

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I – Kardiologie
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg
vorm. Direktor: Prof. Dr. med. Gerhard Steinbeck

**Verbesserung der kardialen Pumpfunktion und des Überlebens
nach induziertem Myokardinfarkt im Mausmodell über eine durch
CD26-/DPPIV-Inhibition und G-CSF-Therapie stimulierte
Ansiedelung von Knochenmarksstammzellen („Stammzellhoming“)
im Herzen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Markus Vallaster
aus Rotthalmünster
im Jahre 2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang-Michael Franz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Jochen Seißler
PD Dr. med. Corinna Leberherz
Prof. Dr. med. Heinrich Netz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Hans D. Theiss

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR,
FRCR

Tag der
mündlichen Prüfung: 25.10.2012

[Vakatseite]

*Meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit*

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	Seite 8
1.2. Embryonale Stammzellen	Seite 9
1.3. Induzierte pluripotente Stammzellen	Seite 11
1.4. Adulte Stammzellen	Seite 14
1.4.1. Mesenchymale Stammzellen	Seite 15
1.4.2. Hämatopoietische Stammzellen	Seite 16
1.4.3. Residente, kardiale Stammzellen	Seite 18
1.4.4. Zusammenfassender Überblick	Seite 19
1.5. Therapeutische Ansätze mit adulten Stammzellen	Seite 19
1.5.1. Exogene Applikation von Stammzellen	Seite 19
1.5.2. Endogene Applikation von Stammzellen	Seite 20
1.6. Fragestellung der Arbeit	Seite 28
2. Material und Methoden	Seite 29
2.1. Material	Seite 29
2.1.1. Chemikalien, Substanzen und Lösungsmittel	Seite 29
2.1.2. Antikörper	Seite 30
2.1.3. Durchführung der LAD-Okklusion	Seite 32
2.1.4. Histologische und immunhistologische Färbemethoden	Seite 33
2.1.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	Seite 34
2.1.6. Proteinnachweis	Seite 34
2.1.7. Funktionsuntersuchung des Herzens	Seite 36
2.1.8. Gerätschaften und Gebrauchsgegenstände anderer Funktion als oben erwähnt	Seite 36
2.1.9. Analysegeräte und -programme	Seite 37
2.2. Methoden	Seite 39
2.2.1. Tiermodell	Seite 39

2.2.2. Versuchsaufbau	Seite 39
2.2.3. Induktion eines Myokardinfarktes im Mausmodell	Seite 42
2.2.4. Gabe von G-CSF, Diprotin A und AMD3100	Seite 44
2.2.5. Hämodynamische Messung der Herzfunktion	Seite 44
2.2.6. Histologie	Seite 49
2.2.7. Immunohistochemie	Seite 52
2.2.8. Durchflusszytometrie („Flow Cytometry“)	Seite 53
2.2.9. ELISA/DPPIV-Aktivität	Seite 55
2.2.10. Massenspektrometrie	Seite 58
2.2.11. Statistische Auswertung	Seite 59
3. Ergebnisse	Seite 60
3.1. Nachweis von SDF-1alpha in Blut und Herzen	Seite 60
3.2. Zellpopulationen im Herzen nach Myokardinfarkt	Seite 67
3.3. Stimulation der residenten, kardialen Stammzellen	Seite 77
3.4. Histologische und immunohistochemische Untersuchung des Herzens	Seite 79
3.5. Positive Effekte auf Apoptose	Seite 85
3.6. Herzfunktion und Überleben 30 Tage nach Myokardinfarkt	Seite 87
4. Diskussion	Seite 93
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	Seite 93
4.2. Einordnung in den Gesamtzusammenhang	Seite 96
4.3. Limitationen der Arbeit	Seite 100
4.4. Ausblick	Seite 102
5. Zusammenfassung der Arbeit	Seite 103

6. Literaturverzeichnis	Seite 105
7. Veröffentlichungen	Seite 116
7.1. Publikationen in Fachzeitschriften	Seite 116
7.2. Posterpräsentationen	Seite 117
8. Danksagung	Seite 121

1. Einleitung

Trotz des medizinischen Fortschrittes, der sich vor allem in den letzten 40 Jahren des vergangenen 20. Jahrhunderts in einem unglaublichen Tempo fortzuentwickeln schien, stellen kardiovaskuläre Erkrankungen immer noch die Haupttodesursache in westlichen Industrienationen dar(1). Den größten Anteil an dieser Gruppe hat schlechterdings die sogenannte ischämische Kardiomyopathie nach akutem Myokardinfarkt, also eine Herzmuskelerkrankung, die durch einen Sauerstoffmangel der entsprechenden Herzmuskelzellen auf Grund eines Verschlusses einer oder mehrerer Herzkranzgefäße und der dadurch entstehenden Folgeschäden wie etwa Verschlechterung der Herzfunktion oder sich negativ auswirkende Umbauvorgänge in und um den Bereich der Infarktnarbe herum verursacht wird. Zwar konnten hier in den vergangenen Jahrzehnten erhebliche Verbesserungen in der Therapie der Patienten mit akutem Myokardinfarkt erzielt werden, was vor allem auf die Fortschritte in der Entwicklung geeigneter Medikamente, aber auch auf die in Deutschland flächendeckende Einführung interventioneller Kardiologien, die mit Hilfe von kleinen Ballons und Metallgerüsten, sogenannten „Stents“, das verschlossenen Gefäß wiederzueröffnen imstande sind, zurückzuführen ist(2-4).

Dennoch warteten in den vergangenen Jahren noch mehr Patienten auf eine Herztransplantation als das Angebot an entsprechenden Organen bewältigen konnte(5). Die langen Wartezeiten auf eine Herztransplantation sind für die Patienten nicht nur eine psychische Belastung, sondern gehen oft auch mit einer erheblichen Verschlechterung der Herzfunktion und nicht selten mit dem Tod des Patienten einher. Vor allem die Auswurfraction des linken Ventrikels, also das pro Herzschlag in den großen Kreislauf beförderte Blutvolumen im Verhältnis zum sich dann noch in der Herzkammer befindlichen Blutvolumens, stellt hier einen aussagekräftigen, prognostischen Faktor dar, weil diese in direkter Korrelation zur Kontraktionsfähigkeit der Herzmuskelzelle steht, die

wiederum von der Vitalität und damit essentiell der Sauerstoffversorgung der Kardiomyozyten abhängt(6).

Zusammengefasst besteht also ein dringender Bedarf an innovativen Therapiekonzepten, wie es beispielsweise die Stammzelltherapie darstellt. Im Folgenden sollen die einzelnen Stammzellentitäten in ihren Eigenschaften und den Bereichen ihres Einsatzes charakterisiert werden.

1.2. Embryonale Stammzellen

Als es im Jahre 1998 gelang, die ersten stabilen Stammzelllinien aus menschlichen Embryonen zu gewinnen(7), war die Hoffnung groß, dass sich dadurch das Problem des Zellersatzes bei den großen Volkskrankheiten wie etwa Diabetes mellitus oder Herzinsuffizienz lösen lasse. Ziel dieser Zellersatztherapie ist es, Gewebe *ex vivo/in vitro* zu züchten und, im Falle eines Myokardinfarktes, anschließend das Narbengewebe durch vitale Kardiomyozyten zu ersetzen. Die nachfolgende Abbildung zeigt den grundsätzlichen Mechanismus der Gewinnung embryonaler Stammzelllinien.

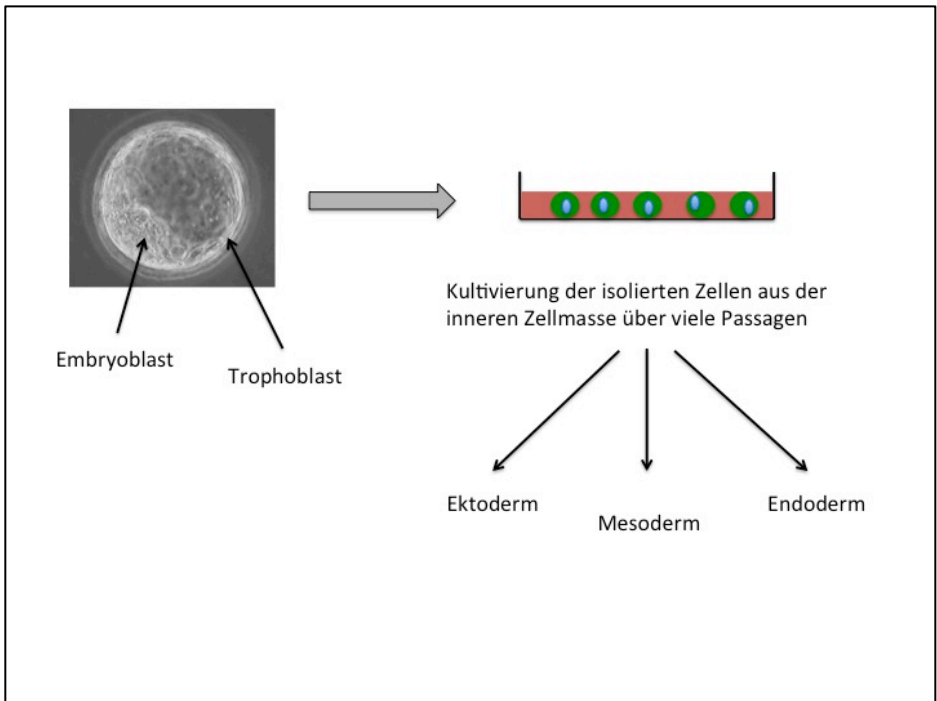


Abbildung 1 zeigt den Mechanismus der Gewinnung embryonaler Stammzelllinien aus dem Embryoblast („Innere Zellmasse“) einer Blastozyste. Die Kultivierung dieses Zell-Konglomerates über viele Passagen führt schließlich zur Entwicklung einer stabilen Stammzelllinie, welche in anschließenden Schritten in die einzelnen Gewebetypen differenziert werden kann, so fern geeignete Protokolle dafür vorliegen. Bild der Blastozyste: Ronald Naumann, MPI für Molekulare Zellbiologie und Genetik; modifiziert vom Autor der Arbeit.

Die Euphorie, die dieses Zellmaterial hervorrief, wurde durch die Tatsache gebremst, dass es bis heute nicht gelungen ist, solches Gewebe erfolgreich herzustellen, vielmehr noch zeigten diese Stammzelllinien eine erhebliche Tendenz zu entarten und im Empfängerorganismus Tumore aus allen drei Keimblättern, sogenannte Teratome, zu formen(8-12). Dies hängt mit zwei

Dingen zusammen, einerseits sind die zugrundeliegenden Mechanismen der Entwicklung eines Organismus noch weitgehend unbekannt, andererseits steht trotz erheblicher Fortschritte(13, 14) bis heute keine optimale Technik zur Aufreinigung von Progenitorzellen für den Zellersatz zur Verfügung. Neben diesen wissenschaftlichen Vorbehalten sollte auch das ethische Dilemma nicht unterschätzt werden, das sich plakativ in der Frage zusammenfassen lässt, ob es erlaubt sei, zukünftiges menschliches Leben durch Zerstörung eines bereits gegenwärtigen menschlichen Lebens zu retten. Wie auch immer man diese Frage beantworten mag, liegt jedenfalls ein klinischer Einsatz dieser Zellen zu Therapiezwecke in weiter Ferne.

1.3. Induzierte pluripotente Stammzellen

Forschern in Japan und den USA gelang es vor einigen Jahren, Pluripotenz in Zellen hervorzurufen, die bereits differenziert waren, also bereits eingebunden waren in den Arbeitsablauf eines bestimmten Gewebes oder Organs des erwachsenen Organismus(15-17). Mit Hilfe viraler Vektoren wurden sogenannte Pluripotenzgene in die Zellen eingebracht und über-exprimiert. In allen bisher berichteten Fällen sind damit Gene gemeint, die relativ früh in der Entwicklung eines Organismus eine entscheidende Rolle beispielsweise bei der Aufrechterhaltung eines undifferenzierten Zellstadiums, sowie bei der Initiierung von Zellproliferation und Wachstum spielen. Die dergestalt infizierten Zellen zeigten im Anschluss eine De-Differenzierung ihrer Zellmorphologie hin zu einem frühen Zelltyp, erkennbar an der nun zu beobachtenden Abrundung der Zellmembran und dem Auftreten von Zell-Clustern(15-17). Die so entstandenen Zellen werden seither *induzierte, pluripotente Stammzellen (iPSCs)* genannt. Die folgende Abbildung zeigt den Prozess der Herstellung solcher iPSCs.

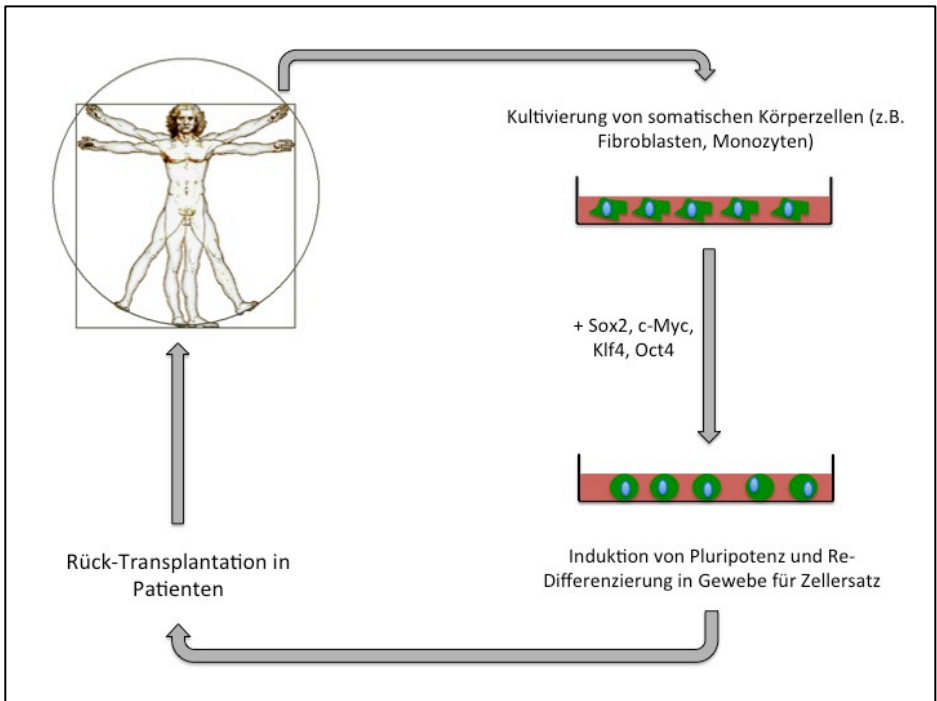


Abbildung 2 zeigt den Prozess der Herstellung induzierter, pluripotenter Stammzellen. Körperzellen eines Patienten werden entnommen und in der Kulturschale angezüchtet. Anschließend wird über die vektorielle Einbringung sogenannter Pluripotenzfaktoren eine De-Differenzierung und Reprogrammierung dieser Zellen erreicht. Diese nun wieder pluripotenten Zellen können als Zellersatz und für die Rück-Transplantation in den Spender dienen.

Allerdings wurden die ersten Versuche, diese Pluripotenz zu erreichen, mit zwei problematischen Methoden durchgeführt. Zum einen handelt es sich bei den in die Zelle eingebrachten Pluripotenzfaktoren Sox2, c-Myc, Klf4 und Oct4 um potentiell karzinogene Gene, von denen Myc (v-Myc) und Oct4 auch tatsächlich Dys- und Neoplasien auslösen(18-20). Zum anderen sind die Vektoren, welche diese Gensequenzen in die Zelle einbringen sollen, meist von HI-Viren

abgeleitete Retro- oder Lentiviren, die zumindest auf Grund ihrer Ontologie als problematisch angesehen werden können. Deshalb versuchte man in den vergangenen Jahren verstärkt, sowohl die genannten Onkogene als auch die Vektormechanismen durch harmlose Alternativen zu ersetzen(21-23). Allerdings scheint es auch hier noch ein langer Weg zu sein, grundlegende molekularbiologische Abläufe zu verstehen, die es ermöglichen, beispielsweise Herzmuskelzellen für den Zellersatz zu generieren. In einer aktuellen Publikation zeigte sich zudem, dass auch pluripotente Zellen, die aus end-differenzierten Zellen ein und desselben Organismus stammen, Spender und Empfänger also identisch sind, trotzdem zu immunogenen Abstoßungsreaktionen dieser iPS Zellen führen(24, 25). Sollten sich diese Ergebnisse durch andere Arbeitsgruppen bestätigen lassen, ist es auch bei den iPS Zellen noch ein weiter Weg bis zur therapeutischen Anwendung. Die nachfolgende Darstellung zeigt die Herausforderungen, mit denen sich die Wissenschaft im Zusammenhang mit dem Einsatz von iPSCs konfrontiert sieht.

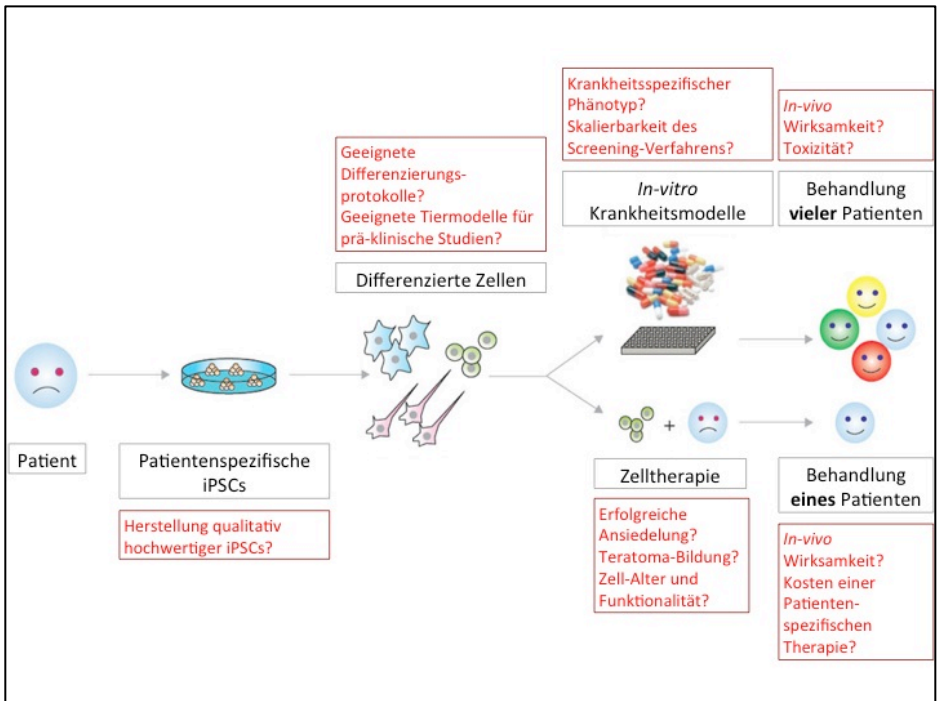


Abbildung 3 zeigt die hauptsächlichen Problemfelder (in rot), die im Rahmen eines Patienten-orientierten Einsatzes von iPSCs zu lösen sind. Abbildung entnommen aus(26), modifiziert vom Autor dieser Arbeit.

1.4. Adulte Stammzellen

Der Begriff der adulten Stammzelle selbst ist nicht genau geklärt. In jedem Falle gelten jedoch die aufgestellten Postulate, dass eine Zelle, um Stammzelle zu sein, zur Selbstregeneration fähig sein und gleichzeitig eine durch asymmetrische Teilung von ihr produzierte Tochterzelle in alle entsprechenden Phänotypen eines Organs oder Gewebes, im Falle des Knochenmarks in alle Blutzelllinien, ausdifferenzieren in der Lage sein muss(27, 28). Darüberhinaus müssen hämatopoietische Stammzellen auch imstande sein, das Knochenmark

eines Organismus zu rekonstruieren, der einer letalen Strahlendosis ausgesetzt wurde(29).

Auch im adulten Organismus finden sich Stammzellen, sogenannte Progenitorzellen, die eine Regeneration des entsprechenden Gewebes zu jedem Zeitpunkt gewährleisten(30). Haare, Haut und Nägel sind dafür plastische Beispiele. Im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen besitzen diese Zellen allerdings keine Pluripotenz mehr, können sich also nicht mehr in Zelltypen aller drei Keimblätter entwickeln, sondern weisen *per definitionem* generell nur noch Multipotenz auf, also eine Wandlungsfähigkeit innerhalb eines Keimblattes(31). Im Knochenmark gibt es verschiedene Entitäten von Stammzellen, die im Folgenden dargestellt werden sollen.

1.4.1. Mesenchymale Stammzellen

Zum einen finden sich hier die mesenchymalen Stammzellen, Vorläuferzellen des Stütz- und Weichteilgewebes und der Blutgefäße(32, 33). Ausgewiesen wird die mesenchymale Stammzelle durch die Expression der Oberflächenmarker CD105+/CD90+/CD73+, CD34-/CD45-/CD11b- oder CD14-/CD19- oder CD79 α -/HLA-DR1-(34). Für mesenchymale Stammzellen wurde immer wieder ein gewisser Grad an Plastizität postuliert, so etwa durch die Koexpression von Oberflächenmarkern für Bindegewebe und für Kardiomyozyten in Co-Kultur mit embryonalen Kardiomyozyten von der Ratte(35) oder auch anderen adulten Modellen(36, 37). Trotzdem geht man doch mehr und mehr davon aus, dass eine Transdifferenzierung von mesenchymalen Stammzellen oder auch hämatopoietischen Stammzellen in Kardiomyozyten nicht stattfindet(38), sondern die beobachteten, positiven Effekte entweder auf Zellfusion oder parakrine Mechanismen zurückzuführen sind(39-41).

1.4.2. Hämatopoietische Stammzellen

Eine weitere Entität im Knochenmark, die sich mit dem Begriff der Stammzelle beschreiben lässt, ist die hämatopoietische Vorläuferzelle. Diese ist verantwortlich für die Zellneubildung des Blutes und sämtlicher Subtypen der immunologischen Abwehrzellen, also Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, etc. der sogenannten lymphoiden und der myeloiden Reihen(42, 43). Für die hämatopoietische Stammzelle gibt es keine eindeutigen Oberflächenmarker, da die meisten von ihnen auch von anderen Zellen exprimiert werden(44, 45). Jedoch hat sich für den alltäglichen Gebrauch in Therapie und Forschung die Definition als c-kit+, CD34+, Sca-1+, Mac1+, VE-cadherin+ und CD45+ für humane Zellen, sowie lin-/Sca1+/c-kit+ für murine Zellen durchgesetzt(46). Darüberhinaus legen aktuelle Ergebnisse nahe, dass CD150 (signalling lymphocyte activation family member 1 [SlamF1]) in den unterschiedlichen Expressionsstufen einen validen Marker für die Unterscheidung zwischen ruhenden und aktivierten hämatopoietischen Stammzellen darstellt(47, 48). Außerdem werden *long-term* hämatopoietische Stammzellen (LT-HSCs) von *short-term* hämatopoietischen Stammzellen unterschieden(49, 50). Die folgende Abbildung stellt den Übergang einer HSC von der Ruhephase in die Phase der Proliferation und Differenzierung anschaulich dar.

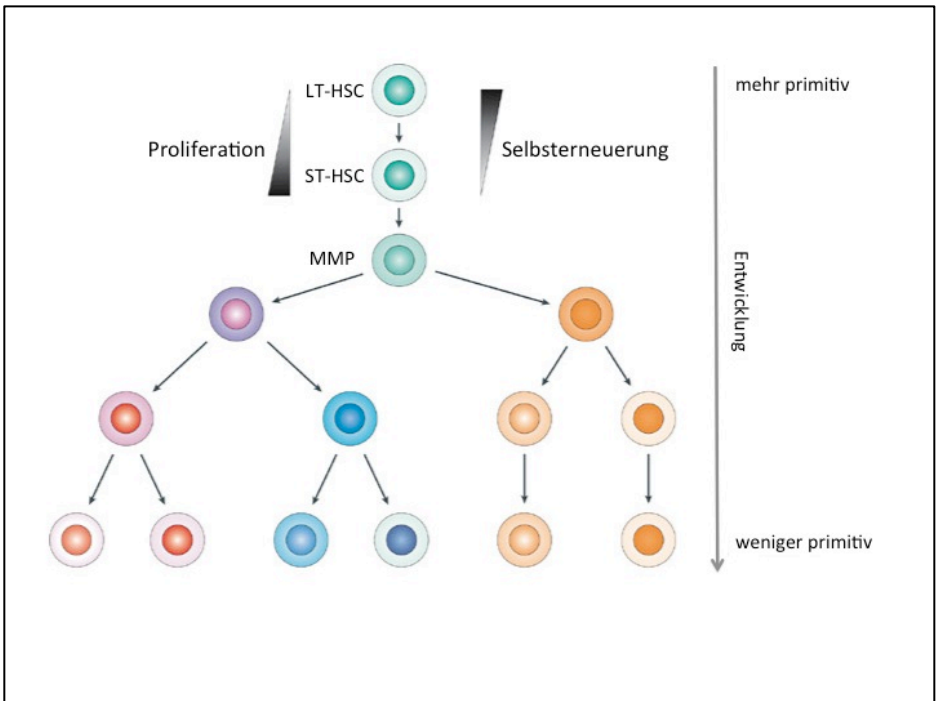


Abbildung 4 zeigt die Entwicklungsstadien einer LT-HSC hin zu differenzierten Zellen der myeloiden und lymphoiden, sowie erythroiden Reihe (Monozyten, Granulozyten, Lymphozyten, Erythrozyten, etc.) über mehrere Zwischenstadien. Einen wesentlichen Schritt bedeutet die Entwicklung zur ST-HSC und multipotenten Progenitorzelle (MMP). Dies ist mit einem Verlust der Fähigkeit zur Selbsterneuerung und einem Zugewinn an Proliferationsvermögen verbunden. Abbildung entnommen aus(50), modifiziert vom Autor der Arbeit.

Der Mechanismus der Umstellung von CD34- *long-term* hämatopoietischen Stammzellen auf *short-term* hämatopoietische Stammzellen ist nicht vollkommen geklärt, jedoch schlechterdings notwendig, damit diese Zellen ihre positiven Effekte auf geschädigte Strukturen freisetzen können. Eine wichtige Substanz, die sich für die Umstellung von LT-HSC auf ST-HSC und in

Folge Progenitorzelle verantwortlich zeigt, ist G-CSF (granulocyte colony stimulating factor)(51).

1.4.3. Residente, kardiale Stammzellen

Bis vor einigen Jahren galt es als eine Art Dogma, dass sich das ausdifferenzierte menschliche Herz nach einer Verletzung oder einem hypoxischen Schaden nicht mehr regenerieren kann(52). Diese Sichtweise wurde durch die Tatsache herausgefordert, dass Herzmuskelzellen anderer Spezies sehr wohl zur Regeneration in der Lage sind, so weist beispielsweise der Zebrafisch ein erstaunliches Potential zur Neubildung von Herzmuskel auf(53-55). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch das Herz eines Menschen in gewissem Umfange zur Zellerneuerung fähig ist(56). Man bediente sich dabei der Tatsache, dass mit dem Stopp von Atomwaffentests in den 60iger Jahren des 20. Jahrhunderts die Konzentration des radioaktiven Isotops C14 in der Atmosphäre und im menschlichen Körper kontinuierlich abnimmt. C14 diente in der Studie als Marker für Herzmuskelzellen von Probanden, die vor und nach den Atomwaffentests geboren wurden.

Unterschiedliche Forschergruppen fanden schon vor Jahren Anhaltspunkte für eine Zellpopulation im Herzen, die als multipotent bezeichnet werden kann(57, 58). Diese Zellen werden gemeinhin als lin- oder CD34-/CD45- und entweder c-kit+ oder Sca-1+ beschrieben. Allerdings geht man auch davon aus, dass diese Population der *residenten, kardialen Stammzellen* im Normalfall so gering ist, dass nach einem größeren Schaden wie etwa einem Myokardinfarkt kein relevanter Zellersatz von ihnen ausgeht(59). Neueste Forschungen im Mausmodell konnten jedoch zeigen, dass gerade im Bereich des Sub-Epikardiums eine nicht unwesentliche Population von adulten, residenten, kardialen Progenitorzellen vorhanden ist(60). Daraus ergibt sich die interessante Fragestellung, ob es möglich sei, diese Stammzellpopulation so zu stimulieren,

dass eine gesteigerte Regenerationsfähigkeit des geschädigten Herzmuskels resultiert(61).

