschvorgang für fünf Minuten mit 1xTBS + 0,5% (vol/vol) Triton. Anschließend wurden die Blotmembranen ca. eine Minute mit dem AP-Puffer inkubiert.

Alkalischer Phosphatasepuffer (AP-Puffer):

Tris/HCl	100 mmol/l (pH 9,5)
MgCl ₂	5 mmol/l
NaCl	10 mmol/l

Antikörperlösung :

Tris	50 mmol/l
NaCl	150 mmol/l
Tween 20	0,05% (vol/vol)
BSA	2% (wt/vol)

Als letzter Schritt wurden die gesuchten Banden mithilfe der Entwicklerlösung sichtbar gemacht. Das diese Farbreaktion auslösende Enzym ist die Alkalische

Phosphatase, die an den Antikörper gekoppelt ist. Durch die katalytische Aktivität dieses Enzyms wird die Phosphatgruppe des BCIP abgespalten. Gleichzeitig wird durch die Alkalische Phosphatase NBT reduziert. BCIP erscheint in dephosphorylierter Form blau, die reduzierte Form von NBT bildet einen violetten, schwerlöslichen Niederschlag. Gemeinsam ergeben beide Farbstoffe ein blauviolett Präzipitat. Die Entwicklerlösung führt also überall dort, wo Alkalische Phosphatase an die Proteine gebunden ist, zu einer blauviolett Färbung.

Entwicklerlösung:

AP-Puffer	50,0 ml
BCIP	5,2 mg
NBT	13,2 mg

Nachdem die Farbreaktion mit Wasser abgestoppt wurde, wurden die entwickelten Blotmembranen getrocknet, eingescannt, die Signalstärke der einzelnen Proteinbanden densitometrisch erfasst und im Programm Image Quant® quantitativ ausgewertet.

3.4 Isolierung von Herzmuskelzellen

3.4.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden, soweit nicht anders erwähnt, mit Kardiomyozyten von ca. 3 Monate alten und 250 - 350 g schweren, männlichen Wistar-Ratten durchgeführt. Die Tiere stammten aus der Zucht des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen. Sie hatten im Tierstall jederzeit freien Zugang sowohl zu Wasser als auch zu fester Nahrung (Standardfuttermittel Altromin®).

3.4.2 Präparation von Herzmuskelzellen adulter Ratten (Piper et al., 1982)

Zur Isolierung der ventrikulären Kardiomyozyten wurde eine Langendorff-Perfusionsapparatur verwendet. Diese wurde vor Beginn der Präparation zunächst mit aqua bidest. und anschließend mit Powell-Medium (s.u.) gespült. Es folgte das Befüllen der Anlage mit 80 ml des gleichen Mediums. Das Powell-Medium musste im Perfusionskreislauf luftblasenfrei zirkulieren und auf eine Temperatur von 37°C erwärmt werden. Während der gesamten Präparation wurde das Powell-Medium mit Carbogen begast.

Zusammensetzung des Powell-Mediums:

NaCl	110 mmol/l
KCl	2,5 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mmol/l
MgSO ₄	1,2 mmol/l
NaHCO ₃	25 mmol/l
Glukose	11 mmol/l

Die Ratten wurden für ca. 1-2 Minuten mit Diethylether narkotisiert und anschließend durch Genickbruch getötet. Nach der Eröffnung des Thorax konnten Lunge und Herz entnommen und in eine Petrischale mit 4°C kalter physiologischer Kochsalzlösung gelegt werden. Das Herz wurde von noch anhängendem Mediastinal- und Pulmonalgewebe befreit und die Aorta ascendens freipräpariert, um das Herz anschließend mit der Aorta an die Perfusionskanüle der Langendorff-Apparatur anzuhängen.

Das Herz wurde nun mit 40 ml Powell-Medium und mit einer Flussgeschwindigkeit von ca. 30 Tropfen/min blutfrei perfundiert. Anschließend erfolgte die 25 minütige rezirkulierende, retrograde Perfusion mit Kollagenasepuffer (s.u.) mit einer Flussgeschwindigkeit von ca. 1 Tropfen/sec..

Kollagenasepuffer:

Powell-Medium	40 ml
Kollagenase	25 mg
Calciumchlorid-Stammlösung	12,5µl

Calciumchlorid-Stammlösung:

CaCl₂ 100 mmol/l

Nach Beendigung der Enzymperfusion wurden die Aorta und die Vorhöfe entfernt und das Ventrikelgewebe mit einem Gewebehacker (Tissue Chopper) bei einer Schnittbreite von 0,7 mm mechanisch zerkleinert. Anschließend erfolgte ein Nachverdau. Hierfür wurde das Gewebe etwa 5 Minuten lang in 30 ml Kollagenase-Puffer aus der Anlage unter permanenter Carbogen-Begasung wiederholt auf- und abpipettiert, um die Auftrennung des Gewebes in Einzelzellen zu unterstützen.

Die so gewonnene Zellsuspension wurde durch ein Nylonnetz mit einer Porengröße von 200 µm filtriert und das Filtrat anschließend 3 Minuten bei 400 U/min zentrifugiert, um kleinere Zellen, wie z.B. Endothelzellen und Zelltrümmer von intakten Kardiomyozyten zu trennen. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 6 ml Powell-Medium mit einem CaCl₂-Anteil von 200 µmol/l resuspendiert. Nach nochmaliger Zentrifugation für 2 Minuten bei 400 U/min und Absaugen des Überstandes wurde das gewonnene Zellpellet erneut in Powell-Medium mit einem gesteigerten CaCl₂-Anteil von 400µmol/l aufgenommen und zu einer homogenen Suspension aufgeschüttelt. Diese wurde in ein zu 2/3 mit Powell-Medium + 1 mM CaCl₂-Lösung gefülltes Reagenzglas gegeben. Nach letztmaliger Zentrifugation für 1 Minute bei 300 U/min und Absaugen des Überstandes erhielt man eine Zellpopulation, die zu 70-80% aus intakten, stäbchenförmigen Kardiomyozyten bestand.

3.5 Zellkultur von isolierten Kardiomyozyten

3.5.1 Vor- und Ausplattieren der Zellkulturschalen

Die Zellkulturschalen vom Typ Falcon 3001 wurden vor dem Ausplattieren der Zellen für mindestens 4 Stunden bei 37°C mit ca. 1 ml Vorinkubationsmedium (s.u.) pro Schale beschichtet. Dies sollte ein Anheften der Kardiomyozyten an den Schalen ermöglichen. Unmittelbar vor dem Ausplattieren der Zellen wurde das Vorinkubationsmedium abgesaugt.

CCT-Medium:

Medium 199 / Earl`s Salts	9,8 g/l
HEPES	15 mmol/l
Kreatin	5 mmol/l
Karnitin	5 mmol/l
Taurin	5 mmol/l
Cytosin- β -Arabinofuranosid	10 μ mol/l

Auf pH 7,4 titriert und sterilfiltriert.

Vorinkubationsmedium:

CCT-Medium	x ml
FCS (fetal calve serum)	4% (vol/vol)
Penicillin	100 IE/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

Das bei der Präparation gewonnene Zellpellet eines Herzens wurde vorsichtig in ca. 24 ml 37°C warmem CCT-Kulturmedium (s.u.) gelöst. Die homogene Suspension wurde anschließend gleichmäßig auf die Zellkulturschalen verteilt. Jede Schale wurde so mit ca. 1 ml der Zell-Suspension gefüllt.

CCT-Kulturmedium:

CCT-Medium	x ml
Penicillin	100 IE/ml
Streptomycin	100 µg/ml

3.5.2 Anlegen von Kurzzeitkulturen isolierter Kardiomyozyten

Um ein Anheften der intakten Zellen an den Boden der Kulturschalen zu erreichen, wurden diese für 2-4 Stunden bei 37°C und unter CO₂-freien Bedingungen im Brutschrank inkubiert. Das anschließende zweimalige Waschen der Zellen mit CCT-Kulturmedium diente der Entfernung von Zelltrümmern sowie von abgerundeten bzw. bis dahin nicht angehefteten Zellen. Auf die Schalen wurde jeweils 1 ml CCT-Kulturmedium als Endvolumen gegeben. Im Anschluss an die Waschvorgänge wurden die Zellen, wenn im Versuchsprotokoll nicht anders vermerkt, über Nacht mit verschiedenen Substanzen inkubiert und anschließend Messungen durchgeführt (siehe Versuchsprotokolle im Ergebnisteil).

Zur Qualitätskontrolle der präparierten Zellen wurde bei jedem Experiment eine Gruppe von Zellen mitgeführt, die im Anschluss an die Waschvorgänge nicht mit weiteren Substanzen inkubiert wurde. Durch Messung der Kontraktionsparameter dieser unbehandelten Kardiomyozyten konnten beispielsweise präparationsbedingte Unterschiede der Zellqualität erfasst werden.

3.6 Messung von Myokardzell-Kontraktionen im elektrischen Feld

3.6.1 Probenvorbereitung

Sofern im Versuchsprotokoll nicht anders angegeben, wurde bei der Messung der Myokardzell-Kontraktionen mit Übernachtkulturen von isolierten Kardiomyozyten gearbeitet. Dazu wurden die Zellen mit unterschiedlichen Substanzen über Nacht für

etwa 20 Stunden inkubiert. Die Messung der Kontraktionsparameter erfolgte, wenn nicht anders vermerkt, ohne Zugabe weiterer Reagenzien.

Eine Gruppe von unbehandelten Zellen, die also nach den Waschvorgängen nicht mit weiteren Substanzen inkubiert wurde, wurde bei jedem Experiment zur Qualitätskontrolle der Zellen mitgeführt.

3.6.2 Elektrische Stimulation und Steuerung der Myokardzell-Kontraktion

Für die nachfolgenden Messungen wurde die Kulturschale auf den Objektisch eines Mikroskops gestellt. Sie wurde mit einem Deckel verschlossen, in den vier Löcher gebohrt waren. Diese waren quadratisch zueinander angeordnet und dienten dazu, dass ein Draht vom Elektrostimulator als Kathode angeschlossen werden konnte, in das Medium eintauchen konnte und durch die benachbarte Bohröffnung wieder herausgeführt werden konnte. Analog dazu führte man durch die beiden anderen Bohrlöcher einen zweiten Draht, der später an die Anode angeschlossen wurde.

Angeschlossen an den Stimulator baute sich zwischen den beiden Drähten ein elektrisches Feld auf. Dieses war einem homogenen Feld angenähert, was einen relativ gleichmäßigen Stromfluss durch die Zellen bewirkte, die zwischen den beiden Drähten lagen.

Die Kardiomyozyten wurden mit biphasischen Stromstößen zur Kontraktion stimuliert. Diese Stromstöße wurden von zwei 60 Volt starken entgegengesetzten Rechteckspannungen ausgelöst und dauerten jeweils 0,5 Millisekunden an. Etwaige Spontankontraktionen der Zellen in unregelmäßiger Frequenz wurden durch die Stimulation vereinheitlicht, indem der Stimulator ihnen seine Stromstoßfrequenz als Kontraktionsfrequenz aufzwang. Diejenigen Zellen, die die vorgegebene Frequenz nicht annahmen, wurden in den Messungen nicht berücksichtigt. Durch Änderung der Stimulationsfrequenz konnte man den Kardiomyozyten nun verschiedene Frequenzen vorgeben.

3.6.3 Messung der Kontraktionsparameter

Die Erfassung der Kontraktionsparameter erfolgte mit einer Geräteanordnung der Firma Scientific Instruments GmbH aus Heidelberg. Die Zellkulturschale befand sich während der Stimulation der Zellen auf dem Objektisch eines Mikroskops, durch welches man die Zellen bei ihren Kontraktionen beobachten konnte.

An das Mikroskop war zum einen eine Videokamera angeschlossen, die der Beobachtung des Okularbildes auf einem Monitor diente und zum anderen eine Zeilenkamera, die in der Lage war, Zellgrenzen über die Wahrnehmung von Helligkeitsunterschieden zu erkennen.

Um die Zellkontraktion mit der Zeilenkamera beobachten zu können, wurde diese nun so positioniert, dass beide Zellenden im Bild der eindimensionalen Zeile lagen. Dazu wurde die Kulturschale so eingestellt, dass sich die betreffende Zelle genau in der Mitte des Okularbildes befand. Anschließend drehte man die Zeilenkamera, bis man am Videobild sehen konnte, dass sich beide Zellenden im Erfassungsbereich der Zeilenkamera befanden.

Das in elektrische Signale umgewandelte Bild der Zeilenkamera wurde nicht auf einem Monitor, sondern über das Interface auf einem Oszillographen dargestellt. Die Ablenkzeit war auf dem Horizontalverstärker fest auf 0,1 ms/cm eingestellt, der Vertikalverstärker war auf 5 V/div geregelt. Für die Bilddarstellung wurde er intern getriggert. So erhielt man ein stehendes Bild. Die von der Zeilenkamera wahrgenommenen unterschiedlichen Helligkeiten wurden auf dem Oszillographen als verschieden starke y-Ablenkungen dargestellt. Die Amplituden, die die Zellgrenzen darstellten, ließen sich an ihrer horizontalen Bewegung identifizieren. Somit war es also möglich, die Zellkontraktionen auf dem Oszillographen zu beobachten.

Der Oszillograph wurde als Zwei-Kanal-Oszillograph betrieben. Am zweiten Kanal lag eine feste Spannung des Interface an. Wenn diese abgelesen wurde, stellte sie sich als eine weitere horizontale Linie einer bestimmten Höhe auf dem Bildschirm des Oszillographen dar. Wurde sie nicht abgelesen, zeigte der Oszillograph eine horizontale Linie in der Höhe Null. Diese zweite Spannung wurde auf folgende Weise extern über das Interface getriggert: Man setzte einen Triggermarker des Interface, der ebenfalls vom Interface auf dem Oszillograph durch eine Amplitude sichtbar

gemacht wurde, vor eine Amplitude des Zellbildes. Erreichte die ansteigende Spannung des Zellbildes (sichtbar gemacht durch den Anstieg der Amplitude des Zellbildes) den Wert, der durch den Triggermarker vorgegeben wurde (sichtbar gemacht durch die Amplitude des Triggermarkers), begann der Oszillograph, die Interface-Spannung am zweiten Kanal aufzuzeichnen. Am Bildschirm des Oszillographen sah man an dieser Stelle im Bild des zweiten Kanals einen Sprung der Horizontalen aus der Null-Position in die Höhe. Veränderte nun die Amplitude des Zellbildes im Zuge der Kontraktion ihre Position, so veränderte sich auch die Position, an welcher der Trigger-Wert erreicht wurde. Damit veränderte sich ebenso die Stelle, an der die Horizontale nach oben sprang. Im bewegten Bild sah man, wie sich die obere Horizontale an ihrer Kante vor und zurück bewegte. Somit konnte man also anhand der Horizontalen die Zelllänge und die Zellkontraktion an dieser Zellkante beobachten. An der anderen Zellkante verfuhr man analog.

Die Information Interface-Spannung an bzw. Interface-Spannung aus wurde vom Oszillograph an das Interface weitergegeben, welche sie wiederum an einen Computer weiterleitete.

Auf diesem PC war das Programm Mucell der Firma Scientific Instruments GmbH installiert. Aus der erhaltenen Information registrierte dieses Programm die Länge der Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt und erstellte daraus einen Graphen, der die Zelllänge in Abhängigkeit der Zeit darstellte, also eine Kurve welche die Kontraktion der Zelle darstellte. Der Computer erkannte an der jeweils einsetzenden Längenverkürzung den Beginn einer Kontraktion. Er nahm vier Kontraktionen auf und ermittelte folgende Werte als Mittelwerte aus den jeweiligen vier Einzelmessungen:

1. Die maximale Zelllänge (diastolische Zelllänge) in Mikrometern
2. Die Zeit vom Beginn der Kontraktion bis zur maximalen Kontraktion („Time-to-Peak“) in Millisekunden
3. Die Amplitude der Zellverkürzung in Mikrometern
4. Die Zeit bis zur 50%igen Zellkontraktion in Millisekunden („Time-to-Peak 50%“)
5. Die Zeit von der maximalen Kontraktion bis zur Relaxation um 50% der Zellverkürzungsstrecke in Millisekunden („R50%“)
6. Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit in Mikrometern pro Sekunde
7. Die maximale Relaxationsgeschwindigkeit in Mikrometern pro Sekunde

Aus diesen Parametern wurden noch drei weitere Parameter errechnet:

1. Die mittlere Verkürzungsgeschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ (Zellverkürzungsamplitude / Time-to-Peak)
2. Der Quotient $\Delta L/L$ wird gebildet aus der Zellverkürzungsamplitude und der diastolischen Zelllänge. In Prozent ausgedrückt zeigt $\Delta L/L$ an, um wie viel Prozent ihrer diastolischen Länge sich die Zelle während der Kontraktion verkürzt.
3. R50-TTP50 gibt die Differenz der Werte für R50% und Time-to-Peak 50% an.

3.6.4 Messprotokoll

Jede Zelle wurde auf die oben beschriebene Weise bei der jeweilig eingestellten Frequenz viermal ausgemessen. Je nach Versuchsanordnung wurden die Kontraktionsparameter bei Frequenzen zwischen 0,5 Hz und 6 Hz gemessen (siehe Ergebnisteil). Die entsprechenden Werte der Kontraktionsparameter wurden in das Programm Excel übertragen und weiter verarbeitet: Aus diesen jeweiligen ersten vier Werten wurden Mittelwert, Standardabweichung und Median bestimmt.

3.6.5 Statistik

Bei der Auswertung der Kontraktionsparameter wurden die in den Experimenten erhaltenen Mediane betrachtet, also pro Zelle und pro Frequenz jeweils ein Wert. Bei Vergleichen zwischen zwei Gruppen wurde ein konventioneller T-Test herangezogen. Wurden mehr als zwei Gruppen in einem Experiment verglichen, wurde zunächst eine Varianzanalyse durchgeführt (ANOVA) und anschließend ein Student-Neumann-Keuls-Test als post hoc Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

3.7 Isolierung von Herzmuskelzellen aus druckbelasteten Herzen

Ein Teil der Versuche wurde mit Kardiomyozyten aus druckbelasteten Rattenherzen durchgeführt. Die hierzu verwendeten Versuchstiere wurden mit freundlicher Genehmigung von Dr. Rolf Schreckenberg, Wissenschaftlicher Mitarbeiter des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen, zur Verfügung gestellt. Die Isolierung und Kultivierung der Kardiomyozyten erfolgte wie unter 3.4 und 3.5 beschrieben.

3.7.1 Herzmuskelzellen aus Ratten mit L-NAME induzierter Hypertonie und nach antihypertensiver Therapie

Drei Monate alte, weibliche, normotensive Wistar-Ratten aus der Zucht des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen wurden in drei Gruppen aufgeteilt und in getrennten Käfigen gehalten. Die Tiere hatten jederzeit freien Zugang sowohl zu Wasser als auch zu fester Nahrung (Standardfuttermittel Altromin®). Über einen Zeitraum von vier Wochen erhielt die erste Gruppe 7,5 mg/Tag L-NAME über das Trinkwasser. L-NAME (N^G-Nitro-L-Arginin-methyl-ester) ist ein Analogon der nicht essentiellen Aminosäure L-Arginin, hemmt die NO-Synthese und verursachte dadurch bei den Versuchstieren eine Hypertonie. Die zweite Gruppe erhielt zunächst ebenfalls 7,5 mg/Tag L-NAME, nach zwei Wochen wurden die Tiere zusätzlich zu L-NAME mit 5,0 mg/Tag Hydralazin, einem Antihypertensivum, gefüttert. Hydralazin hat eine rein vasodilatative Wirkung, es relaxiert also die glatte Muskulatur der Blutgefäße und führt so zu einer Abnahme des peripheren Widerstandes und dadurch zu einer Blutdrucksenkung. Diese reine blutdrucksenkende Wirkung durch Vasodilatation war der Grund für die Auswahl von Hydralazin als Antihypertensivum, da weitere Nebeneffekte wie bei anderen Antihypertensiva, beispielsweise die Rückbildung einer myokardialen Hypertrophie durch ACE-Hemmer, möglichst ausgeschlossen werden sollten. Eine dritte Gruppe diente als Kontrolle und erhielt Trinkwasser ohne Zugabe weiterer Substanzen. Die systolischen Blutdruckwerte und die Herzfrequenz der Versuchstiere wurden in einwöchigen Abständen mit der Tail-cuff-Methode bestimmt. Dazu wurden die Ratten zunächst in einer zweiwöchigen Trainingsphase an die Tail-cuff-Methode gewöhnt.