1.4.4. Zusammenfassender Überblick

Ein großer Vorteil dieser sogenannten, adulten Stammzellpopulationen besteht darin, dass sie leicht verfügbar sind, da sie in mehr oder weniger großem Umfange im menschlichen Organismus zu allen Zeiten vorkommen. Außerdem wird das Risiko einer Teratombildung vermieden, da diese Zellen exogen grundsätzlich nur in dem unterstützt werden sollen, was sie von Natur aus sowieso machen würden, nämlich im Organismus entstehende Schäden zu reparieren, indem sie sich sowohl selbst erneuern als auch eine der entstehenden Tochterzellen zu end-differenzierten, somatischen Zellen werden lassen können. Es konnte gezeigt werden, dass diese aus dem Knochenmark mobilisierten Stamm- und Progenitorzellen zu einer Verbesserung der kardialen Funktion und des Überlebens nach akutem Myokardinfarkt beitragen. Eine Auswahl entsprechender Publikationen soll im Folgenden kurz dargestellt und in den Gesamtzusammenhang eingefügt werden. Es bieten sich zwei Wege an, diese positiven Effekte der hämatopoietischen Stammzellen aus dem Knochenmark nutzbar zu machen.

1.5. Therapeutische Ansätze mit adulten Stammzellen

1.5.1. Exogene Applikation von Stammzellen

Bei diesem Ansatz werden entweder über eine Punktion des Knochenmarks oder über eine Blutentnahme die zirkulierenden, sogenannten mononukleären Zellen entnommen. Es kann sich nach Aufreinigung dieser Zellpopulation entweder eine Anreicherung bestimmter Subpopulationen *in vitro* anschließen, oder aber die Zellen werden dem Patienten direkt via eines *Arteria-Femoralis*-Zugangs und Applikation im Myokard oder der betroffenen

Koronararterie zurückgegeben(62-64). Die meisten Studien zeigen dabei eine grundsätzliche Sicherheit in der Durchführung und den Auswirkungen auf den Patienten. Die Patientenzahlen variieren, allgemein handelt es sich um Gruppen von 60 bis 200 Patienten mit akutem Myokardinfarkt. In den REPAIR-AMI und MYSTAR Studien zeigte sich, dass die Verbesserungen der linksventrikulären Auswurffraktion stark vom Zeitpunkt der Applikation dieser Zellen abhängt(65-68). Dieser variiert in der Regel zwischen 5 und 30 Tage nach erlittenem Myokardinfarkt und scheint darüber hinaus bei einer früheren Applikation geringer auszufallen(69). Andere Studien wiederum zeigten keinerlei positive Effekte auf die Auswurffraktion(63, 70, 71). Verschiedene Arbeitsgruppen verwenden unterschiedliche Methoden und Protokolle zur Isolation der Stammzellpopulation. Dies mag als eine mögliche Ursache angesehen werden, warum die Ergebnisse so unterschiedlich ausfallen(72). Die Entnahme selbst ist mitunter sehr invasiv und für den ohnehin schon geschwächten Patienten durchaus belastend. Eine schonendere Vorgehensweise bietet deshalb die endogene Applikation von Stammzellen über eine vermehrte Mobilisierung aus dem Knochenmark.

1.5.2. Endogene Applikation von Stammzellen

Dieser vielversprechende Ansatz bietet sich an durch die Möglichkeit, Stammzellen aus dem Knochenmark direkt in das periphere Blut mobilisieren zu können. Man geht dabei davon aus, dass ähnlich wie bei entsprechenden therapeutischen Ansätzen im Rahmen einer onkologischen Neutropenie die jeweiligen Zellen in ihren speziellen Aufgaben so programmiert sind, dass sie ihren Weg zum Ursprungsort des Gewebes Schadens, in diesem Falle also zum Herzen nach einem Myokardinfarkt finden.

Schon seit langem aus der Onkologie bekannt macht man sich in der Therapie des akuten Myokardinfarktes die Eigenschaft von G-CSF als genereller Stammzellmobilisator aus dem Knochenmark zu nutze. G-CSF besitzt die Potenz,

Stammzellen und Vorläuferzellen der myeloiden/lymphoiden Reihe aus dem Knochenmark direkt in das periphere Blut zu mobilisieren(73). Außerdem konnte bereits vor einigen Jahren gezeigt werden, dass G-CSF vor allem über den Jak/Stat Signalweg an Kardiomyozyten auch direkt anti-apoptotisch und neovaskularisierend wirkt(74, 75). Die Verbesserung des Zellüberlebens zeigt sich vor allem dann, wenn das Gewebe einer Sauerstoffmangelversorgung ausgesetzt ist. Aktuelle Veröffentlichungen konnten diese positiven Effekte von G-CSF ubiquitär im Organismus demonstrieren(76).

G-CSF gehört zur GM-CSF/IL-3/IL-5 Familie von Zytokinen. Zellen des hämatopoietischen Systems besitzen wenige hundert Rezeptoren an ihrer Zelloberfläche, die in der Lage sind, auf einen durch Zytokine ausgelösten Stimulus zu antworten(77). Die Rezeptoren selbst bestehen aus einer Zytokin-spezifischen alpha-Untereinheit und einer allen Rezeptoren eigenen beta-Untereinheit. Die erwähnte GM-CSF/IL-3/IL-5 Familie scheint besonders in Notfallsituationen eine Rolle zu spielen, dann nämlich, wenn der Organismus auf Grund von Verletzungen, Infektionen, etc. schnell möglichst viele Zellen in die Zirkulation entlassen muss, um den Schaden unter Kontrolle bringen und beheben zu können(77). Neben konventionellen Abwehrmechanismen scheint dieses Ligand-Rezeptor-System aber auch eine Rolle bei immunologischen Überreaktionen wie beispielsweise Asthma und Morbus Crohn zu spielen. Bis dato wurden verschiedene intrazelluläre Signalwege aufgezeigt, die in der Übermittlung des Stimulus die Rolle des Mediators einnehmen, hauptsächlich Januskinasen, STAT (signal transducer and activator of transcription) und auch RAS-Kinasen(78-80). Der dadurch verursachte anti-apoptotische Effekt ist wiederum von Belang, wenn die stimulierten Zellen entarten und onkologische Krankheitsbilder wie Leukämie hervorrufen. Im Knochenmark stimuliert G-CSF die Überexpression von Proteasen wie Elastase und Kathepsin G. Es konnte gezeigt werden, dass diese Proteasen entscheidend an der Destruktion der Anker beteiligt sind, worüber hämatopoietische Stammzellen in ihre Nische eingebettet

sind, und über die Unterbrechung der SDF-1alpha/CXCR4-Achse zu einer vermehrten Freisetzung dieser Zellen ins Blut führen(73, 81, 82). Die folgende Abbildung vermittelt einen Eindruck von der Wirkung von G-CSF innerhalb der Stammzellnische.

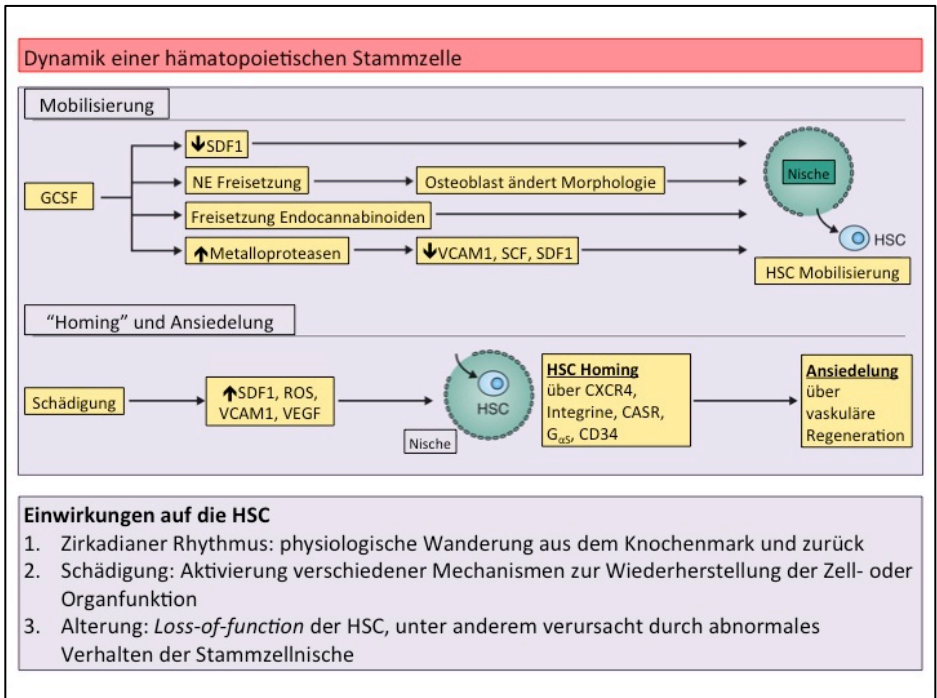


Abbildung 5 zeigt die Dynamik einer hämatopoietischen Stammzelle nach Mobilisation durch G-CSF. Für die An siedelung im geschädigten Organ wiederum spielt die Anhebung des SDF-1alpha Levels eine wesentliche Rolle. Abkürzungen: CASR Ca²⁺ sensing receptor, G_{αs} G-protein-coupled receptor subunit αS, NE norepinephrine, ROS reactive oxygen species; Abbildung entnommen aus(83), modifiziert vom Autor der Arbeit.

Obwohl diese sogenannte Stammzellnische von der Forschung unterschiedlich definiert und interpretiert wird, herrscht doch Einigkeit darüber, dass sie für den Erhalt der Pluri- oder Multipotenz, sowie die Regenerationsfähigkeit der Stammzelle verantwortlich ist(84-86). Dieser sogenannten *Mikro-Umgebung* der Stammzelle kommt somit eine wesentliche Bedeutung zu, wobei dieser Begriff als Summe all derjenigen Faktoren verstanden werden soll, welche die Entwicklung einer Stammzelle bestimmen(83). Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über die Komplexität und das feinregulierte Zusammenspiel zwischen einer hämatopoietischen Stammzelle und ihrer Nische. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf SDF-1alpha und seinem Rezeptor CXCR4. Im Zusammenhang mit der Stammzellnische kommt SDF-1alpha/CXCR4 eine wesentliche Rolle bei der Verortung der HSC zu.

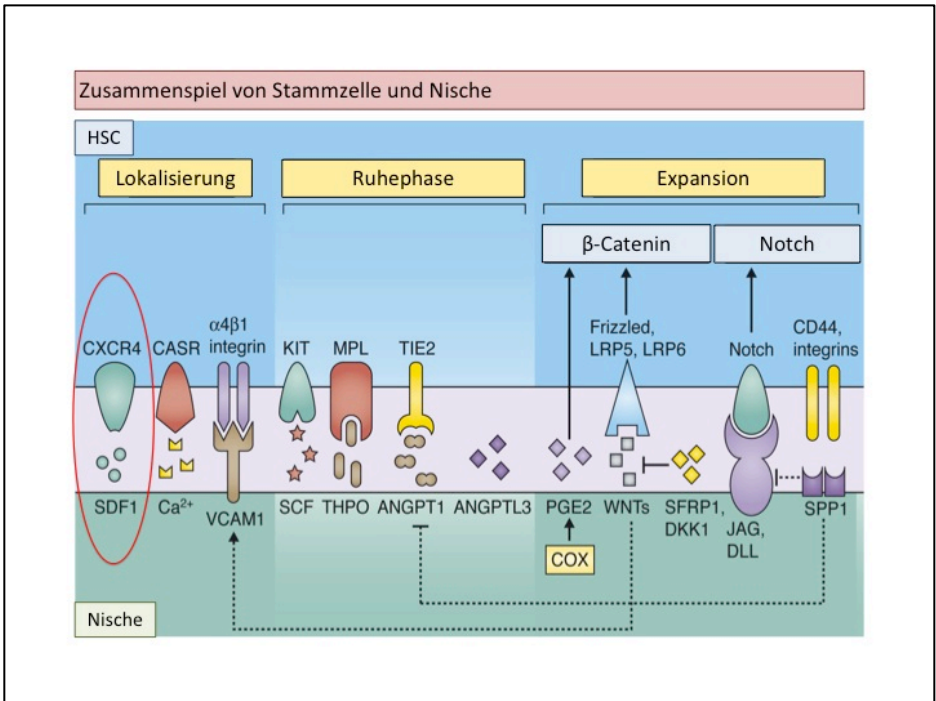


Abbildung 6 zeigt das feinregulierte Wechselspiel zwischen HSC und Nische von der Lokalisierung der Stammzelle über die Ruhephase hin zur Expansion nach entsprechendem Stimulus. Abkürzungen: ANGPT1 Angiotensin 1, ANGPTL3 angiotensin-like 3, CASR Ca²⁺ sensing receptor, COX Cyclooxygenase, CXCR4 chemokine receptor 4, DKK1 dickkopf homolog, DLL delta-like Ligand, KIT v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog, LRP5 low density lipoprotein receptor-related protein 5, LRP6 low density lipoprotein receptor-related 6, MPL myeloproliferative leukemia virus oncogene, SPP1 secreted phosphoprotein 1 (osteopontin), THPO thrombopoietin, VCAM1 vascular cell adhesion molecule 1, VEGF vascular endothelial growth factor; Abbildung entnommen aus(83), modifiziert vom Autor der Arbeit.

Schon vor einigen Jahren wollte man sich die positiven Eigenschaften von G-CSF in der Behandlung von Patienten nach akutem Myokardinfarkt zu nutze machen. Allerdings zeigten die durchgeführten Studien geringe bis keine Effekte hinsichtlich Auswurfraction, enddiastolischem Volumen und „cardiac output“(87-89). Auch wenn die Verabreichung von G-CSF mit einer exogenen Zufuhr von zuvor isolierten Stammzellen aus dem Knochenmark verbunden wurde, zeigten sich keine additiven Effekte(90). Dennoch konnte bei früher G-CSF Applikation zumindest die Perfusion teilweise verbessert und die klinische Sicherheit der Applikation gezeigt werden(91).

Deshalb stellt sich die Frage, wie die Stammzellen verstärkt in das geschädigte Herz gelockt werden könnten. Es zeigte sich, dass die bereits eingangs erwähnte SDF-1alpha/CXCR4-Achse nicht nur im Knochenmark von entscheidender Bedeutung ist(92), sondern darüber hinaus die Hauptankerfunktion darstellt, wenn Stammzellen in geschädigtes Gewebe einwandern(93). Nach einer hypoxischen Schädigung ist SDF-1alpha für bis zu 72 Stunden in dem entsprechenden Organ hochreguliert und wird dann erst wieder innerhalb von 7 Tagen zurückreguliert. Die dafür verantwortlichen Zellen sind Stroma-Zellen(94, 95). Der Rezeptor für SDF-1alpha ist CXCR4(96). Dabei handelt es sich um einen Rezeptor aus der Familie der 7-transmembran-Domänen, G-Protein gekoppelten Rezeptoren. CXCR4 bindet SDF-1, welches als Chemoattraktant für hämatopoietische, CD34+ Stammzellen fungiert(97). CXCR4 selbst weist in seiner genomischen Sequenz am 5' Ende des ersten Exons unmittelbar „downstream“ (Richtung 3'-Ende) der TATA-Box einige Bindungsstellen für unterschiedliche Transkriptionsfaktoren auf, unter anderem für solche, die in Hämatopoiese und Wachstum involviert sind (PEA3, Lyf1). Bereits während der Entwicklung spielt die SDF-1alpha/CXCR4-Achse eine entscheidende Rolle bei der Migration von Keimzellen und erzeugt beispielsweise ein pro-kardiogenes Signal, welches pluripotente Stammzellen in die Entwicklung hin zu kardialen Progenitorzellen treibt(98, 99).

Diese Effekte der Rekrutierung von Stammzellen versucht man sich im adulten Organismus unter anderem dadurch zu nutze zu machen, dass man diese Achse im Zielgewebe zu stabilisieren sucht. Ein möglicher Ansatz ist hierbei die Hemmung einer CD26/DPPIV Protease, welche für den Abbau von SDF-1alpha verantwortlich ist. Diprotin A stellt einen Inhibitor dieser Protease dar. Mit seiner Aminosäureabfolge Ile-Pro-Ile bindet es am aktiven Zentrum von CD26 und hemmt so die Aktivität des Enzyms. CD26/DPPIV selbst ist eine membrangebundene, extrazellulär ubiquitär vorkommende Protease, die Proteine, unter anderem SDF-1, vom N-Terminus her kommend nach einem Alanin oder einem Prolin spaltet(100). G-CSF reguliert CD26/DPPIV im Knochenmark hoch, was die Freisetzung von CD34+ Stammzellen über die Destruktion von SDF-1alpha erhöht(81). Andererseits mag dies zu einem verschlechterten „Homing“ in der Peripherie führen, weshalb in der Peripherie die Blockierung der CD26/DPPIV-Aktivität durch Applikation eines geeigneten Inhibitors wie Diprotin A die SDF-1alpha/CXCR4-Achse stabilisieren soll(101-103). In den genannten Publikationen konnte auch für Diprotin A gezeigt werden, dass dieses über eine Inhibition der CD26/DPPIV-Protease zu einer gesteigerten Stammzellmigration in das geschädigte Myokard beitragen kann.

Die nachfolgende Abbildung fasst diejenigen Aspekte der Stammzellmobilisierung und Stammzellrekrutierung in das geschädigte Myokard nochmals anschaulich zusammen, die in dieser Arbeit von Bedeutung waren und mechanistisch aufgeklärt werden sollten. Die Abbildung zeigt dementsprechend die Arbeitshypothese, unter der unsere Experimente geplant und durchgeführt wurden und die im nächsten Abschnitt 1.6. genauer erläutert werden soll.

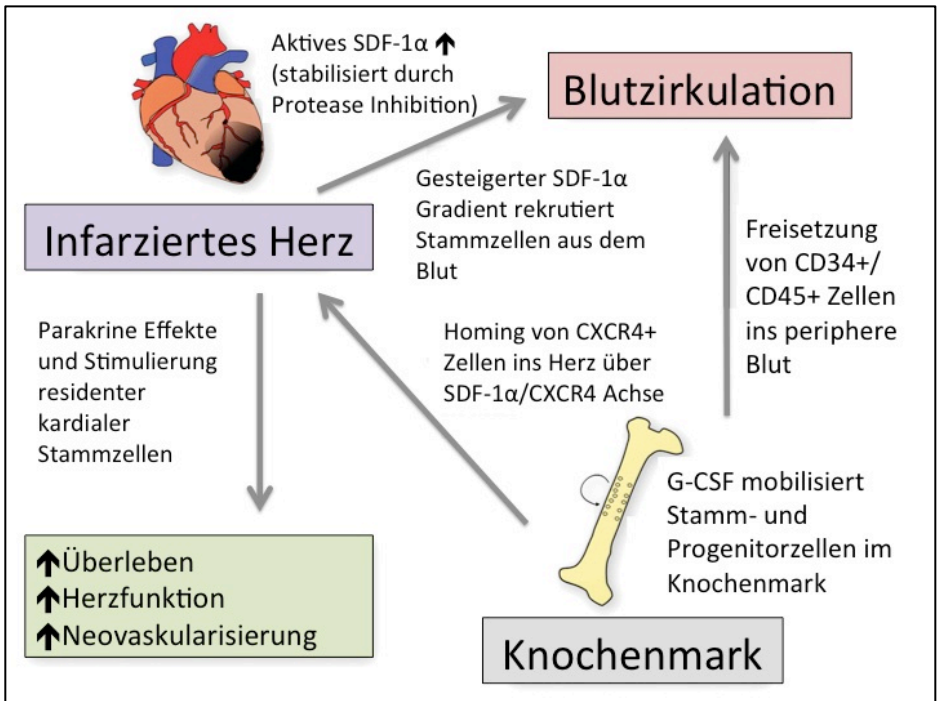


Abbildung 7 zeigt die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Mechanismen der Stammzellfreisetzung durch G-CSF und SDF-1alpha Stabilisierung durch Hemmung der CD26/DPPIV Protease. Abbildung entnommen aus(104), modifiziert vom Autor der Arbeit.

1.6. Fragestellung der Arbeit

Vor dem oben beschriebenen Hintergrund waren folgende Aspekte von besonderem Interesse

1. Kann Diprotin A, ein CD26/DPPIV Inhibitor, die Ansiedelung, also das sogenannte „Homing“ von Stammzellen aus dem Knochenmark über die SDF-1alpha/CXCR4 Achse im geschädigten Myokard verbessern und sind diese Effekte spezifisch für die SDF-1alpha/CXCR4 Achse?
2. Gibt es additive und/oder synergistische Effekte bei einerseits gesteigerter Mobilisierung durch G-CSF und andererseits verbessertem Homing über eine stabilisierte SDF-1alpha/CXCR4 Achse durch Applikation von Diprotin A?
3. Lassen sich durch Verwendung von Wildtyp-Mäusen und Knockout-Tieren Einblicke in die molekularbiologischen Details des sogenannten Stammzellhomings gewinnen?
4. Führen eventuelle positive Effekte in Bezug auf Stammzellmobilisierung und Stammzellhoming zu einer Stimulation der residenten, kardialen Stammzellen?

Die Arbeitshypothese kann also zusammengefasst werden wie folgt:

Der kombinierte Einsatz von G-CSF und Diprotin A führt über gesteigerte Mobilisation und verstärktes Homing zu einer Verbesserung der kardialen Funktion und des Überlebens nach Myokardinfarkt im Mausmodell, wobei Homing hauptsächlich über die SDF-1alpha/CXCR4 Achse stattfindet, sowie zu einer Stimulation der residenten, kardialen Stammzellen.

2. Material und Methoden:

2.1. Material

Die verwendeten Materialien entsprechen den aktuellen Standards für Labore und Forschungseinrichtungen. Der Bezug erfolgte in dem jeweils höchsten derzeit erhältlichen Reinheitsgrad.

2.1.1. Chemikalien, Substanzen und Lösungsmittel

<u>Substanz</u>	<u>Bezugsquelle</u>
AMD3100 (1,1'-[1,4-Phenylenebis(methylene)]bis-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane octahydrochloride)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-SDF-1alpha Antikörper	Torrey Pines Biolabs
Aqua ad injectabilia	B Braun, Melsungen
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Chloroform	Merck, Darmstadt
Ile-Pro-Ile (Diprotin A)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Roth, Karlsruhe
Eisessig	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol 100 %	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare, UK
Formalin (Formaldehyd 4%)	Roth, Karlsruhe
G-CSF (300mg/0,5ml) [100µg/kg KG]	Amgen, München

Heparin-Na 25000 iE	B Braun, Melsungen
H2O2	Merck, Darmstadt
Isopropanol (2-Propanol)	Roth, Karlsruhe
Isotone Natrium- Chlorid- Lösung	B Braun, Melsungen
Kollagenase Typ IV 0,1 %	Invitrogen, Carlsbad, USA
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Protease-Inhibitor Complete	Roche Pharma, Basel
Protein G Sepahorse	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
SDF-1alpha, rekombinant	eBiosciences, San Diego, USA
TRIS (hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe
TritonX	Roth, Karlsruhe

2.1.2. Antikörper

<u>Bezeichnung</u>	<u>Verteilung</u>	<u>Funktion</u>	<u>Bezugsquelle</u>
CD31 (PECAM-1; PE, anti-mouse)	Blutplättchen, Granulozyten, Endothelzellen, dendritische Zellen, Mononukleäre Ssp., T ssp., B ssp., LAK	CD38 Rezeptor, Signaltransduktion, Plättchen/Endothel -Adhäsion	BD Pharmingen, Heidelberg
CD34 (Mucosialin)	Kapilläres Endothel, Knochenmark, Stroma, Mastzellen	CD62L Rezeptor Adhäsion	BD Pharmingen, Heidelberg
CD45 (LCA, Ly-5, Ptprc)	Leukozyten, nicht- ausgereifte Erythrozyten	Tyrosin- phosphatase, Leukozythen-	BD Pharmingen, Heidelberg

		Differenzierung/- Aktivierung	
CD117 (c-kit)	Hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen, Neural-crest-derived Melanozyten, primordiale Keimzellen, Mastzellen	Stem-cell-factor receptor, HPPCs Entwicklung/Differ enzierung, dominant white spotting Mutationen	BD Pharmingen, Heidelberg
CD184 (CXCR4, Cmkar4)	T ssp., B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, Endothelzellen	SDF-1 Rezeptor, Embryogenese (human: X4 HIV-1 Ko-Rezeptor)	BD Pharmingen, Heidelberg
CD309 (VEGFR2, Flk-1, KDR)	Endothel, angiogenetische „Precursor“-Zellen, Hämangioblasten	bindet VEGF, reguliert Adhäsion und Zell-Signale	BD Pharmingen, Heidelberg
LFA-1 (beta2- Integrin)	Lymphozyten	Zelladhäsion	BD Pharmingen, Heidelberg
Sca-1 (Ly-6A/E)	Myeloid-Zellen ssp., periphere Lymphozyten, Mastzellen	T-Zell-Aktivierung	BD Pharmingen, Heidelberg
VLA-4 (Integrin- alpha4-beta1)	Lymphozyten	Ligand für VCAM-1, Endotheladhäsion	BD Pharmingen, Heidelberg
Lin (CD3,	Lymphozyten,	reife Zellen der	BD

CD45R/B220, CD11b, Ter119, Ly-6G)	Monozyten, Neutrophile, Eosinophile	myelo- hämatoopoietischen Reihe	Pharmingen, Heidelberg
---	---	---------------------------------------	---------------------------

2.1.3. Durchführung der LAD-Okklusion

<u>Bezeichnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Baktolin wash	Bode Chemie, Hamburg
Braunol-Lösung	B Braun, Melsungen
Dexpanthenol (Bepanthen Augensalbe)	Bayer, Leverkusen
Dreieckige Saugtupfer, unsteril (SUGI)	Kettenbach Medical, Eschenburg
Chirurgisches Nahtmaterial (Ethibond, Prolene)	Ethicon, Norderstedt
Chirurgisches Operationsbesteck	B Braun, Melsungen
Durapore 1,25 cm x 9,1 m	3M Health Care, Neuss
elca Enthaarungscreme	Asid Bonz, Herrenberg
Feather disposable Scalpel No. 11 Feather safety razor	Osaka, Japan
Haushaltsfaden cotton (Baumwolle)	Gütermann, Gutach
Kaltlichtlampe/Quelle KL 1500	Opto, Gräfelfing
Ketaminhydrochlorid (Ketamin-Inresa 5%) [80mg/kg]	Inresa, Freiburg
Mehrzweckgefäß mit Schnapdeckel	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Microlance 3 Einmal-Injektions-Kanülen der Größen 0,9 mm x 40 mm und 0,3 mm x 13 mm	Becton Dickinson, Heidelberg
Mouse-Ventilator Minivent 845	Hugo Sachs Elektronik, March- Hugstetten
OP- Mikroskop Stemi 2000	Carl Zeiss, Jena

Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, USA
Schutzhandschuhe unsteril	Semperit, Wien, Österreich
Spritzen zu 1 und 2 ml (BD Plastipak) und Spritzen BD Micro-Fine + 1 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterillium	Bode Chemie, Hamburg
Wärmeplatte mit Rektalkatheter TKM-0902	Föhr Medical Instruments, Seeheim
Xylazinhydrochlorid (Rompun 2 %) [9mg/kg KG]	Bayer, Leverkusen
Zellstoff-Ecken (Zelletten)	Lohmann & Rauscher, Rengsdorf

2.1.4. Histologische und immunohistologische Färbemethoden

<u>Bezeichnung</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Eosin	färbt eosinophile Strukturen wie Zytoplasma, Kollagen, Muskelgewebe rot	Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin	färbt basophile Strukturen wie den Zellkern blau	Roth, Karlsruhe
Masson-Trichrom	Zellkerne dunkelbraun/schwarz, Zytoplasma hellrot, Keratin und Muskelfibrillen rot, Kollagen und Knochen grün/blau	Roth, Karlsruhe
CD31-Antikörper	färbt Endothelzellen, die den Oberflächenmarker CD31 exprimieren	R&D Systems, UK
TUNEL-Assay (terminal deoxynucleotidyl	zeigt DNA-Doppelstrangbrüche an	R&D Systems, UK

transferase dUTP nick end labelling)		
---	--	--

2.1.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

<u>Bezeichnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
100 bp DNA-Leiter	New England Biolabs, Ipswich, USA
Agarose GTQ	Roth, Karlsruhe
DNase I	Invitrogen, Carlsbad, USA
DNase I reaction Puffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
Omniskript RT-Kit (Buffer RT, dNTP 5 mM, Omniskript, RNase-free water) Qiagen, Hilden Primer SDF-1	MWG Biotech, Ebersberg
Random-Primer (3 µg/µl)	Invitrogen, Carlsbad, USA
RNase-Inhibitor	Promega, Madison, USA
SYBR Green Supermix (Taq-Polymerase, PCR Puffer)	Bio Rad, Hercules, USA

2.1.6. Proteinnachweis

<u>Bezeichnung</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
<i>ELISA:</i>		
plate reader TECAN	Datenauswertung auf Grund des Fluoreszenz-Signals	Genios Tecan, Schweiz
Quantikine Mouse CXCL12/SDF-1_ (MCX120)	enthält folgende Bestandteile: Microplate 96 well, Conjugate, Standard, Kit Control, Assay Diluent RD1-55, Calibrator Diluent RD6Q, Wash Buffer	R&D Systems, UK

	Concentrate, Color Reagent A and B, Stop Solution, Plate Covers	
<i>Massenspektrometrie:</i>		
Acetonitril	Rotisolv Ultra LC-MS	Roth, Karlsruhe
SDF-1alpha [100µg/ml]	rekombinantes SDF-1alpha Protein aus E.coli	R&D Systems, UK
SDF-1alpha Antikörper	Anti-h/mCXCL12/SDF-1	R&D Systems, UK
IP Puffer	140mM NaCl, 1.0% Octyl b-D Glycopyranosid, 100mM Tris-HCl [pH 8.0], 50mM EDTA	Roth, Karlsruhe
Matrix	a-Cyano-4-hydroxycinnamic acid	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
Protein G Sepharose	4 Fast Flow	GE Healthcare, USA
TFA	Ionen-paarendes Reagenz, dient zur Peptid-Synthese für Nanoelektrospray	Roth, Karlsruhe
Wasser	LiChrosolv, für Chromatographie	Merck, Darmstadt
<i>Enzymaktivität:</i>		
96-well-Microplate	96-well Inkubationsschale	R&D Systems, UK
H-Met-Gly-Pro-AMC (7-Amino-4-Methyl- Coumarin)	fluorogenes Substrat zur Detektion der Enzymaktivität im plate reader	R&D Systems, UK

AMC-Standard	Zur Bestimmung der Standardkurve	R&D Systems, UK
CD26/DPPIV-Standard	zur Bestimmung der Referenzwerte	R&D Systems, UK
Wasch-Puffer	zur Entfernung überschüssigen AMCs	R&D Systems, UK

2.1.7. Funktionsuntersuchung des Herzens

<u>Bezeichnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Millar Tip-Katheter (1.4 French)	Millar Instruments, Houston, USA
Millar Aria Pressure-Volume-Conductance	Millar Instruments, Houston, USA

2.1.8. Gerätschaften und Gebrauchsgegenstände anderer Funktion als oben erwähnt

<u>Bezeichnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Autoklav Varioklav Dampfsterilisatoren	H + P Labortechnik, Oberschleißheim
Chemikalienlöffel	Roth, Karlsruhe
Eppendorf Cups 1,5 ml/2ml	Eppendorf, Hamburg
Elektrophorese E 802 mit Gelkammern	Consort, Turnhout, Belgien
FACS (Analysegerät) Coulter Epics XL	Beckman Coulter, Fullerton, USA
FACS-Röhrchen 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Finnpipette	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Finntip Stepper 5,0 ml, 50 Stück	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Floureszenz-Kamera Gel Doc 2000	BioRad, Hercules, USA
Gefrierschrank Hera freeze -80°C	Heraeus Holding, Hanau

Glaszylinder, 500 ml	Schott, Mainz
Heizblock HTM 130	HLC BioTech, Bovenden
Kühlschrank/Gefrierschrank Premium	Liebherr, Biberach
Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop-Photokamera Axio Cam HRc	Carl Zeiss, Jena
Mikrowelle Microwave 800	Severin Elektrogeräte, Sundern
Multipipette (20-200 µl)	Eppendorf, Hamburg
Petrischale Steriplan	Roth, Karlsruhe
Pipetten 2,5/20/200/1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Rotilabo Reaktionsgefäßständer	Roth, Karlsruhe
Schüttelgerät Polymax 10/40	Heidolph Instruments, Schwabach
Thermocycler Biometra t-personal combi	Biometra, Göttingen
Ultraschallhomogenisator Sonopuls	Bandelin Electronic, Berlin
Vortex-Genie	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage Scout Pro	Ohaus, Giessen
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Holding, Hanau
Zentrifuge Centrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Mikro 20	Hettich, Bäch, Schweiz
Zentrifuge Multifuge 3 L-R	Heraeus Holding, Hanau

2.1.9. Analysegeräte und -programme

<u>Bezeichnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Adobe Photoshop 9.0	Adobe, San Jose, USA
Axio Vision V4.3	Carl Zeiss, Jena
Data Explorer	Applied Biosystems, Framingham, USA

Dell Desktop PC Optiplex GX 260	Dell, Round Rock, USA
Expo 32 ADC	Beckman Coulter, Fullerton, USA
HSE Isoheart	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
LG Desktop PC	LG Electronics, Seoul, Korea
MPCU2PV.exe	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
PVAN 2.9.	Millar Instruments, Houston, USA
QuantityOne	BioRad, Hercules, USA
Siemens Desktop PC Scenic L 1850 PM	Siemens, Berlin und München
Siemens Desktop PC Scenic Pro M7	Siemens, Berlin und München
XFlour TECAN Software	Tecan, Schweiz

2.2. Methoden

2.2.1. Tiermodell

Als Mausstamm diente C57/Bl6, von dem ausschließlich die männlichen Tiere mit einem Alter zwischen 8-10 Wochen und einem Körpergewicht von 20-25g für die Versuche verwendet wurden. Der Bezug der Wildtyp-Tiere erfolgte über Charles River, Sulzfeld, derjenige der DPPIV/CD26-Knockout-Mäuse über Dr. N. Wagtman (NovoDordisk, Blagsværd, Dänemark) mit freundlicher Genehmigung von Dr. D. Marguet (Centre d'Immunologie de Marseille Luminy-INSERM, Marseille Luminy, Frankreich). Die Aufzucht und Haltung der Tiere erfolgte nach Entwöhnung von der Mutter in Einzelkäfigen. Die Tiere waren einem 12-stündigen Tag- und Nachtrhythmus unterworfen, die Raumtemperatur betrug 24° Celsius, die Luftfeuchtigkeit lag bei 50%. Die Versorgung mit ausreichend Nahrung und Flüssigkeit war 24 Stunden täglich gewährleistet, ebenso die bei Bedarf vorgenommene Säuberung der Einstreu, bestehend aus Holzspänen und Zellstoff. Haltung der Tiere und die in dieser Arbeit durchgeführten Methoden entsprechen den jeweiligen strengen Standards zu Umgang und Verwendung von Labortieren des U.S. National Institutes of Health(105), sowie den Leitlinien zur Einhaltung wissenschaftlicher Standards der entsprechenden Fachgesellschaften und den Vorschriften der Tierschutzverordnung. Die Tierexperimente wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Az: 55.2-1-54-2531-63-06).

2.2.2. Versuchsaufbau

Die Tiere wurden an Tag 0 einem operativen Eingriff mit intraoperativer Induktion eines Myokardinfarktes unterzogen. Die Tiere wurden vor Beginn der Prozedur randomisiert in die jeweiligen Versuchsgruppen eingeteilt, wobei eine davon nur zum Schein ohne Okklusion eines Herzkranzgefäßes operiert wurde und als sogenannte "Sham-OP" im Verlaufsprotokoll geführt wurde. Die

restlichen Tiere erhielten für insgesamt 6 Tage eine postoperative Behandlung mit entweder Natriumchlorid (100µl, 0,9%ige Lösung), G-CSF (100µg/kg KG), Diprotin A (70µg/kg KG) oder G-CSF und Diprotin A (100µg/kg KG und 70µg/kg KG). Den DPPIV/CD26-Knockout-Tiere wurde entweder 0,9%iges Natriumchlorid (100µl) oder G-CSF (100µg/kg KG) appliziert, oder es erfolgte keinerlei Behandlung. Die Tiere erhielten an Tag 6 oder Tag 30 eine Herzkatheteruntersuchung. Nach sachgerechter Tötung der Tiere wurden die Herzen explantiert und anschließend der histologischen und immunohistochemischen Aufarbeitung zugeführt.

An Tag 2 post-OP erfolgte die Analyse von peripherem Blut und Herzlysaten via Massenspektrometrie, ELISA-assay und Durchflusszytometrie (FACS). An Tag 6 post-OP wurden die Herzen der Versuchstiere entnommen, histologisch und immunohistochemisch aufbereitet und ausgewertet. Die Bestimmung der kardialen Funktionsparameter, sowie die Erstellung einer Überlebenskurve nach Kaplan-Meier fand an Tag 30 post-OP statt. Die Applikation der unterschiedlichen Substanzen fand an sechs aufeinanderfolgenden Tagen nach der unter 2.2.4. beschriebenen Methodik statt, wobei die erste Injektion 30 Minuten post-OP an Tag 0 appliziert wurde

Die folgenden beiden Abbildungen zeigen die verschiedenen Behandlungsgruppen und das experimentelle Design des Projektes.

<i>Gruppenbezeichnung</i>	<i>Erläuterung</i>
WT + Sham	Kontrolle ohne Infarkt
WT + MI	Kontrolle mit Infarkt (100µl 0,9% NaCl)
WT + MI + G-CSF	Monotherapie mit G-CSF (100µg/kg KG) nach Myokardinfarkt
WT + MI + Diprotin A	Monotherapie mit Diprotin A (70µg/kg KG) nach Myokardinfarkt

WT + MI + G-CSF + Diprotin A	Doppelbehandlung mit G-CSF (100µg/kg KG) und Diprotin A (70µg/kg KG) nach Myokardinfarkt
WT + MI + G-CSF + Diprotin A + AMD	Testung des reversen Effekts von AMD3100 (1,25mg/kg KG) durch CXCR4 Antagonisierung
KO + MI	Kontrolle ohne CD26/DPPIV Aktivität
KO + MI + G-CSF	Knockout mit Monobehandlung und erwartetem synergistischen Effekt nach Myokardinfarkt
KO + MI + G-CSF + AMD	Testung des reversen Effektes von AMD (1,25mg/kg KG) im Knockout-Modell nach Myokardinfarkt

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der einzelnen Versuchsgruppen, sowie des Behandlungsregimes mit Konzentrationsangaben der Wirksubstanzen.

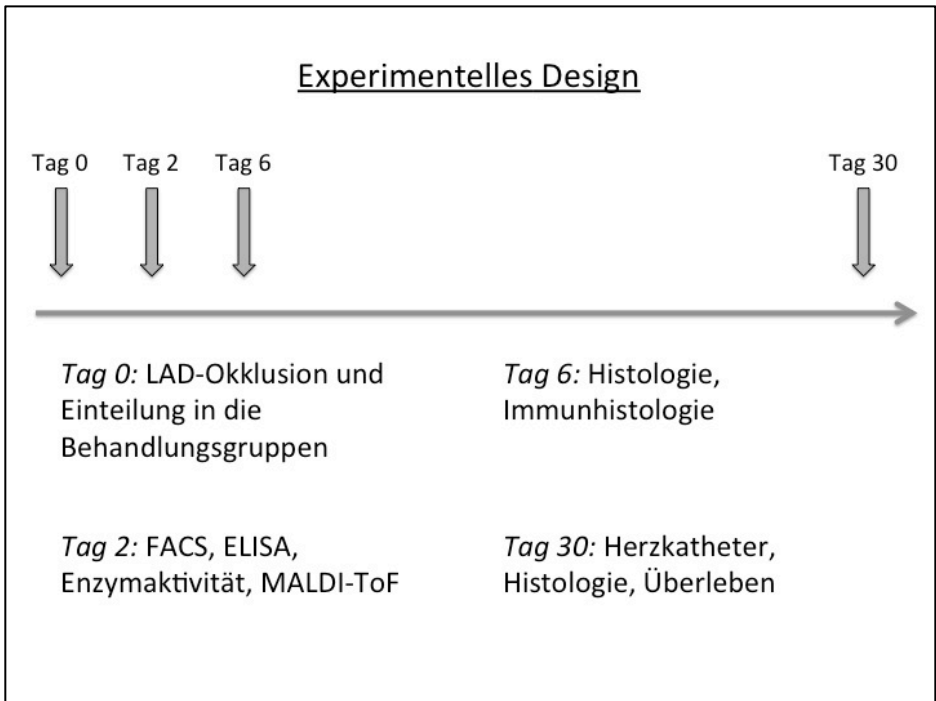


Abbildung 8 zeigt das experimentelle Design des Projektes

2.2.3. Induktion eines Myokardinfarktes im Mausmodell

Das Tier wurde manuell aus dem Käfig entnommen. Unter konstantem Griff in den Nacken und Wendung des Tieres in Rückenlage erfolgte die Einleitung der Narkose gewichtsadaptiert mit Xylazinhydrochlorid (9,0mg/kg KG) und Ketaminhydrochlorid (80,0mg/kg KG). Die Narkose trat nach circa 5 Minuten ein und hielt circa 30min, was für die sich anschließende Operation mit einer durchschnittlichen Dauer von 20min ausreichend war. Die Fixierung des Versuchstieres auf der mit 37° Celsius vorgeheizten Wärmeplatte wurde in Rückenlage mit Klebestreifen an allen vier Extremitäten vorgenommen. Bepanthen-Salbe verhinderte das Austrocknen der Augen und eine rektale Temperatursonde gewährleistete eine konstante Temperatur während der

gesamten Prozedur. Anschließend wurde die Haut am Hals mit einem longitudinalen Schnitt median inzidiert und unter stumpfer Präparation der *Glandulae mandibularis et parotis* die Trachea freigelegt, welche in einem nächsten Schritt von oral unter Sicht mit einer Metallkanüle (19gauge) intubiert werden konnte. Visuell konnte

daraufhin die korrekte Lage des Tubus festgestellt werden. Die Beatmung des Tieres erfolgte mit einem über einen Gummischlauch mit der Metallkanüle verbundenen Beatmungsgerät, einem Tidalvolumen von 200 μ l und einer Atemfrequenz von 200 pro Minute. Die Speicheldrüsen wurden reponiert und die Haut mit U-Naht verschlossen (5-0 Ethibond). Im Anschluss wurde die linke Thoraxseite der Maus enthaart und mit Braunol ausgiebig desinfiziert. Die Haut wurde im Bereich der 2. und 3. linken Rippen inzidiert, sowie die darunterliegende Pektoralis-Muskulatur durchtrennt. Der Zugang zum Herzen erfolgte über einen ca. 0,5 cm langen Schnitt im 2. Interkostalraum links. Die zweite und dritte Rippe wurden dann jeweils mit einem 5-0 Ethibond-Faden umschlungen und auseinandergezogen, damit eine freie Sicht auf den Thoraxraum gewährleistet werden konnte. Nach stumpfer Präparation des Perikards wurde am Herzen der absteigende Ast der linken Koronararterie aufgesucht (LAD – left anterior descendens) und 2mm unterhalb des linken Herzohres mit einem monofilen 8-0 Prolene-Faden umstochen und durch Verknotung okkludiert. Die korrekte Ligation des Gefäßes zeigte sich unmittelbar durch eine weißliche Verfärbung des kaudal gelegenen Myokards. Anschließend wurden die Spreizfäden entfernt, die Rippen mit 3 Einzelknopfnähten (5-0 Ethibond) adaptiert und die darüberliegende Pektoralismuskulatur vernäht (5-0 Ethibond). Schließlich wurde die Haut re-adaptiert und mit Braunol abermals ausgiebig desinfiziert. Die Maus wurde so bald wie möglich extubiert und unter geeigneter Schmerztherapie (0,05-0,1 mg/kg KG Buprenorphin intraperitoneal) in den mit Zellstoff ausgelegten Käfig verbracht. Eine ausreichende Temperierung

erfolgte über eine bereitgestellte Infrarotlampe. Die statistische Auswertung des Überlebens begann 24 Stunden post-operativ.

2.2.4. Gabe von G-CSF, Diprotin A und AMD3100

Die Behandlung mit dem Stammzellmobilisator G-CSF (granulocytes colony stimulating factor) erfolgte einmal täglich in einer Dosis von 100µg/kg KG intraperitoneal. Diprotin A wurde zweimal täglich subkutan in die Nackenfalte des Tieres injiziert (70µg/kg KG/bid).

AMD3100 wurde in früheren Publikationen anderer Arbeitsgruppen zunächst als wirksamer Mobilisator von Knochenmarksstammzellen eingesetzt und ähnlich zu G-CSF oftmals auch in synergistischer Weise benutzt(106, 107). Dieser Mechanismus wirkt hauptsächlich über eine stimulierende Funktion an CXCR7 und eine die SDF-1alpha/CXCR4 Achse unterbrechende Funktion an CXCR4 im Knochenmark(108, 109). In unseren Experimenten machten wir uns diese bivalente Fähigkeit von AMD3100 zu Nutze, um in einer geeigneten Konzentration von 1,25mg/kg Körpergewicht die positiven Effekte einer Doppelbehandlung mit G-CSF und Diprotin A aufheben zu können.

2.2.5. Hämodynamische Messung der Herzfunktion

Die hämodynamische Messung der Herzfunktion im Mausmodell beruht auf der Beobachtung, dass sich die elektrische Leitfähigkeit des Blutes im Herzen innerhalb eines Herzzyklus ändert. Mit Hilfe eines sogenannten Conductance-Katheters lassen sich im Rahmen einer Funktionsuntersuchung sowohl der linksventrikuläre Druck als auch das linksventrikuläre Volumen bestimmen. Zu diesem Zweck wird ein 1.4 French messender Millar-Tip Katheter über die rechte Karotis und die Aorta retrograd so in das Herz eingeführt, dass die distale Elektrode im apikalen Teil des linken Ventrikels zu liegen kommt und die proximale Elektrode direkt unterhalb der Aortenklappe. Die nachfolgende Abbildung gibt einen Eindruck von der Morphologie des Katheters.

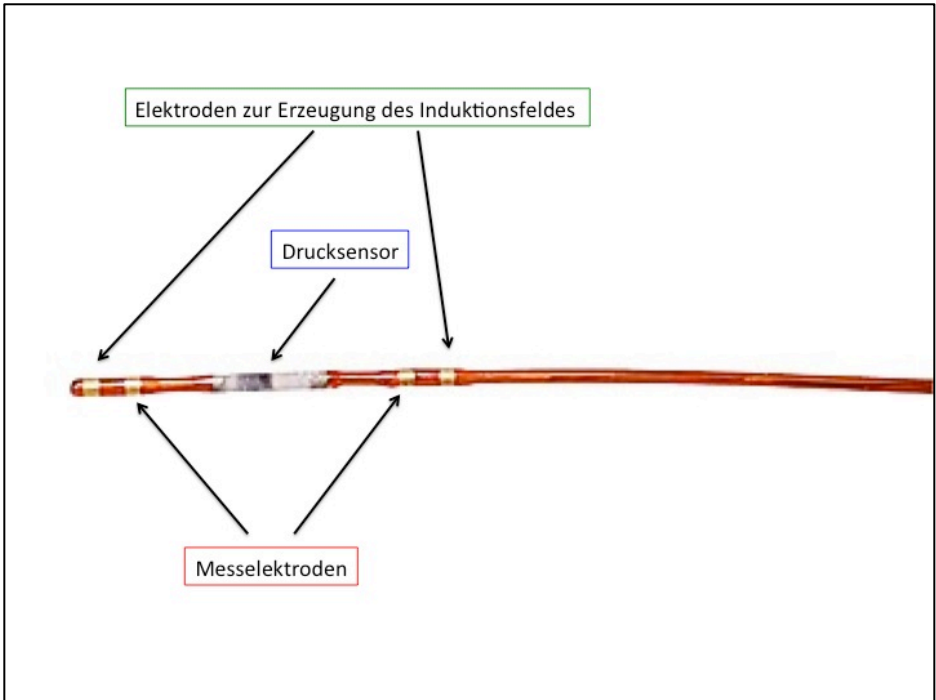


Abbildung 9 zeigt die Katheterspitze eines Millar-Tip Katheters. Bild entnommen von ADInstruments Ltd, Unit B, Bishops Mews, Transport Way, Oxford, OX4 6HD, United Kingdom, modifiziert vom Autor dieser Arbeit.

Über das durch Induktion erzeugte Spannungsfeld zwischen den beiden äußeren Elektroden lassen sich Schwankungen im Spannungsverhältnis zum umliegenden Gewebe, in unserem Falle also Blut und Herzmuskelgewebe, erkennen, die über die inneren beiden Elektroden des Katheters abgelesen werden können. Dies wird Gesamtconductance (Ct) genannt und wird über folgende Formel berechnet:

$$V(t) = (1/\alpha) \times (L^2/\sigma b) \times (G(t) - G(p))$$

- mit $V(t)$: zeitabhängiges ventrikuläres Volumen
 α : Korrekturfaktor $\frac{\text{Schlagvolumen}_{(\text{Conductance})}}{\text{Schlagvolumen}_{(\text{Referenzmethode})}}$
 L : Elektrodenabstand
 σ_b : spezifische Leitfähigkeit des Blutes
 $G(t)$: Gesamtleitfähigkeit
 $G(p)$: Leitfähigkeit des umliegenden Gewebes (parallele Conductance)

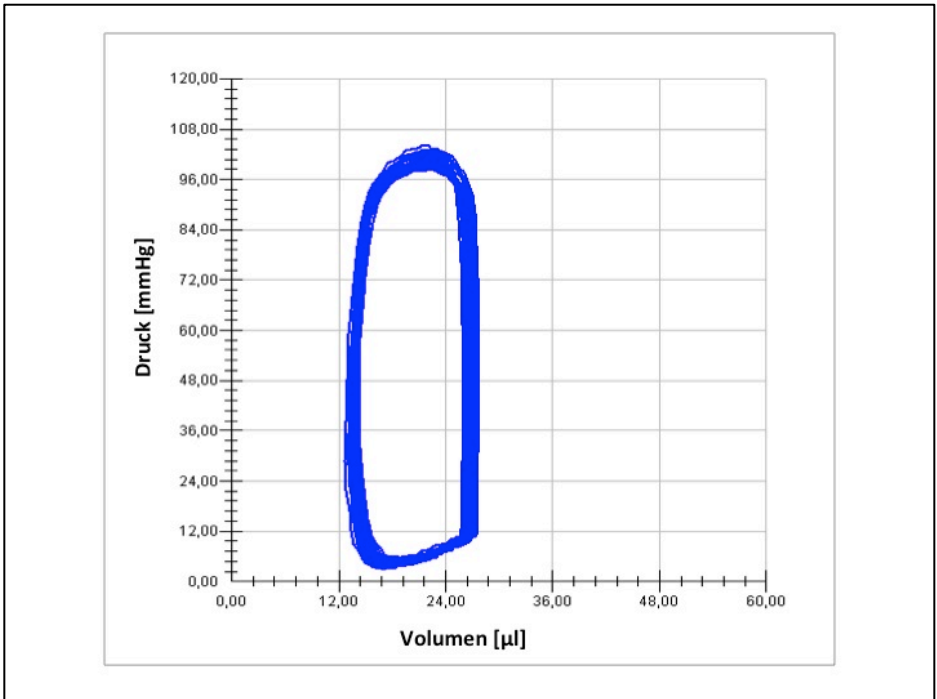


Abbildung 10 zeigt eine repräsentative Druck-Volumen-Schleife [entnommen aus (110)]

Damit der Summationsfehler der Elektroden (Blut und Herzgewebe) korrigiert werden kann, muss am Ende einer jeden Messung die parallele Conductance des Gewebes (C_p) bestimmt werden, welche anschließend von der

Gesamtconductance subtrahiert wird. Die Leitfähigkeit des umliegenden Gewebes wird bestimmt durch Injektion einer hyper-salinen Kochsalzlösung (4,5%), nämlich dergestalt, dass sich während der Injektion weder Druck noch Volumen des Ventrikels signifikant ändern, wohl aber die Leitfähigkeit des Blutes. Das Volumen des umliegenden Gewebes V_p lässt sich als Gerade durch alle Messpunkte der hyper-salinen Injektion bestimmen. Danach wird unter Zuhilfenahme der Gleichung:

$$\text{Enddiastolisches Volumen (Ved)} = \text{Endsystolisches Volumen (Ves)}$$

diejenige Gerade bestimmt, auf welcher der Druck und Volumen im Ventrikel = 0 sind. Der Schnittpunkt beider Geraden stellt dasjenige Volumen V_p dar, welches als Gewebevolumen vom Gesamtvolumen (V_t) subtrahiert werden muss, damit man das tatsächliche Blutvolumen erhält. Die nachfolgende Abbildung fasst diese Berechnungen nochmals anschaulich zusammen.

Berechnung von V_p als Schnittpunkt zweier Geraden

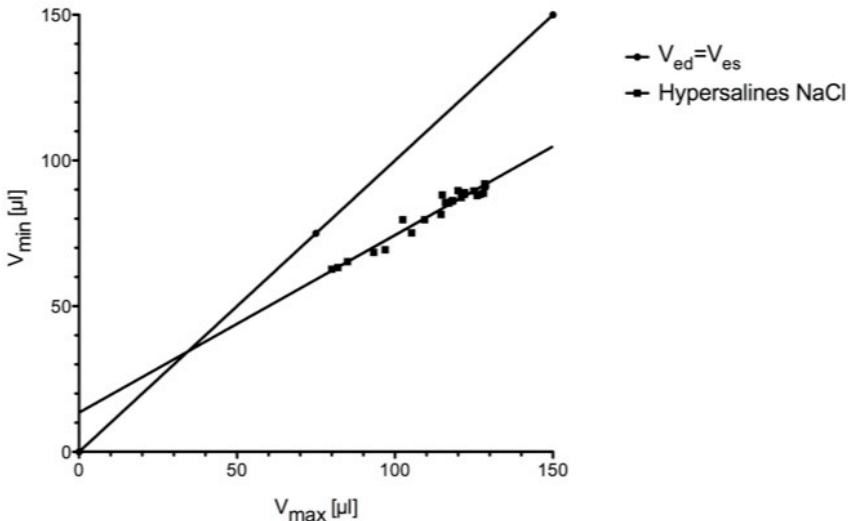


Abbildung 11 zeigt die Berechnung von V_p als Schnittpunkt der Eichgeraden, wo gilt $V_{ed}=V_{es}$, und die Berechnung der Geraden für die Messwerte mit hypersalinem NaCl.

Die Messung an sich wurde am anästhesierten Tier durchgeführt. Dazu wurde wie oben beschrieben die Maus in Rückenlage auf einer Wärmeplatte fixiert. Nach erfolgreicher Intubation wurde die *Arteria Carotis* auf der rechten Seite des Halses von kranial nach kaudal unter Schonung des *Nervus vagus* freipräpariert und mobilisiert. Anschließend wurde das kraniale Ende der Karotis mit einem 3-0 Prolene Faden okkludiert, damit sich der Gefäßdurchmesser durch den Rückstau des Blutes vergrößerte. Durch Anheben der Karotis mit Hilfe einer Büroklammer wurde das Gefäß so gespannt und damit der Blutfluss gehemmt, dass mit einer 20G Kanüle das Gefäß punktiert werden

konnte. In das noch immer mit der Büroklammer komprimierte und ausgeblutete Ende der Karotis wurde nun der Millar-Tip Katheter eingeführt und unter Entfernung der Büroklammer bis zum linken Herzen vorgeschoben. Der Katheter selbst war an seinem proximalen Ende mit einem Druckaufnehmer (HSE) und einem Rechner verbunden, was die synchrone Aufzeichnung der erhobenen Rohdaten erlaubte. Alsdann erfolgte die Berechnung folgender Parameter:

Herzfrequenz (HF) in [1/min]

Maximaler Blutdruck (LVP) in [mmHg]

Minimaler Blutdruck (MinP) in [mmHg]

Endsystolisches Volumen (ESV) in [μ l]

Enddiastolisches Volumen (EDV) in [μ l]

Schlagvolumen (SV) = EDV-ESV in [μ l]

Ejektionsfraktion (EF) = (EDV-ESV)/EDV \times 100 in [%]

Herzzeitvolumen (HZV; cardiac output) = HF \times SV in [μ l/min]

Maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dP/dtmax) in [mmHg/sec]

Tau weiss in [msec]

Arterielle Nachlast (E) = Endsystolischer Druck (P)/SV in [mmHg/ml]

Nach erfolgreicher Messung wurde der Katheter aus dem Versuchstier zurückgezogen, und der Tod des Tieres trat durch Ausbluten innerhalb von Sekunden ein. Die Messung der Herzfunktion wurde an Tag 30 post-OP durchgeführt. Dies ist eine Standardprozedur in der Arbeitsgruppe von Professor Franz und wurde so für alle Publikationen und Dissertationsschriften der Gruppenmitglieder durchgeführt.