Bei dieser nicht-invasiven Messmethode wird mithilfe einer aufblasbaren Druckmanschette und eines integrierten Pulssensors der systolische Blutdruck sowie die Herzfrequenz bestimmt. Dazu wird die Druckmanschette um die Rattenschwanzwurzel gelegt und durch Aufblasen der Manschette eine Druckerhöhung erzeugt, bis es zu einem Verschluss der arteriellen Gefäße kommt. Anschließend wird der Druck in der Manschette langsam abgelassen und der Druck, bei dem die Pulswelle erstmals wieder einsetzt als systolischer Blutdruck registriert. Die Herzfrequenz wird durch den in der Manschette integrierten Pulssensor ermittelt. Dieser Sensor registriert Veränderungen der Lichtdurchlässigkeit des Rattenschwanzes, die durch Blutdruckschwankungen in den arteriellen Gefäßen entstehen. Durch das erhaltene Pulssignal kann schließlich die Herzfrequenz berechnet werden. Zur Bestimmung der systolischen Blutdruckwerte wurde für jedes Tier der Mittelwert aus zehn aufeinanderfolgenden Messungen berechnet. Zudem wurde in wöchentlichen Abständen das Körpergewicht der Versuchstiere bestimmt und der Trinkwasserverbrauch wurde täglich protokolliert. Zu Beginn des Versuches lagen die basalen Blutdruckwerte in allen Versuchsgruppen im Mittel bei 122 mmHg systolisch. Die Kontrollgruppe zeigte über den gesamten Versuchszeitraum keine Veränderungen der Blutdruckwerte. Bei den Tieren, die täglich mit L-NAME gefüttert wurden, zeigte sich am Ende der vierwöchigen Versuchphase eine Blutdrucksteigerung. Der systolische Blutdruck lag hier im Mittel bei 181 mmHg. Bei der Gruppe, die zunächst zwei Wochen mit L-NAME und für die verbleibenden zwei Wochen zusätzlich mit Hydralazin gefüttert wurde, sank der Blutdruck von im Mittel 165 mmHg am Ende der zweiwöchigen L-NAME-Behandlung auf durchschnittlich 131 mmHg am Ende der vierwöchigen Versuchszeit. Die Herzfrequenz zeigte in allen drei Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum keine Veränderungen. Im Anschluss erfolgte wie unter 3.4 und 3.5 beschrieben die Isolierung und Kultivierung der Kardiomyozyten der Versuchstiere.

3.7.2 Herzmuskelzellen aus spontan hypertensiven Ratten und nach antihypertensiver Therapie

Ein Teil der Versuche wurde mit Kardiomyozyten aus acht Monate alten, weiblichen spontan hypertensiven Ratten (SHR) durchgeführt. Spontan hypertensive Ratten sind das weltweit am häufigsten eingesetzte Tiermodell zur Untersuchung des

essentiellen Bluthochdrucks (Kurtz et al., 1987) und sind zudem als Standardmodell bei Untersuchungen des menschlichen essentiellen Bluthochdrucks anerkannt (Trippodo et al., 1981). Das Bluthochdruckmerkmal in spontan hypertensiven Ratten wird von einer kleinen Anzahl von Genen kontrolliert (3-4), unter denen sich mindestens ein Majorgen befindet (Yen et al., 1974). Ab einem Alter von 7-15 Wochen entwickeln die spontan hypertensiven Ratten einen Bluthochdruck (Yamori, 1984), wobei die erwachsenen weiblichen Ratten systolische Blutdruckwerte von 175 mmHg erreichen und die erwachsenen männlichen Tiere systolische Werte von 196 mmHg aufweisen (Yen et al., 1974). Das Auftreten von histopathologischen Veränderungen wurde bei den männlichen spontan hypertensiven Ratten ab einem Alter von 8 Monaten beobachtet, bei den weiblichen Tieren ab einem Alter von 12-15 Monaten (Wexler et al., 1981). Die spontan hypertensiven Ratten wurden für die Versuche in zwei Gruppen aufgeteilt und in getrennten Käfigen gehalten. Die Tiere hatten jederzeit freien Zugang sowohl zu Wasser als auch zu fester Nahrung (Standardfuttermittel Altromin®). Über einen Zeitraum von zwei Wochen erhielt die erste Gruppe 5,0 mg/Tag Hydralazin über das Trinkwasser. Wie unter 3.7.1 beschrieben, führte dieses Antihypertensivum über seine gefäßerweiternde Wirkung zu einer Abnahme des peripheren Widerstandes und dadurch zu einer Blutdrucksenkung. Auch hier war der rein blutdrucksenkende Effekt entscheidend für die Auswahl von Hydralazin als Antihypertensivum. Eine zweite Gruppe spontan hypertensiver Ratten diente als Kontrollgruppe und erhielt Trinkwasser ohne Zugabe weiterer Substanzen. Die systolischen Blutdruckwerte und die Herzfrequenz der Versuchstiere wurden in einwöchigen Abständen mit der Tail-cuff-Methode (vgl. 3.7.1) bestimmt. Ebenso wie bei den unter 3.7.1 beschriebenen Versuchstieren wurden die Ratten zunächst in einer zweiwöchigen Trainingsphase an die Tail-cuff-Methode gewöhnt. Zur Bestimmung der systolischen Blutdruckwerte wurde für jedes Tier der Mittelwert aus zehn aufeinanderfolgenden Messungen berechnet. Zudem wurde in wöchentlichen Abständen das Körpergewicht der Versuchstiere bestimmt und der Trinkwasserverbrauch wurde täglich protokolliert. Zu Beginn des Versuches lagen die basalen Blutdruckwerte in beiden Versuchsgruppen im Mittel bei 193 mmHg systolisch. Die Kontrollgruppe zeigte über den gesamten Versuchszeitraum keine Veränderungen der Blutdruckwerte. Bei den Tieren, die täglich mit Hydralazin gefüttert wurden, zeigte sich am Ende der zweiwöchigen Versuchphase eine Blutdrucksenkung. Der systolische Blutdruck lag hier im Mittel bei 119 mmHg. Die

Herzfrequenz zeigte in beiden Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum keine Veränderungen. Anschließend erfolgte wie unter 3.4 und 3.5 beschrieben die Isolierung und Kultivierung der Kardiomyozyten der Versuchstiere.

4. Ergebnisse

4.1 Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung residenter kardialer Progenitorzellen aus seneszenten Rattenherzen

4.1.1 Bilder

Wie unter 3.1 beschrieben, wurden während der Kultivierung kardialer Progenitorzellen Aufnahmen unter dem Mikroskop angefertigt. Abb. 4.1 zeigt die Aufnahmen am Ende der Auswuchsphase. Nach vierwöchiger Kultivierung war eine Schicht fibroblastenartiger Zellen entstanden, über der kleine, hell leuchtende Zellen lagen, die sogenannten cardiosphere-bildenden Zellen.

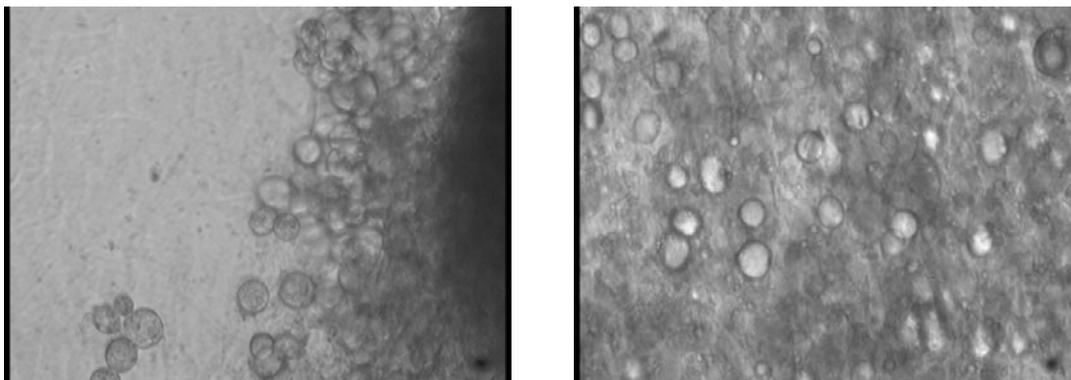


Abbildung 4.1: Bilder aufgenommen am Ende der vierwöchigen Auswuchsphase. Es war eine Schicht fibroblastenartiger Zellen entstanden, über der kleine, hell leuchtende Zellen lagen, die sogenannten cardiosphere-bildenden Zellen.

Die nächsten Bilder wurden am Ende der zweiwöchigen Differenzierungsphase angefertigt (Abb. 4.2). Die Zellen waren nach der insgesamt sechswöchigen Kultivierung zu Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen differenziert.

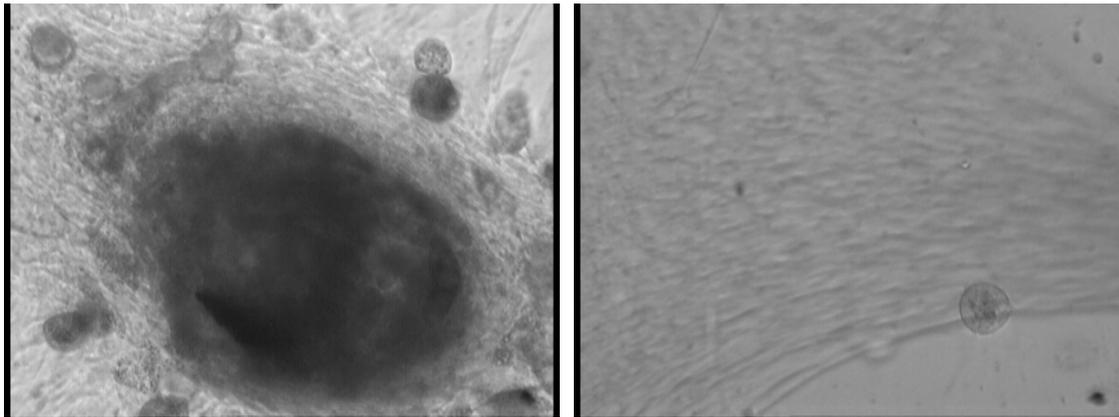


Abbildung 4.2: Bilder aufgenommen am Ende der zweiwöchigen Differenzierungsphase. Die Zellen waren nach der insgesamt sechswöchigen Kultivierung zu Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen differenziert.

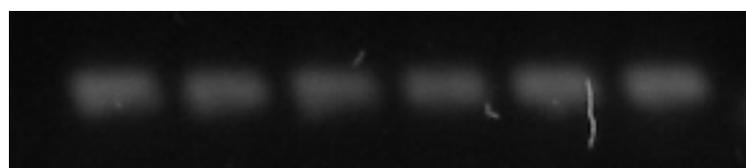
4.1.2 RT-PCR

Nach Abschluss der Kultivierung kardialer Progenitorzellen aus Rattenherzen wurde mithilfe der RT-PCR auf mRNA-Ebene untersucht, ob diese Progenitorzellen verschiedene Stammzell- und herzspezifische Marker exprimieren. Die Zellen wurden hierzu wie unter 3.2 beschrieben geerntet. Anschließend wurde eine RNA-Isolierung durchgeführt und aus der Gesamt-RNA wurde cDNA synthetisiert. Im Thermocycler erfolgte schließlich die Amplifikation der cDNA.

Zur Auswertung der RT-PCR wurden die untersuchten PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (vgl. 3.2.6). Untersucht wurden folgende Marker: Sca-1, ISL-1 und c-kit als Stammzellmarker, ANP, BNP, eNOS (endotheliale NO-Synthase), α -Actin und β -MHC als kardiale Marker und HPRT als Referenzgen. Repräsentative Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 4.3 dargestellt.



eNOS (144 bp)



ISL-1 (122 bp)

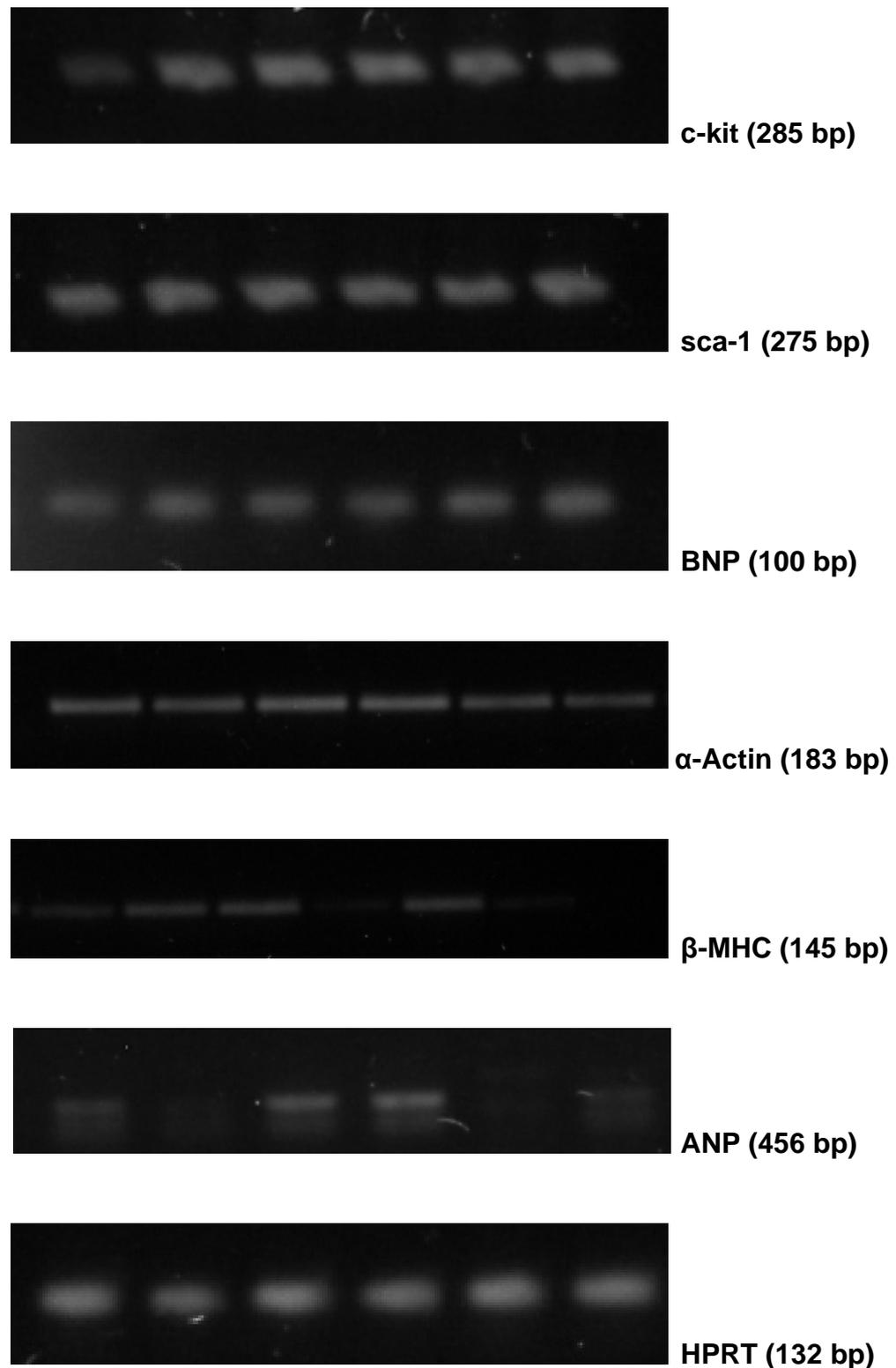
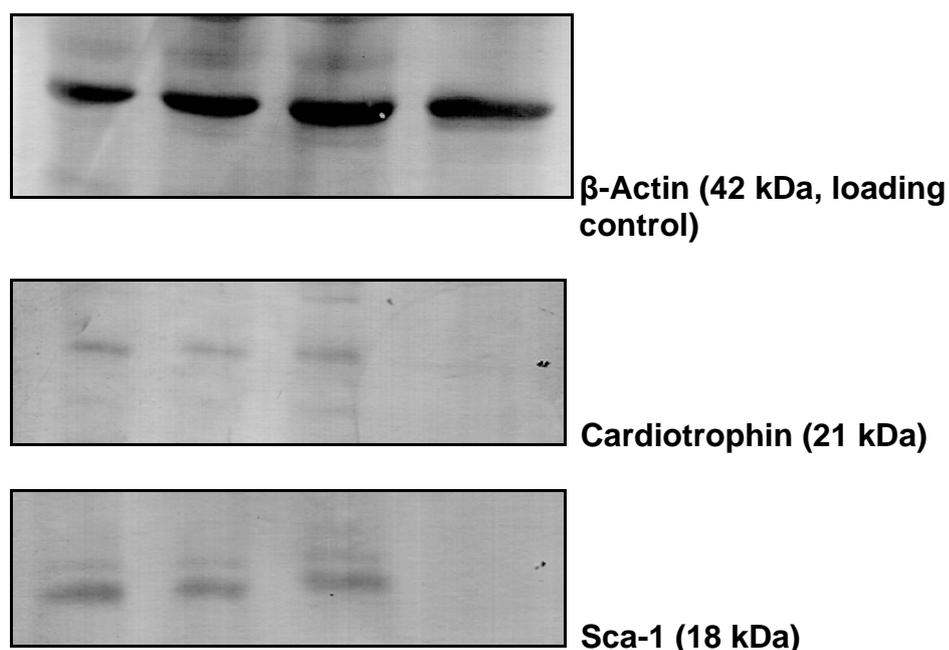


Abbildung 4.3: Expression verschiedener Stammzell- und herzspezifischer Marker auf mRNA-Ebene in kardialen Progenitorzellen der Ratte. Die Zellen wurden geerntet und die isolierte RNA einer RT-PCR-Analyse unterzogen. Durch die anschließende Agarose-Gelelektrophorese wurden die entstandenen PCR-Produkte aufgetrennt und die DNA-Banden durch UV-Licht sichtbar gemacht. Die Abbildung zeigt repräsentative Ergebnisse dieser Untersuchungen.

4.1.3 Immunoblots

Nach Abschluss der Kultivierung kardialer Progenitorzellen aus Rattenherzen wurde zusätzlich zur RT-PCR auch durch Anwendung des Western Blot-Verfahrens die Expression verschiedener Stammzell- und herzspezifischer Marker durch die Progenitorzellen untersucht. Hierzu wurden die Zellen wie unter 3.3 beschrieben geerntet und einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen. Die Expression der verschiedenen Stammzell- und herzspezifischen Marker wurde anschließend auf Proteinebene im Western-Blot bestimmt. Untersucht wurden folgende Marker: Sca-1, GATA-4, ISL-1 und c-kit als Stammzellmarker, Cardiotrophin und ANP als kardiale Marker und β -Actin als loading control. Durch die Anlagerung der spezifischen Antikörper an die entsprechenden in den Proben enthaltenen Proteine und einer anschließenden Farbreaktion entstanden sichtbare Banden. Repräsentative Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 4.4 dargestellt. Es zeigte sich eine deutliche Expression der abgebildeten Marker in den kardialen Progenitorzellen, die dagegen in adulten, terminal differenzierten ventrikulären Herzmuskelzellen nicht nachgewiesen werden konnte. Die Expression von c-kit konnte auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden.