2.2.6. Histologie

Nach Tötung der Tiere gemäß den entsprechenden Richtlinien mit einer Überdosis Ketamin wurden die Herzen entnommen, von umliegendem Gewebe

befreit und mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9%) retrograd über die Aorta gespült. Anschließend erfolgte zur Quervernetzung des Gewebes und damit zur Fixierung die Einbettung in 4%-iger Formaldehyd-Lösung (Formalin). Nach 24 Stunden wurde das Herz über eine aufsteigende Alkoholreihe, beginnend mit 70% und endend mit 100%, entwässert und in erwärmtes, flüssiges Paraffin eingebettet. Nach Aushärtung konnten aus dem Block 4µm dünne Scheiben geschnitten werden, welche auf einem Objektträger aufgetragen wurden.

Die Bestimmung der Infarktgröße und der Morphologie des linken Ventrikels unter besonderer Berücksichtigung der Wanddicke und Septumstärke erfolgte an Hand von vier Hämatoxylin/Eosin-gefärbten Schnitten pro Versuchstier. Da es sich bei den Herzschnitten um Querschnitte durch verschiedene Ebenen des Herzens handelte, wurde die Querausdehnung des Infarktes mit folgender Formel berechnet:

$$A(I)/A(LV) \text{ in } [\text{mm}^2], \text{ wobei } [A(I)] = \text{ infarzierte Fläche und } [A(LV)] = \text{ Gesamtfläche des linken Ventrikels einschließlich Septum}$$

Dieser Wert wurde mit dem Quotienten der Längsausdehnung des Infarktes zur Gesamtlänge des linken Ventrikels in [mm], die vor Sektion des Herzens bestimmt wurden, verrechnet, damit das Endergebnis die Gesamtausdehnung des Infarktes in allen drei Raumrichtungen repräsentierte. Die nachfolgende Abbildung fasst die durchgeführte Berechnung nochmals anschaulich zusammen.

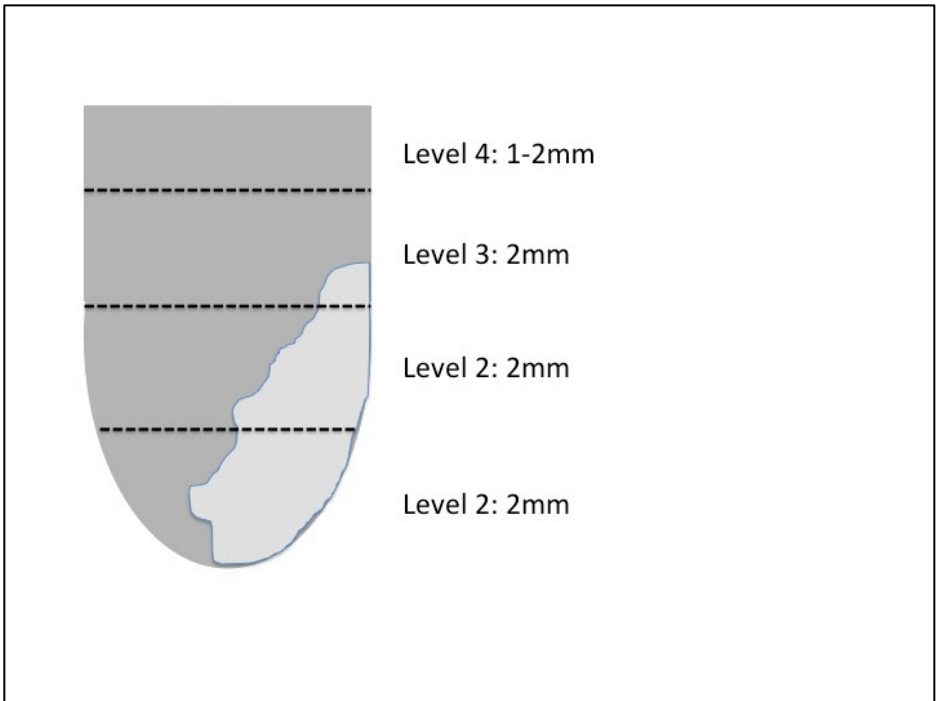


Abbildung 12 zeigt schematisch die Berechnung der Längs- und Querausdehnung der Infarktzone

Granulationsgewebe und Wanddicke der Herzen wurden mit der Software *Axiovision* und 15-facher Vergrößerung gemessen, wobei hier derjenige Querschnitt durch das Herz ausgewählt wurde, der auf Höhe der Papillarmuskeln lag. Nach Festlegung der Infarktzone und der jeweiligen Abgrenzung zum gesunden Herzmuskelgewebe erfolgte die Verbindung des Mittelpunktes des linken Ventrikels mit den Infarktgrenzen durch entsprechende Geraden. Der dabei entstandene spitze Winkel wurde in 5 gleiche Abschnitte unterteilt. Innerhalb jedes einzelnen dieser Abschnitte wurde die Wanddicke an ihrer dünnsten Stelle bestimmt und daraus der Mittelwert gebildet. Die Bestimmung der Wanddicke des interventrikulären Septums erfolgte nach der gleichen

Methode, wobei hier die Septumgrenzen als Abgrenzung zum restlichen Myokard herangezogen wurden.

Die Bestimmung des Granulationsgewebes in [%] errechnete sich aus dem Quotienten der Fläche des infarzierten Areals in [mm²] minus der Gesamtfläche aller nekrotischen Areale in [mm²] zur Fläche des infarzierten Areals in [mm²]. Diese Methodik entspricht den pathologischen Vorgaben und ist eine Standardprozedur in den von der Arbeitsgruppe veröffentlichten Publikationen, sowie in den in der Vergangenheit entstandenen Dissertationsschriften aus den Reihen nun ehemaliger Doktoranden. Die Histologie wurde in Kooperation mit dem Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität, Campus Großhadern durchgeführt.

2.2.7. Immunohistochemie

Die präparierten Schnitte wurden zur Entfernung des Paraffins für 3 mal 5 Minuten in Xylol gewaschen und in der oben erwähnten Alkoholreihe, dieses Mal aber in absteigender Form, für jeweils 10 Minuten re-hydriert. Anschließend Behandlung mit 7,5%-igem Wasserstoffperoxid für ebenfalls 10 Minuten sorgte für die notwendige Inaktivierung der endogenen Peroxidase. Es erfolgten Waschschrte mit *Aqua bidest.* für 10 Minuten und dann für 3 mal 5 Minuten mit TBS. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (10µg einer Stockkonzentration von 0,2mg/ml), der mit einem Biotin-Molekül verbunden ist, fand unter Standardbedingungen bei Raumtemperatur für 60 Minuten statt. Der nächste Schritt bestand in dreimaligem Waschen mit TBS und der Inkubation mit dem Sekundärantikörper, einem Streptavidin-Peroxidase gekoppeltem IgG (1µg einer Stockkonzentration von 20µg/ml). Dabei erkennt Streptavidin das auf dem ersten Antikörper enthaltene Biotin und bildet mit ihm einen Komplex. Über das Enzym Peroxidase lässt sich eine Lichtreaktion initiieren, die unter dem Mikroskop als bräunliche Anfärbung sichtbar wird. Der dabei verwendete Ki67-Antikörper ist in der Lage, als sogenannter Proliferationsmarker spezifisch sich

teilende Zellen nachzuweisen(111). Die Färbung mit einem CD31 Antikörper erfolgte, damit die Anzahl der Endothelzellen bestimmt werden konnte, was wiederum einen Rückschluss auf die Gefäßneubildung (Angiogenese) in der Grenzzone des Infarktes zulässt(112-114). Die Immunohistochemie wurde in Kooperation mit dem Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität, Campus Großhadern durchgeführt.

2.2.8. Durchflusszytometrie (Flow Cytometry)

Die Methode des sogenannten *Fluorescence Activated Cell Sortings (FACS)* ermöglicht die Analyse einzelner Zellen auf Grund ihrer Eigenschaften bezüglich Größe, Granularität, Morphologie und nach Inkubation entsprechender Antikörper auch nach bestimmten Molekülen, die sich an der Oberfläche der Zellen oder intrazellulär befinden. Hierzu wurden die Zellen in Suspension gebracht, wobei als Medium PBS + 10% fetales Kälberserum diente. Zuvor erfolgte eine Anfärbung von sich an der Zelloberfläche befindlichen Molekülen wie CD34, CD45, CXCR4 oder Flk1 mit Antikörpern, die mit einem Fluorochrom gekoppelt sind. Als Fluorochrome standen uns die Farbstoffe FITC (Fluorescein-Isothiocyanat), PE (Phycoerythrin) und PerCP (Peridinin-Chlorophyll-A-Protein) zur Verfügung. Diese Farbstoffe werden von Licht unterschiedlicher Wellenlänge angeregt und zur Emission gebracht. Laserköpfe im Inneren des FACS-Gerätes sind in der Lage, diese Wellenlängen zu generieren. Die sich in Suspension befindlichen Zellen werden mit hoher Geschwindigkeit angesaugt und durchlaufen als einzelne Zellen die unterschiedlichen Laser. Ein Detektor misst die dabei entstehenden Lichtsignale als Vorwärtsstreuung und Seitwärtsstreuung bzw. als Licht bestimmter Wellenlänge und verrechnet sie in Ereignisse pro Skalierung, die entweder nur aus Granularität und Größe besteht, also keines Fluorochroms bedarf, oder die angeregten Wellenlängen bestimmt, was mit Hilfe von Filtern geschieht. Als Analysegerät diente ein Zytometer der Firma Beckman und Coulter (Coulter Epics XL) mit entsprechender Software.

Jeweils an Tag 2 und Tag 6 nach Induktion des Myokardinfarktes wurde den Versuchstieren Blut und Herz entnommen. Das Blut wurde über einen Ficoll-Gradienten mit einer Dichte von 1,077g/ml aufgetrennt und die Phase der Peripheren Mononukleären Zellen gesammelt. Die nachfolgende Abbildung zeigt die Auftrennung der einzelnen Zellreihen mit dieser Methode.

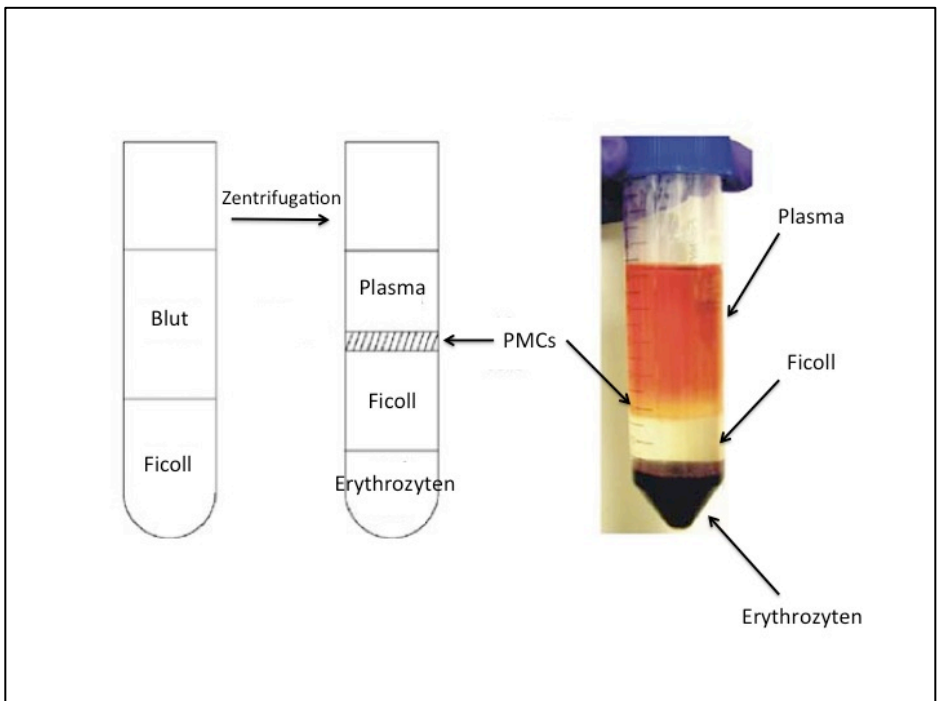


Abbildung 13 zeigt die Auftrennung der einzelnen Zellreihen in einem Ficoll-Gradienten. Abbildung entnommen aus(115), modifiziert vom Autor der Arbeit.

Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Inkubation mit Antikörpern gegen CD34, CD45, CD31, CXCR4, c-kit, Sca1, Flk1 und die Lineage-Reihe im Dunkeln bei 4 Grad Celsius für 60 Minuten. Die Konzentration der einzelnen Antikörper betrug 2,5-3,0 μ g/10⁶ Zellen. Die Stockkonzentration war 0,5mg/ml.

Die biotinierte Lineage-Reihe machte einen zusätzlichen Inkubationsschritt mit Streptavidin in gleicher Konzentration notwendig, ebenfalls im Dunkeln, allerdings bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Überschüssiger Antikörper wurde durch weitere Waschschrte entfernt. Die Aufbereitung des Herzens erfolgte ähnlich, wobei zuvor allerdings das Herz in kleine Stücke von ca. 1mm Durchmesser zerlegt wurde und zur Depletion der Kardiomyozyten mit 0,1%-iger Collagenase IV bei 37 Grad Celsius für 45 Minuten inkubiert wurde. Dieser Schritt war notwendig, da wir im Besonderen an den eingewanderten Stammzellen interessiert waren(116).

2.2.9. ELISA/DPPIV-Aktivität

An Tag 2 post-OP erfolgte die Entnahme der Herzen und wie bei der Vorbereitung für die Durchflusszytometrie der Verdau der Herzen mit 0,1%-iger Collagenase Typ IV bei 37 Grad Celsius für 45 Minuten. Anschließend wurden die verdauten Herzen nochmals mit einem Ultraschall-Puls-Echo für dreimal 30s auf Eis lysiert. Zur Detektion von SDF-1alpha via ELISA wurde ein Quantakine-Kit der Firma R&Dsystems verwendet. In der nachfolgenden Abbildung ist die Standardkurve für eine exemplarische Messung angegeben.

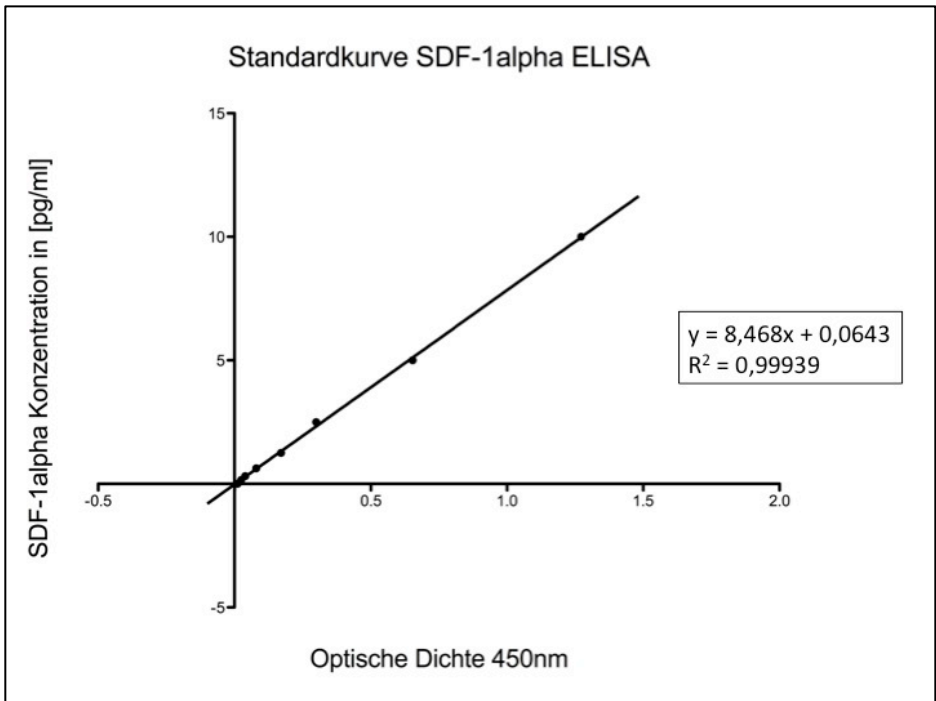


Abbildung 14 zeigt die Standardkurve einer exemplarischen Messung mit der Konzentration von SDF-1alpha als Funktion der optischen Dichte, sowie den Korrelationskoeffizienten R^2 .

Die DPPIV-Enzymaktivität wurde als Substratumsatz pro Zeiteinheit bestimmt (H-Met-Gly-Pro-AMC; 353nm_{em} , 442nm_{ex}), wobei ein Reaktionsansatz 5mM H-Met-Gly-Pro-AMC in einem Gesamtvolumen von $10\mu\text{l}$ pro Reaktion in 100mM Tris-HCl und einem pH von 8 enthält. Nach enzymatischer Entfernung des Methionins kann das Substrat durch CD26/DPPIV gespalten werden. Für die Erstellung einer geeigneten Standardkurve wurde AMC Standard in 10X H_2O verdünnt und anschließend in einem Volumen von 0, 2, 4, 6, 8, und $10\mu\text{l}$ in die einzelnen Wells einer „Micro-reader“-Platte aufgetragen. Er erfolgte eine Verdünnung mit Puffer-Lösung zu einem Gesamtvolumen von $100\mu\text{l}$, um eine

Endkonzentration von 0, 20, 40, 60, 80 und 100pmol zu erhalten. Die nachfolgende Abbildung zeigt die Standardkurve einer exemplarischen Messung der relativen fluoreszierenden Einheiten (RFU) als Funktion von pAMC.

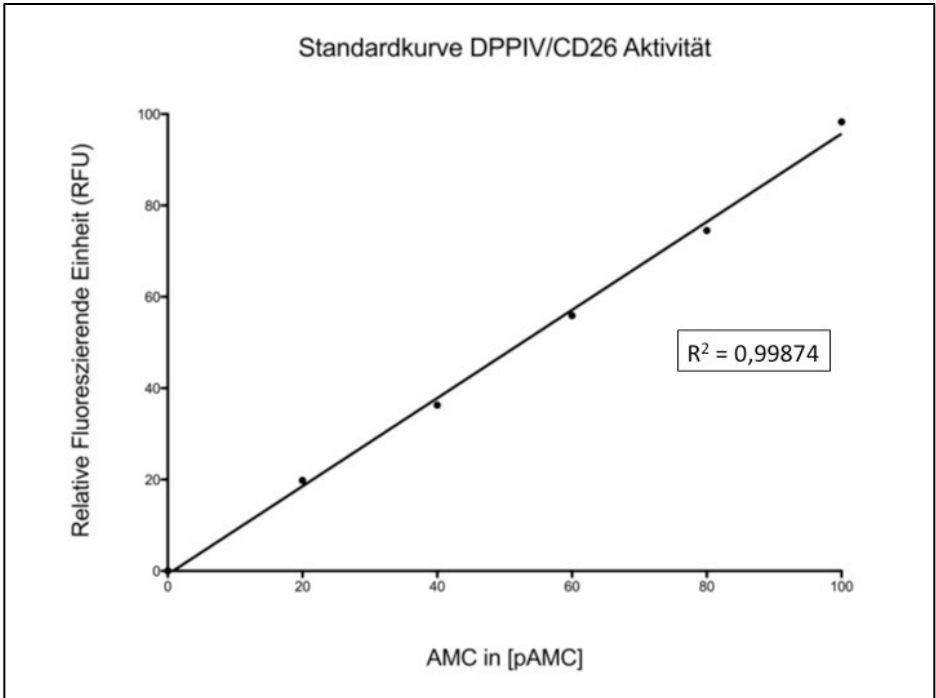


Abbildung 15 zeigt die Standardkurve einer exemplarischen Messung der DPPIV/CD26 Aktivität als Funktion von AMC in [pAMC]. Um die Enzymaktivität zu erhalten, wurde in der Auswertung ΔRFU gegen die erzeugte Standardkurve für AMC als Menge pro ΔT aufgetragen. Der Korrelationskoeffizient ist mit 0,99874 angegeben.

Der Anstieg der Kurve als Funktion des Substratumsatzes wurde als Aktivität bestimmt. Anschließend wurde das gemessene Signal in Produktmenge über die Umwandlung des maximalen Fluoreszenz-Signals nach vollständigem

Substratumsatz berechnet, gemäß der einschlägigen Literatur(117). Die Entnahme und primäre Verarbeitung der Proben erfolgte durch den Autor selbst. Die Messung und die damit verbundene, unmittelbare Probenaufbereitung wurden von Frau Petra Nathan, PhD Student in der Arbeitsgruppe von Professor Franz durchgeführt.

2.2.10. Massenspektrometrie

Die Herzen wurden wie zur Messung der ELISA/DPPIV-Aktivität aufbereitet. 100µl je Probe wurden bei 56 Grad Celsius für 30 Minuten inkubiert, was zu einem 40-50%igen Ausfall des ursprünglichen Volumens führte. Anschließend erfolgte eine High-Speed Zentrifugation mit einer Tischzentrifuge für 30 Sekunden. 20µl Überstand wurden abpipettiert und mit 20µl PBS und 8µl rekombinantem SDF-1alpha (entspricht 800ng) bei 37 Grad Celsius und Rotation mit 550ppm über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Probe jeweils dreimal mit 1X IP-Puffer und HPLC-Wasser gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand weitgehend abgenommen und die so entstandenen Beads unter dem Abzug getrocknet. In einem nächsten Schritt wurde etwa das gleiche Volumen an Matrix (α-Cyanohydroxymethylsäure in Acetonitril/0,6% TFA) zugegeben bis zu einer Endkonzentration von 50% Acetonitril/0,3% TFA. Der Überstand wurde daraufhin auf hydrophobe Targets gespottet und per MALDI gemessen (Applied Biosystems Voyager-DE STR; linearer Modus)(118). Die Entnahme und primäre Verarbeitung der Proben erfolgte durch den Autor selbst. Die Aufbereitung der Proben unmittelbar vor der Analyse im MALDI-ToF MS, sowie die Messung selbst wurden von Herrn Lars Israel, Post-Doc im Labor von Professor Axel Imhof durchgeführt.

2.2.11. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Einzelwerte oder als Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes) angegeben. Soweit es sich um den Vergleich unterschiedlicher Gruppen handelte, diente der ANOVA Test als Standard, gefolgt vom Bonferoni Algorithmus, für Vergleiche von zwei Gruppen miteinander wurde der gepaarte „Students t-Test“ zur Berechnung herangezogen. Als signifikant wurde ein p-Wert von $<0,05$ angenommen. Das Überleben der Versuchstiere wurde in einem Kaplan-Meier-Diagramm dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Nachweis von SDF-1alpha in Blut und Herzen

Da die Dipeptidylpeptidase DPPIV/CD26 wie in der Einleitung gezeigt die N-terminale Seite von SDF-1alpha um ein Di-Peptid verkürzt, lag das vorrangige Interesse an der Frage, ob eine mögliche Inhibition der enzymatischen Aktivität von DPPIV/CD26 zu einer post-translationalen Stabilisierung der ungespaltenen, und somit aktiven Form von SDF-1alpha führen könnte.

Wir bestimmten die proteolytische Aktivität von DPPIV/CD26 im Blutserum und in lysiertem Myokard zwei Tage nach erfolgreicher LAD-Okklusion. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe bestehend aus Wildtyp C57/Bl6 Mäusen zeigte der Vergleich mit CD26 Knockout Tiere keinerlei DPPIV/CD26-Aktivität im Herzen. Die folgende Abbildung zeigt die CD26/DPPIV Enzymaktivität im Herzen.

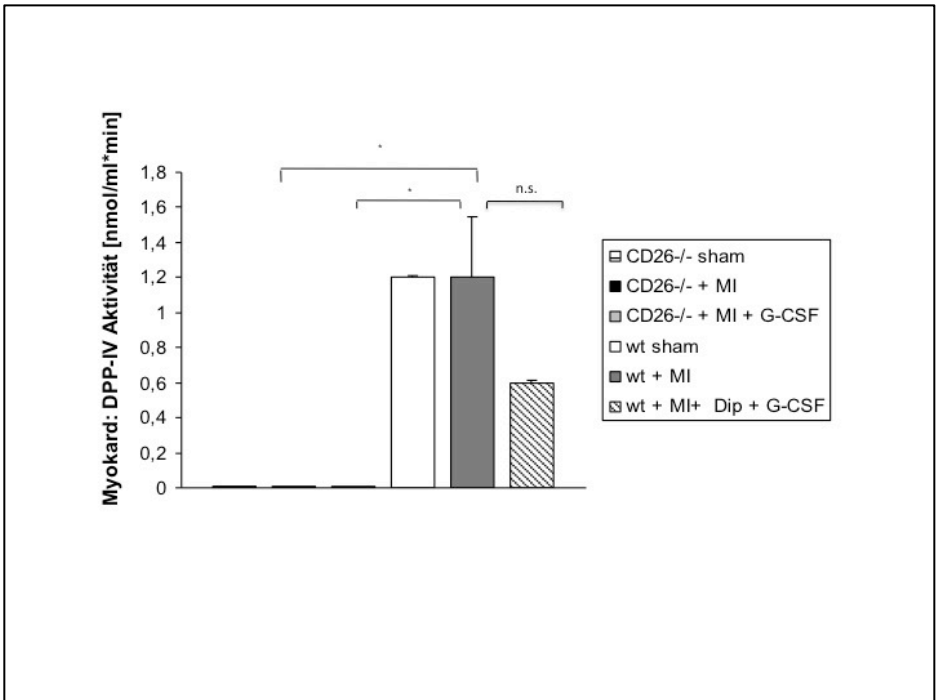


Abbildung 16 zeigt die CD26/DPPIV Enzymaktivität im Herzen zwei Tage nach induziertem Myokardinfarkt. Im Knockout zeigt sich eine komplette Blockierung der Aktivität, im mit Diprotin A behandelten Wildtyp eine signifikante Reduzierung der Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. Mittelwert \pm SEM, $n=3$; [*]: $p<0,05$; [n.s.]: nicht signifikant.

Die von uns festgestellte DPPIV/CD26 Aktivität auf niedrigem (KO-Tiere) und etwas höherem (wt-Tiere) Niveau im Serum ist in diesem Zusammenhang am ehesten mit dem Auftreten DPPIV/CD26-ähnlicher proteolytischer Aktivität anderer Enzyme wie zum Beispiel Matrix-Metalloproteasen zu erklären(82). Andererseits kann es sich aber auch schlichtweg um eine Fehlmessung handeln. Die folgende Abbildung stellt jedenfalls die DPPIV/CD26 Aktivität im Serum für Wildtyp und Knockout Tiere dar.

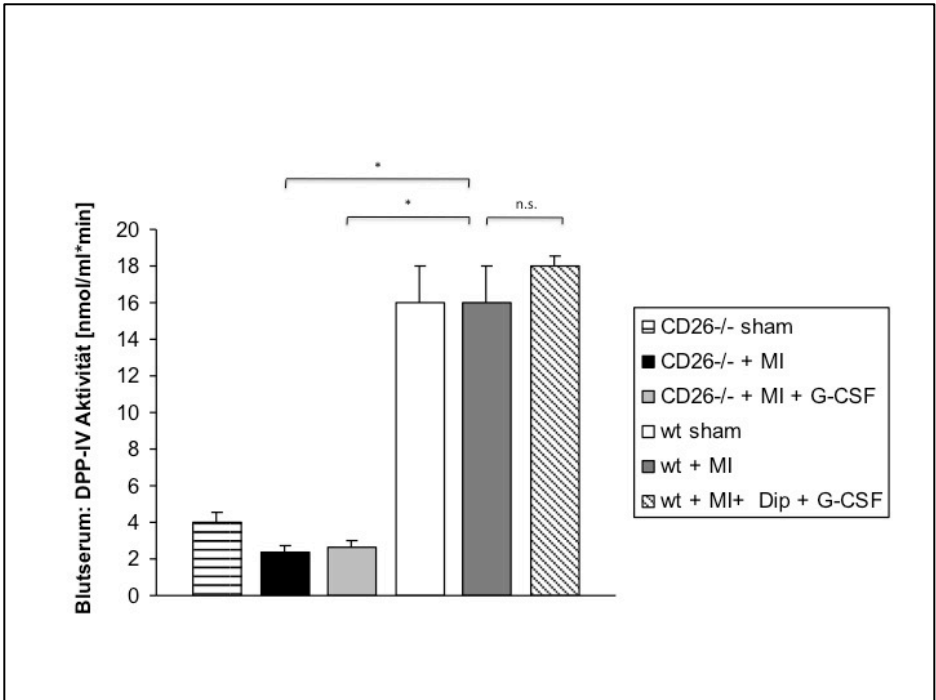


Abbildung 17 zeigt die CD26/DPPIV Enzymaktivität im Serum zwei Tage nach induziertem Myokardinfarkt. Im Knockout zeigt sich eine inkomplette Blockierung der Aktivität, im mit Diprotin A behandelten Wildtyp kein signifikanter Effekt. Mittelwert \pm SEM, $n=3$; [*]: $p<0,05$; [n.s.]: nicht signifikant.

Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Kombination von G-CSF und Diprotin A in Wildtyp-Tieren zu einer verminderten Aktivität von DPPIV/CD26 im Myokard, nicht jedoch im Blutserum führte.

Zur Bestimmung des Proteinlevels von SDF-1alpha wurden als nächstes die lysierten Herzen von Wildtyp- und Knockout-Tieren untersucht. Wir bestimmten deshalb die Gesamtmenge an SDF-1alpha mit ELISA. Nach

Myokardinfarkt zeigte sich die Menge an SDF-1alpha sowohl im Wildtyp als auch im Knockout erhöht, wie in den folgenden Abbildungen zu erkennen ist.

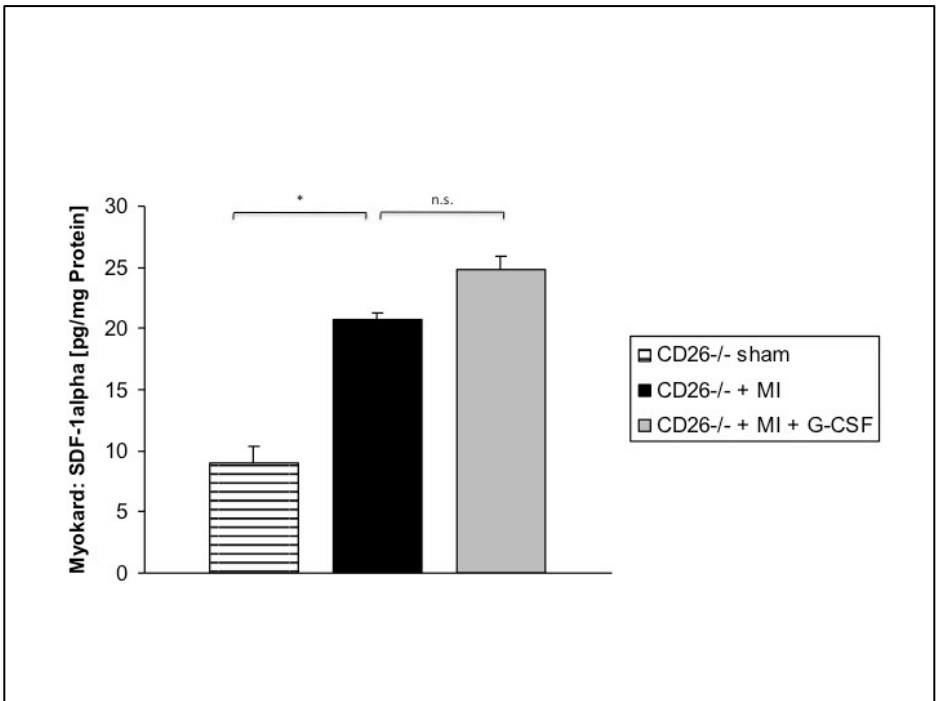


Abbildung 18 zeigt die mit ELISA bestimmte Konzentration von SDF-1alpha im Myokard zwei Tage nach induziertem Myokardinfarkt. Die Induktion einer Ischämie führt zu einer signifikant erhöhten Konzentration von SDF-1alpha. Mittelwert \pm SEM, $n=3$; [*]: $p<0,05$; [n.s.]: nicht signifikant.

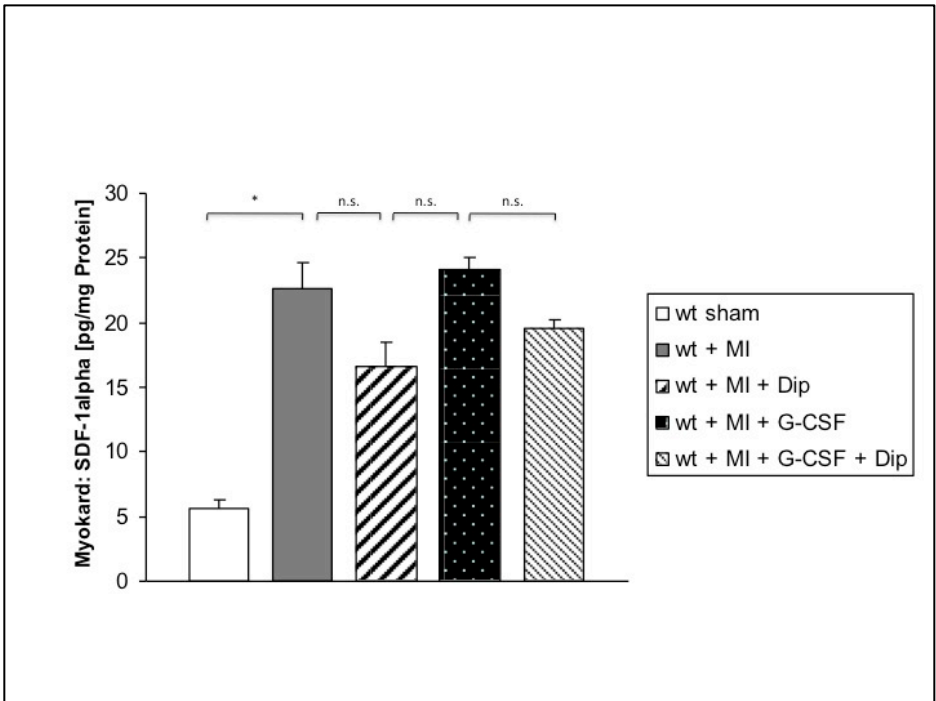


Abbildung 19 zeigt die Konzentration von SDF-1alpha im Myokard zwei Tage nach induziertem Myokardinfarkt in den Wildtyp-Gruppen. Die Induktion einer Ischämie stellt auch hier den stärksten Stimulus zur Erhöhung des Proteinlevels von SDF-1alpha dar. Mittelwert \pm SEM, $n=3$; [*]: $p<0,05$; [n.s.]: nicht signifikant.

Die beobachteten Schwierigkeiten bei der Bestimmung von SDF-1alpha mögen der Tatsache geschuldet sein, dass der von uns verwendete und ausschließlich erhältliche, polyklonale Antikörper für SDF-1alpha keine Unterscheidung ermöglicht zwischen der gespaltenen, inaktiven Form von SDF-1alpha (3-68 Aminosäuren lang) und der ungespaltenen, und somit aktiven Form (1-68 Aminosäuren lang), sondern nur eine Aussage über die Gesamtmenge an SDF-1alpha zulässt. Um diese Einschränkung im experimentellen Aufbau zu umgehen, führten wir in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Axel Imhof,

Adolf-Butenandt-Institut München, eine massenspektrometrische Analyse durch. Die Bedienung des massenspektrometrischen Gerätes, sowie die Aufreinigungs- und Inkubationsschritte der Proben, die kurz vor und während der Messung notwendig waren, wurden von Lars Israel durchgeführt, einem Post-Doc aus der AG Imhof. Dabei wurde rekombinantes SDF-1alpha mit lysiertem Myokard von Wildtyp- und Knockout-Tieren inkubiert. Die von uns aus Herzen von DPPIV/CD26 Knockout-Tieren gewonnenen Extrakte zeigten sowohl in der mit NaCl als auch in der mit G-CSF behandelten Gruppe jeweils nur einen Peak bei 7978 kDa, was die aktive Form des 1-68 Aminosäuren langen SDF-1alpha Proteins repräsentiert. Im Gegensatz dazu waren in den Herzlysaten von Wildtyp-Tieren zwei Peaks erkennbar, der des ungespaltenen Proteins bei 7978 kDa und ein zusätzlicher Peak bei 7748 kDa, welcher mit der N-terminal gespaltenen Form von SDF-1alpha übereinstimmt. Die folgende Abbildung zeigt die durchgeführte, massenspektrometrische Analyse.

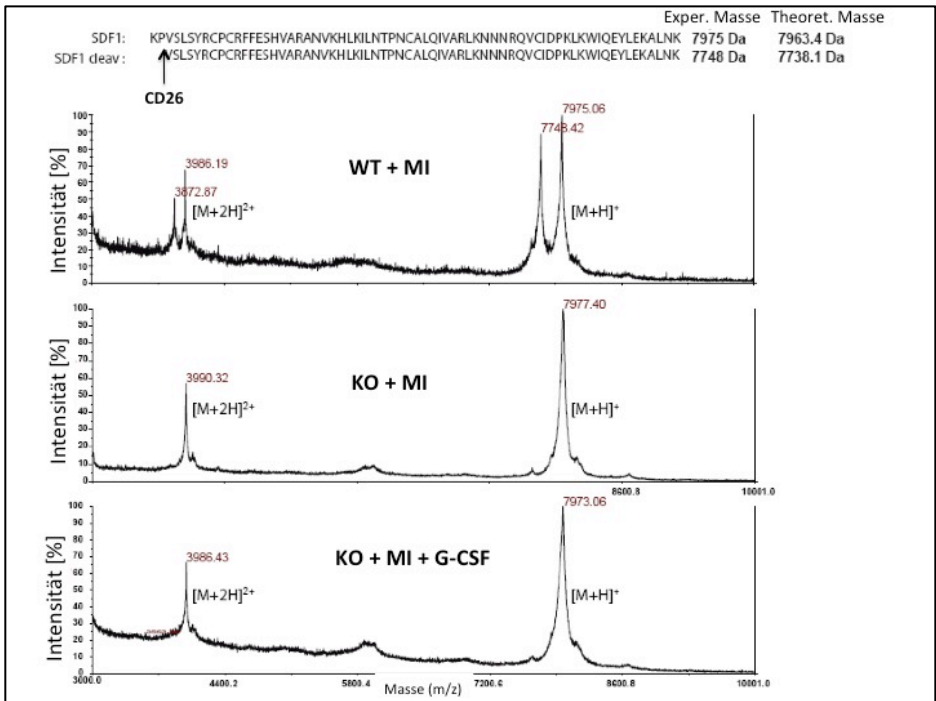


Abbildung 20 zeigt in der Massenspektrometrie eine Hemmung des SDF-1 Abbaus nach Inkubation der lysierten Herzen (Tag 2 post-OP) mit rekombinantem SDF-1 im Knockout. In der Wildtyp-Kontrollgruppe sind weiterhin zwei Peaks bei 7975Da und 7748Da zu erkennen, wobei der kleinere dem gespaltenen SDF-1 entspricht. Mittelwert \pm SEM, n=4; [*]: $p < 0,05$; [n.s.]: nicht signifikant.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Ausschaltung von DPPIV/CD26 durch entweder ein genetisches CD26/DPPIV-Knockout Modell oder eine pharmakologische Inhibition mit Diprotin A zu einer post-translationalen Stabilisierung der aktiven Form des SDF-1 α Proteins in Herzlysaten führt.

3.2. Zellpopulationen im Herzen nach Myokardinfarkt

Um das quantitative Ausmaß der Mobilisierung von Stammzellen darstellen zu können, wurde eine durchflusszytometrische Untersuchung (FACS) des peripheren Blutes (PB) von Wildtyp-Tieren durchgeführt. Die mit G-CSF (100µg/kg KG) ± Diprotin A (70µg/kg KG) behandelten Wildtyp-Tiere zeigten im Vergleich zu den mit Natriumchlorid (100µl 0,9%iges NaCl) behandelten Kontrollen eine signifikant erhöhte Mobilisierung von CD45+/CD34+ Vorläuferzellen. Da bekannt ist, dass aktives SDF-1alpha als Chemoattraktant auf angiogenetische CD34+ Vorläuferzellen wirkt, untersuchten wir die Anzahl CD34+ Zellen im Herzen(95, 119, 120). Wir verwendeten in unseren Versuchen den hämatopoietischen Marker CD45 zusätzlich zu dem oben erwähnten CD34+, damit Zellen identifiziert werden konnten, die aus dem peripheren Blut eingewandert waren. Die folgende Abbildung zeigt dies exemplarisch an Hand eines FACS Plotes.

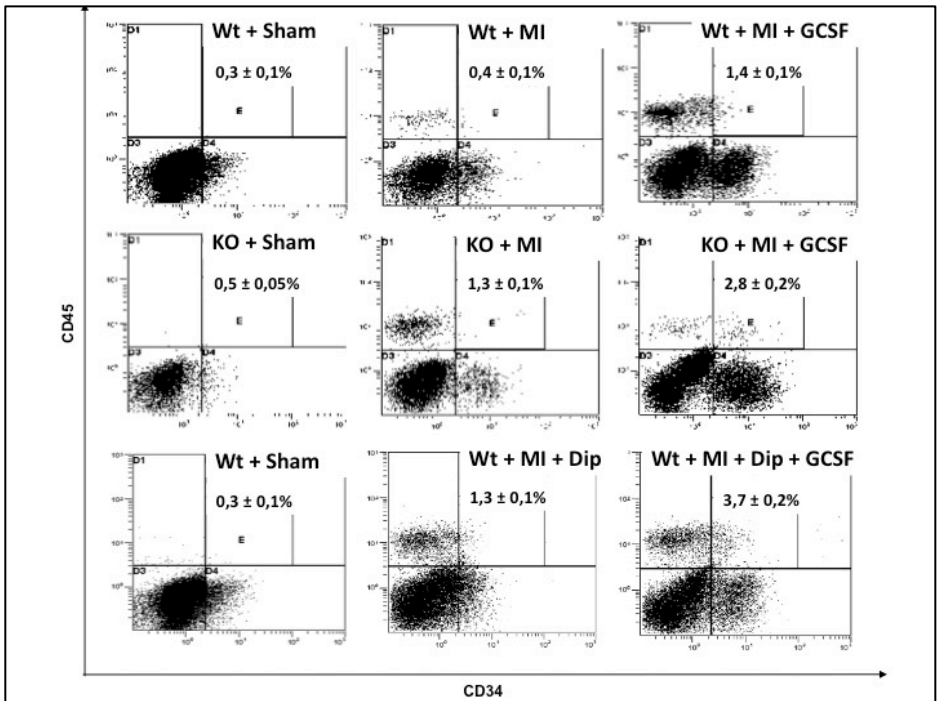


Abbildung 21 zeigt in einer repräsentativen, durchflusszytometrischen Messung die prozentuale Anzahl CD34⁺/CD45⁺ Zellen im Myokard von Wildtyp-Mäusen und Knockout-Tieren mit oder ohne Diprotin A respektive mit oder ohne G-CSF an Tag 2 post-OP. Mittelwert ± SEM.

Schein-operierte Wildtyp-Tiere zeigten eine kleine Population kardialer CD45⁺/CD34⁺ Zellen. Die pharmakologische Inhibition von DPPIV/CD26 in Kombination mit G-CSF führte nach LAD-Okklusion zu der relativ größten Anzahl CD45⁺/CD34⁺ Vorläuferzellen im Herzen im Vergleich zu allen anderen von uns erstellten Gruppen. Mehr als 80% dieser CD45⁺/CD34⁺ Zellen in Herzen von mit G-CSF- und Diprotin A behandelten Tieren exprimierten den für die Anheftung im geschädigten Myokard wichtigen Rezeptor für SDF-1alpha, nämlich CXCR4, sowie

gleichzeitig die Stammzellmarker CD117 (c-kit), eine Tyrosinkinase, und Sca-1 (Ly6), wie in der folgenden Abbildung erkenntlich ist.

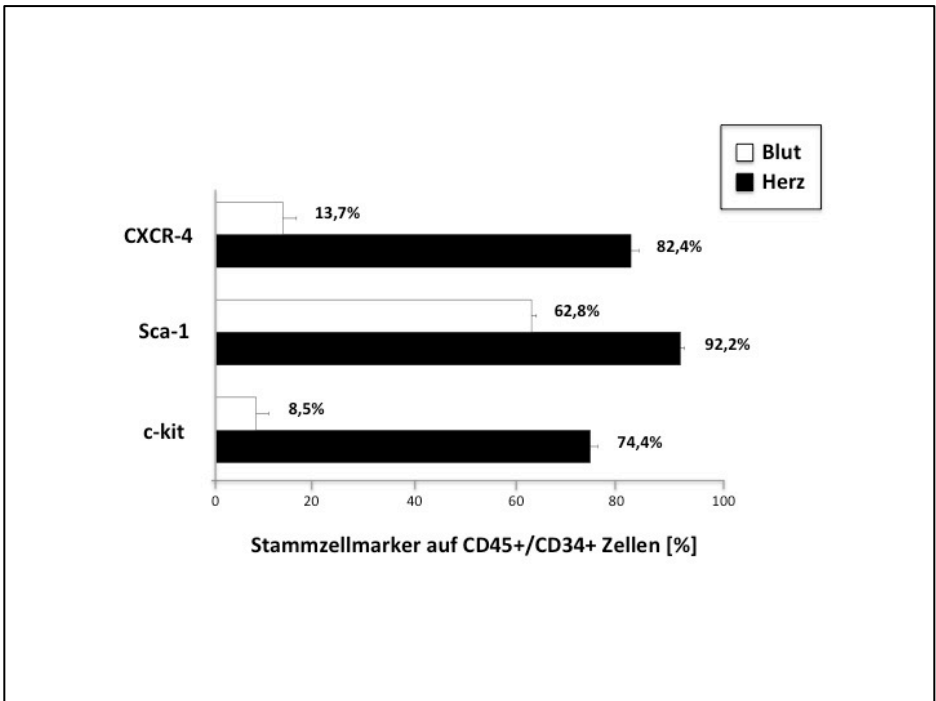


Abbildung 22 zeigt die Gegenüberstellung der CXCR4 Expression im peripheren Blut versus Myokard an Tag 2 post-OP. Mittelwert \pm SEM, n=6; [*]: $p < 0,05$; [n.s.]: nicht signifikant.

Dieses Expressionsmuster war ähnlich zu den anderen Gruppen, die eine Behandlung durchliefen. Im Gegensatz zum Herzen war die CXCR4 Co-expression auf CD45+/CD34+ Vorläuferzellen im peripheren Blut allerdings signifikant erniedrigt, was sich damit erklären ließe, dass bevorzugt die Subpopulation der CXCR4+ Stammzellen vom Blut ins Herz rekrutiert würde. Die pharmakologische Inhibition von DPPIV/CD26 in Kombination mit einer Behandlung mit G-CSF

führten zu einer signifikanten Erhöhung der Zellzahl unterschiedlicher Subpopulationen der CD45+/CD34+ Vorläuferzellen, nämlich im einzelnen CD45+/CD34+/c-kit+, CD45+/CD34+/Sca-1+, CD45+/CD34+/CXCR4+, CD45+/CD34+/Flk-1+, ebenso zu einem Anstieg lin-/c-kit+/Sca-1+ hämatopoietischer Stammzellen im Herzen nach LAD-Verschluss. Die folgenden Diagramme zeigen die Anzahl der ins Herz eingewanderten Subpopulationen von CD34+/CD45+ Stamm- und Progenitorzellen.

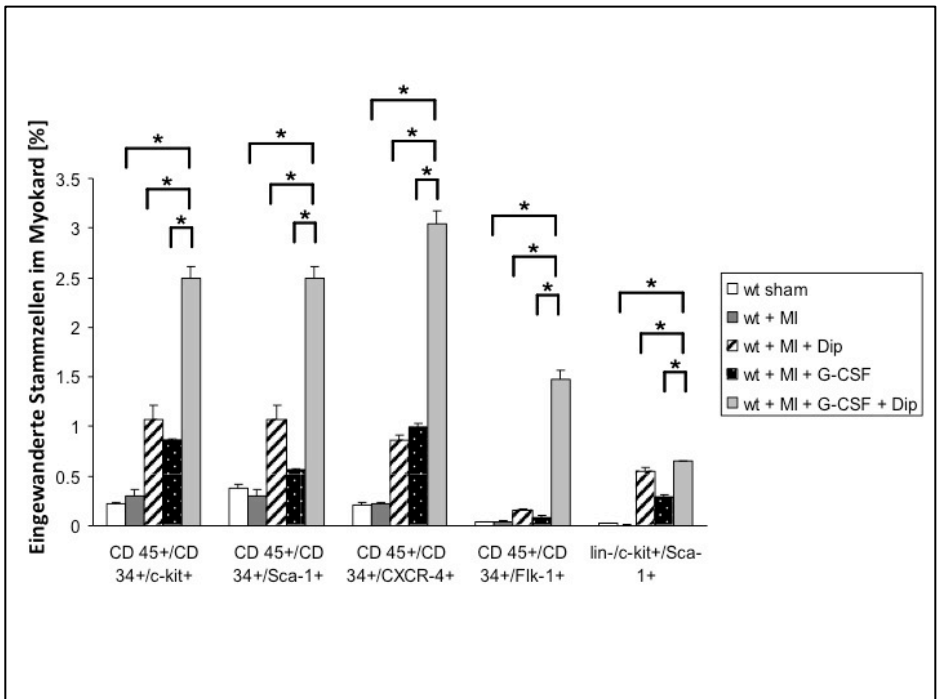


Abbildung 23 zeigt den prozentualen Anteil von CD34+/CD45+ Subpopulationen (c-kit+, Sca1+, CXCR4+, Flk1+) und die lin-/c-kit+/Sca1+ Zellpopulation in Wildtyp Gruppen 2 Tage post-OP. Es finden sich signifikant mehr Stammzellen im Myokard in der doppelt behandelten Wildtyp-Gruppe und in der mit G-CSF behandelten Knockout-Gruppe. Mittelwert \pm SEM, n=6; [*]: p<0,05; [n.s.]: nicht signifikant.

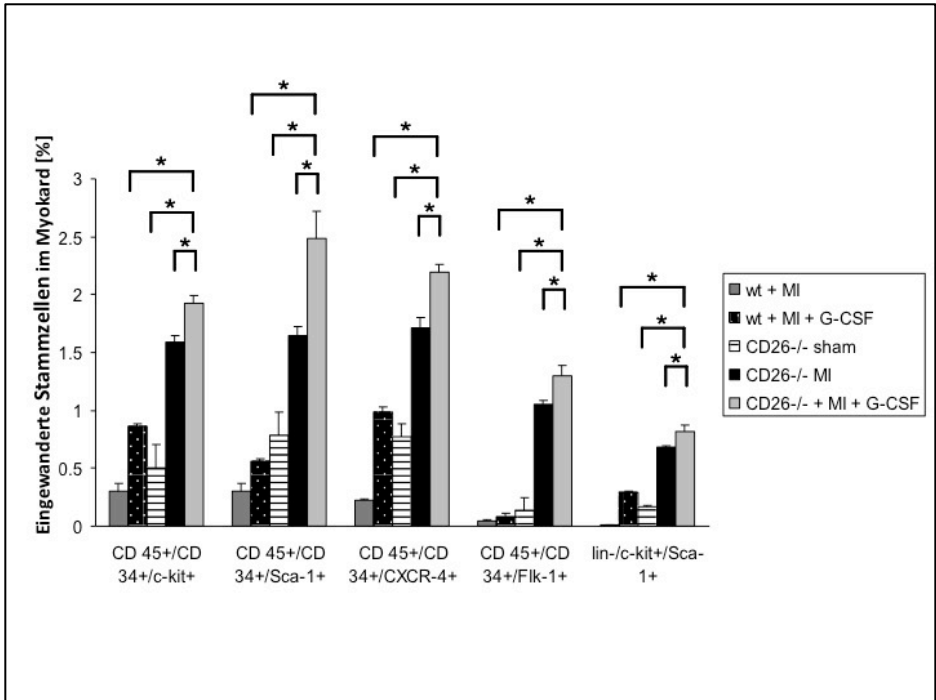


Abbildung 24 zeigt den prozentualen Anteil von CD34+/CD45+ Subpopulationen (*c-kit+*, *Sca1+*, *CXCR4+*, *Flk1+*) und die *lin-/c-kit+/Sca1+* Zellpopulation in Wildtyp und Knockout Gruppen 2 Tage post-OP. Es finden sich signifikant mehr Stammzellen im Myokard in der doppelt behandelten Wildtyp-Gruppe und in der mit G-CSF behandelten Knockout-Gruppe. Mittelwert \pm SEM, n=6; [*]: $p < 0,05$; [n.s.]: nicht signifikant.

Ist nun dieses verbesserte „Homing“ dieser Vorläuferzellen aus dem Knochenmark über das periphere Blut in das Myokard im Besonderen auf die Wechselwirkung der SDF-1 α /CXCR4-Achse zurückzuführen? Diese Frage versuchten wir im Folgenden zu beantworten. Dazuhin applizierten wir in mit G-CSF stimulierten DPPIV-/CD26-knockout Mäusen, Wildtyp-Tieren oder der

Doppelbehandlungsgruppe (G-CSF und Diprotin A) den CXCR4 Antagonisten AMD3100 (1,25mg/kg KG)(121). Da in der Literatur unterschiedliche Konzentrationen von AMD3100 zu finden sind, wurde in einem ersten Schritt diejenige Konzentration bestimmt, mit der die größtmögliche Blockierung von CXCR4 bei gleichzeitig nicht vorhandener oder minimaler Mobilisation stattfindet. Die folgende Abbildung verdeutlicht den mobilisierenden Effekt von AMD3100, der in der von uns verwendeten Konzentration von 1,25mg/kg KG am geringsten und gleichzeitig in den Subpopulationen, die für uns von Bedeutung waren, am ähnlichsten zur Kontrolle war.

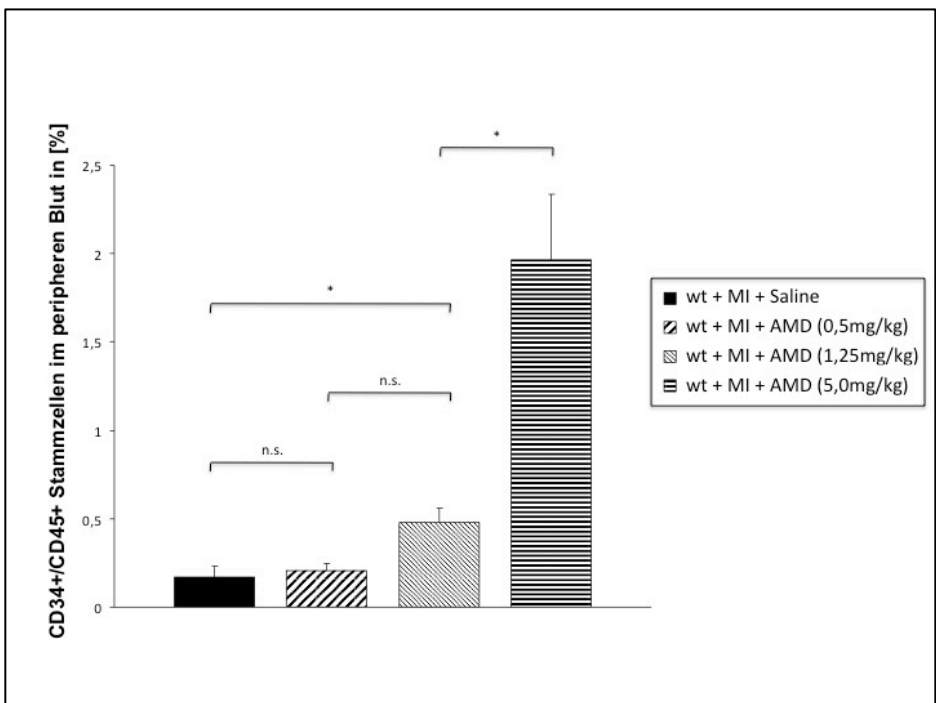


Abbildung 25 zeigt den prozentualen Anteil von CD34+/CD45+ Stamm- und Progenitorzellen im peripheren Blut nach Applikation unterschiedlicher

Konzentrationen von AMD3100. Mittelwert \pm SEM, n=6; []: $p < 0,05$; [n.s.]: nicht signifikant.*

Darüberhinaus ist die mobilisierende Wirkung von AMD3100 besonders auf die CD34+/CD45+/CXCR4+ Subpopulation am geringsten ausgeprägt und im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nicht signifikant, was in der nachfolgenden Abbildung gesehen werden kann. Eine Konzentration von 0,5mg/kg KG hingegen wies weniger CD34+/CD45+/CXCR4+ Zellen im Blut auf als die Kontroll-Gruppe, und erreicht damit nicht die von uns als Referenzbereich festgelegten, physiologischen Werte von CD34+/CD45+/CXCR4+ Zellen in der Kontrolle. Zusammengefasst wurde also diejenige höchste Konzentration gewählt, die im Vergleich zur Kontroll-Gruppe noch unter physiologischen Bedingungen keinen mobilisierenden Effekt auf CD34+/CD45+/CXCR4+ Progenitorzellen zeigte.