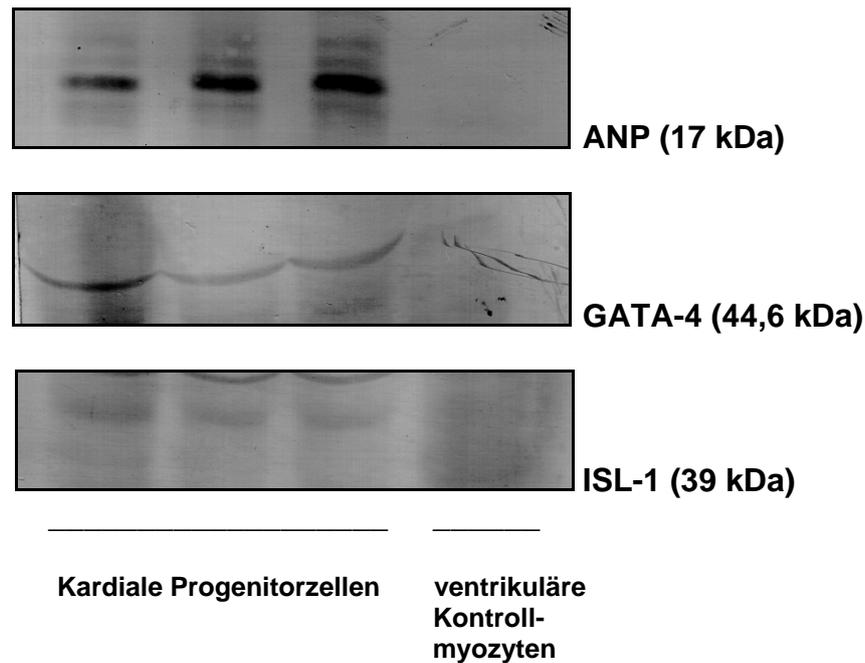


Abbildung 4.4: Expression verschiedener Stammzell- und herzspezifischer Marker in kardialen Progenitorzellen der Ratte. Die Zellen wurden geerntet und einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen. Die Expression der verschiedenen Marker wurde anschließend auf Proteinebene im Western Blot bestimmt. Die Abbildung zeigt repräsentative Ausschnitte der Western Blots.

4.2 Etablierung eines Nachweissystems zur Charakterisierung der Wirkung von Progenitorzellüberständen auf die Funktion von Herzmuskelzellen

4.2.1 Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten Tag 0 vs. Tag 1

In diesem Versuch sollte das Kontraktionsverhalten adulter Kardiomyozyten in Abhängigkeit von ihrer Kultivierungszeit verglichen werden. In den Versuchen der nachfolgenden Kapitel wurde, soweit nicht anders erwähnt, mit Übernachtskulturen isolierter Kardiomyozyten der Ratte gearbeitet. Die Zellen wurden dazu über Nacht für etwa 20 Stunden mit unterschiedlichen Substanzen inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Kontraktionsparameter. Dieser Versuch diente somit der Etablierung eines *in vitro* – Systems zur Bestimmung der parakrinen Funktion kardialer Progenitorzellen. Zunächst sollte mit folgendem Versuch untersucht werden, inwiefern sich das Kontraktionsverhalten dieser über Nacht kultivierten Zellen vom Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten unterscheidet, die noch am Tag der Präparation und des Ausplattierens gemessen wurden, d.h. direkt im Anschluss an die Waschvorgänge (wie im Methodenteil unter 3.5.2 beschrieben). Die

Kardiomyozyten wurden für diesen Versuch nicht mit unterschiedlichen Substanzen inkubiert, sondern ihre Kontraktion wurde in unmodifiziertem Zellkulturmedium (CCT-Medium) untersucht. Dies geschah bei der einen Gruppe von Herzmuskelzellen direkt im Anschluss an die Waschvorgänge am Tag der Präparation, bei der anderen Gruppe 24 Stunden nach Ausplattieren der Zellen. Diese wurden dafür mit fünf verschiedenen Frequenzen (0,5 Hz, 1 Hz, 2 Hz, 4 Hz und 6 Hz) elektrisch stimuliert. Als Maß für die kontraktile Funktion der Herzmuskelzellen wurde ihre Zellverkürzung relativ zur diastolischen Zelllänge ($\Delta L/L$ in %) berechnet.

Dabei zeigte sich im gesamten gemessenen Frequenzbereich eine geringere kontraktile Funktion der Zellen, die über Nacht kultiviert wurden gegenüber den Kardiomyozyten, die am Tag der Präparation untersucht wurden. Bei einer Frequenz von 0,5 Hz betrug diese Verschlechterung der kontraktilen Funktion bei den über Nacht kultivierten Zellen $11,7\% \pm 7,85\%$. Zudem konnte beobachtet werden, dass mit ansteigender Frequenz die Zellkontraktion der über Nacht kultivierten Zellen im Gegensatz zur Vergleichsgruppe abnahm (Abb.4.5).

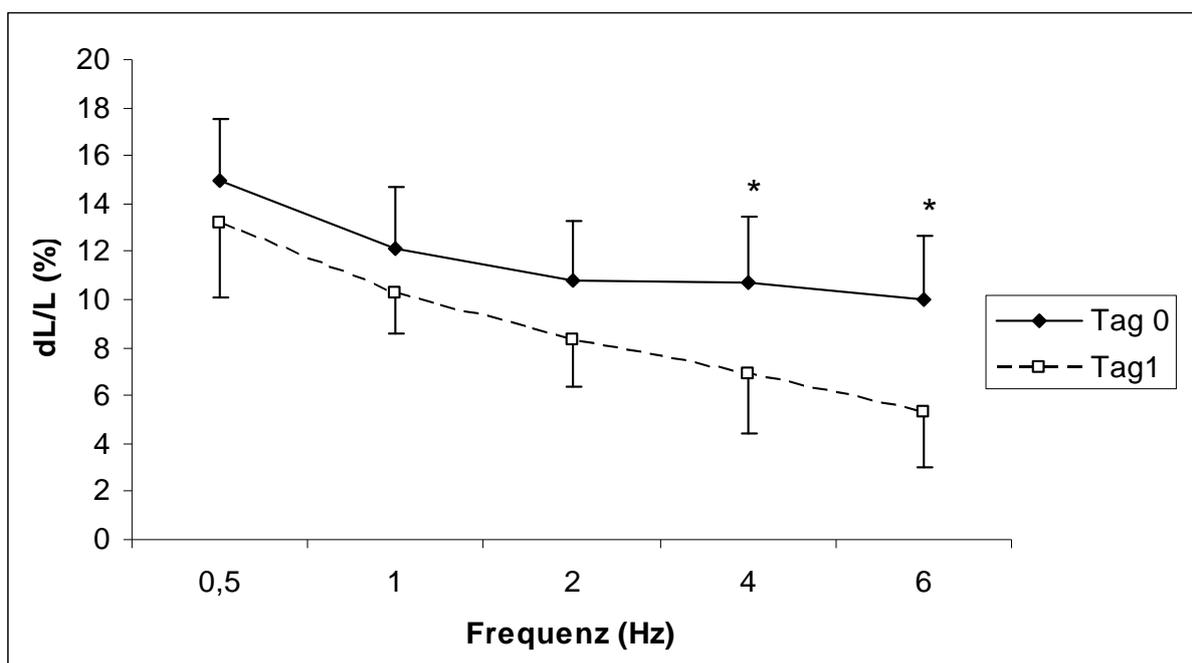


Abbildung 4.5: Einfluss der Kultivierungszeit auf das Kontraktionsverhalten adulter ventrikulärer Kardiomyozyten. Isolierte Herzmuskelzellen wurden am Tag der Präparation (Tag 0, n=90) und am Folgetag der Präparation (Tag 1, n=90) in unmodifiziertem Zellkulturmedium untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz, 1 Hz, 2 Hz, 4 Hz und 6 Hz stimuliert. $*=p<0,05$ vs. C.

4.3 Wirksamkeit der gewonnenen Progenitorüberstände auf die Herzmuskelzellen in Abhängigkeit von der Differenzierung

4.3.1 Chronische Wirkung

4.3.1.1 Wirkung der Differenzierungsüberstände aus drei Monate alten, weiblichen Wistar-Ratten

Wie in Abschnitt 3.1 des Methodenteils beschrieben wurden im Rahmen der Isolierung und Kultivierung kardialer Progenitorzellen aus Rattenherzen verschiedene Kulturmedien eingesetzt und Überstände gewonnen. Zum einen wurde in der ersten, vierwöchigen Phase der Kultivierung das sogenannte Auswuchsmedium oder complete explant medium (CEM) verwendet und bei den zwei- bis dreitägigen Waschvorgängen der sogenannte Auswuchsüberstand gewonnen.

In der sich anschließenden zweiwöchigen Kultivierungsphase sollten die Zellen durch ein weiteres spezielles Medium zu Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen differenzieren. Dieses Medium wurde als Differenzierungsmedium oder cardiosphere-growing medium (CGM) bezeichnet. Analog zum Auswuchsüberstand wurde hier bei den Waschvorgängen der sogenannte Differenzierungsüberstand gewonnen.

In folgenden Versuchen wurde nun untersucht, ob der Differenzierungsüberstand eine Wirkung auf die Funktion von Herzmuskelzellen hat. Dazu wurden die Kardiomyozyten diesem Überstand über einen Zeitraum von 20 Stunden vor Messung ihrer Kontraktionsparameter exponiert. Hierzu wurden zu den adulten ventrikulären Kardiomyozyten direkt im Anschluss an die Waschvorgänge pro Zellkulturschale jeweils 10 µl des im Verhältnis 1:100 verdünnten Differenzierungsüberstandes der Progenitorzellen pipettiert. Das Verdünnungsverhältnis in der Schale betrug somit 1:10000. Als Kontrollgruppe dienten Kardiomyozyten, die ebenfalls 2-4 Stunden nach Ausplattieren der Zellen direkt im Anschluss an die Waschschrte pro Zellkulturschale jeweils 10 µl des im Verhältnis 1:100 verdünnten Differenzierungsmediums zugesetzt bekamen. Hierbei wurden Differenzierungsüberstände bzw. Differenzierungsmedien eingesetzt, die zuvor, wie in Abschnitt 3.1 am Beispiel einer ca. 18 Monate alten weiblichen Wistar-

Ratte beschrieben, von einer drei Monate alten, weiblichen Wistar-Ratte gewonnen worden waren. Die Herzmuskelzellen wurden über Nacht mit diesem Medium bzw. Überstand inkubiert und die Messung der Kontraktionsparameter erfolgte 24 Stunden nach Ausplattieren der Zellen. Die Herzmuskelzellen wurden mit drei verschiedenen Frequenzen (0,5 Hz, 1 Hz, 2 Hz) elektrisch stimuliert und die relative Zellverkürzung $\Delta L/L$ als Maß für die kontraktile Funktion bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass die kontraktile Funktion der Myokardzellen bei einer Frequenz von 0,5 Hz durch den Differenzierungsüberstand im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant um $11,3\% \pm 2,1\%$ gesteigert wurde (Abb. 4.6). Dieser kontraktionssteigernde Effekt nahm allerdings mit steigender Frequenz ab. Aus diesem Grund wurden die Kontraktionsparameter der Herzmuskelzellen in den nachfolgenden Versuchen nur bei einer Frequenz von 0,5 Hz gemessen.

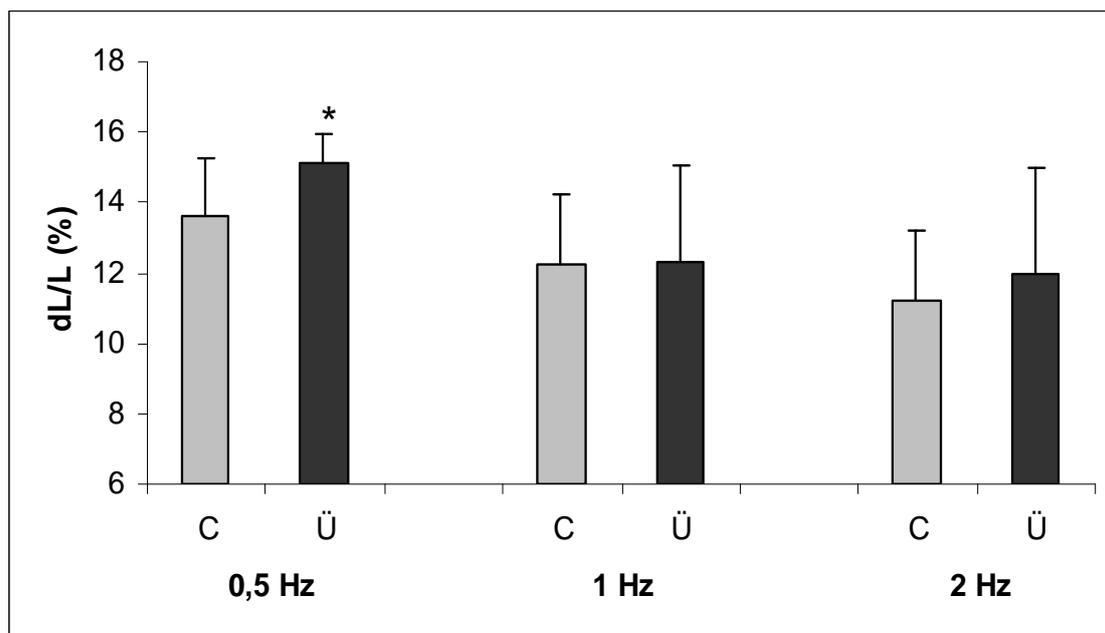


Abbildung 4.6: Wirkung der Progenitorzellüberstände in Abhängigkeit von der Frequenz im Übernachtversuch. Isolierte ventrikuläre Herzmuskelzellen wurden über Nacht mit Differenzierungsmedium (Kontrolle, 1:100, n=20) oder mit Differenzierungsüberstand (Überstand, 1:100, n=20) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz, 1 Hz und 2 Hz stimuliert. C=Kontrolle, Ü=Überstand, *= $p < 0,05$ vs. C.

Um die Reproduzierbarkeit dieses Effektes zu überprüfen wurde der vorherige Versuch mit den Differenzierungsmedien und Differenzierungsüberständen der Progenitorzellen aus einer weiteren drei Monate alten, weiblichen Wistar-Ratte wiederholt. Wieder wurden zu den adulten ventrikulären Kardiomyozyten direkt im

Anschluss an die Waschvorgänge pro Zellkulturschale jeweils 10 μ l des im Verhältnis 1:100 verdünnten Differenzierungsüberstandes pipettiert und als Kontrollgruppe dienten wiederum Kardiomyozyten, die im Anschluss an die Waschschrte pro Zellkulturschale jeweils 10 μ l des im Verhältnis 1:100 verdünnten Differenzierungsmediums zugesetzt bekamen. Es folgte die 20-stündige Inkubation mit diesen Medien und Überständen und die anschließende Messung der Kontraktionsparameter. Die Herzmuskelzellen wurden aufgrund der Ergebnisse des Vorversuches lediglich mit einer Frequenz von 0,5 Hz elektrisch stimuliert und die relative Zellverkürzung $\Delta L/L$ als Maß für die kontraktile Funktion bestimmt. Hierbei bestätigte sich, dass die kontraktile Funktion der Myokardzellen bei einer Frequenz von 0,5 Hz durch den Differenzierungsüberstand im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant gesteigert wird (Abb. 4.7). Die Verbesserung der kontraktile Funktion der mit Differenzierungsüberstand inkubierten Zellen gegenüber den Kontrollzellen betrug $9,1\% \pm 1,9\%$.

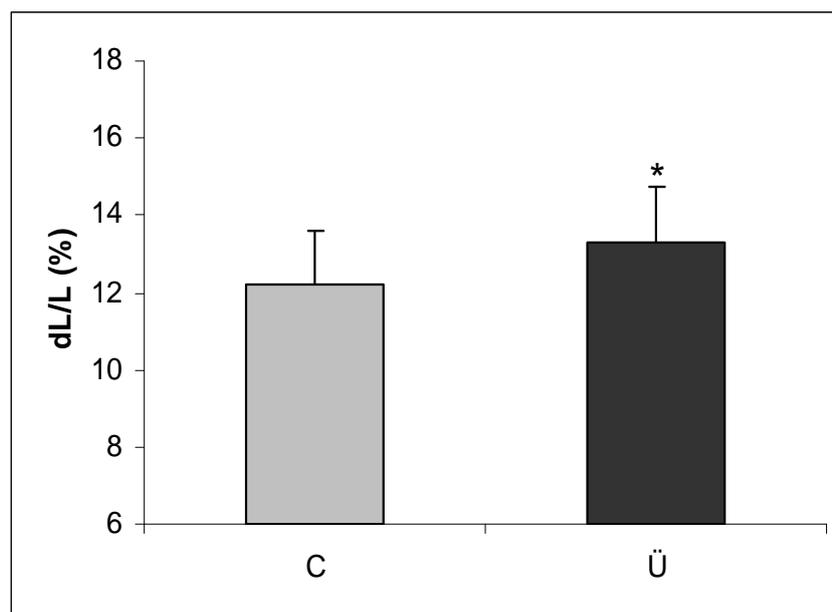


Abbildung 4.7: Wirkung der Progenitorzellüberstände im Übernachtversuch. Isolierte ventrikuläre Herzmuskelzellen wurden über Nacht mit Differenzierungsmedium (Kontrolle, 1:100, n=54) oder mit Differenzierungsüberstand (Überstand, 1:100, n=54) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. C=Kontrolle, Ü=Überstand, *= $p < 0,05$ vs. C.

4.3.1.2 Wirkung der Auswuchsüberstände aus drei Monate alten, weiblichen Wistar-Ratten

Im nachfolgenden Versuch wurden statt Differenzierungsmedien und –überständen die Auswuchsmedien und –überstände der Progenitorzellen untersucht, um herauszufinden, ob auch diese einen Effekt auf die Funktion von Herzmuskelzellen haben. Der eingesetzte Auswuchsüberstand war zuvor als letzter Überstand am Ende der ersten, vierwöchigen Kultivierungsphase gewonnen worden. Das verwendete Auswuchsmedium entsprach dem Kulturmedium, welches zuvor bei einem der Waschvorgänge angesetzt worden war. Zu den adulten ventrikulären Kardiomyozyten wurden direkt im Anschluss an die Waschvorgänge pro Zellkulturschale jeweils 10 μ l des im Verhältnis 1:100 verdünnten Auswuchsüberstandes pipettiert. Als Kontrollgruppe dienten Kardiomyozyten, die ebenfalls direkt im Anschluss an die Waschschriffe pro Zellkulturschale jeweils 10 μ l des im Verhältnis 1:100 verdünnten Auswuchsmediums zugesetzt bekamen. Nach 20-stündiger Inkubation mit diesen Medien und Überständen folgte die Messung der Kontraktionsparameter. Die Herzmuskelzellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz elektrisch stimuliert und die relative Zellverkürzung $\Delta L/L$ als Maß für die kontraktile Funktion bestimmt. Es war kein Unterschied messbar zwischen den Zellen, die mit Auswuchsüberstand inkubiert worden waren und den Zellen, die dem Auswuchsmedium exponiert waren (Abb. 4.8).

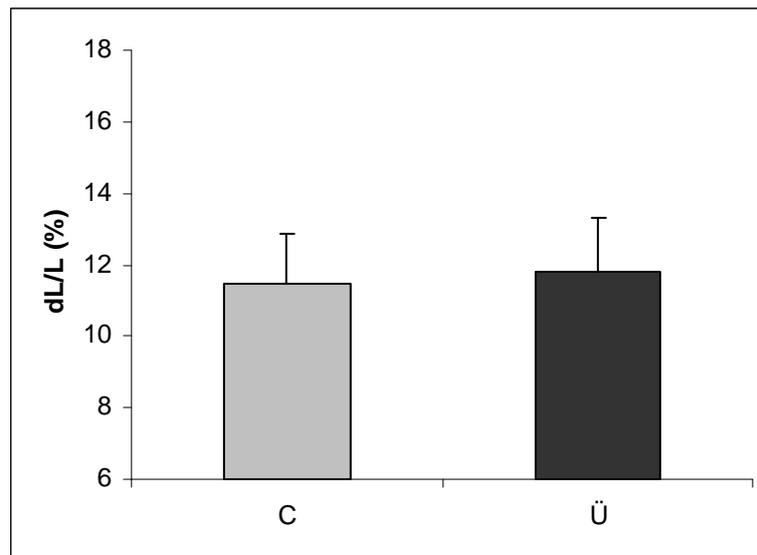


Abbildung 4.8: Wirkung der Progenitorzellüberstände im Übernachtversuch. Isolierte ventrikuläre Herzmuskelzellen wurden über Nacht mit Auswuchsmedium (Kontrolle, 1:100, n=108) oder mit Auswuchsüberstand (Überstand, 1:100, n=108) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. C=Kontrolle, Ü=Überstand.

4.3.1.3 Wirkung der Differenzierungsüberstände aus einer 18 Monate alten, weiblichen Wistar-Ratten

Um den Einfluss des Alters der Ratte auf die Wirkung der Progenitorzellüberstände zu untersuchen, wurden in den folgenden zwei Versuchen die Auswuchsüberstände und –medien bzw. Differenzierungsüberstände und -medien eingesetzt, welche zuvor, wie in Abschnitt 3.1 beschrieben, von einer ca. 18 Monate alten weiblichen Wistar-Ratte gewonnen worden waren.