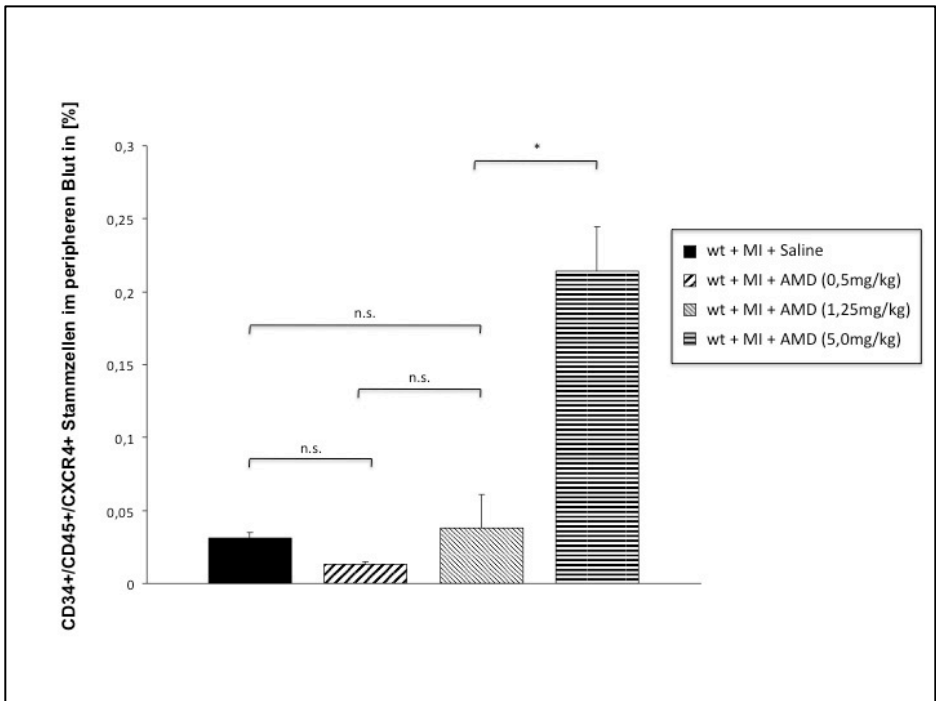


Abbildung 26 zeigt den prozentualen Anteil der CD34+/CD45+/CXCR4+ Subpopulation der Stamm- und Progenitorzellen im peripheren Blut nach Applikation unterschiedlicher Konzentrationen von AMD3100. Mittelwert \pm SEM, $n=6$; [*]: $p<0,05$; [n.s.]: nicht signifikant.

Die Menge an ins Herz einwandernden CD45+/CD34+/CXCR4+ Stammzellen in Tieren mit Myokardinfarkt war in Kombination mit AMD3100 in den Gruppen mit genetischer oder pharmakologischer Inhibition von DPPIV/CD26 umkehrbar, nicht aber in der mit G-CSF allein behandelten Wildtyp-Gruppe. Die Werte im Wildtyp mit Doppelbehandlung bzw. im Knockout mit G-CSF waren dabei mit den ausschließlich mit G-CSF behandelten Wildtyp-Tieren vergleichbar. Die folgende Abbildung zeigt die Menge der eingewanderten Stammzellen ins infarzierte Myokard mit und ohne AMD3100 Applikation.

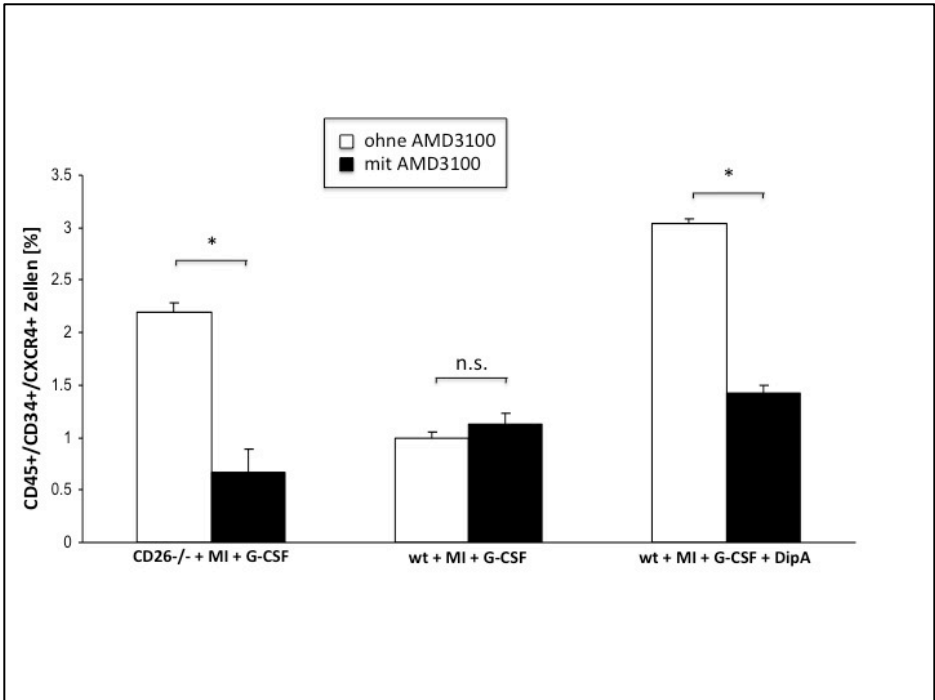


Abbildung 27 zeigt den reversiblen Effekt einer Applikation von AMD3100 in Bezug auf das Stammzellhoming bei Analyse des Herzens 2 Tage post-OP im Vergleich \pm AMD3100. In der nur mit G-CSF behandelten Wildtyp-Gruppe zeigt sich kein Effekt. Mittelwert \pm SEM, $n=6$; [*]: $p<0,05$; [n.s.]: nicht signifikant.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dieser reversible Effekt von AMD3100 gerade bei der CXCR4+ Subpopulation der CD34+/CD45+ Zellen signifikant zu Tage tritt, wie in der folgenden Abbildung deutlich zu erkennen ist.

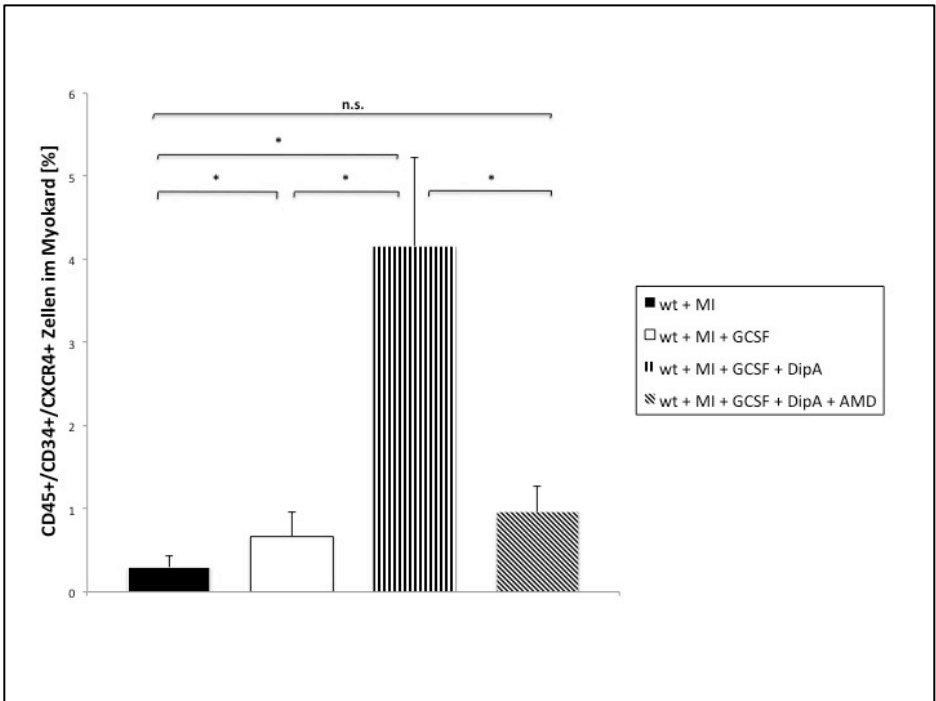


Abbildung 28 zeigt den negativen Effekt von AMD3100 auf das Homing CXCR4 positiver Stammzellen; signifikant im Vergleich der einzelnen Wildtyp Behandlungsgruppen. Mittelwert \pm SEM, n=6; [*]: $p < 0,05$; [n.s.]: nicht signifikant.

Zusammenfassend kann deshalb konstatiert werden, dass diese Ergebnisse die Bedeutung einer intakten SDF-1alpha/CXCR4-Achse unterstreichen, damit ein optimales Migrationsverhalten der mobilisierten Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark über die Blutzirkulation in das geschädigte Myokard gewährleistet werden kann.

3.3. Stimulation der residenten, kardialen Stammzellen

6 Tage nach Applikation von G-CSF und Diprotin A wurden die Herzen aus den euthanasierten Tieren entnommen und gemäß Protokoll für die durchflusszytometrische Untersuchung aufbereitet. Es fand sich dabei im Myokard eine gesteigerte Anzahl von CD34-/CD45-/c-kit+ und CD34-/CD45-/Sca1+ residenten, kardialen Stammzellen in der doppelt behandelten Gruppe, wie in den beiden folgenden Abbildungen gesehen werden kann.

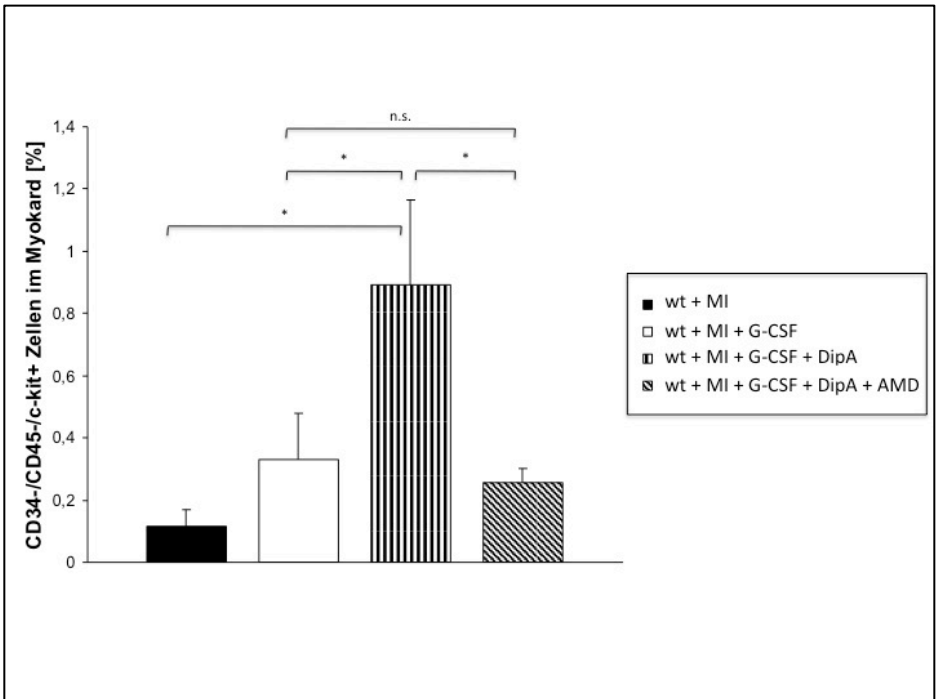


Abbildung 29 zeigt den Anteil der residenten CD34-/CD45-/c-kit+ kardialen Stammzellen im Myokard. In der mit G-CSF und Diprotin A behandelten Wildtyp-Gruppe zeigt sich eine deutliche, prozentuale Erhöhung, die durch Applikation von AMD3100 reversibel ist. Mittelwert \pm SEM, $n=6$; [*]: $p<0,05$; [n.s.]: nicht signifikant.

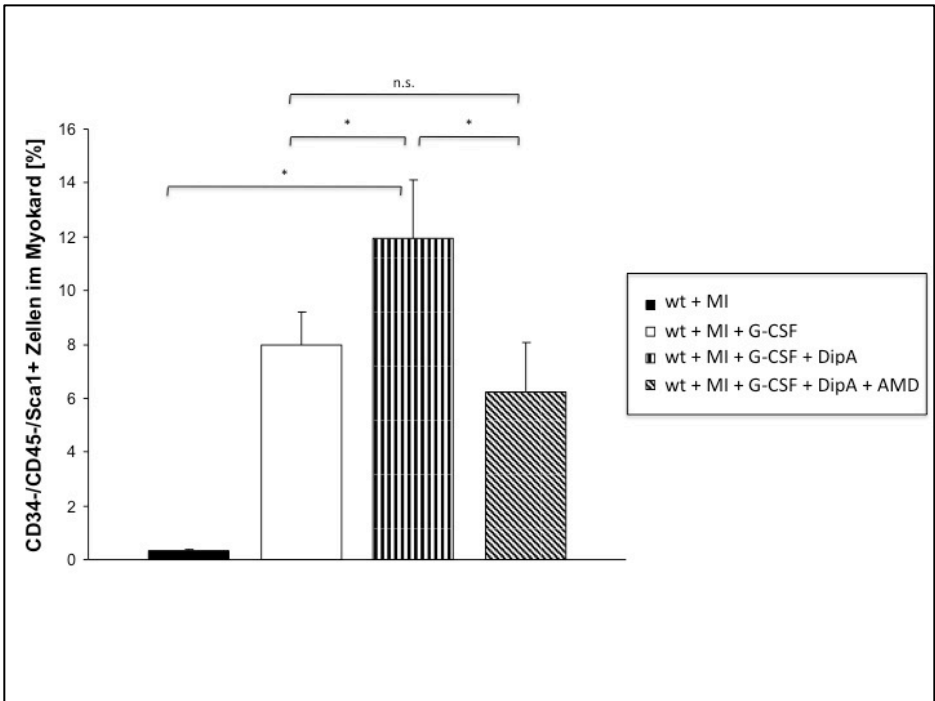


Abbildung 30 zeigt den Anteil der residenten CD34-/CD45-/Sca1+ kardialen Stammzellen im Myokard. In der mit G-CSF und Diprotin A behandelten Wildtyp-Gruppe zeigt sich eine deutliche, prozentuale Erhöhung, die durch Applikation von AMD3100 reversibel ist. Mittelwert \pm SEM, n=6; [*]: $p < 0,05$; [n.s.]: nicht signifikant.

Eine zusätzliche Behandlung mit AMD3100 ließ die Population c-kit+ residenter Progenitorzellen auf einen etwas über ihrem ursprünglichen Ausgangsniveau liegenden Wert zurückfallen. Die Sca1+ Zellen zeigten ein Verhalten, das sich an der ausschließlich mit G-CSF behandelten Gruppe orientierte.

3.4. Histologische und immunohistochemische Untersuchung des Herzens

An Tag 6 nach LAD-Verschluss waren die LV-Infarktgrößen in den einzelnen Behandlungsgruppen noch ununterscheidbar, wie auf der folgenden Abbildung zu erkennen ist.

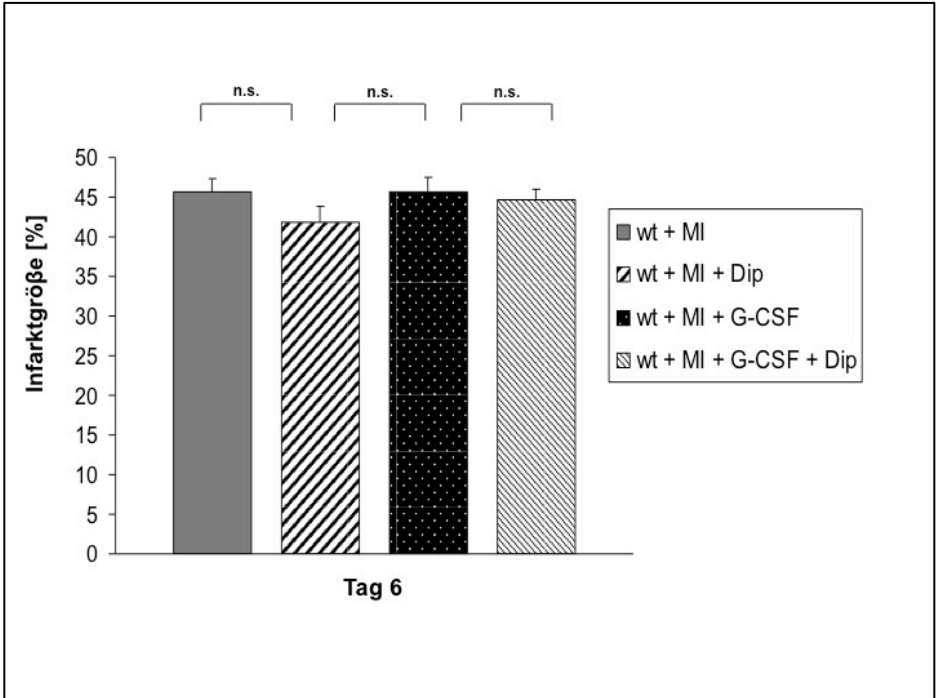


Abbildung 31 zeigt die gemessenen Infarktgrößen in den Wildtyp-Gruppen im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle. An Tag 6 zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Mittelwert \pm SEM, $n=6$; [*]: $p<0,05$; [n.s.]: nicht signifikant.

An Tag 30 jedoch war eine verkleinerte LV-Infaktnarbe in den mit G-CSF behandelten Wildtyp-Tieren, sowie in der G-CSF/Diprotin A - Gruppe deutlich erkennbar, was in der folgenden Abbildung gezeigt wird.

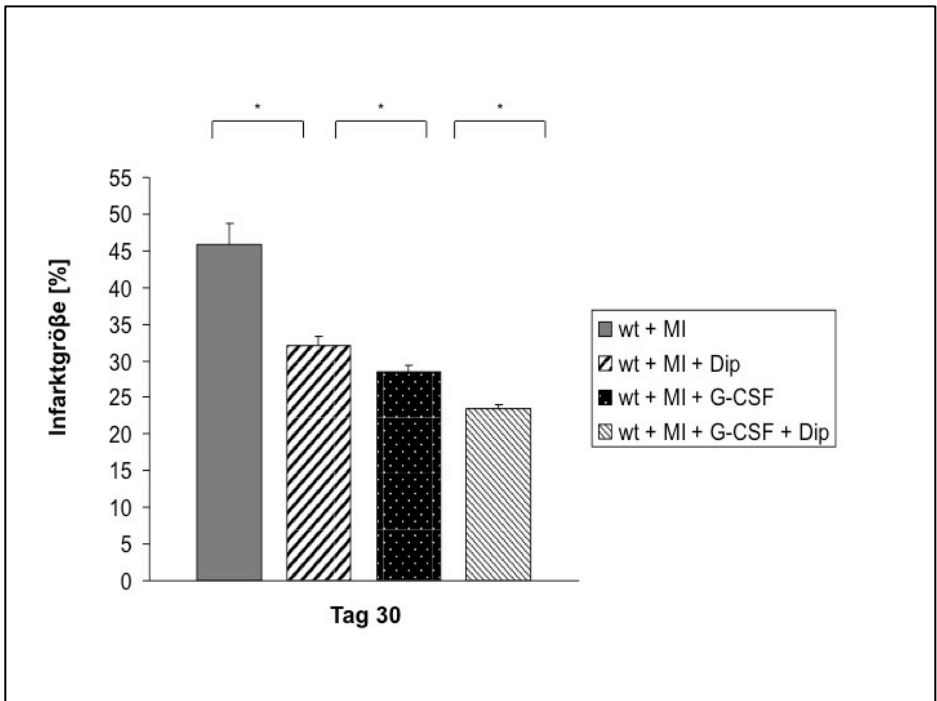


Abbildung 32 zeigt die gemessenen Infarktgrößen in den Wildtyp-Gruppen im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle. An Tag 30 ist ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Wildtyp-Gruppen feststellbar. Mittelwert \pm SEM, n=6; [*]: $p < 0,05$; [n.s.]: nicht signifikant.

Im Gegensatz zum unbehandelten Wildtyp, war in der Gruppe mit der pharmakologischen Inhibition von DPPIV/CD26 zusammen mit G-CSF die linksventrikuläre Wanddicke signifikant verbreitert, was in der folgenden Abbildung seine Darstellung findet.

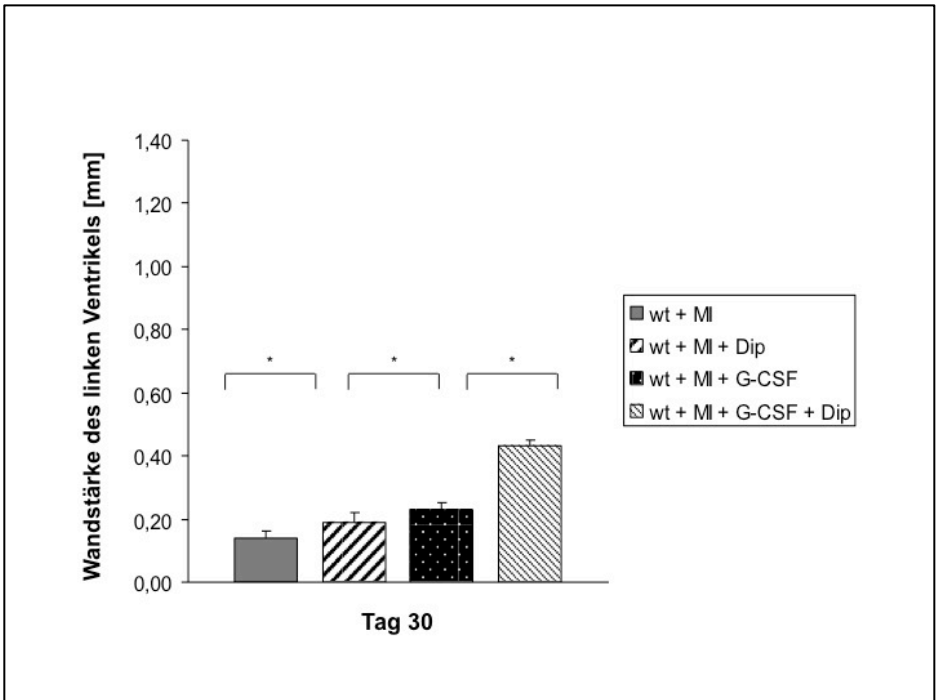


Abbildung 33 zeigt die Wanddicke des linken Ventrikels in den Wildtyp-Gruppen an Tag 30. Signifikante Verstärkung der Wanddicke in allen Gruppen im Vergleich zur Kontrolle und untereinander. Mittelwert \pm SEM, n=6; [*]: $p < 0,05$; [n.s.]: nicht signifikant.

Die nachfolgenden, histologischen Bilder zeigen einen repräsentativen Schnitt durch ein Herz in Höhe der Papillarmuskeln für die vier verschiedenen Wildtyp-Gruppen.

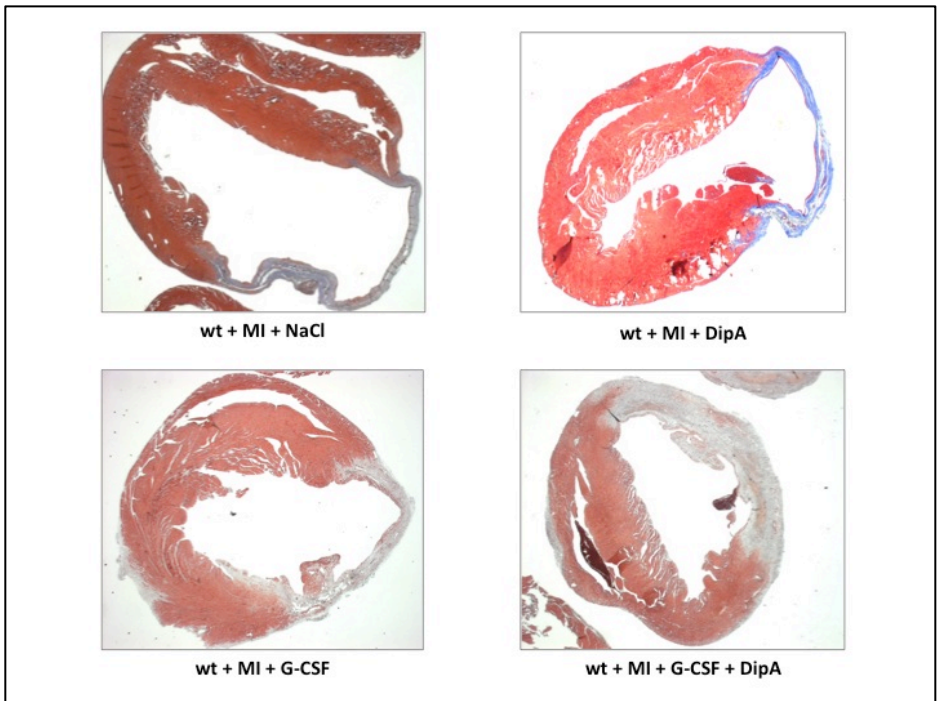


Abbildung 34 zeigt repräsentative Schnitte zur Bestimmung der Infarktgröße und Wanddicke in den einzelnen Gruppen, H/E-Färbung, Vergrößerung 2,5-fach.

Da zirkulierende CD34+ Zellen als Träger angiogenetischer Wachstumsfaktoren bekannt sind(122, 123), untersuchten wir im Folgenden das Ausmaß der Neovaskularisierung der Grenzzone des Infarktes zum unbeschädigten Myokard. Hier war in der Gruppe mit G-CSF/Diprotin A - Applikation eine erhöhte Dichte von CD31+ Kapillaren feststellbar, was mit den von uns beobachteten, grundsätzlich verbesserten kardialen Umbauvorgängen („Remodelling“) übereinstimmte. Eine immunohistochemische Auswertung dieser CD31+ Kapillaren und eine statistische Einordnung sind in der folgenden Abbildung zu erkennen. Darüberhinaus sind repräsentative Bilder von mit einem Antikörper gegen CD31 angefärbten Schnitten zu sehen.

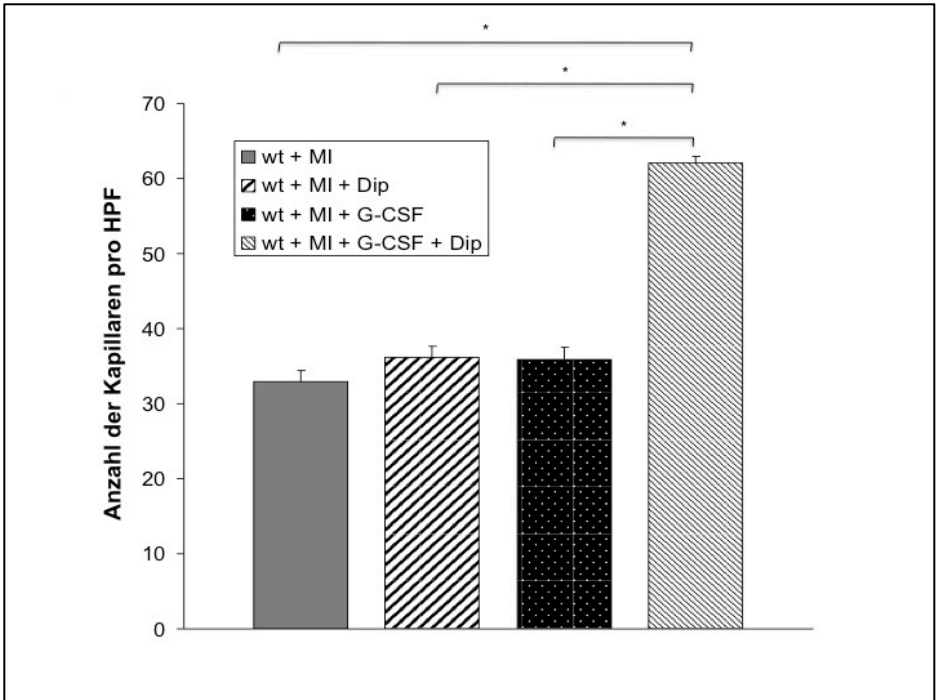


Abbildung 35 zeigt die Anzahl CD31+ Zellen in der Grenzzone des Infarktes pro 40X-facher Vergrößerung, hier als "High Power Field -HPF" bezeichnet, an Tag 6 post-OP. G-CSF und Diprotin A bzw. G-CSF im Knockout führen zu einer signifikanten Zunahme CD31+ Zellen. Mittelwert \pm SEM, n=6; [*]: $p < 0,05$; [n.s.]: nicht signifikant.

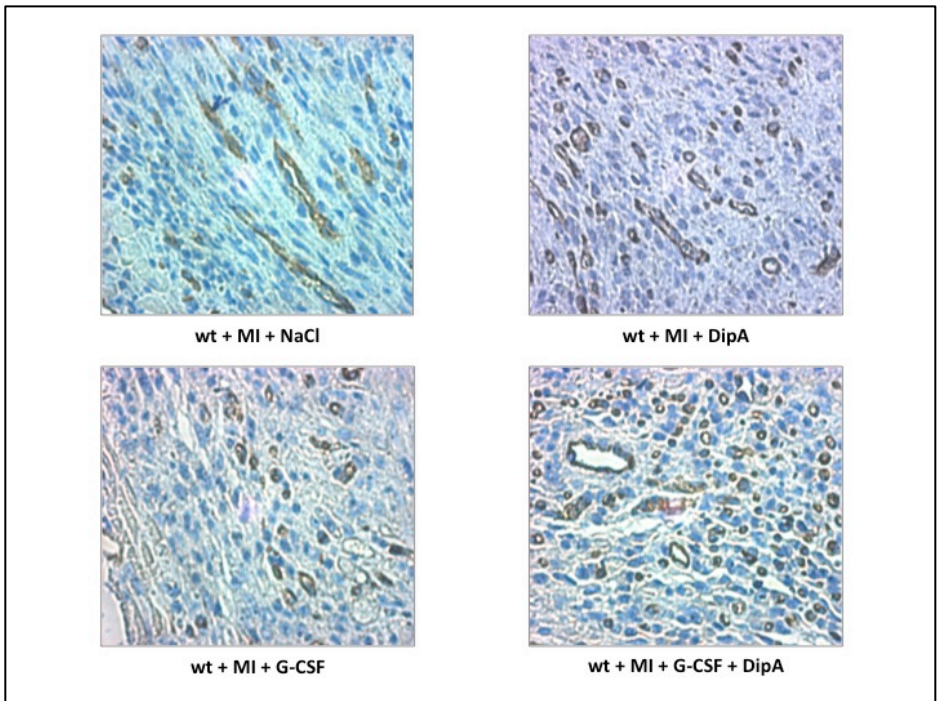


Abbildung 36 zeigt repräsentative Bilder einer immunohistochemischen Färbung gegen CD31 auf Endothelzellen, Vergrößerung 40X.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Doppelbehandlung mit dem Stammzellmobilisator G-CSF und dem Proteaseinhibitor Diprotin A in den Wildtyp-Gruppen zu einer Verkleinerung des infarzierten Areals bei gleichzeitiger Verstärkung der linksventrikulären Wand 30 Tage nach induziertem Myokardinfarkt führt. Der beobachtete Anstieg der Anzahl CD31+ positiver Zellen in der Grenzzone des Infarktes 6 Tage nach LAD Okklusion weist in diesem Zusammenhang auf eine vermehrte Neovaskularisierung hin.

3.5. Positive Effekte auf Apoptose

Neben den positiven Auswirkungen einer verbesserten Neovaskularisierung auf die kardialen Reparaturmechanismen, scheint die Verhinderung des frühen Zelltodes von Herzmuskelzellen einen Hauptangriffspunkt jeder Prävention einer ischämischen Kardiomyopathie darzustellen. Aus diesem Grunde untersuchten wir den apoptotischen Zelltod in der Grenzzone des Infarktes mit der TUNEL-Färbung. Im Vergleich zur nach LAD-Okklusion mit NaCl behandelten Placebogruppe führte G-CSF im Wildtyp und im Knockout zu einer verminderten Anzahl TUNEL-positiver Kardiomyozyten in der Grenzzone des Myokardinfarktes, wie in der folgenden Abbildung zu erkennen ist.

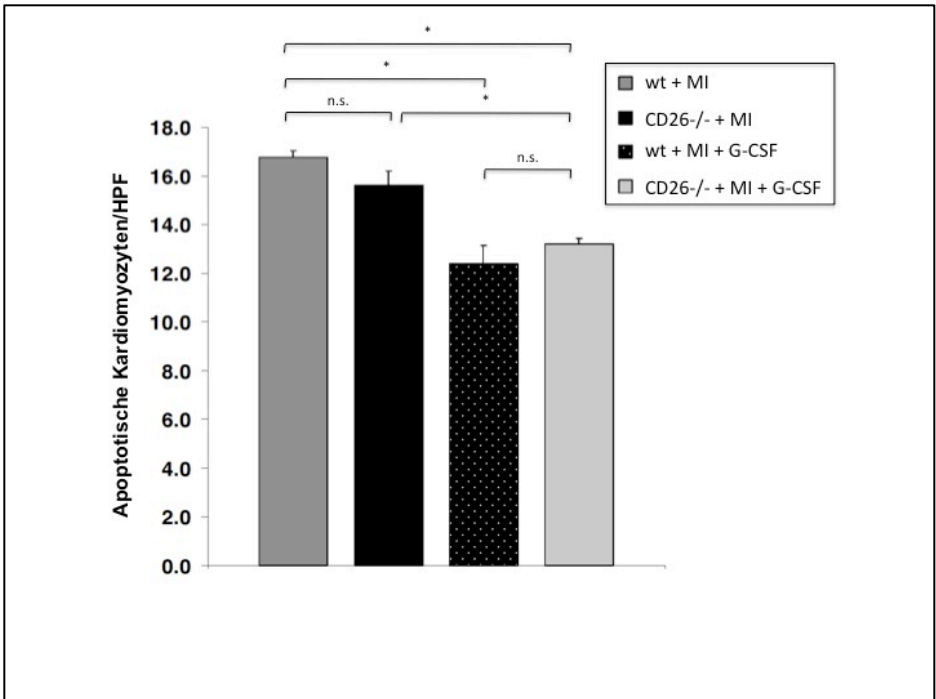


Abbildung 37 zeigt die Anzahl der TUNEL-positiven, apoptotischen Herzmuskelzellen in der Grenzzone des Infarktes pro "High Power Field (HPF)" an

Tag 2 post-OP. G-CSF reduziert die Anzahl apoptotischer Kardiomyozyten signifikant sowohl in der Wildtyp-Gruppe als auch im CD26/DPPIV Knockout. Mittelwert \pm SEM, n=3; []: $p < 0,05$; [n.s.]: nicht signifikant.*

Da die Apoptoserate in der ausschließlich mit G-CSF behandelten Wildtyp- oder Knockout-Gruppe am geringsten war, lässt dies auf parakrine, anti-apoptotische Effekte der verstärkten Präsenz von CD34+/CD45+/CXCR4+ Stamm- und Progenitorzellen einerseits, als auch auf intrinsische, anti-apoptotische Effekte der Behandlung mit dem Cytokin G-CSF andererseits schließen. Die alleinige Inhibition von DPPIV/CD26 hingegen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Apoptoserate der Kardiomyozyten.

3.6. Herzfunktion und Überleben 30 Tage nach Myokardinfarkt

Vier Wochen nach LAD-Okklusion wurde die Herzfunktion mittels einer Kathetermessung in vivo in den Gruppen „Placebo-Behandlung“ und „Wildtyp mit G-CSF mit oder ohne Diprotin A“ bestimmt. Die folgenden Abbildungen fassen die Ergebnisse unter besonderer Berücksichtigung der Auswurf fraktion und des enddiastolischen Volumens zusammen.

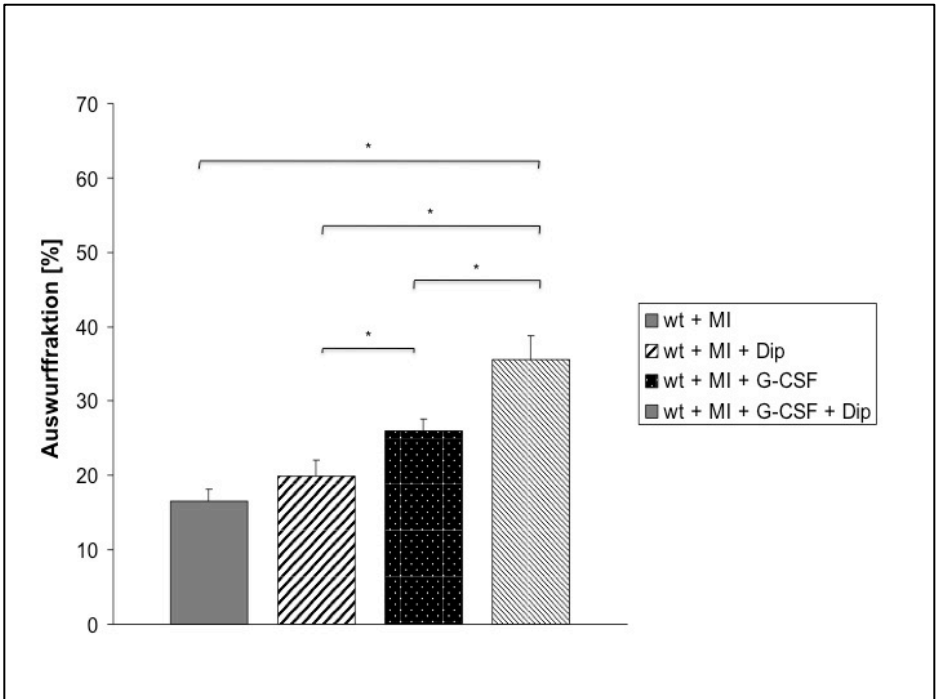


Abbildung 38 zeigt die Herzfunktion als Auswurf fraktion für Wildtyp-Gruppen an Tag 30 post-OP. Signifikante Verbesserung in der mit G-CSF und Diprotin behandelten Gruppe im Vergleich zu allen anderen Gruppen. Mittelwert \pm SEM, $n=10$; [*]: $p<0,05$; [n.s.]: nicht signifikant.

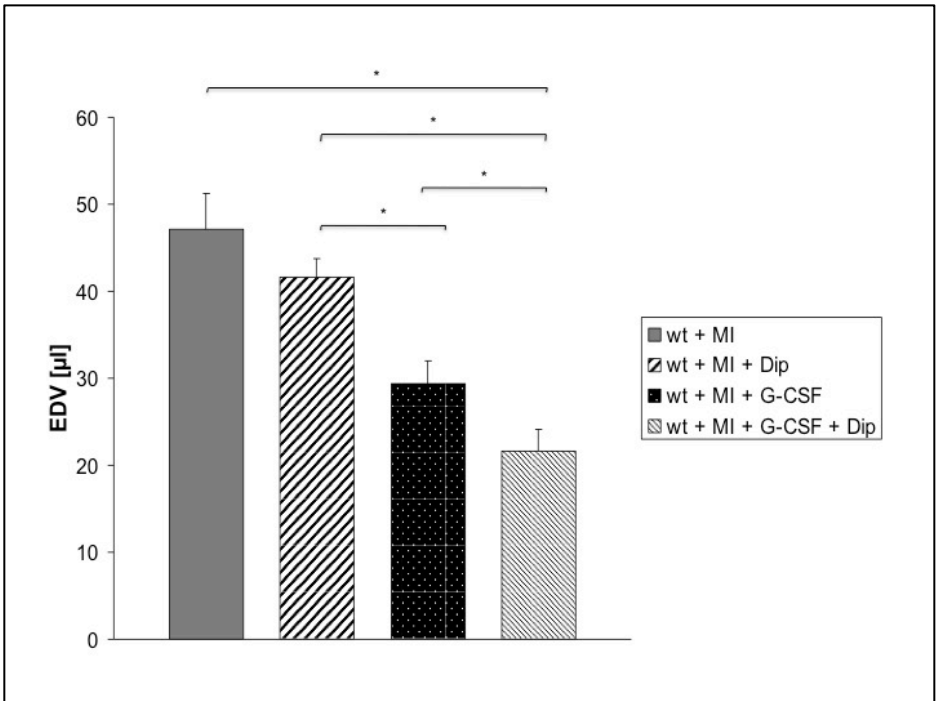


Abbildung 39 zeigt das Ausmaß der Dilatation des linken Ventrikels, dargestellt als Funktion des enddiastolischen Volumens für Wildtyp-Gruppen an Tag 30 post-OP. Signifikante Verbesserung in der mit G-CSF und Diprotin A behandelten Gruppe. Mittelwert \pm SEM, $n=10$; [*]: $p<0,05$; [n.s.]: nicht signifikant.

Im Vergleich zum nicht behandelten Wildtyp war in den mit G-CSF und zusätzlich mit Diprotin A behandelten Wildtyp-Mäusen die systolische Herzfunktion deutlich verbessert, exemplifiziert in einer signifikant erhöhten Auswurfraction, verbessertem „Cardiac Output“ und verstärkter Kontraktilität.

Darüber hinaus ließ sich in der mit G-CSF und Diprotin A behandelten Wildtyp-Gruppe eine verminderte Dilatation aufzeigen, dargestellt als Veränderung im enddiastolischen Volumen, eine verbesserte diastolische Herzfunktion, gezeigt als isovolumentrischer Relaxationsparameter *Tau weiss*. Die

arterielle Nachlast war ebenfalls merklich reduziert in den erwähnten Gruppen, was sich in einer verminderten arteriellen Elastizität zeigte. Das enddiastolische Volumen erhöhte sich nach Applikation von AMD3100 signifikant. Die folgende Tabelle stellt die Ergebnisse in den einzelnen Gruppen nochmals anschaulich gegenüber.

	WT + MI	WT + MI + GCSF	WT + MI + DipA	WT + MI + GCSF + DipA	Schein-OP ("Sham")
HR [bpm]	432 ± 27.0	407 ± 20.0	449 ± 21.0	421 ± 30.0	459 ± 5.3
Pmax [mmHg]	64.8 ± 1.7 [++]	81.6 ± 1.4 [++]	72.0 ± 1.0 [++]	94.7 ± 1.5 [++]	92.5 ± 3.3 [++]
EDV [ul]	46.7 ± 1.2 [++]	29.4 ± 0.9 [++]	41.6 ± 0.8 [++]	21.6 ± 0.9 [++]	19.1 ± 1.8 [++]
Contractility					
EF [%]	16.5 ± 0.6 [++]	26.0 ± 0.6 [++]	19.9 ± 0.8 [++]	35.6 ± 1.1 [++]	61.8 ± 2.5 [++]
CO [ul/min]	1748 ± 220 [++]	3626 ± 401 [++]	3085 ± 200 [++]	4890 ± 318 [++]	8000 ± 1179 [++]
dP/dtmax [mmHg/sec]	3163 ± 248 [++]	4086 ± 223 [++]	3277 ± 98 [++]	7092 ± 500 [++]	6425 ± 350 [++]
Relaxation					
dP/dtmin [mmHg/sec]	-3103 ± 145 [++]	-4189 ± 196 [++]	-3193 ± 171 [++]	-7310 ± 370 [++]	-6468 ± 271 [++]
Tau glantz [msec]	18.5 ± 0.4 [++]	13.7 ± 0.6 [++]	14.2 ± 0.3 [++]	8.9 ± 0.2 [++]	8.9 ± 0.4 [++]
Arterial Elastance [mmHg/ul]	13.6 ± 0.9 [++]	6.7 ± 0.4 [++]	10.6 ± 0.4 [++]	7.1 ± 0.6 [++]	5.4 ± 0.7 [++]

Tabelle 2 zeigt spezifische Parameter der Herzfunktion. [+] = signifikant im Vergleich zur nächsten Gruppe, [*] = signifikant im Vergleich zur übernächsten Gruppe, [†] = signifikant im Vergleich zur drittnächsten Gruppe, [‡] = signifikant im Vergleich zur viertnächsten Gruppe. Mittelwert ± SEM, n=10; [*]: p<0,05; [n.s.]: nicht signifikant.

Die nachfolgende Abbildung zeigt exemplarisch vier repräsentative Druck-Volumen-Schleifen, wie sie während einer Herzkathetermessung standardmäßig aufgezeichnet wurden.

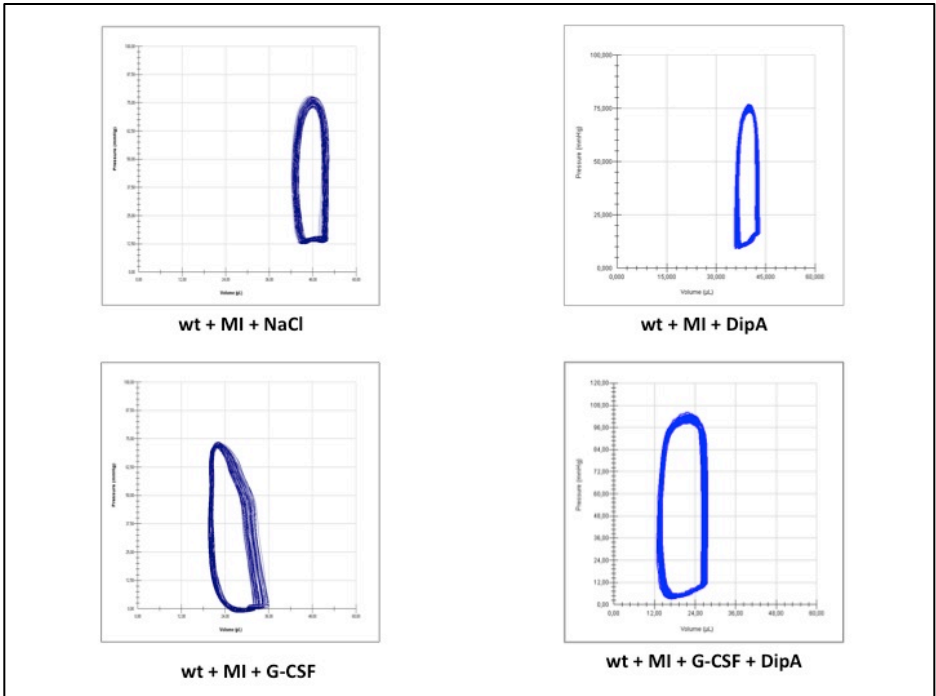


Abbildung 40 zeigt repräsentative Druck-Volumen-Schleifen für die vier verschiedenen Behandlungsgruppen, aufgenommen mit einem Millar-Tip-Kathetersystem.

Schließlich war die Überlebensrate in den Wildtyp-Tieren, die nach induziertem Myokardinfarkt einer Doppelbehandlung mit G-CSF und Diprotin A zugeführt wurden, signifikant verbessert (70%). Nach Applikation des CXCR4 Antagonisten AMD3100 fiel das Gesamtüberleben auf einen Wert von 35%

zurück. Die nachfolgende Abbildung zeigt in einem Kaplan-Meier Diagramm das Überleben der Tiere, aufgeteilt nach den einzelnen Behandlungsgruppen.

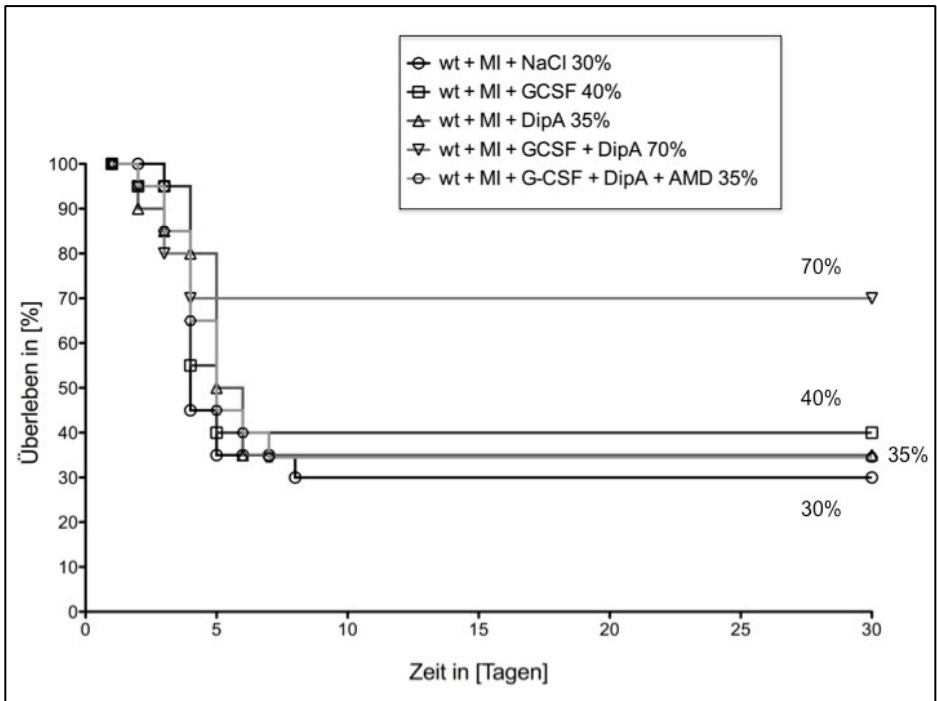


Abbildung 41 zeigt in einem Kaplan-Meier Diagramm das Überleben der einzelnen Gruppen für Wildtyp-Tiere in Tagen nach induziertem Myokardinfarkt. G-CSF und Diprotin A (70%) im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (30%), sowie zu monotherapierten Tieren; eine zusätzliche Behandlung mit AMD3100 führte zu einer Aufhebung der positiven Effekte von Diprotin A und G-CSF in Kombination. Der Wert fiel auf 35% zurück; n=20 pro Gruppe.

Generell war die Mortalität innerhalb der ersten 7 Tage in allen Gruppen am höchsten und nahm dann ebenfalls in allen Gruppen im weiteren Verlauf ab.

Dies ist mit der größten Fragilität des Ventrikels unmittelbar nach einem ischämischen Ereignis zu erklären.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Behandlung mit G-CSF und Diprotin A mit einer signifikant verbesserten Herzfunktion im Mausmodell 30 Tage nach LAD-Okklusion vergesellschaftet ist. Diese mündet letztendlich in ein signifikant verbessertes Überleben. Das vermehrte Stammzellhoming über die stabilisierte SDF-1alpha/CXCR4 Achse scheint hier einen wesentlichen Einfluss auf das Gesamt-Resultat zu haben, was durch die Blockierung der SDF-1alpha/CXCR4 Achse mit AMD3100 gezeigt werden konnte.

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die durchgeführten Experimente zeigen, dass es mit einem dualen Therapieansatz im Mausmodell möglich ist, nach induziertem Myokardinfarkt in ansonsten gesunden Mäusen eine Verbesserung des „Stammzellhomings“, der Herzfunktion und des Überlebens herbeizuführen. Der synergistische Effekt der Therapie basiert einerseits auf einer gesteigerten Freisetzung CD34+/CD45+ Stammzellen aus dem Knochenmark und andererseits auf der vermehrten Einwanderung dieser Zellen in das geschädigte Myokard durch Stabilisierung der SDF-1alpha/CXCR4 Achse, was letztendlich zur Stimulierung endogener, kardialer Stammzellen führt. Im Einzelnen konnten folgende Ergebnisse gefunden werden:

1. Auf molekularer Ebene zeigte sich eine erhöhte Konzentration von SDF-1alpha nach Induktion einer Ischämie am Herzen, sowie ebenfalls im Herzen eine verminderte bis nicht vorhandene Aktivität des Enzymes CD26/DPPIV im Wildtyp nach Applikation von Diprotin A bzw. im CD26/DPPIV Knockout.
2. Die Applikation von G-CSF in Kombination mit dem CD26/DPPIV-Inhibitor Diprotin A bzw. die G-CSF Behandlung des CD26/DPPIV Knockouts führten zu einer signifikant erhöhten Anzahl CD34+/CD45+ Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark im geschädigten Myokard. Neben anderen Subpopulationen zeigte hier vor allem die Population der CD34+/CD45+/CXCR4+ Zellen eine vermehrte Präsenz im Herzmuskel. Darüber hinaus ergab die Doppelbehandlung mit G-CSF und Diprotin A im Wildtyp einen Anstieg der als residente kardiale Stammzellen definierten Populationen der CD34-/CD45-/Sca-1+ bzw. c-kit+ Zellen im geschädigten Myokard.

3. In der kardialen Funktionsdiagnostik zeigte sich für die mit beiden Substanzen (G-CSF und Diprotin A) behandelte Wildtyp-Gruppe eine im Vergleich zur Kontrolle und den nur mit einer Substanz behandelten Tieren signifikant verbesserte Auswurf Funktion, sowie ein erniedrigtes enddiastolisches Volumen. Diese Effekte korrespondierten mit einer histologisch verringerten Infarktgröße 30 Tage post-OP, sowie einer vermehrten Neovaskularisation und verringerten Apoptose in der Grenzzone des Infarktes.
4. Das Überleben war 30 Tage nach induziertem Myokardinfarkt in der G-CSF + Diprotin A Wildtyp-Gruppe signifikant verbessert im Vergleich zu allen anderen Gruppen.
5. Die positiven Effekte des Zell-„Homings“ und Überlebens in der Doppelbehandlung mit G-CSF und Diprotin A waren durch die Applikation eines CXCR4-Antagonisten (AMD3100) im Wildtyp aufhebbar.

Die Arbeit zeigte als erste ihrer Art, dass mit einem dualen Therapieansatz im Mausmodell signifikante Verbesserungen in den Endpunkten Herzfunktion und Überleben erzielt werden können. Durch die Verwendung der pharmakologischen Inhibitoren Diprotin A und AMD3100 und in Kombination mit dem transgenen Mausmodell eines CD26/DPPIV Knockouts stellt diese Arbeit nicht nur die klinischen Auswirkungen im Sinne einer Verbesserung der morphologischen Umbauvorgänge im Myokard nach Induktion eines Myokardinfarktes und einer Verbesserung der kardialen Funktion dar, sondern leistet in der Tat durch die fokussierte Untersuchung der SDF-1alpha/CXCR4-Achse einen Beitrag zum mechanistischen Verständnis der Migration und des „Homings“ von Knochenmarkstammzellen über eben diese Verbindung zwischen zirkulierenden Stamm- und Progenitorzellen und dem infarzierten Myokard. Die folgende Abbildung stellt den Mechanismus der Stammzellmobilisierung und Migration nochmals anschaulich zusammen.