Im ersten Versuch wurden die Differenzierungsüberstände der Progenitorzellen eingesetzt, die als letzte Überstände am Ende der zweiten, zweiwöchigen Kultivierungsphase, der sogenannten Differenzierungsphase von der ca. 18 Monate alten weiblichen Wistar-Ratte gewonnen worden waren. Das für die Kontrollgruppe verwendete Differenzierungsmedium entsprach dem Kulturmedium, welches zwei Tage zuvor beim letzten Waschvorgang dieser Kultivierungsphase eingesetzt worden war. Die Herzmuskelzellen wurden über Nacht mit diesem Medium bzw. Überstand inkubiert, nachdem direkt im Anschluss an die Waschvorgänge pro Zellkulturschale jeweils 10 µl des im Verhältnis 1:100 verdünnten Differenzierungsüberstandes bzw. Differenzierungsmediums hinzupipettiert worden waren. Nach 20-stündiger

Inkubation erfolgte die Messung der Kontraktionsparameter. Die Herzmuskelzellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz elektrisch stimuliert und die relative Zellverkürzung $\Delta L/L$ als Maß für die kontraktile Funktion bestimmt. Es zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Verbesserung von $7,1\% \pm 2,1\%$ der kontraktilen Funktion der Zellen, die mit Differenzierungsüberstand inkubiert worden waren (Abb. 4.9).

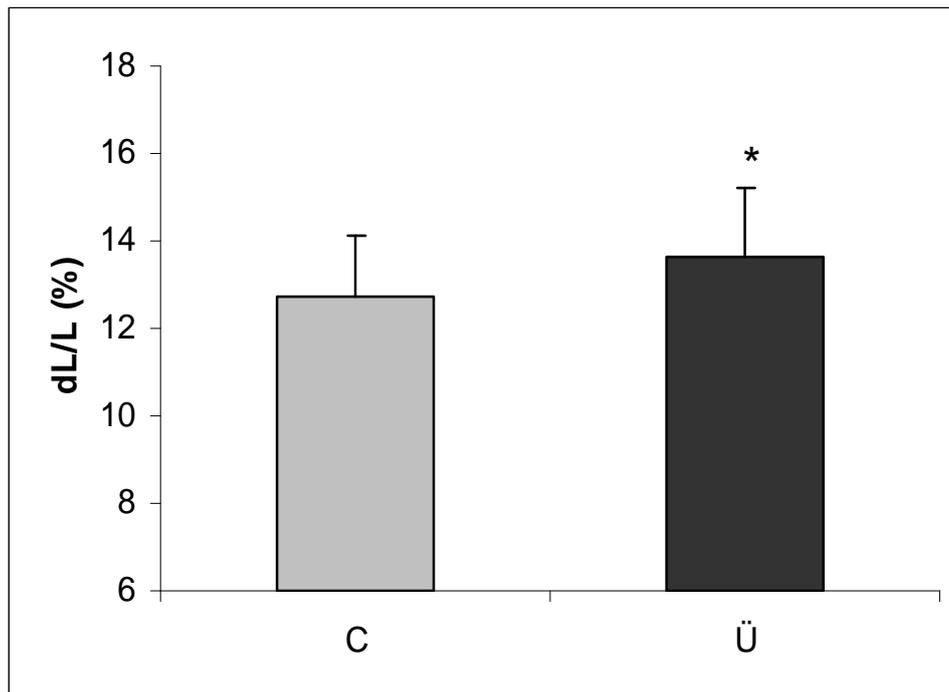


Abbildung 4.9: Wirkung der Progenitorzellüberstände im Übernachtversuch. Isolierte ventrikuläre Herzmuskelzellen wurden über Nacht mit Differenzierungsmedium (Kontrolle, 1:100, n=54) oder mit Differenzierungsüberstand (Überstand, 1:100, n=54) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. C=Kontrolle, Ü=Überstand, *= $p < 0,05$ vs. C.

4.3.1.4 Wirkung der Auswuchsüberstände aus einer 18 Monate alten, weiblichen Wistar-Ratten

Im nächsten Versuch wurden nun die Auswuchsüberstände der Progenitorzellen eingesetzt, die als letzte Überstände am Ende der ersten, vierwöchigen Kultivierungsphase gewonnen worden waren. Da die Überstände aus allen drei Kulturschalen einzeln gewonnen und aufbewahrt worden waren, konnten diese auch im folgenden Versuch einzeln untersucht werden (Überstand a, b und c). Das verwendete Auswuchsmedium entsprach dem Kulturmedium, welches zwei Tage

zuvor beim letzten Waschvorgang dieser Kultivierungsphase eingesetzt worden war. Die Herzmuskelzellen wurden über Nacht mit diesem Medium bzw. diesen Überständen inkubiert, nachdem direkt im Anschluss an die Waschvorgänge pro Zellkulturschale jeweils 10 μl des im Verhältnis 1:100 verdünnten Auswuchsüberstandes bzw. Auswuchsmediums hinzupipettiert worden waren. Die mit Auswuchsmedium versetzten Kulturschalen dienten als Kontrollgruppe. Nach 20-stündiger Inkubation erfolgte die Messung der Kontraktionsparameter. Die Herzmuskelzellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz elektrisch stimuliert und die relative Zellverkürzung $\Delta L/L$ als Maß für die kontraktile Funktion bestimmt. Es zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe kein Unterschied bei den Zellen, die mit Auswuchsüberstand b inkubiert worden waren, aber eine signifikante Verschlechterung der kontraktilen Funktion bei den Myokardzellen, die mit den Auswuchsüberständen a und c inkubiert worden waren von $7,2\% \pm 5,41\%$ (Überstand a) bzw. $6,1\% \pm 2,49\%$ (Überstand c) (Abb.4.10).

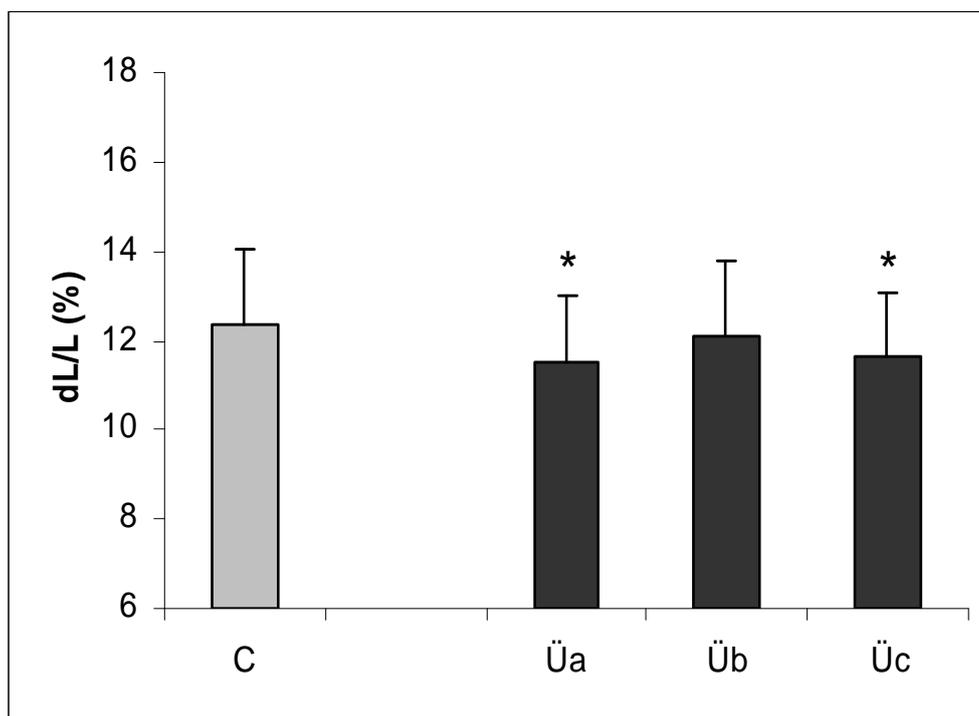


Abbildung 4.10: Wirkung der Progenitorzellüberstände im Übernachtversuch. Isolierte ventrikuläre Herzmuskelzellen wurden über Nacht mit Auswuchsmedium (Kontrolle, 1:100, n=135) oder mit Auswuchsüberständen (Überstand, 1:100, n=45) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. C=Kontrolle, Ü=Überstand, a,b,c=unterschiedliche Überstände aus den drei im Versuch angelegten Zellkulturschalen, *= $p < 0,05$ vs. C.

4.3.1.5 Wirkung der Differenzierungsüberstände in Gegenwart von Isoprenalin

Um den Einfluss von Isoprenalin auf die Wirkung der Progenitorzellüberstände zu untersuchen, wurden isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten über Nacht mit Differenzierungsüberständen bzw. –medien einer drei Monate alten, weiblichen Wistar-Ratte inkubiert. Pro Zellkulturschale wurden dazu jeweils 10 μ l des Überstandes bzw. Mediums hinzupipettiert. Die mit Differenzierungsmedium inkubierten Zellen dienten dabei als Kontrollzellen. Diese waren zuvor im Verhältnis 1:100 verdünnt worden. Nach 24 Stunden erfolgte die Messung der Kontraktionsparameter. Ein Teil der mit Differenzierungsüberstand bzw. –medium inkubierten Zellen wurde drei bis fünf Minuten vor der Messung zusätzlich mit Isoprenalin (100 nM), einem β -Sympathomimetikum inkubiert. Die Herzmuskelzellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz elektrisch stimuliert und die relative Zellverkürzung $\Delta L/L$ als Maß für die kontraktile Funktion bestimmt. Bei den Zellen, die nicht mit Isoprenalin behandelt worden waren zeigte sich wie auch schon zuvor eine signifikante Verbesserung um $6,1\% \pm 1,28\%$ der relativen Zellverkürzung der Zellen, die mit Differenzierungsüberstand inkubiert worden waren im Vergleich zu den Kontrollzellen. Isoprenalin führte sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei den mit Differenzierungsüberstand behandelten Zellen zu einer signifikanten Verbesserung der kontraktilen Funktion im Vergleich zu den nicht mit Isoprenalin behandelten Zellen. Bei der Kontrollgruppe führte Isoprenalin im Vergleich zu den Kontrollzellen ohne Isoprenalin zu einer Verbesserung der kontraktilen Funktion um $39,5\% \pm 1,96\%$. Die mit Differenzierungsüberstand und Isoprenalin inkubierten Zellen zeigten eine um $34\% \pm 2,19\%$ gesteigerte kontraktile Funktion im Vergleich zu den Kontrollzellen ohne Isoprenalin und eine um $26,3\% \pm 2,06\%$ verbesserte kontraktile Funktion im Vergleich zu den mit Differenzierungsüberstand ohne Isoprenalin inkubierten Zellen. Beim Vergleich der mit Isoprenalin und Differenzierungsüberstand inkubierten Zellen mit den Kardiomyozyten, die mit Isoprenalin und Differenzierungsmedium behandelt worden waren konnte dagegen kein signifikanter Unterschied der kontraktilen Funktion festgestellt werden (Abb. 4.11).

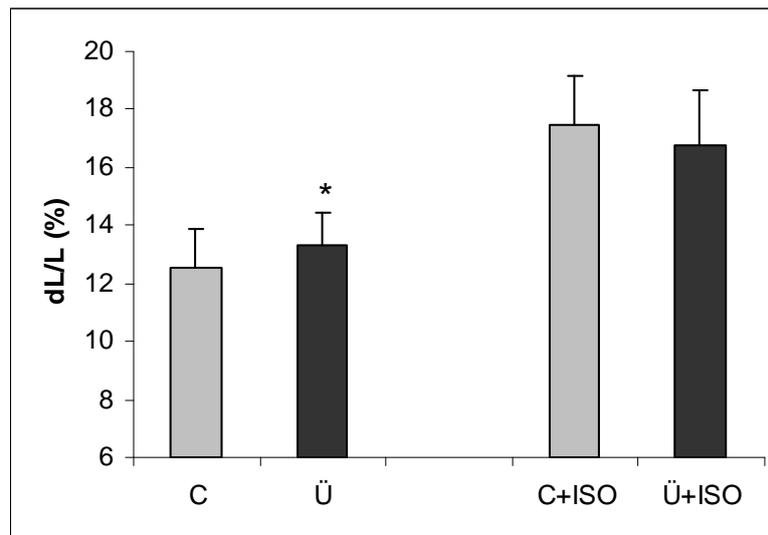


Abbildung 4.11: Wirkung der Progenitorzellüberstände im Übernachtversuch und in Gegenwart von Isoprenalin. Isolierte ventrikuläre Herzmuskelzellen wurden über Nacht mit Differenzierungsmedium (Kontrolle, 1:100, n=72) oder mit Differenzierungsüberstand (Überstand, 1:100, n=72) inkubiert. Eine weitere Gruppe von Zellen wurde drei bis fünf Minuten vor Messung der Kontraktionsparameter zusätzlich mit Isoprenalin (100 nM) inkubiert (Kontrolle+Isoprenalin, n=72; Überstand+Isoprenalin, n=72). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. C=Kontrolle, Ü=Überstand, ISO=Isoprenalin.

4.3.1.6 Wirkung der Überstände adulter Kardiomyozyten

Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob auch die Überstände adulter Kardiomyozyten eine Wirkung auf die Funktion von Herzmuskelzellen haben. Dazu wurden wie unter 3.4 beschrieben über Nacht Kurzzeitkulturen isolierter Kardiomyozyten angelegt. Das Kulturmedium (CCT-Kulturmedium + Gentamycin) wurde am Folgetag als Überstand abpipettiert und im Verhältnis 1:100 verdünnt. Anschließend wurden zu adulten ventrikulären Kardiomyozyten direkt im Anschluss an die Waschvorgänge pro Zellkulturschale jeweils 10 µl des verdünnten Überstandes pipettiert. Als Kontrollgruppe dienten Kardiomyozyten, die in unmodifiziertem Zellkulturmedium untersucht wurden. Nach 20-stündiger Inkubation wurden die Herzmuskelzellen mit einer Frequenz von 0,5 Hz elektrisch stimuliert und die relative Zellverkürzung $\Delta L/L$ als Maß für die kontraktile Funktion bestimmt. Hierbei zeigte sich kein Unterschied zwischen den mit Überstand adulter Kardiomyozyten inkubierten Zellen und der Kontrollgruppe (Abb. 4.12).

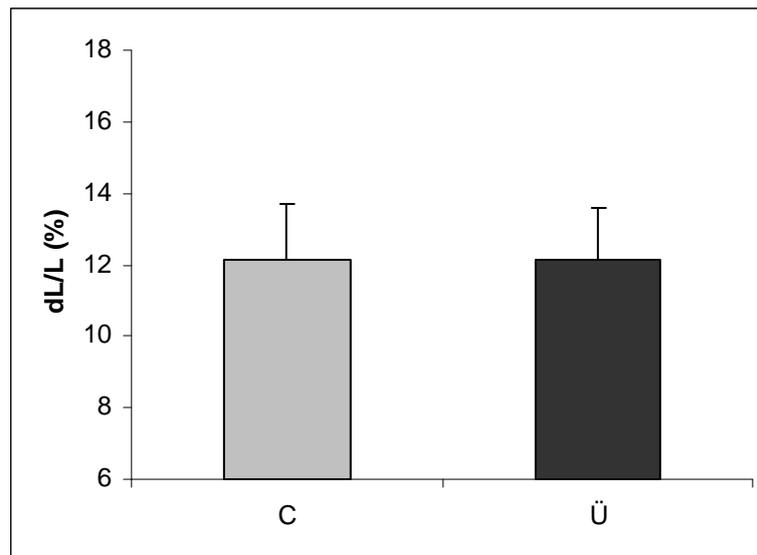


Abbildung 4.12: Wirkung der Überstände adulter Kardiomyozyten im Übernachtversuch. Isolierte ventrikuläre Herzmuskelzellen wurden über Nacht in unmodifiziertem Kulturmedium (Kontrolle, n=90) oder mit Überstand adulter Kardiomyozyten (Überstand, 1:100, n=135) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. C=Kontrolle, Ü=Überstand.

4.4 Mechanismus der Wirkung von Progenitorzellüberständen

4.4.1 Wirkung unter Hemmung der Translation

Um den Mechanismus der Wirkung von Progenitorzellüberständen zu untersuchen wurde im folgenden Versuch die Wirkung der Überstände unter Hemmung der Translation bestimmt. Dazu wurden die adulten ventrikulären Kardiomyozyten 20 Stunden mit Cycloheximid (35 μ M) inkubiert. Cycloheximid ist ein Translationshemmer und unterbindet somit die Proteinbiosynthese. Direkt im Anschluss erfolgte pro Kulturschale die Zugabe von jeweils 10 μ l des im Verhältnis 1:100 verdünnten Differenzierungsüberstandes bzw. des Differenzierungsmediums bei den Kontrollzellen. Hier wurden wieder die Differenzierungsüberstände bzw. Differenzierungsmedien der Progenitorzellen eingesetzt, die zuvor, wie in Abschnitt 3.1 am Beispiel einer ca. 18 Monate alten weiblichen Wistar-Ratte beschrieben, von einer drei Monate alten, weiblichen Wistar-Ratte gewonnen worden waren. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit einer Frequenz von 0,5 Hz elektrisch stimuliert und die relative Zellverkürzung $\Delta L/L$ als Maß für die kontraktile Funktion bestimmt.

Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen den mit Differenzierungsüberstand und Cycloheximid inkubierten Zellen und den Kontrollzellen, die mit Differenzierungsmedium und Cycloheximid inkubiert worden waren (Abb. 4.13).

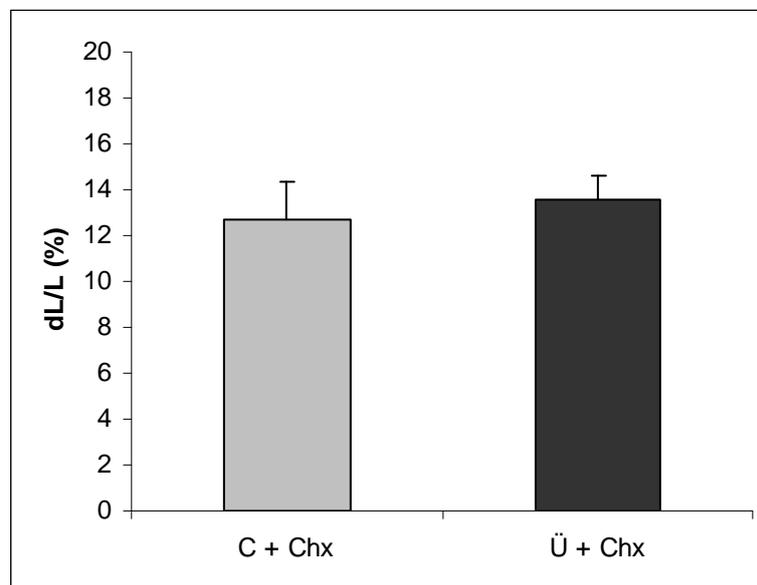


Abbildung 4.13: Wirkung der Progenitorzellüberstände unter Hemmung der Translation. Isolierte ventrikuläre Herzmuskelzellen wurden über Nacht mit Differenzierungsmedium (1:100) plus Cycloheximid (35 μM) (Kontrolle + Cycloheximid, n=15) oder mit Differenzierungsüberstand (1:100) plus Cycloheximid (35 μM) (Überstand + Cycloheximid, n=15) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. C=Kontrolle, Chx=Cycloheximid, Ü=Überstand.

4.4.2 Wirkung unter Hemmung der Transkription

Zur Untersuchung des Wirkmechanismus der Progenitorzellüberstände wurde im folgenden Versuch, analog zum Vorversuch unter 4.5.1, die Wirkung der Überstände unter Hemmung der Transkription bestimmt.

Dazu wurden die adulten ventrikulären Kardiomyozyten 20 Stunden mit Actinomycin D (5 μM) inkubiert. Actinomycin D ist ein Hemmstoff der Transkription. Direkt im Anschluss erfolgte wieder pro Kulturschale die Zugabe von jeweils 10 μl des im Verhältnis 1:100 verdünnten Differenzierungsüberstandes der Progenitorzellen bzw. des Differenzierungsmediums bei den Kontrollzellen. Hier wurde das gleiche Differenzierungsmedium bzw. der gleiche Differenzierungsüberstand eingesetzt wie im Vorversuch unter 4.5.1. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit einer

Frequenz von 0,5 Hz elektrisch stimuliert und die relative Zellverkürzung $\Delta L/L$ als Maß für die kontraktile Funktion bestimmt.

Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen den mit Differenzierungsüberstand und Actinomycin D inkubierten Zellen und den Kontrollzellen, die mit Differenzierungsmedium und Actinomycin D inkubiert worden waren (Abb. 4.14).

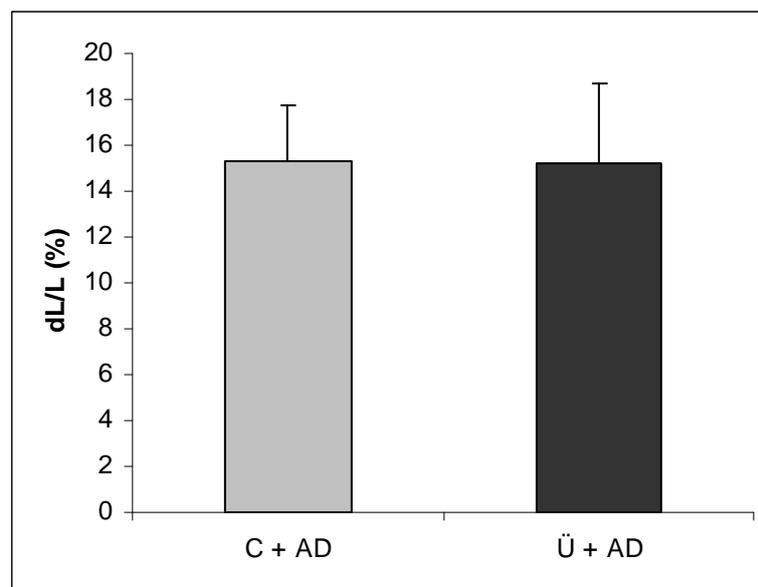


Abbildung 4.14: Wirkung der Progenitorzellüberstände unter Hemmung der Transkription. Isolierte ventrikuläre Herzmuskelzellen wurden über Nacht mit Differenzierungsmedium (1:100) plus Actinomycin D (5 μM) (Kontrolle + Actinomycin D, n=45) oder mit Differenzierungsüberstand (1:100) plus Actinomycin D (5 μM) (Überstand + Actinomycin D, n=63) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. C=Kontrolle, AD=Actinomycin D, Ü=Überstand.

4.5 Vergleich der Wirksamkeit von Progenitorzellüberständen aus Maus und vom Menschen

4.5.1 Wirkung der Differenzierungsüberstände aus Maus und vom Menschen

Um zu untersuchen, ob auch die aus Mäuse- und Menschenherzen gewonnenen Progenitorzellüberstände eine Wirkung auf die Funktion von Herzmuskelzellen haben, wurden für folgende Versuche Mäuseherzen sowie im Rahmen von chirurgischen Eingriffen gewonnene Gewebeproben humaner Herzen verwendet. Wie unter 3.1 beschrieben, erfolgte auch hier die Isolierung und Kultivierung der kardialen Progenitorzellen.

Zunächst wurden die aus Mäuseherzen gewonnenen Überstände untersucht. Hierzu wurden zu den adulten ventrikulären Kardiomyozyten direkt im Anschluss an die Waschvorgänge pro Zellkulturschale jeweils 10 μl des im Verhältnis 1:100 verdünnten Differenzierungsüberstandes der Progenitorzellen pipettiert. Als Kontrollgruppe dienten Kardiomyozyten, die ebenfalls 2-4 Stunden nach Ausplattieren der Zellen direkt im Anschluss an die Waschschriffe pro Zellkulturschale jeweils 10 μl des im Verhältnis 1:100 verdünnten Differenzierungsmediums zugesetzt bekamen. Die Herzmuskelzellen wurden über Nacht mit diesem Medium bzw. Überstand inkubiert und die Messung der Kontraktionsparameter erfolgte 24 Stunden nach Ausplattieren der Zellen. Die Kardiomyozyten wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz elektrisch stimuliert und die relative Zellverkürzung $\Delta L/L$ als Maß für die kontraktile Funktion bestimmt. Hierbei zeigte sich kein Unterschied der mit Differenzierungsüberstand exponierten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 4.15).

Im nächsten Versuch sollte überprüft werden, ob durch eine höhere Konzentration der Progenitorzellüberstände ein Effekt auf die Funktion der Myokardzellen gemessen werden konnte. Dazu wurden wieder die im Vorversuch eingesetzten Überstände und Medien verwendet und statt im Verhältnis 1:100 für diesen Versuch im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die übrige Versuchsdurchführung blieb identisch. Die adulten ventrikulären Kardiomyozyten wurden direkt im Anschluss an die Waschvorgänge mit pro Zellkulturschale jeweils 10 μl des verdünnten Differenzierungsüberstandes versetzt. Die Kardiomyozyten der Kontrollgruppe wurden analog mit Differenzierungsmedium inkubiert. Die Herzmuskelzellen wurden über Nacht mit diesem Medium bzw. Überstand inkubiert und die Messung der Kontraktionsparameter erfolgte 24 Stunden nach Ausplattieren der Zellen. Die elektrische Stimulation der Zellen erfolgte mit einer Frequenz von 0,5 Hz und die relative Zellverkürzung $\Delta L/L$ als Maß für die kontraktile Funktion wurde bestimmt. Hier zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Verbesserung der kontraktilen Funktion um $10,7\% \pm 2,5\%$ bei den Zellen, die mit Differenzierungsüberstand inkubiert worden waren (Abb. 4.15).

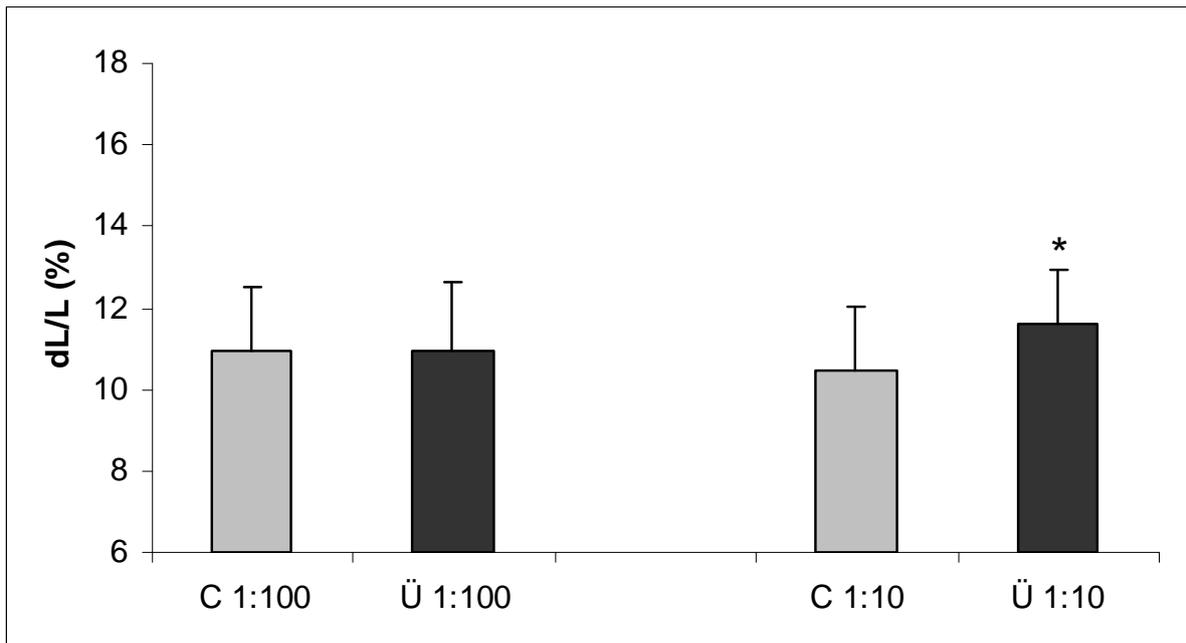


Abbildung 4.15: Wirkung der Progenitorzellüberstände aus Mäuseherzen im Übernachtversuch. Isolierte ventrikuläre Herzmuskelzellen wurden über Nacht mit Differenzierungsmedien (Kontrolle, 1:100: n=71; 1:10: n=36) oder mit Differenzierungsüberständen (Überstand, 1:100: n=71; 1:10: n=36) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. C=Kontrolle, Ü=Überstand, 1:100, 1:10= Verdünnungsverhältnis, *= $p < 0,05$ vs. C.

Im nächsten Versuch sollten die aus humanen Herzen gewonnenen Progenitorzellüberstände untersucht werden. Es wurden hier die Überstände aus zwei unterschiedlichen Herzen untersucht. Dazu wurden zu den adulten ventrikulären Kardiomyozyten direkt im Anschluss an die Waschvorgänge pro Zellkulturschale jeweils 10 μl des im Verhältnis 1:100 verdünnten Differenzierungsüberstandes pipettiert. Als Kontrollgruppe dienten Kardiomyozyten, die ebenfalls 2-4 Stunden nach Ausplattieren der Zellen direkt im Anschluss an die Waschschritte pro Zellkulturschale jeweils 10 μl des im Verhältnis 1:100 verdünnten Differenzierungsmediums zugesetzt bekamen. Die Herzmuskelzellen wurden über Nacht mit diesem Medium bzw. Überstand inkubiert und die Messung der Kontraktionsparameter erfolgte 24 Stunden nach Ausplattieren der Zellen. Die Kardiomyozyten wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz elektrisch stimuliert und die relative Zellverkürzung $\Delta L/L$ als Maß für die kontraktile Funktion bestimmt. Hier zeigte sich in beiden Fällen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Verbesserung der kontraktilen Funktion bei den Zellen, die mit Differenzierungsüberstand inkubiert worden waren (Abb. 4.16). Diese Verbesserung

der kontraktile Funktion betrug bei den mit Überstand 1 inkubierten Zellen $7,2\% \pm 2,1\%$ im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei den mit Überstand 2 inkubierten Zellen $11,3\% \pm 1,7\%$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.

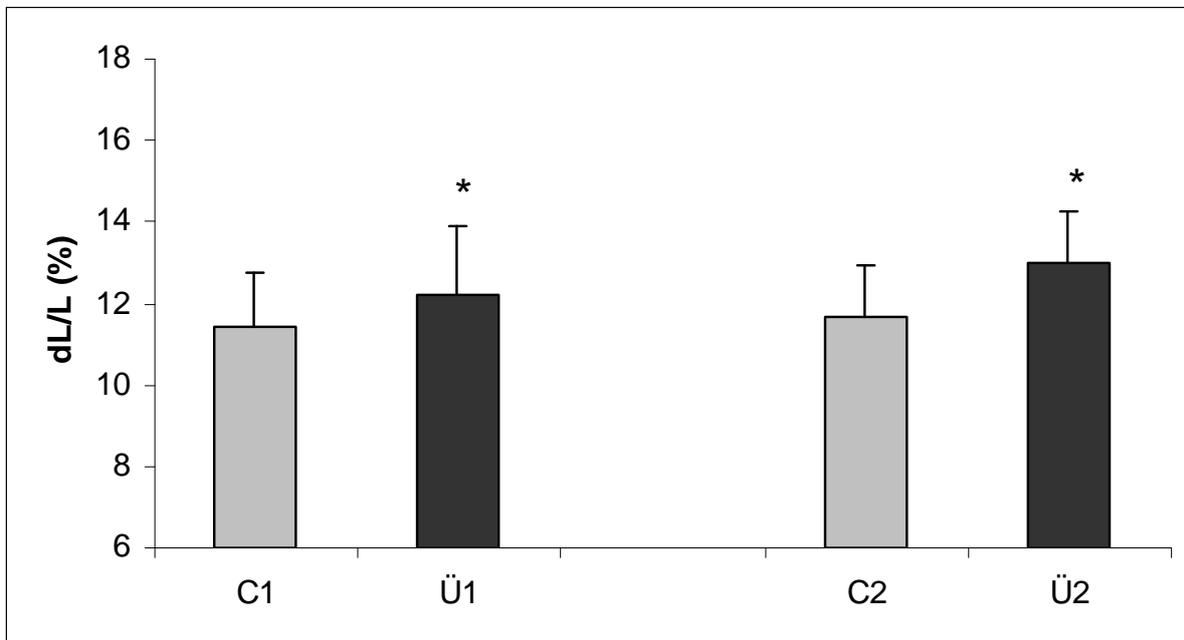


Abbildung 4.16: Wirkung der Progenitorzellüberstände aus Menschenherzen im Übernachtversuch. Isolierte ventrikuläre Herzmuskelzellen wurden über Nacht mit Differenzierungsmedien (Kontrolle, 1:100, C1: n=60; C2: n=60) oder mit Differenzierungsüberständen (Überstand, 1:100, Ü1: n=60; Ü2: n=60) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. C=Kontrolle, Ü=Überstand, 1, 2=aus unterschiedlichen Herzen gewonnene Überstände und Medien, *= $p < 0,05$ vs. C.

4.5.2 Wirkung der Auswuchsüberstände aus Maus und vom Menschen

In den nachfolgenden Versuchen wurde untersucht, ob entsprechend den Auswuchsüberständen und –medien der Progenitorzellen der Ratte auch diejenigen von Maus und Mensch keinen Einfluss auf die Kontraktionsfähigkeit der Myokardzellen haben.

Dazu wurden zunächst die Auswuchsüberstände und –medien der Maus untersucht. Es wurden die Medien und Überstände derselben Maus untersucht, deren Differenzierungsüberstand auch schon zuvor untersucht worden war. Diese wurden im Verhältnis 1:10 verdünnt. Zu den adulten ventrikulären Kardiomyozyten wurden im

Anschluss an die Waschvorgänge pro Zellkulturschale jeweils 10 μ l des Auswuchsüberstandes pipettiert. Als Kontrollgruppe dienten Kardiomyozyten, die ebenfalls 2-4 Stunden nach Ausplattieren der Zellen im Anschluss an die Waschschrirte pro Zellkulturschale jeweils 10 μ l des Auswuchsmediums zugesetzt bekamen. Die Herzmuskelzellen wurden über Nacht mit diesem Medium bzw. Überstand inkubiert. Die Messung der Kontraktionsparameter erfolgte 24 Stunden nach Ausplattieren der Zellen. Die Kardiomyozyten wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz elektrisch stimuliert und die relative Zellverkürzung $\Delta L/L$ als Maß für die kontraktile Funktion bestimmt. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Auswuchsüberstand inkubierten Zellen und der Kontrollgruppe (Abb. 4.17).

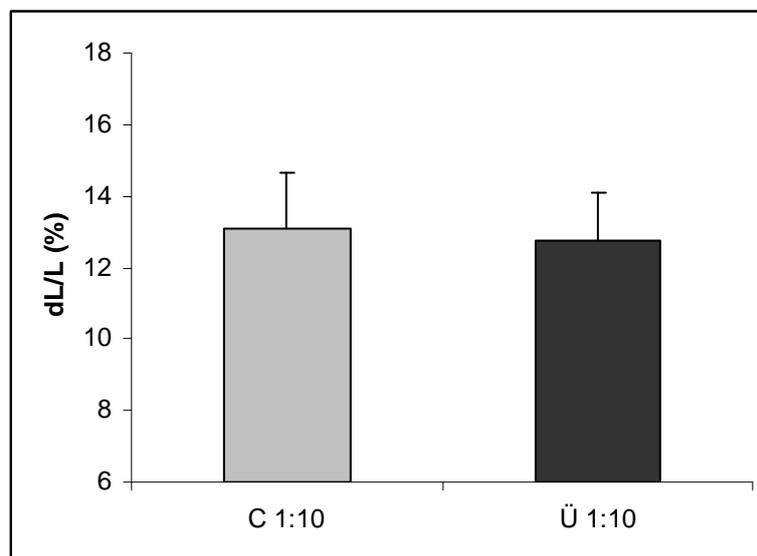


Abbildung 4.17: Wirkung der Progenitorzellüberstände aus Mäuseherzen im Übernachtversuch. Isolierte ventrikuläre Herzmuskelzellen wurden über Nacht mit Auswuchsmedium (Kontrolle, 1:10, n=54) oder mit Auswuchsüberstand (Überstand, 1:10, n=54) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. C=Kontrolle, Ü=Überstand, 1:10=Verdünnungsverhältnis.

Im Anschluss wurden auch die Auswuchsmedien und -überstände der Progenitorzellen untersucht, die aus Menschenherzen gewonnen worden waren. Es wurden Überstände und Medien aus den zwei unterschiedlichen Herzen untersucht, deren Differenzierungsüberstände auch schon zuvor eingesetzt worden waren. Diese wurden im Verhältnis 1:100 verdünnt und im Anschluss an die Waschvorgänge mit jeweils 10 μ l pro Kulturschale zu den adulten ventrikulären Kardiomyozyten pipettiert.

Die mit Auswuchsmedien inkubierten Gruppen dienten als Kontrollen. Die Herzmuskelzellen wurden über Nacht mit diesen Medien bzw. Überständen inkubiert. Die Messung der Kontraktionsparameter erfolgte 24 Stunden nach Ausplattieren der Zellen. Die Kardiomyozyten wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz elektrisch stimuliert und die relative Zellverkürzung $\Delta L/L$ als Maß für die kontraktile Funktion bestimmt. Auch hier zeigten sich zwischen den mit Auswuchsüberständen inkubierten Gruppen und der jeweiligen Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede (Abb. 4.18).

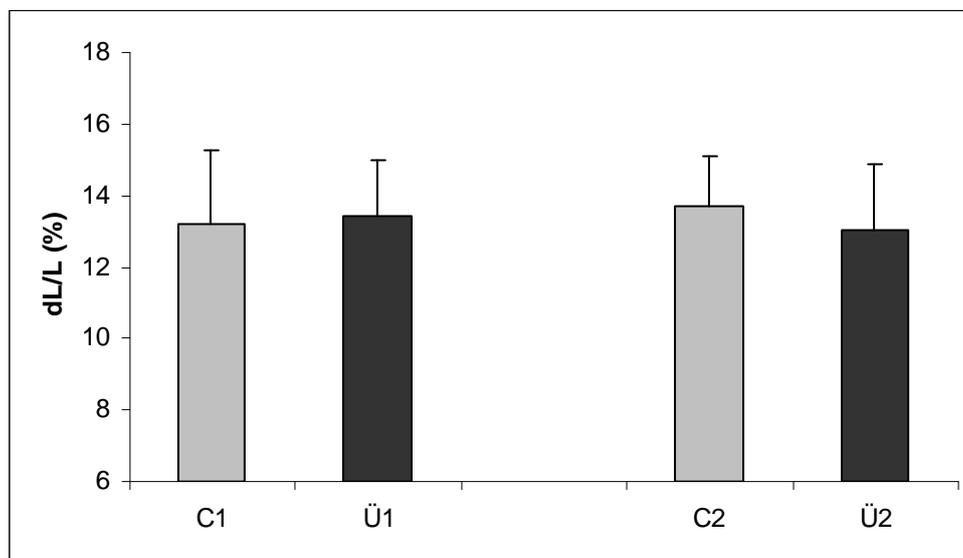


Abbildung 4.18: Wirkung der Progenitorzellüberstände aus Menschenherzen im Übernachtversuch. Isolierte ventrikuläre Herzmuskelzellen wurden über Nacht mit Auswuchsmedien (Kontrolle, 1:100, C1: n=54; C2: n=54) oder mit Auswuchsüberständen (Überstand, 1:100, Ü1: n=54; Ü2: n=54) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. C=Kontrolle, Ü=Überstand, 1, 2=aus unterschiedlichen Herzen gewonnene Überstände und Medien.

4.6 Wirkung von Progenitorzellüberständen auf Kardiomyozyten aus druckbelasteten Herzen

4.6.1 Wirkung auf Herzmuskelzellen aus Ratten mit L-NAME induzierter Hypertonie und nach antihypertensiver Therapie

Im folgenden Versuch sollte die Wirkung der Progenitorzellüberstände auf Herzmuskelzellen aus Ratten mit L-NAME induzierter Hypertonie untersucht werden. Als Versuchstiere dienten hier drei normotensive, weibliche, drei Monate alte Wistar-Ratten, die über einen Zeitraum von vier Wochen mit L-NAME gefüttert wurden. Die

genaue Behandlung der Tiere wurde in Abschnitt 3.7 beschrieben. L-NAME hemmt die NO-Synthese und verursachte dadurch bei den Versuchstieren eine Hypertonie mit systolischen Blutdruckwerten von im Mittel 181 mmHg. Wie unter 3.4 beschrieben erfolgte auch bei diesen Versuchstieren die Isolierung der Kardiomyozyten aus den Rattenherzen. Nach Ausplattieren und Waschvorgängen wurden die Herzmuskelzellen über Nacht mit Differenzierungsüberstand der Progenitorzellen inkubiert, welcher zuvor im Verhältnis 1:100 verdünnt worden war. Pro Zellkulturschale erfolgte die Zugabe von jeweils 10 μ l Überstand. Die Myokardzellen der Kontrollgruppe wurden entsprechend mit Differenzierungsmedium inkubiert, welches ebenfalls im Verhältnis 1:100 verdünnt worden war. Auch hier wurden pro Zellkulturschale 10 μ l des Mediums hinzupipettiert. Es wurden die Differenzierungsüberstände bzw. Differenzierungsmedien der Progenitorzellen einer drei Monate alten, weiblichen Wistar-Ratte eingesetzt. Die Messung der Kontraktionsparameter erfolgte 24 Stunden nach Ausplattieren der Zellen. Die Herzmuskelzellen wurden mit drei verschiedenen Frequenzen (0,5 Hz, 1 Hz, 2 Hz) elektrisch stimuliert und die relative Zellverkürzung $\Delta L/L$ als Maß für die kontraktile Funktion bestimmt. Hierbei zeigte sich über alle drei gemessenen Frequenzen kein signifikanter Unterschied der kontraktile Funktion zwischen den jeweiligen Versuchs- und Kontrollgruppen (Abb. 4.19). In der Abbildung wurden die Ergebnisse der drei Versuchstiere zusammengefasst.

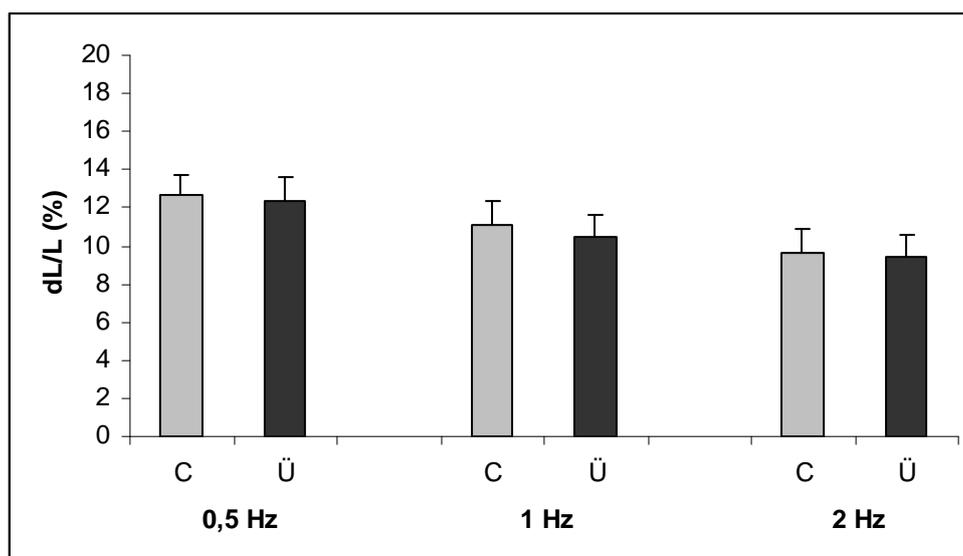


Abbildung 4.19: Wirkung der Progenitorzellüberstände auf Herzmuskelzellen aus Ratten mit L-NAME induzierter Hypertonie in Abhängigkeit von der Frequenz im Übernachtversuch. Die isolierten ventrikulären Herzmuskelzellen wurden über Nacht mit Differenzierungsmedium (Kontrolle, 1:100, n=27) oder mit Differenzierungsüberstand (Überstand, 1:100, n=27) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz, 1 Hz und 2 Hz stimuliert. C=Kontrolle, Ü=Überstand.

Im anschließenden Versuch sollte die Wirkung der Progenitorzellüberstände auf Herzmuskelzellen aus Ratten mit L-NAME induzierter Hypertonie nach antihypertensiver Therapie untersucht werden. Als Versuchstiere dienten hier, wie in Abschnitt 3.7 beschrieben, wie zuvor drei normotensive Ratten, die über einen Zeitraum von vier Wochen mit dem NO-Syntheseantagonisten L-NAME gefüttert wurden. Nach zwei Wochen wurden die Ratten zusätzlich zu L-NAME für die weiteren zwei Wochen mit dem Antihypertensivum Hydralazin gefüttert. Nach der zweiwöchigen L-NAME-Behandlung lag der systolische Blutdruck der Versuchstiere im Mittel bei 165 mmHg. Dieser sank durch die anschließende zusätzliche Hydralazin-Behandlung bis zum Ende der insgesamt vierwöchigen Behandlungszeit auf durchschnittlich 131 mmHg systolisch ab. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte wie unter 3.4 die Isolierung der Kardiomyozyten aus den Rattenherzen. Nach Ausplattieren und Waschvorgängen wurden die Herzmuskelzellen über Nacht mit Differenzierungsüberstand der Progenitorzellen inkubiert, welcher zuvor im Verhältnis 1:100 verdünnt worden war. Pro Zellkulturschale erfolgte die Zugabe von jeweils 10 µl Überstand. Die Myokardzellen der Kontrollgruppe wurden entsprechend mit Differenzierungsmedium inkubiert, welches ebenfalls im Verhältnis 1:100 verdünnt worden war. Auch hier wurden pro Zellkulturschale 10 µl des Mediums hinzupipettiert. Es wurden die Differenzierungsüberstände bzw. Differenzierungsmedien der Progenitorzellen einer drei Monate alten, weiblichen Wistar-Ratte eingesetzt. Die Messung der Kontraktionsparameter erfolgte 24 Stunden nach Ausplattieren der Zellen. Die Herzmuskelzellen wurden mit drei verschiedenen Frequenzen (0,5 Hz, 1 Hz, 2 Hz) elektrisch stimuliert und die relative Zellverkürzung $\Delta L/L$ als Maß für die kontraktile Funktion bestimmt. Hierbei zeigte sich bei einer Frequenz von 0,5 Hz im Trend eine Verbesserung der kontraktile Funktion von $10,8 \% \pm 4,0\%$ (Abb. 4.20). In der Abbildung wurden die Ergebnisse der drei Versuchstiere zusammengefasst.

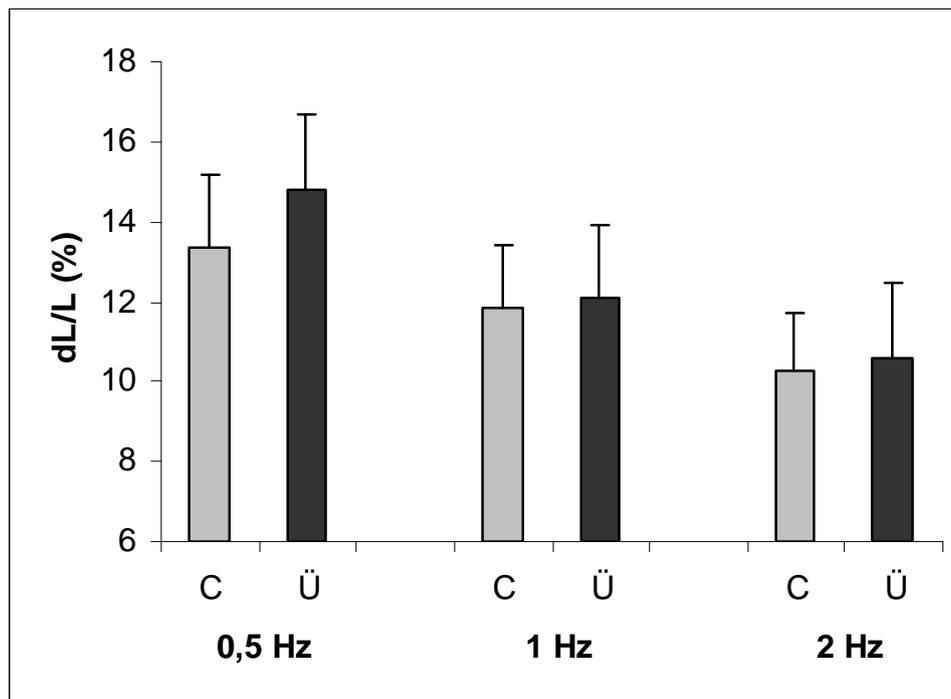


Abbildung 4.20: Wirkung der Progenitorzellüberstände auf Herzmuskelzellen aus Ratten mit L-NAME induzierter Hypertonie nach antihypertensiver Therapie in Abhängigkeit von der Frequenz im Übernachtversuch. Die isolierten ventrikulären Herzmuskelzellen wurden über Nacht mit Differenzierungsmedium (Kontrolle, 1:100, n=21) oder mit Differenzierungsüberstand (Überstand, 1:100, n=21) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz, 1 Hz und 2 Hz stimuliert. C=Kontrolle, Ü=Überstand.

4.6.2 Wirkung auf Herzmuskelzellen aus spontan hypertensiven Ratten und nach antihypertensiver Therapie

In folgenden Versuchen sollte die Wirkung der Progenitorzellüberstände auf Herzmuskelzellen aus spontan hypertensiven Ratten (SHR) untersucht werden. Zunächst wurden zwei unbehandelte SH-Ratten untersucht, deren systolische Blutdruckwerte bei durchschnittlich 193 mmHg lagen.

Wie unter 3.4 beschrieben erfolgte die Isolierung der Kardiomyozyten aus den Rattenherzen. Nach Ausplattieren und Waschvorgängen wurden die Herzmuskelzellen über Nacht mit Differenzierungsüberstand der Progenitorzellen inkubiert, welcher zuvor im Verhältnis 1:100 verdünnt worden war. Pro Zellkulturschale erfolgte die Zugabe von jeweils 10 µl Überstand. Die Myokardzellen der Kontrollgruppe wurden entsprechend mit Differenzierungsmedium inkubiert, welches ebenfalls im Verhältnis 1:100 verdünnt worden war. Auch hier wurden pro Zellkulturschale 10 µl des Mediums hinzupipettiert. Es wurden die

Differenzierungsüberstände bzw. Differenzierungsmedien der Progenitorzellen einer drei Monate alten, weiblichen Wistar-Ratte eingesetzt. Die Messung der Kontraktionsparameter erfolgte 24 Stunden nach Ausplattieren der Zellen. Die Herzmuskelzellen wurden mit drei verschiedenen Frequenzen (0,5 Hz, 1 Hz, 2 Hz) elektrisch stimuliert und die relative Zellverkürzung $\Delta L/L$ als Maß für die kontraktile Funktion bestimmt. Hierbei zeigte sich in beiden Fällen über alle drei gemessenen Frequenzen kein signifikanter Unterschied der kontraktile Funktion zwischen den jeweiligen Versuchs- und Kontrollgruppen (Abb. 21 + 22).

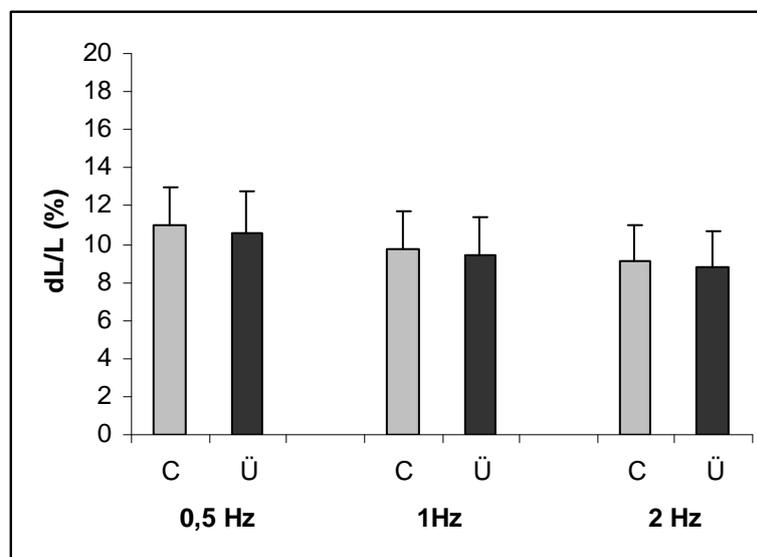


Abbildung 4.21: Wirkung der Progenitorzellüberstände auf Herzmuskelzellen aus spontan hypertensiven Ratten in Abhängigkeit von der Frequenz im Übernachtversuch. Die isolierten ventrikulären Herzmuskelzellen wurden über Nacht mit Differenzierungsmedium (Kontrolle, 1:100, n=45) oder mit Differenzierungsüberstand (Überstand, 1:100, n=45) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz, 1 Hz und 2 Hz stimuliert. C=Kontrolle, Ü=Überstand.

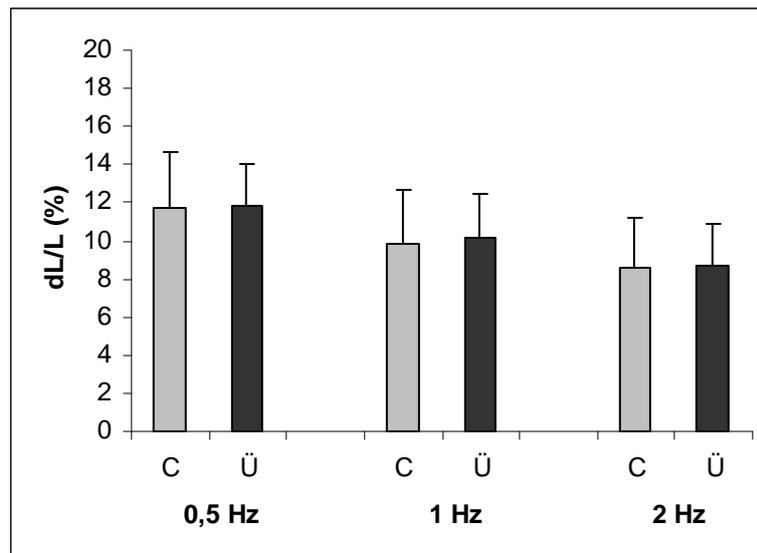


Abbildung 4.22: Wirkung der Progenitorzellüberstände auf Herzmuskelzellen aus spontan hypertensiven Ratten in Abhängigkeit von der Frequenz im Übernachtversuch. Die isolierten ventrikulären Herzmuskelzellen wurden über Nacht mit Differenzierungsmedium (Kontrolle, 1:100, n=45) oder mit Differenzierungsüberstand (Überstand, 1:100, n=45) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz, 1 Hz und 2 Hz stimuliert. C=Kontrolle, Ü=Überstand.

Anschließend sollte die Wirkung der Progenitorzellüberstände auf die Kontraktilität von Herzmuskelzellen aus spontan hypertensiven Ratten untersucht werden, die antihypertensiv behandelt worden waren. Dazu wurden insgesamt vier spontan hypertensive Ratten untersucht, die über einen Zeitraum von zwei Wochen mit dem Antihypertensivum Hydralazin gefüttert wurden. Der Blutdruck der Versuchstiere wurde dadurch gesenkt und betrug am Ende der zwei Wochen im Mittel 119 mmHg systolisch. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte wie unter 3.4 beschrieben die Isolierung der Kardiomyozyten aus den Rattenherzen. Nach Ausplattieren und Waschvorgängen wurden die Herzmuskelzellen über Nacht mit Differenzierungsüberstand der Progenitorzellen inkubiert, welcher zuvor im Verhältnis 1:100 verdünnt worden war. Pro Zellkulturschale erfolgte die Zugabe von jeweils 10 µl Überstand. Die Myokardzellen der Kontrollgruppe wurden entsprechend mit Differenzierungsmedium inkubiert, welches ebenfalls im Verhältnis 1:100 verdünnt worden war. Auch hier wurden pro Zellkulturschale 10 µl des Mediums hinzupipettiert. Es wurden die Differenzierungsüberstände bzw. Differenzierungsmedien der Progenitorzellen einer drei Monate alten, weiblichen Wistar-Ratte eingesetzt. Die Messung der Kontraktionsparameter erfolgte 24 Stunden nach Ausplattieren der Zellen. Die Herzmuskelzellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz elektrisch stimuliert und die

relative Zellverkürzung $\Delta L/L$ als Maß für die kontraktile Funktion bestimmt. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied von $4,7\% \pm 1,8\%$ der kontraktilen Funktion zwischen den mit Differenzierungsüberstand inkubierten Zellen und den mit Differenzierungsmedium inkubierten Kontrollzellen (Abb. 4.23). In der Abbildung wurden die Ergebnisse der vier Versuchstiere zusammengefasst.

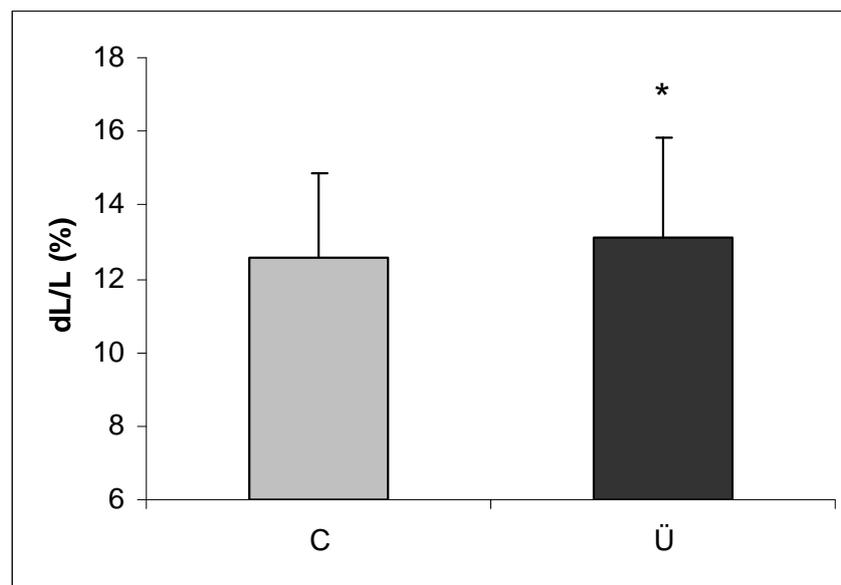


Abbildung 4.23: Wirkung der Progenitorzellüberstände auf Herzmuskelzellen aus spontan hypertensiven Ratten nach antihypertensiver Therapie im Übernachtversuch. Die isolierten ventrikulären Herzmuskelzellen wurden über Nacht mit Differenzierungsmedium (Kontrolle, 1:100, n=150) oder mit Differenzierungsüberstand (Überstand, 1:100, n=155) inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die relative Zellverkürzung. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. C=Kontrolle, Ü=Überstand, *=p<0,05 vs. C.

5. Diskussion

Der vorliegenden Arbeit lag die Hypothese zugrunde, dass kardiale Progenitorzellen über die Freisetzung von verschiedenen Faktoren auf parakrinem Weg die Zellfunktion von Kardiomyozyten verbessern.

Zur Untersuchung der Fragestellungen wurde zunächst ein *in vitro* – System etabliert, anhand dessen die Wirkung kardialer Progenitorzellüberstände untersucht werden konnte. Da die vorliegende Arbeit auf den therapeutischen Nutzen der Progenitorzellen abzielt, wurde nach einem Herzinsuffizienzmodell gesucht, an dem die Wirkung der Progenitorzellüberstände beobachtet werden konnte. Die Untersuchung des Kontraktionsverhaltens adulter, ventrikulärer Kardiomyozyten aus Rattenherzen in Abhängigkeit von ihrer Kultivierungszeit ergab, dass Kardiomyozyten, die über Nacht kultiviert werden, eine geringere kontraktile Funktion aufweisen als die noch am Tag der Präparation untersuchten Myokardzellen. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden alle nachfolgenden Untersuchungen der kontraktilen Funktion mit Übernachtkulturen durchgeführt. Die über Nacht kultivierten Kardiomyozyten mit ihrer verringerten kontraktilen Funktion sollten dabei als Modell der auch bei Herzinsuffizienz eingeschränkten kontraktilen Funktion der Myokardzellen dienen.

Durch die *in vitro* durchgeführten Versuche konnten Nebeneffekte und gegenregulatorische Mechanismen von *in vivo* - Modellen weitestgehend ausgeschlossen werden. Durch die Fokussierung auf die einzelnen Kardiomyozyten im *in vitro* – Versuch wurden zudem möglicherweise zusätzlich bestehende Wirkungen der Progenitorzellen auf das kardiovaskuläre System, wie beispielsweise Homing, Remodelling oder Neovaskularisierung unterbunden und es konnte eine Aussage über den direkten Effekt der Progenitorzellüberstände auf die einzelnen Kardiomyozyten getroffen werden.

5.1 Hauptbefunde

Folgende Hauptbefunde konnten in der vorliegenden Studie nachgewiesen werden:

- 1) Kardiale Progenitorzellen können kultiviert werden und zu Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen differenzieren.
- 2) Die Überstände dieser Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen verbessern in vitro die kontraktile Funktion von isolierten, ventrikulären Herzmuskelzellen aus Rattenherzen.
- 3) Der positive Effekt auf das Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten ist unabhängig vom Alter der Gewebe, denen die Progenitorzellen entstammen.
- 4) Unabdingbar für die beobachteten Effekte sind dagegen ein gewisser Differenzierungsgrad der Progenitorzellen, ein bestimmtes Verdünnungsverhältnis der Überstände sowie die Proteinbiosynthese der untersuchten Kardiomyozyten.
- 5) Ähnliche Effekte auf das Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten sind bei Progenitorzellüberständen aus Mäuse- und Menschenherzen zu beobachten.
- 6) Eine antihypertensive Therapie begünstigt die Wirkung der Progenitorzellüberstände auf Kardiomyozyten aus druckbelasteten Herzen.

5.2 Beurteilung der PCR- und Western Blot-Untersuchungen

Die Ergebnisse der PCR- und Western Blot-Untersuchungen zeigen, dass die nach dem Protokoll von Messina et al. (2004) ex vivo kultivierten kardialen Progenitorzellen aus Rattenherzen am Ende ihrer sechswöchigen Kultivierungszeit sowohl Stammzell- als auch herzspezifische Marker exprimieren. Die Expression der Stammzellmarker ISL-1 und Sca-1 konnte sowohl auf mRNA-Ebene in der RT-PCR als auch auf Proteinebene im Western Blot nachgewiesen werden. Moretti et al.

(2006) fanden vor wenigen Jahren im Herzen eine ISL-1-positive Zellpopulation, die in der Lage war, sich sowohl zu Kardiomyozyten als auch zu glatten Muskelzellen und Endothelzellen zu differenzieren. Die Expression des Stammzellmarkers c-kit konnte lediglich auf mRNA-Ebene, nicht dagegen auf Proteinebene gezeigt werden. Die Tatsache, dass die untersuchten Progenitorzellen sowohl Stammzellmarker (Sca-1, ISL-1, c-kit, GATA-4) als auch kardiale Marker wie ANP, BNP, eNOS, Cardiotrophin, α -Actin, β -Actin und β -MHC exprimieren zeigt, dass diese Zellen zum einen noch Eigenschaften von Stammzellen aufweisen, zum anderen aber schon Marker exprimieren, die ausdifferenzierte Herzmuskelzellen charakterisieren.

5.3 Wirkung von Progenitorzellüberständen aus Rattenherzen in Abhängigkeit vom Alter auf die Funktion von isolierten Herzmuskelzellen

Es wurden bereits zahlreiche Studien zur Untersuchung von kardialen Progenitorzellen durchgeführt, in denen in vivo eine kardioprotektive Wirkung der Progenitorzellen nachgewiesen werden konnte. Der dieser Wirkung zugrunde liegende Mechanismus ist aber bisher weitestgehend unverstanden. Die Annahme, kardiale Progenitorzellen könnten durch Differenzierung in Kardiomyozyten direkt das verletzte Herzgewebe beispielsweise nach einem Myokardinfarkt ersetzen (Beltrami et al., 2003) wurde immer mehr durch die Vermutung verdrängt, ein parakriner Mechanismus könnte ihrer Wirkung zugrunde liegen, bei dem die kardialen Progenitorzellen verschiedene Faktoren freisetzen und so auf die umgebenden Herzmuskelzellen und Gewebe wirken können (Chimenti et al., 2010; Anderson et al., 2008). Da im in vivo-Modell nicht zwischen einer direkten Wirkung auf die Kardiomyozyten und anderen Wirkungen auf das kardiovaskuläre System, die auch zu einer Verbesserung der Herzfunktion führen können, wie beispielsweise Homing, Remodeling und Neovaskularisation unterschieden werden kann, bietet das hier verwendete in vitro Modell die Möglichkeit, den direkten Einfluss der kardialen Progenitorzellen auf die Funktion der Kardiomyozyten zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Progenitorzellüberstände aus verschiedenen Rattenpräparationen bezüglich ihrer Wirkung auf die kontraktile Funktion von Herzmuskelzellen untersucht. Dabei wurden Progenitorzellüberstände untersucht,

die aus drei Monate alten, weiblichen Wistar-Ratten bzw. einer 18 Monate alten, weiblichen Wistar-Ratte gewonnen worden waren. Zum einen konnte so die Reproduzierbarkeit der Effekte überprüft werden und zum anderen konnte der Einfluss des Alters der Rattenherzen auf die Wirkung der aus ihnen gewonnenen Progenitorzellüberstände erfasst werden. Die dazu untersuchten Progenitorzellüberstände entsprachen jeweils den Differenzierungsüberständen, die am Ende der insgesamt sechswöchigen Kultivierungszeit gewonnen worden waren, d. h. die Zellen waren schon zu Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen differenziert.

Kretlow et al. (2008) zeigten an Stammzellen aus dem Knochenmark von Mäusen eine mit dem Alter einhergehende Beeinträchtigung des Differenzierungspotentials. Smith et al. (2004) wiesen dagegen ebenfalls an Mäusen nach, dass es mit zunehmendem Alter dennoch zu einer signifikanten Zunahme an Knochenmarkstammzellen kommt und dass die Proliferation von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen auch mit zunehmendem Alter nicht zum Stillstand kommt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Progenitorzellüberstände aller Präparationen zu einer signifikanten Verbesserung der kontraktilen Funktion der untersuchten Kardiomyozyten führen. Die größten Effekte zeigen sich jeweils bei einer für die Ratten unphysiologisch niedrigen Herzfrequenz von 0,5 Hz bzw. 30 Schlägen/Minute. Die Steigerung der kontraktilen Funktion lag bei den Überständen der beiden drei Monate alten, weiblichen Wistar-Ratten bei $11,3\% \pm 2,1\%$ bzw. $9,1\% \pm 1,9\%$, die Überstände der 18 Monate alten, weiblichen Wistar-Ratte führten zu einer Verbesserung der kontraktilen Funktion von $7,1\% \pm 2,1\%$. Es zeigt sich also eine deutliche Verbesserung der Zellfunktion isolierter Kardiomyozyten durch die 24-stündige Inkubation der Zellen mit den beschriebenen Progenitorzellüberständen. Die unterschiedlichen Präparationen zeigen zudem eine weitestgehend altersunabhängige Wirkung der Progenitorzellüberstände. Die Fähigkeit der kultivierten Progenitorzellen zur Freisetzung von Faktoren, die die Funktion von Kardiomyozyten günstig beeinflussen, scheint demnach mit zunehmendem Alter des Herzens nicht verloren zu gehen.

Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass in Gegenwart des β -Sympathomimetikums Isoprenalin keine zusätzliche Verbesserung der kontraktilen Funktion der Kardiomyozyten durch die Behandlung mit Progenitorzellüberständen erzielt wird.

Alle Progenitorzellüberstände zeigten bei einem Verdünnungsverhältnis von 1:10000 in der Messschale (jeweils 10 µl der 1:100 verdünnten Überstände wurden in die 1 ml - Schalen pipettiert) die beschriebenen Effekte. In Vorversuchen innerhalb der Arbeitsgruppe, bei der auch niedrigere Verdünnungsverhältnisse getestet wurden, hatte sich gezeigt, dass erst bei einer Verdünnung von 1:10000 der größte Effekt auf die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten messbar war. Der Grund für diese recht hohe Verdünnung könnte darin liegen, dass nicht nur ein einzelner Faktor, sondern eine Mischung vieler verschiedener Faktoren durch die Progenitorzellen freigesetzt wird, die jedoch nicht alle die Zellfunktion der Kardiomyozyten verbessern. Denkbar wäre die Freisetzung einer Reihe von verschiedenen Faktoren, die teilweise günstige und teilweise ungünstige Wirkungen auf die Zellfunktion ausüben. Durch eine möglicherweise konzentrationsabhängige Wirkung dieser Faktoren könnte es bei einer zu hohen Konzentration zu einem Nachlassen der Wirkung mancher günstiger Faktoren und/oder zu einer verbesserten Wirkung ungünstiger Faktoren kommen, sodass ein Übergewicht der ungünstig wirkenden Faktoren entsteht, wohingegen bei einer niedrigeren Konzentration die Wirkung der günstigen Faktoren überwiegt. Dies ist aber nur eine mögliche Erklärung, die weiteren Untersuchungen bedarf.

In der Tat wurden in verschiedenen Studien bereits verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren identifiziert, die von kardialen Progenitorzellen sezerniert werden. Nicht allen dieser Faktoren wurde dabei eine kardioprotektive Wirkung zugesprochen, für einige Zytokine wurde sogar eine kardiodepressive Wirkung beschrieben (Joulin et al., 2007). Einige Faktoren scheinen aber tatsächlich einen nachweislich positiven Effekt auf die Herzfunktion zu haben. So wiesen Chimenti et al. (2010) nach, dass humane kardiale Progenitorzellen VEGF, HGF und IGF-1 sezernieren können. Markel et al. (2008) wiesen VEGF eine entscheidende Rolle bei der Stammzell-vermittelten kardioprotektiven Wirkung zu und auch für HGF und IGF-1 wurden positive Effekte auf die Herzfunktion beobachtet. Urbanek et al. (2005) und Linke et al. (2005) zeigten im Tierversuch, dass es durch die intramyokardiale Injektion dieser beiden Wachstumsfaktoren nach induziertem Myokardinfarkt zu einer Aktivierung kardialer Progenitorzellen und Förderung der Bildung von Kardiomyozyten und Koronargefäßen innerhalb des Infarktgebietes kommt. Auch Anderson et al. (2008) zeigten eine durch HGF vermittelte Verringerung der Infarktgröße und Erhöhung der linksventrikulären Ejektionsfraktion, wenn HGF direkt

nach akutem Myokardinfarkt appliziert wurde. Rota et al. (2008) zeigten sogar, dass die intramyokardiale Injektion von HGF und IGF-1 auch noch 20 Tage nach induziertem Myokardinfarkt im Rattenmodell zur Regeneration des Infarktgewebes beiträgt. Weitere Faktoren, die von kardialen Progenitorzellen aber auch von anderen adulten Stammzellen, insbesondere mesenchymalen Stammzellen sezerniert werden und für die eine kardioprotektive Wirkung diskutiert wird sind unter anderem TGF- β 1 (Doyle et al., 2008), sVCAM-1 (Matsuura et al., 2009), Interleukin-10 (Burchfield et al., 2008), MCP-1 (Morimoto et al., 2006), MMPs und TIMPs (Gnecchi et al., 2008). Dennoch wurden viele der bisher identifizierten Faktoren noch nie auf ihre Wirkung auf die Funktion von Herzmuskelzellen hin untersucht, sodass weitere Untersuchungen notwendig sind, um zu klären, welche Faktoren und welcher Mechanismus den beobachteten Effekten zugrunde liegen.

5.4 Wirkmechanismus der Progenitorzellüberstände

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, Erkenntnisse über den Wirkmechanismus der Progenitorzellüberstände zu gewinnen. Bisher wurde zwar in zahlreichen Studien nachgewiesen, dass kardiale Progenitorzellen eine günstige Wirkung auf die Herzfunktion haben, aber der zugrunde liegenden Mechanismus ist noch unklar. Eine mögliche Erklärung ist die Freisetzung von verschiedenen Faktoren, insbesondere von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, in das umgebende Gewebe der Progenitorzellen, die dann in der Lage sind, den Heilungsprozess im Herzen durch verschiedene Reparaturmechanismen zu unterstützen (Burchfield et al., 2008). Zu diesen verschiedenen Mechanismen gibt es allerdings noch keine genaueren Erkenntnisse. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob die Hemmung der Translation oder Transkription in den untersuchten Zellen einen Einfluss auf die Wirkung der Progenitorzellüberstände hat, um so möglicherweise Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus ziehen zu können.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl durch eine Hemmung der Translation in den untersuchten Kardiomyozyten durch Cycloheximid, als auch durch eine Hemmung der Transkription durch Actinomycin D kein Effekt der Progenitorzellüberstände mehr auf die kontraktile Funktion der Myokardzellen messbar ist. Beide, sowohl Translation als auch Transkription sind Teilschritte der Proteinbiosynthese. Die

Untersuchung deutet demnach darauf hin, dass eine funktionierende Proteinbiosynthese in den Herzmuskelzellen Voraussetzung ist für die positive Wirkung der Progenitorzellüberstände auf deren kontraktile Funktion.

5.5 Vergleich der Wirksamkeit von Progenitorzellüberständen aus Ratte, Maus und Mensch

Die Wirkung von Progenitorzellen auf die Herzfunktion wurde in zahlreichen Tiermodellen mit positiven Resultaten untersucht. Dabei wurden unter anderem Ratten und Mäuse eingesetzt. Auch eine klinische Studie am Menschen wird derzeit durchgeführt (CADACEUS) um den therapeutischen Nutzen der Progenitorzellen bei verminderter Herzfunktion und/oder nach Myokardinfarkt zu testen. Adulte Stammzellen aus dem Knochenmark wurden bereits in einigen klinischen Studien auf ihre Wirkung auf die Herzfunktion nach Myokardinfarkt hin untersucht (Schächinger et al., 2006; Wollert et al., 2004; Perin et al., 2003; Dimmeler et al., 2008). Die Ergebnisse dieser Studien zeigten einen Rückgang der Infarktnarbe, eine Verbesserung der Ejektionsfraktion und ein verringertes linksventrikuläres endsystolisches Volumen. Es ist also anzunehmen, dass die Wirkungen der Progenitorzellen bei den untersuchten Tieren und dem Menschen vergleichbar sind. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwiefern die Wirksamkeit von Progenitorzellüberständen, die aus Mäuse- und Menschenherzen gewonnen wurden vergleichbar ist mit der derjenigen von aus Rattenherzen gewonnenen Progenitorzellüberständen. Die dazu untersuchten Progenitorzellüberstände entsprachen jeweils den Differenzierungsüberständen, die am Ende der insgesamt sechswöchigen Kultivierungszeit gewonnen worden waren, d. h. die Zellen waren schon zu Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen differenziert.

Die Ergebnisse zeigen, dass im Falle der aus Menschenherzen gewonnenen Progenitorzellüberstände vergleichbare Wirkungen auf die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten erzielt werden wie bei den zuvor untersuchten Progenitorzellüberständen aus Rattenherzen. Die Verbesserung der kontraktilen Funktion betrug durch die beiden untersuchten Überstände aus humanen Herzen jeweils $7,2\% \pm 2,1\%$ bzw. $11,3\% \pm 1,7\%$ im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Die aus Rattenherzen gewonnenen Überstände zeigten vergleichbare Werte von je nach Präparation $11,3\% \pm 2,1\%$, $9,1\% \pm 1,9\%$ bzw. $7,1\% \pm 2,1\%$ Steigerung der

kontraktilen Funktion der Herzmuskelzellen. Das Verdünnungsverhältnis der eingesetzten Überstände betrug in allen Fällen 1:100 (Endverdünnung in der Messschale 1:10000). Die Ergebnisse sprechen demnach dafür, dass die Fähigkeit kardialer Progenitorzellen zur Freisetzung von Faktoren, die die Funktion von Kardiomyozyten verbessern, sowohl bei Ratten als auch bei Menschen in vergleichbarer Weise vorhanden ist.

Im Falle der aus Mäuseherzen gewonnenen Progenitorzellüberstände konnte bei gleichem Verdünnungsverhältnis von 1:100 (Endverdünnung in der Messschale 1:10000) kein Unterschied der kontraktilen Funktion zwischen den mit Progenitorzellüberstand inkubierten Herzmuskelzellen und den Kontrollzellen festgestellt werden. Eine daraufhin durchgeführte Untersuchung der gleichen Progenitorzellüberstände bei einer Verdünnung von 1:10 (Endverdünnung in der Messschale 1:1000) ergab dagegen eine um $10,7\% \pm 2,5\%$ verbesserte kontraktile Funktion der untersuchten Kardiomyozyten. Dies entspricht also wieder den Werten, die bei Überständen aus Ratten- und Menschenherzen beobachtet wurden. Eine Erklärung für den erst bei einer vergleichsweise höheren Konzentration des Überstandes gemessenen Effekt könnte sein, dass das Mäuseherz im Vergleich zum Rattenherz kleiner ist. Somit könnte auch die Freisetzung von Faktoren, welche die Kontraktion von Myokardzellen günstig beeinflussen durch die aus dem kleineren Mäuseherz gewonnenen Progenitorzellen im Verhältnis zur Ratte verringert sein. Die Tatsache, dass im Falle der Progenitorzellüberstände aus Menschenherzen lediglich Gewebeproben des Herzens, die im Rahmen von operativen Eingriffen gewonnen worden waren, und nicht das vollständige Herz wie im Falle von Maus und Ratte zur Isolierung und Kultivierung der kardialen Progenitorzellen verwendet wurden, erklärt, warum die Konzentration der humanen Progenitorzellüberstände nicht deutlich geringer sein muss, um einen vergleichbaren Effekt wie bei der Ratte zu erzielen. Dennoch zeigen also auch die aus Mäuseherzen gewonnenen Progenitorzellüberstände, wenn auch in höherer Konzentration als im Falle von Ratten und Menschen, eine günstige Wirkung auf die kontraktile Funktion von Herzmuskelzellen.

5.6 Abhängigkeit der Wirkung der Progenitorzellüberstände vom Grad der Differenzierung

Um zu überprüfen, inwiefern der Grad der Differenzierung der Progenitorzellen einen Einfluss auf die Wirkung der entsprechenden Überstände hat, wurden neben den Differenzierungsüberständen, die am Ende der insgesamt sechswöchigen Kultivierungsphase gewonnen wurden auch die Auswuchsüberstände der Progenitorzellen untersucht. Diese wurden jeweils am Ende der ersten, vierwöchigen Kultivierungsphase gewonnen. Zu diesem Zeitpunkt waren noch die sogenannten cardiosphere-bildenden Zellen vorhanden. Deren Überstände zeigten in keinem Versuch einen positiven Effekt auf die kontraktile Funktion der Herzmuskelzellen. Dies gilt sowohl für die aus Rattenherzen unterschiedlichen Alters gewonnenen Progenitorzellüberstände, als auch für diejenigen aus Mäuse- und Menschenherzen. Im Gegenteil konnte teilweise sogar eine signifikante Verschlechterung der kontraktilen Funktion festgestellt werden. Dies war der Fall bei einem Teil der Kardiomyozyten, die mit den Auswuchsüberständen aus einer 18 Monate alten, weiblichen Wistar-Ratte inkubiert worden waren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass für die positive Wirkung der Progenitorzellüberstände auf die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten ein gewisser Grad der Differenzierung der Progenitorzellen unabdingbar ist. Ohne deren Differenzierung zu Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen konnte in keinem Fall ein positiver Effekt festgestellt werden.

Zudem wurde untersucht, ob die Überstände ausdifferenzierter Kardiomyozyten eine Wirkung auf die Funktion von Herzmuskelzellen haben. Die Ergebnisse zeigen, dass bei Inkubation von Herzmuskelzellen mit diesen Überständen keinerlei Effekt messbar ist. Adulte, ventrikuläre Kardiomyozyten scheinen demnach im Laufe ihrer Differenzierung die Fähigkeit verloren zu haben, Faktoren freizusetzen, die die kontraktile Funktion verbessern.

5.7 Wirkung der Progenitorzellüberstände auf Kardiomyozyten aus druckbelasteten Herzen

Bei der Untersuchung der Wirkung der Progenitorzellüberstände auf Kardiomyozyten aus druckbelasteten Herzen fällt auf, dass sowohl die Kardiomyozyten aus spontan hypertensiven Ratten als auch die Herzmuskelzellen aus Ratten mit L-NAME induzierter Hypertonie nach 24-stündiger Inkubation mit Progenitorzellüberständen keine signifikanten Veränderungen ihrer kontraktilen Funktion zeigen. Nach antihypertensiver Therapie der Ratten mit Hydralazin zeigt sich dagegen durch die 24-stündige Inkubation mit Progenitorzellüberständen eine Verbesserung der kontraktilen Funktion bei einer Frequenz von 0,5 Hz. Diese Verbesserung liegt bei den antihypertensiv behandelten spontan hypertensiven Ratten bei $4,7\% \pm 1,8\%$. Bei den Ratten mit L-NAME induzierter Hypertonie und anschließender antihypertensiver Behandlung zeigt sich im Trend eine Steigerung der kontraktilen Funktion von $10,8\% \pm 4,0\%$. Die Ergebnisse belegen deutlich, dass eine antihypertensive Therapie die Wirkung der Progenitorzellüberstände auf Kardiomyozyten aus druckbelasteten Herzen begünstigt.

5.8 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit belegt die Verbesserung der kontraktilen Funktion isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten durch parakrine Effekte von ex vivo kultivierten kardialen Progenitorzellen aus adulten Rattenherzen. Durch die in vitro durchgeführten Versuche konnten Nebeneffekte und gegenregulatorische Mechanismen von in vivo - Modellen weitestgehend ausgeschlossen werden. Durch die Fokussierung auf die einzelnen Kardiomyozyten im in vitro – Versuch konnte zudem eine Aussage über den direkten Effekt der Progenitorzellüberstände auf die einzelnen Kardiomyozyten getroffen werden, da möglicherweise zusätzlich bestehende Wirkungen der Progenitorzellen auf das kardiovaskuläre System, wie beispielsweise Homing, Remodeling oder Neovaskularisierung unterbunden wurden. Es wurde zudem nachgewiesen, dass die positive Wirkung der Progenitorzellüberstände auf das Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten unabhängig vom Alter der Gewebe ist, aus denen die Progenitorzellen gewonnen werden. Für die beobachteten Effekte notwendig ist dagegen die Differenzierung der

Progenitorzellen zu Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen, ein entsprechendes Verdünnungsverhältnis der Überstände sowie die ungestörte Proteinbiosynthese der untersuchten Kardiomyozyten. Weiter konnte nachgewiesen werden, dass vergleichbare Effekte auf das Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten auch bei Progenitorzellüberständen aus Mäuse- und Menschenherzen zu beobachten sind sowie dass die Wirkung der Progenitorzellüberstände auf Kardiomyozyten aus druckbelasteten Herzen durch eine antihypertensive Therapie begünstigt wird.

Die vorliegende Arbeit demonstriert die parakrine Wirkung kardialer Progenitorzellen auf isolierte ventrikuläre Herzmuskelzellen und trägt so zum Verständnis des Wirkmechanismus einer vielversprechenden Therapieoption der Herzinsuffizienz bei.

6. Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören vor allem in den Industrienationen zu den häufigsten Todesursachen. Ein entscheidender Faktor in der Entwicklung der Herzinsuffizienz besteht im Verlust von Herzmuskelzellen nach einem Myokardinfarkt sowie im Fehlen endogener Reparaturmechanismen. Die Erkenntnis, dass im Herzen eine Zellpopulation mit den Eigenschaften undifferenzierter Zellen zu finden ist und somit die Annahme, das Herz sei ein post-mitotisches Organ vollständig überdacht werden musste, führte zu zahlreichen Untersuchungen dieser kardialen Progenitorzellen im Hinblick auf ihren therapeutischen Nutzen insbesondere im Rahmen der Behandlung der Herzinsuffizienz. In Tiermodellen konnte bereits gezeigt werden, dass die kardialen Progenitorzellen in der Lage sind, die Regeneration des Herzmuskels nach Myokardinfarkt zu fördern. Der zugrunde liegende Mechanismus ist aber weiterhin ungeklärt. Vermutet wird unter anderem ein parakriner Mechanismus, über den Progenitorzellen die Herzmuskelzellen sowie das umgebende Gewebe günstig beeinflussen, Reparaturvorgänge vermitteln oder durch eine direkte Wirkung auf die Herzmuskelzellen zu einer Verbesserung der kardialen Funktion führen. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Wirkung kardialer Progenitorzellüberstände auf die kontraktile Funktion isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten untersucht werden.

Die dazu durchgeführten Untersuchungen ergaben zum einen, dass die Überstände von ex vivo kultivierten Progenitorzellen zu einer signifikanten Verbesserung der kontraktilen Funktion von isolierten ventrikulären Kardiomyozyten führen. Zudem konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt unabhängig vom Alter der Gewebe, dem die Progenitorzellen entstammen, bestehen bleibt. Notwendig für die beobachteten Effekte ist allerdings ein gewisser Differenzierungsgrad der Progenitorzellen, ein gewisses Verdünnungsverhältnis der Überstände sowie eine ungestörte Proteinbiosynthese der untersuchten Kardiomyozyten. Weiter konnte beim Vergleich von Progenitorzellen aus Ratten-, Mäuse- und Menschenherzen gezeigt werden, dass die Überstände durchaus vergleichbare Effekte zeigen. Zuletzt wurde nachgewiesen, dass im Falle von Herzmuskelzellen aus druckbelasteten Herzen die Wirkung der Progenitorzellüberstände durch eine vorherige antihypertensive Therapie begünstigt wird.

Die vorliegende Arbeit zeigt die parakrine Wirkung kardialer Progenitorzellen auf die kontraktile Funktion von Herzmuskelzellen und trägt so zum Verständnis des Wirkmechanismus einer vielversprechenden Therapieoption der Herzinsuffizienz bei.

7. Summary

Cardiovascular diseases are one of the leading causes of death in the industrial nations. One of the contributing factors in the development of heart failure is the loss of cardiomyocytes after myocardial infarction and the absence of endogenous repair mechanisms. Due to the finding that the adult heart contains a cell population with the characteristics of undifferentiated cells, the assumption that the adult heart is a post-mitotic organ had to be completely reconsidered. Numerous investigations were made to explore the therapeutic benefit of these cardiac progenitor cells, especially in the context of heart failure. In animal models cardiac progenitor cells were shown to promote cardiac regeneration after myocardial infarction. Nevertheless, the underlying mechanism remains unclear. Increasing evidence suggests that one mechanism of action by which progenitor cells provide tissue protection and repair may involve paracrine factors. Therefore, the present study examined the effect of supernatants from cardiac progenitor cells on contractile function of isolated adult ventricular cardiomyocytes.

The results of this study demonstrate that supernatants from ex vivo generated cardiac progenitor cells improve contractile function of isolated ventricular cardiomyocytes. Furthermore, this effect is independent of the donor's age. Indispensable is a certain differentiation state of the cardiac progenitor cells, a certain dilution of the supernatants and an unimpaired protein biosynthesis in the examined cardiomyocytes. The investigation of cardiac progenitor cells from rats, mice and human hearts demonstrates comparable effects on the contractile function of isolated cardiomyocytes. In addition, the effect of supernatants from cardiac progenitor cells was enhanced by antihypertensive therapy in case of isolated ventricular cardiomyocytes from hypertensive rats.

This study demonstrates the paracrine effect of cardiac progenitor cells on contractile function of cardiomyocytes and helps to understand the underlying mechanism of a promising therapeutic option in treatment of heart failure.

8. Literaturverzeichnis

Anderson, C.D., Heydarkhan-Hagvall, S., Schenke-Layland, K., Yang, J.Q., Jordan, M.C., Kim, J.K., Brown, D.A., Zuk, P.A., Laks, H., Roos, K.P., MacLellan, W.R., Beygui, R.E. (2008)

The role of cytoprotective cytokines in cardiac ischemia/reperfusion injury.

J. Surg. Res.; 148:164-171.

Asai, S., Saito, Y., Kuwahara, K., Mizuno, Y., Yoshimura, M., Higashikubo, C., Tsuji, T., Kishimoto, I., Harada, M., Hamanaka, I., Takahashi, I., Yasue, H., Nakao, K. (2000)

The heart is a source of circulating cardiotrophin-1 in humans.

Biochem. Biophys. Res. Commun.; 279:320-323.

Ballard, V.L. (2010)

Stem cells for heart failure in the aging heart.

Heart Fail. Rev.; doi:10.1007/s10741-010-9160-z.

Bearzi, C., Rota, M., Hosoda, T., Tillmanns, J., Nascimbene, A., De Angelis, A., Yasuzawa-Amano, S., Trofimova, I., Siggins, R.W., LeCapitaine, N., Cascapera, S., Beltrami, A.P., D'Alessandro, D.A., Zias, E., Quaini, F., Urbanek, K., Michler, R.E., Bolli, R., Kajstura, J., Leri, A., Anversa, P. (2007)

Human cardiac stem cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 104:14068-14073.

Beltrami, A.P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., Leri, A., Kajstura, J., Nadal-Ginard, B., Anversa, P. (2003)

Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration.

Cell; 114:763-776.

Burchfield, J. S., Dimmeler, S. (2008)

Role of paracrine factors in stem and progenitor cell mediated cardiac repair and tissue fibrosis.

Fibrogenesis & Tissue Repair; 1:4.

Burchfield, J.S., Iwasaki, M., Koyanagi, M., Urbich, C., Rosenthal, N., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. (2008)

Interleukin-10 from transplanted bone marrow mononuclear cells contributes to cardiac protection after myocardial infarction.

Circ. Res.; 103:203-211.

Cardiosphere-derived autologous stem cells to reverse ventricular dysfunction (CADUCEUS, 2009)

www.clinicaltrials.gov

Chimenti, I., Smith, R.R., Li, T.S., Gerstenblith, G., Messina, E., Giacomello, A., Marban, E. (2010)

Relative Roles of Direct Regeneration Versus Paracrine Effects of Human Cardiosphere-Derived Cells Transplanted Into Infarcted Mice.

Circ. Res.; 106:971-980.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987)

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

Anal. Biochem.; 162:156-159.

Cohn, J. N., Ferrari, R., Sharpe, N., (2000)

Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: A consensus paper from an international forum on cardiac remodeling.

J. Am. Coll. Cardiol.; 35:569-582.

Dimmeler, S., Burchfield J., Zeiher A.M. (2008)

Cell-based therapy of myocardial infarction.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.; 28:208-216.

Doyle, B., Sorajja, P., Hynes, B., Kumar, A.H., Araoz, P.A., Stalboerger, P.G., Miller, D., Reed, C., Schmeckpeper, J., Wang, S., Liu, C., Terzic, A., Kruger, D., Riederer, S., Caplice, N.M. (2008)

Progenitor cell therapy in a porcine acute myocardial infarction model induces cardiac hypertrophy, mediated by paracrine secretion of cardiogenic factors including TGFbeta1.

Stem. Cells. Dev.; 17:941-951.

Durocher, D., Charron, F., Warren, R., Schwartz, R.J., Nemer, M. (1997)

The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors.

EMBO J.; 16:5687-5696.

Gnecchi, M., Zhang, Z., Ni, A., Dzau, V.J. (2008)

Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy.

Circ. Res.; 103:1204-1219.

Grépin, C., Robitaille, L., Antakly, T., Nemer, M. (1995)

Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks in vitro cardiac muscle differentiation.

Mol. Cell. Biol.; 15:4095-4102.

Harrisons Innere Medizin, 16. Auflage (2005)

Deutsche Ausgabe in Zusammenarbeit mit der Charité.

Manfred Dietel, Norbert Suttorp, Martin Zeitz

Heng, B.C., Haider, H.K., Sim, E.K., Cao, T., Ng, S.C. (2004)

Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro.

Cardiovasc. Res.; 62:34-42.

Joulin, O., Petillot, P., Labalette, M., Lancel, S., Neviere, R. (2007)

Cytokine profile of human septic shock serum inducing cardiomyocyte contractile dysfunction.

Physiol. Res.; 56:291-297.

Kretlow, J.D., Jin, Y.-Q., Liu, W., Zhang, W.J., Hong, T-H., Zhou, G., Baggett, L.S., Mikos, A.G., Cao, Y. (2008)

Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells.

BMC Cell. Biol.; 9:60.

Kurtz, T., Morris, R. (1987)

Biological variability in Wistar-Kyoto rats. Implications for research with the spontaneously hypertensive rat.

Hypertension; 10:127-131.

Kyhse-Andersen, J. (1984)

Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.

J. Biochem. Biophys. Methods; 10:203-209.

Lev, S., Yarden, Y., Givol, D. (1992)

Dimerization and activation of the kit receptor by monovalent and bivalent binding of the stem cell factor.

J. Biol. Chem.; 267:15970-15977.

Linke, A., Muller, P., Nurzynska, D., Casarsa, C., Torella, D., Nascimbene, A., Castaldo, C., Cascapera, S., Bohm, M., Quaini, F., Urbanek, K., Leri, A., Hintze, T.H., Kajstura, J., Anversa, P. (2005)

Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA.;102:8966–8971.

Mahdavi, V., Periasamy, M., Nadal-Ginard, B. (1982)

Molecular characterization of two myosin heavy chain genes expressed in the adult heart.

Nature; 297:659-664.

Markel, T.A., Wang, Y., Herrmann, J.L., Crisostomo, P.R., Wang, M., Novotny, N.M., Herring, C.M., Tan, J. Lahm, T., Meldrum, D.R. (2008)

VEGF is critical for stem cell-mediated cardioprotection and a crucial paracrine factor for defining the age threshold in adult and neonatal stem cell function.

Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.; 295:H2308-H2314.

Matsuura, K., Honda, A., Nagai, T., Fukushima, N., Iwanaga, K., Tokunaga, M., Shimizu, T., Okano, T., Kasanuki, H., Hagiwara, N., Komuro, I. (2009)

Transplantation of cardiac progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice.

J. Clin. Invest.; 119:2204-2217.

Messina, E., De Angelis, L., Frati G., Morrone, S., Chimenti, S., Fiordaliso, F., Salio, M., Battaglia, M., Latronico, M. V. G., Coletta, M., Vivarelli, E., Frati, L., Cossu, G., Giacomello, A. (2004)

Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart.

Circ. Res.; 95:911-921.

Michel, T., Feron, O. (1997)

Perspective series: Nitric oxide and nitric oxide synthases. Nitric oxide synthases: Which, Where, How, and Why?

J. Clin. Invest.; 100:2146-2152.

Moretti, A., Lam, J., Evans, S.M., Laugwitz, K.L. (2007)

Biology of Isl1+ cardiac progenitor cells in development and disease.

Cell. Mol. Life Sci.; 64:674-682

Moretti, A., Caron, L., Nakano, A., Lam, J.T., Bernshausen, A., Chen, Y., Qyang, Y., Bu, L., Sasaki, M., Martin-Puig, S., Sun, Y., Evans, S.M., Laugwitz, K.L., Chien, K.R. (2006)

Multipotent embryonic ISL+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle and endothelial cell diversification.

Cell; 127:1151-1165.

Morimoto, H., Takahashi, M., Izawa, A., Ise, H., Hongo, M., Kolattukudy, P.E., Ikeda, U. (2006)

Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction.

Circ. Res.; 99:891-899.

Mullis, K., Falcoona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Ehrlich, H. (1986)

Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction.

Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.; 51:263-273.

Perin, E.C., Dohmann H.F., Borojevic R., Silva S.A., Sousa A.L., Mesquita C.T., Rossi, M.I., Carvalho A.C., Dutra H.S., Dohmann H.J., Silva G.V., Belém L., Vivacqua R., Rangel F.O., Esporcatte R., Geng Y.J., Vaughn W.K., Assad J.A., Mesquita E.T., Willerson J.T. (2003)

Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure.

Circulation; 107:2294-2302.

Piper, H.M., Probst, I., Schwartz, P. Hutter, J.F. and Spieckermann, P.G. (1982)

Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes.

J. Mol. Cell. Cardiol.; 14:397-412.

Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, 261. Auflage (2007)

Walter de Gruyter, Berlin, New York

Rota, M., Padin-Iruegas, M.E., Misao, Y., De Angelis, A., Maestroni, S., Ferreira, Martins, J., Fiumana, E., Rastaldo, R., Arcarese, M., Mitchell, T.S., Boni, A., Bolli, R., Urbanek, K., Hosoda, T., Anversa, P., Leri, A., Kajstura, J. (2008)

Local activation or implantation of cardiac progenitor cells rescues scarred infarcted myocardium improving cardiac function.

Circ. Res.; 103:107-116.

Sadat, S., Gehmert, S., Song, Y.H., Yen, Y., Bai, X., Gaiser, S., Klein, H., Alt, E. (2007)

The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF.

Biochem. Biophys. Res. Commun.; 363:674-679.

Schächinger, V., Erbs S., Elsässer A., Haberbosch W., Hambrecht R., Hölschermann, H., Yu J., Corti R., Mathey DG., Hamm CW., Süselbeck T., Assmus B., Tonn T., Dimmeler S., Zeiher A.M., REPAIR-AMI Investigators (2006)

Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction.

N. Engl. J. Med.; 355:1210-1221.

Sheng, Z., Pennica, D., Wood, W.I., Kenneth, R.C. (1996)

Cardiotrophin-1 displays early expression in the murine heart tube and promotes cardiac myocyte survival.

Development; 122:419-428.

Smith, A.L., Ellison, F.M., McCoy Jr., J.P., Chen, J. (2004)

C-kit expression and stem cell factor-induced hematopoietic cell proliferation are up-regulated in aged B6D2F1 mice.

J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.; 60:448-456.

Smits, A.M., van Vliet, P., Hassink, R.J., Goumans, M.J., Doevendans, P.A. (2005)

The role of stem cells in cardiac regeneration.

J. Cell. Mol. Med.; 9:25-36.

Statistisches Bundesamt Deutschland

Herzinsuffizienz häufigster Grund für einen Krankenhausaufenthalt in 2006.

www.destatis.de

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M. (1998)

Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.

Science; 282:1145-1147.

Trippodo, N., Frohlich, E. (1981)

Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat.

Circ. Res.; 48:309-319.

Urbanek, K., Rota, M., Cascapera, S., Bearzi, C., Nascimbene, A., De Angelis, A., Hosoda, T., Chimenti, S., Baker, M., Limana, F., Nurzynska, D., Torella, D., Rotatori, F., Rastaldo, R., Musso, E., Quaini, F., Leri, A., Kajstura, J., Anversa, P. (2005)

Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival.

Circ. Res.; 97:663-673.

Van de Run, M., Heimfeld, S., Spangrude, G.J., Weissman, I.L. (1989)

Mouse hematopoietic stem-cell antigen Sca-1 is a member of the Ly-6 antigen family.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 86:4634-4638.

Wexler, B., McMurtry, J., Lams, S. (1981)

Histopathologic changes in aging male vs female spontaneously hypertensive rats.

J. Gerontol.; 36:514-519.

WHO

Cardiovascular diseases (CVDs), Fact sheet N°317, updated september 2009

www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html

Wollert K.C., Meyer G.P., Lotz J., Ringes-Lichtenberg S., Lippolt P., Breidenbach C., Fichtner S., Korte T., Hornig B., Messinger D., Arseniev L., Hertenstein B., Ganser A., Drexler H. (2004)

Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial.

Lancet; 364:141-148.

Yamori, Y. (1984)

The development of Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications. In: Handbook of Hypertension. Vol. 4. Experimental and genetic models of hypertension (de Jong W., ed). Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier, 224-239.

Yen, T., Yu, P., Roeder, H., Willard, P. (1974)

A genetic study of hypertension in Okamoto-Aoki spontaneously hypertensive rats.

Heredity; 33:309-316.

Zohlnhöfer, D., Dibra, A., Koppa, T., de Waha, A., Ripa, R.S., Kastrup, J., Valgimigli, M., Schömig, A., Kastrati, A. (2008)

Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor for myocardial recovery after acute myocardial infarction: a meta-analysis.

J. Am. Coll. Cardiol.; 51:1429-1437.

9. Erklärung

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

Gießen, im April 2010

Andrea Müller

10. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Schlüter für die Bereitstellung des interessanten Themas und die sehr gute Betreuung.

Zudem möchte ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts bedanken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben. Besonders danken möchte ich PD Dr. Sibylle Wenzel und Dr. Rolf Schreckenber, Nadine Woitasky, Daniela Schreiber, Sergej Kechter und Peter Volk sowie Ilhan Tastan, Andreas Habbig, Alexandra Diehl und Meike Wischnewski.

Ich danke meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir das Studium und vieles mehr ermöglicht haben, meiner Schwester Anne Maria und Lea.



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5687-2



9 783835 195687 2