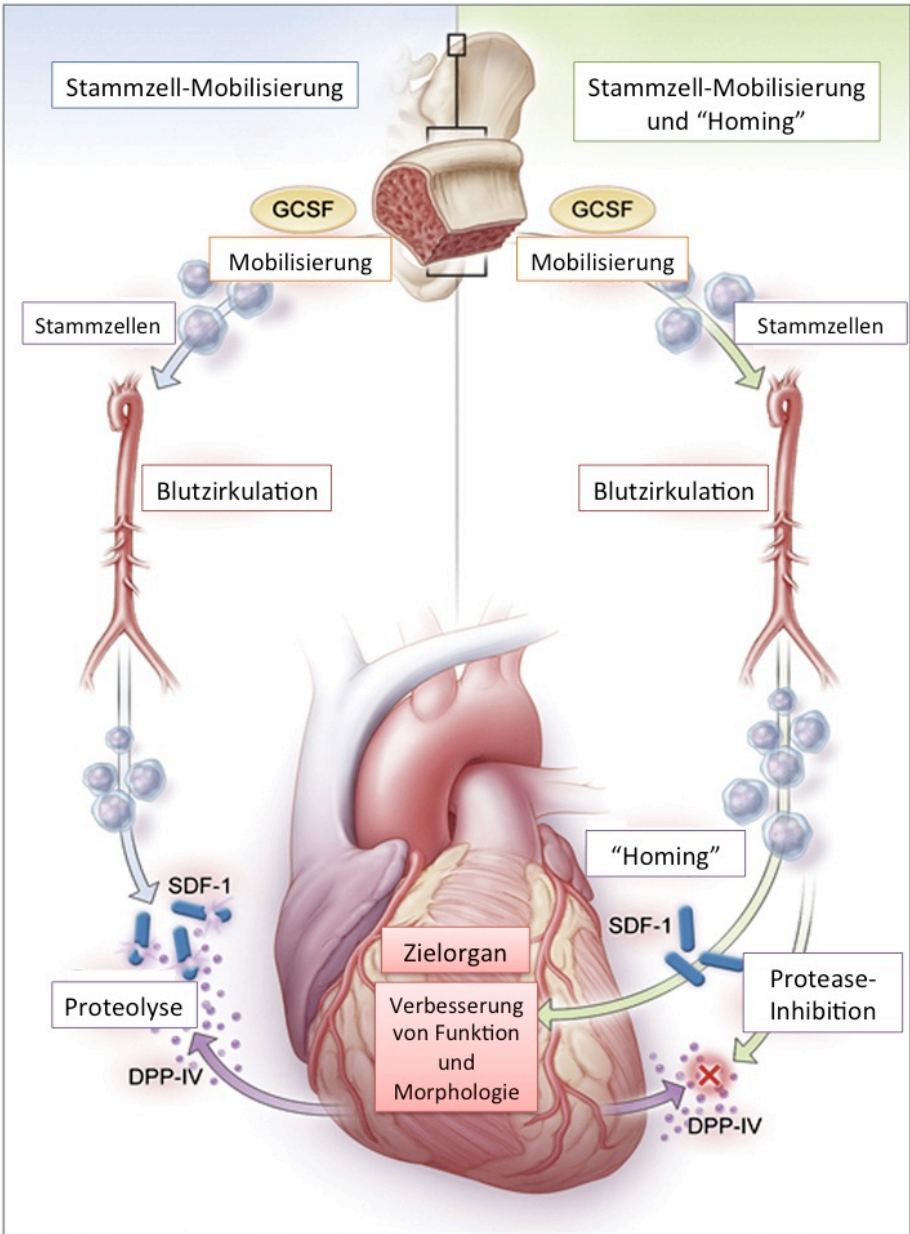


Abbildung 42 zeigt den Mechanismus, wie Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark mobilisiert werden, so in die Blutzirkulation gelangen und über eine

pharmakologische oder genetische Inhibition der CD26/DPPIV Protease und der damit verbundenen Stabilisierung der aktiven Form von SDF-1alpha vermehrt in das geschädigte Myokard einwandern können. Abbildung entnommen aus(124), modifiziert vom Autor der Arbeit.

4.2. Einordnung in den Gesamtzusammenhang

Die Arbeit konnte durch die innovative Kombination von G-CSF als Stammzellmobilisator aus dem Knochenmark und einem CD26/DPPIV Protease-Inhibitor eine signifikante Verbesserung der Herzfunktion und des Überlebens nach induziertem Myokardinfarkt im Mausmodell zeigen, sowie eine gesteigerte Stimulation der residenten, kardialen Stammzellen.

Die Unversehrtheit der SDF-1alpha/CXCR4 Achse spielt hierbei eine prominente Rolle. Dieses Ergebnis stimmt mit der Bedeutung überein, die SDF-1alpha und CXCR4 auch bereits während der Herzentwicklung zukommt. So konnte vor kurzem gezeigt werden, dass die Induktion der SDF-1alpha/CXCR4 Ligand-Rezeptor Achse in embryonalen Stammzellentitäten zu einer gesteigerten Anzahl schlagender Areale führt(99). Der durch lentivirale siRNA erfolgte Knockdown von CXCR4 störte nicht nur die spontane Differenzierung von *embryoid bodies (EB)*, sondern wirkte sich auch auf die Expression kardiogener Marker wie MEF2C, Nkx2.5, MLC2a, MLC2v und kardiales MHC aus. Im Knockdown führte die anschließende Zufuhr von exogenem SDF-1alpha zu keiner Modifikation des beobachteten Kardiogenese-defizitären Phänotyps.

Eine weitere, vor kurzem durchgeführte Studie ergab, dass die beobachteten Verbesserungen in Herzfunktion und Überleben nach Myokardinfarkt in der Tat zu einem wesentlichen Teil auf die direkten Effekte der ins geschädigte Gewebe eingewanderten Progenitorzellen zurückzuführen sind(125). Den Autoren zufolge konnten nach intramuskulärer Injektion von VEGF (vascular endothelial growth factor) zwei klar voneinander unterscheidbare Mechanismen beobachtet werden. Ein zellunabhängiger,

parakriner Mechanismus, ausgelöst durch die kardioprotektiven Signale von VEGF selbst, und ein SDF-1alpha abhängiger Signalweg. Dieser konnte durch die Blockierung von SDF-1alpha selbst unterbrochen werden, und resultierte nicht nur in einer verminderten Anzahl von CXCR4+ und c-kit+ Progenitorzellen im Myokard, sondern auch in einem Verlust kardiotropher Faktoren und einer Herabsetzung von Kardiomyogenese und Angiogenese.

Kürzlich konnte in einem Ischämie/Reperusionsmodell der Ratte gezeigt werden, dass SDF-1alpha Protein, welches molekulargenetisch dergestalt verändert wurde, dass SDF-1alpha resistent war gegenüber dem Abbau durch MMP2 und CD26/DPPIV, bei einmaliger Applikation nach Myokardinfarkt zu einer Verbesserung der kardialen Funktion und der Angiogenese bereits drei Stunden nach Myokardinfarkt führte(126). Der Effekt beruhte vor allem auf dem inhibierten Abbau von SDF-1alpha, da die Angriffspunkte für die entsprechenden Proteasen verändert wurden. Diese Ergebnisse betonen die zentrale Relevanz von SDF-1alpha in der Regeneration des Myokards nach induziertem Infarkt.

Wie von uns und anderen Arbeitsgruppen gezeigt, kann eine kurzzeitige Anhebung des Levels an aktivem SDF-1alpha bereits zu einer gesteigerten Einwanderung von Stamm- und Progenitorzellen in das geschädigte Myokard führen. Der wirkungsvollste Stimulus für eine absolute Anhebung des SDF-1alpha Levels ist die Induktion einer Ischämie. Hier scheint neben anderen Faktoren auch HIF eine entscheidende Rolle zu spielen(127). Wir vermuten, dass für ein gesteigertes „Homing“ von Stammzellen darüberhinaus der vergrößerte Quotient von ungespaltenem, also aktivem und gespaltenem, also inaktiviertem SDF-1alpha Protein einen entscheidenden Vorteil bezüglich der untersuchten Endpunkte, also Herzfunktion und Überleben, aufweist.

Die massenspektrometrische Untersuchung von SDF-1alpha bietet eine robuste und standardisierte Methodik, die es erlaubt, Unterschiede zwischen aktivem und inaktiven SDF-1alpha herauszuarbeiten. Der Nachweis einer Inhibition der Spaltung von rekombinantem SDF-1alpha im Knockout-Modell

oder im Wildtyp nach Zugabe von Diprotin A erhärtete unsere Hypothese, dass eine Blockierung der Aktivität von CD26/DPPIV die Degradierung von SDF-1alpha verhindert.

Es ist hinlänglich bekannt, dass CD26/DPPIV nicht das einzige Enzym ist, welches die Fähigkeit besitzt, SDF-1alpha zu degradieren. Allerdings sind die dafür verantwortlichen Matrix-Metallo-Proteasen hauptsächlich im Knochenmark präsent(128-131). Es findet sich in der Literatur kein entscheidender Hinweis darauf, dass diese Proteasen im geschädigten Myokard eine signifikante Rolle spielen. Somit scheint die SDF-1alpha/CXCR4 Achse eine prominente Rolle in der Rekrutierung und im Homing von Progenitorzellen in das Myokard zu spielen.

Die Umkehrung der positiven Effekte einer Doppelbehandlung mit G-CSF und Diprotin A unter Applikation des CXCR4 Antagonisten AMD3100 erweist sich als weiterer Hinweis auf den zugrundeliegenden Mechanismus für eine gesteigerte Einwanderung von Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark über die Blutzirkulation in das Myokard. Da einige Arbeitsgruppen AMD3100 als Stammzellmobilisator benutzen(109, 132, 133) wurde von uns eine Dosierung auf einem Niveau verwendet, die zwar ausreichend Blockadewirkung über CXCR4 bietet, aber dennoch eine zu geringe Stimulation von CXCR7, um zu einer ausreichenden Mobilisierung von Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark führen zu können. In der von uns gewählten Konzentration (1,25mg/kg KG) bleibt das physiologische Verhalten des Organismus, nämlich die auf ein Minimum begrenzte Freisetzung CD34+/CD45+/CXCR4+ Progenitorzellen, erhalten, was mit 0,5mg/kg KG nicht mehr der Fall war. Mit dem oben Gesagten lässt sich jedenfalls das relativ verminderte Auftreten der CD34+/CD45+/CXCR4+ Subpopulation im Myokard erklären, trotz der leicht erhöhten Werte für CD34+/CD45+ Zellen in toto. Tatsächlich legen neuere Veröffentlichungen nahe, dass AMD3100 den Rezeptorsubtyp Nummer 4 der CXC-Familie zwar blockiert, gleichzeitig aber über CXCR7 zu einer Stimulation

der Stammzellfreisetzung aus dem Knochenmark führt(134, 135). Um aber den gewünschten, mobilisierenden Effekt zu erzielen, muss AMD3100 in weitaus höheren Konzentrationen verwendet werden, als dies in unserer Studie der Fall war. AMD3100 in einer Konzentration von 1,25mg/kg KG ermöglichte deshalb die weitere Aufklärung der mechanistischen Vorgänge, welche letztendlich zu einer Stammzellrekrutierung in das geschädigte Myokard führen.

In unserer Arbeit konnte wir außerdem beobachten, dass die vermehrte Einwanderung aus dem Knochenmark stammender Stamm- und Progenitorzellen mit einer Stimulation und gesteigerten Anzahl residenter, kardialer Progenitorzellen vergesellschaftet ist. Wie eingangs erwähnt, sind diese residenten Stammzellen während der Embryonalentwicklung vor allem als *Embryonale Epikardiale Progenitorzellen* (EPDCs) vorhanden(136, 137). Die Detektion im adulten Organismus gestaltete sich allerdings seit jeher schwierig. Einer englischen Arbeitsgruppe jedoch ist es vor kurzem gelungen, diese EPDCs auch im adulten Herzen nachzuweisen(138). Die Forscher re-exprimierten den EPDCs Marker *Wt1* durch eine Behandlung von *Wt1^{GFP^{Cre}/+}* Mäusen mit Thymosin β 4 und induzierten anschließend einen Myokardinfarkt. Ohne Thymosin β 4 konnte nach Infarzierung eine Hochregulierung des *Wt1*-GFP Markers an Tag 7 post-OP verzeichnet werden, in der Gruppe mit Thymosin β 4 Vorbehandlung allerdings trat dieser Effekt wesentlich früher, nämlich bereits an Tag 2, und verstärkt ein. Dies mündete in einer gesteigerten Anzahl *Wt1+* und *Tbx18+* Zellen an Tag 7 im Vergleich zur Gruppe ohne Vorbehandlung. Eine epikardiale Subpopulation, welche positiv war für *Isl1* und *Nkx2.5*, verzeichnete einen Anstieg in der Zellzahl an Tag 7 post-OP. Darüberhinaus konnten GFP oder YFP markierte Progenitorzellen an Tag 14 als Kardiomyozyten in der Grenzzone des Infarktes verortet werden. Dieser Effekt wurde allerdings nur nach Vorbehandlung mit Thymosin β 4 beobachtet. Über eine Serie von Kontrollexperimenten schlossen die Forscher eine mögliche Zellfusion oder ein Leck des Reportergens aus. Zusammenfassend schlussfolgerten die Autoren der

Arbeit eine Initiierung und Migration residenter kardialer Stammzellen nach Ischämie an den Ort der Schädigung, sowie eine Ausbildung und Transdifferenzierung dieser Zellen hin zu einem kardiomyozytären Phänotyp.

Es kann davon ausgegangen werden, dass Thymosin $\beta 4$ nicht die einzige Substanz ist, welche die genannten Progenitorzellen zu einer signifikanten Beteiligung an endogenen Reparaturmechanismen treibt. Die von uns verwendeten Substanzen G-CSF und Diprotin A und die beschriebenen Beobachtungen der verbesserten Neovaskularisierung und des gesteigerten Stammzell-„Homings“ könnten einen ähnlichen Mechanismus unterstützen. Unsere Daten bieten eine robuste Basis für die weitere Forschung auf diesem Gebiet und die mechanistische Aufklärung der Stimulation residenter, kardialer Progenitorzellen.

4.3. Limitationen der Arbeit

Die verwendeten Versuchstiere sind jung (8-10 Wochen alt), ausschließlich männlich und gesund. Das Aktivierungsmuster aber und die Kapazität der hämatopoietischen Stammzellen verändert sich bzw. nimmt mit dem Alter ab(139, 140). Der Aspekt der Komorbiditäten scheint eine Rolle zu spielen, wenn es um die Auswirkungen dieser Resultate auf Therapieansätze im humanen Patienten geht, da es sich bei diesen Patienten meist eben um komorbide und alte Menschen handelt(88, 91, 141). Artherosklerose und eine daraus resultierende Plaqueruptur scheinen, abgesehen von genetischen Ursachen und seltenen Ausnahmen, der Hauptgrund für einen Herzinfarkt zu sein. Diese Komorbiditäten konnten in Mäusen nicht oder nur schwer simuliert werden. Die Auswirkungen, die ein gestörter Metabolismus im Rahmen einer Fettstoffwechselstörung oder eines erhöhten Blutdrucks auf die Genexpression und die Kompensationsmechanismen des einzelnen Organismus hat, sind nicht ausreichend verstanden, scheinen aber gerade vor dem Hintergrund einer individuellen Therapie mehr und mehr an Bedeutung zu gewinnen.

Beispielsweise ist bekannt, dass Veränderungen im Rahmen des metabolischen Syndroms zu einem Austausch von adultem alpha-MHC durch fetales beta-MHC führt(142). Dies wiederum spielt eine erhebliche Rolle im Expressionsverhalten der einzelnen Zelle. Die Vermutung liegt daher nahe, dass sich damit auch der Effekt anti-apoptotischer oder die Gefäßneubildung stimulierender Substanzen auf diese Zelle verändert, zumal sich gesamte Expressions- und Transkriptionsmuster zu Ungunsten eines Patienten mit metabolischem Syndrom verschieben können. Es wird daher in Zukunft mehr und mehr auf transgene Tiere zurückzugreifen sein.

Darüber hinaus konnten Arbeiten aus dieser Arbeitsgruppe zeigen, dass positive Effekte von G-CSF alleine im Mausmodell nicht oder in nur sehr bedingtem Maße eine Übertragung auf den Menschen erlauben(87, 91, 143, 144). Die Anwendung eines dualen Therapiekonzeptes in dieser Arbeit versuchte diesem Aspekt der translationalen Medizin gerecht zu werden.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit ein permanentes Okklusionsmodell der LAD verwendet, welches nur bedingt den physiologischen Gegebenheiten in einem Patienten entspricht, der nach einem erlittenen Herzinfarkt innerhalb weniger Stunden einer PTCA, einer Lysetherapie oder einer Bypassoperation zugeführt wird. Der Einfluss einer frühzeitigen Reperfusion sollte gerade vor dem Hintergrund einer möglichen Myokardregeneration, als auch der Entstehung von schädigenden Sauerstoffradikalen nicht unterschätzt werden(145, 146). Auf der anderen Seite bietet das von unserer Arbeitsgruppe favorisierte, permanente Okklusionsmodell die Möglichkeit, unter Ausschluss anderer Variablen wie eben gerade einsetzender Reperfusionsschäden eine reproduzierbare und wissenschaftlich belastbare Standardbedingung zu simulieren.

4.4. Ausblick

Es bietet sich in weiteren Versuchen ein Austausch des nicht für den humanen Bereich zugelassenen Diprotin A durch die bereits zur Diabetes-Behandlung verwendeten Gliptine an. Auch hierbei handelt es sich um Inhibitoren der CD26/DPPIV-Protease. Sitagliptin kann direkt am Patienten eingesetzt werden. Eine dazu verfasste, multizentrische Studie, die von unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wird, befindet sich bereits im Progress. Erste Zwischenergebnisse konnten die Wirksamkeit und die Sicherheit der dualen Therapie mit G-CSF und Sitagliptin nach akutem Myokardinfarkt zeigen(147). Die Studie wird die Frage beantworten, ob die positiven Ergebnisse aus den Tierversuchen auf den humanen Patienten übertragbar sind.

Außerdem bildet die neu etablierte Protein-Messung via Massenspektrometrie ein geeignetes Werkzeug zur weiteren, detaillierten Aufklärung molekularbiologischer Mechanismen im Rahmen der Stammzellmigration und des „Stammzellhomings“. Beteiligte, und bisher noch unbekannte Moleküle können damit allein auf Grund ihrer molekularen Größe und der Referenz auf eine entsprechende, elektronische Bibliothek mit großer Sicherheit bestimmt werden.

Der von uns gewählte Ansatz des Stammzell-„Homings“ stellt einen essentiellen Bestandteil der Rekrutierungsvorgänge von Stamm- und Progenitorzellen in das geschädigte Myokard dar. Ein wesentliches Augenmerk sollte sich deshalb in Hinkunft auf die wichtige Rolle der SDF-1alpha/CXCR4-Achse im mechanistischen Konzert dieser Vorgänge richten. Die Ergebnisse bezüglich einer gesteigerten Anzahl residenter, kardialer Stammzellen bieten einen neuen Aspekt des Verständnisses von Signalwegen und Regulationsschritten und könnten durch genaue Aufklärung der Wirkmechanismen einen Beitrag zur Verbesserung der gegenwärtigen Stammzelltherapie leisten.

5. Zusammenfassung

In westlichen Industrienationen stellt der Tod durch kardiovaskuläre Erkrankungen immer noch die Haupttodesursache dar. Die Stammzelltherapie nach akutem Myokardinfarkt ist eine vielversprechende Alternative zur konventionellen, medikamentösen oder Katheter-gestützten Intervention. Da embryonale oder induzierte pluripotente Stammzellen immer noch Hindernisse für einen klinischen Einsatz wie beispielsweise Teratombildung und Abstoßungsreaktionen zu adressieren haben, bietet die Verwendung von sogenannten adulten Stamm- und Progenitorzellen eine schnelle und sichere Therapieoption. Die parakrinen, anti-apoptischen und angiogenetischen Effekte dieser Zellen sind dabei seit langem bekannt. Wichtig für die Ansiedelung zirkulierender Stammzellen im geschädigten Myokard ist dabei besonders die SDF-1alpha/CXCR4 Achse, über die eine Einwanderung in das Gewebe stattfindet. Ziel der Arbeit war es, einerseits mehr Stammzellen aus dem Knochenmark in das Blut zu mobilisieren, und andererseits durch Stabilisierung des Proteins SDF-1alpha die Ansiedelung („Homing“) dieser Zellen im Myokard zu verbessern. Wir verwendeten deshalb das Cytokin G-CSF als Stammzellmobilisator und Diprotin A als pharmakologischen Inhibitor der für den Abbau von SDF-1alpha verantwortlichen Protease CD26/DPPIV bzw. ein genetisches CD26/DPPIV-Knockoutmodell.

Wir induzierten einen Myokardinfarkt in männlichen, 8-10 Wochen alten C57/Bl6 Wildtyp-Mäusen oder CD26-Knockout Tieren. Danach erfolgte eine Therapie mit G-CSF und/oder Diprotin A für 6 Tage. Am Tag 2 post-OP ließ sich eine erhöhte Konzentration von SDF-1alpha Protein in allen Gruppen im Vergleich zur Schein-OP messen. In den Gruppen mit pharmakologischer oder genetischer Inhibition von CD26/DPPIV zeigte sich eine signifikant erniedrigte Enzymaktivität der Protease im Herzen. In der Massenspektrometrie wurde eine Stabilisierung der ungespaltenen, aktiven Form von SDF-1alpha gefunden. Die

durchflusszytometrischen Untersuchungen bestätigten ein gesteigertes „Homing“ aller relevanten Stammzellpopulationen (CD34+/CD45+/CXCR4+, CD34+/CD45+/c-kit+, CD34+/CD45+/Sca1+) in den Gruppen mit Doppelbehandlung oder Knockout plus G-CSF. Diese Effekte waren durch Applikation des CXCR4-Rezeptorblockers AMD3100 in den doppelt behandelten Gruppen umkehrbar, was die spezifische Wirkungsweise dieses dualen Ansatzes über die SDF-1alpha/CXCR4 Achse darstellen konnte. Es zeigte sich eine verminderte Apoptose an Tag 2 post-OP, eine vermehrte Vaskularisierung der Infarktgrenzzone 6 Tage post-OP und eine Verkleinerung der Infarktgröße sowie eine verstärkte Wanddicke des linken Ventrikels 30 Tage post-OP. Das Überleben in der mit G-CSF und Diprotin A behandelten Gruppe war 30 Tage post-OP signifikant verbessert. In den Wildtyp-Gruppen fand sich eine gesteigerte Anzahl residenter, kardialer Stammzellen nach Applikation von G-CSF und Diprotin A.

Dieser von uns gewählte, duale Ansatz und die daraus resultierende Stabilisierung der SDF-1alpha/CXCR4 Achse zeigen im Vergleich zu Kontrolle und monotherapierten Tieren, sowie im Vergleich zu doppelt behandelten Gruppen mit einer zusätzlichen Gabe von AMD3100 deutliche Verbesserungen in Morphologie und kardialer Funktion, und bieten deshalb ein neuartiges und innovatives Therapiekonzept für die Behandlung von Patienten nach akutem Myokardinfarkt an.

6. Literaturverzeichnis

1. Todesursachen. Statistisches Bundesamt. 2010.
2. Haude M, Schulz R, Heusch G, Erbel R. Overview of contemporary reperfusion strategies in acute ST-elevation myocardial infarction. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2005;3(4):667-80.
3. Shah SR, Hochberg CP, Pinto DS, Gibson CM. Reperfusion strategies for ST-elevation myocardial infarction. *Curr Cardiol Rep.* 2007;9(4):281-8.
4. Eitel I, Franke A, Schuler G, Thiele H. ST-segment resolution and prognosis after facilitated versus primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction: a meta-analysis. *Clin Res Cardiol.* 2010;99(1):1-11.
5. Organtransplantationen. Statistisches Bundesamt. 2009.
6. Holland DJ, Kumbhani DJ, Ahmed SH, Marwick TH. Effects of treatment on exercise tolerance, cardiac function, and mortality in heart failure with preserved ejection fraction. A meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(16):1676-86.
7. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145-7.
8. Blum B, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Adv Cancer Res.* 2008;100:133-58.
9. Fong CY, Gauthaman K, Bongso A. Teratomas from pluripotent stem cells: A clinical hurdle. *J Cell Biochem.* 2010;111(4):769-81.
10. Knoepfler PS. Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. *Stem Cells.* 2009;27(5):1050-6. PMID: 2733374.
11. Ben-David U, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(4):268-77.
12. Wobus AM. The Janus face of pluripotent stem cells--connection between pluripotency and tumourigenicity. *Bioessays.* 2010;32(11):993-1002.
13. David R, Brenner C, Stieber J, Schwarz F, Brunner S, Vollmer M, et al. MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation through Dkk-1-mediated blockade of Wnt-signalling. *Nat Cell Biol.* 2008;10(3):338-45.
14. David R, Groebner M, Franz WM. Magnetic cell sorting purification of differentiated embryonic stem cells stably expressing truncated human CD4 as surface marker. *Stem Cells.* 2005;23(4):477-82.
15. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-76.
16. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007;131(5):861-72.

17. Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. 2008;451(7175):141-6.
18. Pan GJ, Chang ZY, Scholer HR, Pei D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res*. 2002;12(5-6):321-9.
19. Kang J, Shakya A, Tantin D. Stem cells, stress, metabolism and cancer: a drama in two Octs. *Trends Biochem Sci*. 2009;34(10):491-9.
20. Albiñá A, Johnsen JI, Henriksson MA. MYC in oncogenesis and as a target for cancer therapies. *Adv Cancer Res*. 2010;107:163-224.
21. Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*. 2008;454(7204):646-50.
22. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hamalainen R, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2009;458(7239):766-70.
23. Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*. 2009;458(7239):771-5. PMID: 2667910.
24. Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011;474(7350):212-5.
25. Apostolou E, Hochedlinger K. Stem cells: iPS cells under attack. *Nature*. 2011;474(7350):165-6.
26. Wu SM, Hochedlinger K. Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nat Cell Biol*. 2011;13(5):497-505.
27. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 1996;273(5272):242-5.
28. Marciniak-Czochra A, Stiehl T, Ho AD, Jager W, Wagner W. Modeling of asymmetric cell division in hematopoietic stem cells--regulation of self-renewal is essential for efficient repopulation. *Stem Cells Dev*. 2009;18(3):377-85.
29. Cheung AM, Kwong YL, Liang R, Leung AY. Stem cell model of hematopoiesis. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2006;1(3):305-15.
30. Chen FM, Wu LA, Zhang M, Zhang R, Sun HH. Homing of endogenous stem/progenitor cells for in situ tissue regeneration: Promises, strategies, and translational perspectives. *Biomaterials*. 2011;32(12):3189-209.
31. Sohni A, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011;24(1):3-11.
32. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997;276(5309):71-4.
33. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.

34. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
35. Rose RA, Jiang H, Wang X, Helke S, Tsoporis JN, Gong N, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells express cardiac-specific markers, retain the stromal phenotype, and do not become functional cardiomyocytes in vitro. *Stem Cells*. 2008;26(11):2884-92.
36. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105(1):93-8.
37. Hattan N, Kawaguchi H, Ando K, Kuwabara E, Fujita J, Murata M, et al. Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovasc Res*. 2005;65(2):334-44.
38. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 2004;428(6983):664-8.
39. Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*. 2003;425(6961):968-73.
40. Mirosou M, Zhang Z, Deb A, Zhang L, Gnecci M, Noiseux N, et al. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(5):1643-8. PMID: 1785280.
41. Gallo MP, Ramella R, Alloati G, Penna C, Pagliaro P, Marcantoni A, et al. Limited plasticity of mesenchymal stem cells cocultured with adult cardiomyocytes. *J Cell Biochem*. 2007;100(1):86-99.
42. Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, Ahlenius H, Sonu R, Wagers AJ, et al. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(26):9194-9. PMID: 1153718.
43. Medvinsky A, Rybtsov S, Taoudi S. Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. *Development*. 2011;138(6):1017-31.
44. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005;121(7):1109-21.
45. Foudi A, Hochedlinger K, Van Buren D, Schindler JW, Jaenisch R, Carey V, et al. Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2009;27(1):84-90. PMID: 2805441.
46. Taoudi S, Gonneau C, Moore K, Sheridan JM, Blackburn CC, Taylor E, et al. Extensive hematopoietic stem cell generation in the AGM region via maturation of VE-cadherin+CD45+ pre-definitive HSCs. *Cell Stem Cell*. 2008;3(1):99-108.

47. Morita Y, Ema H, Nakauchi H. Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment. *J Exp Med.* 2010;207(6):1173-82. PMID: 2882827.
48. Hock H. Some hematopoietic stem cells are more equal than others. *J Exp Med.* 2010;207(6):1127-30. PMID: 2882834.
49. Engelhardt M, Lubbert M, Guo Y. CD34(+) or CD34(-): which is the more primitive? *Leukemia.* 2002;16(9):1603-8.
50. Orford KW, Scadden DT. Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat Rev Genet.* 2008;9(2):115-28.
51. Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, et al. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell.* 2008;135(6):1118-29.
52. Zak R. Development and proliferative capacity of cardiac muscle cells. *Circ Res.* 1974;35(2):suppl II:17-26.
53. Borchardt T, Braun T. Cardiovascular regeneration in non-mammalian model systems: what are the differences between newts and man? *Thromb Haemost.* 2007;98(2):311-8.
54. Gonzalez-Rosa JM, Martin V, Peralta M, Torres M, Mercader N. Extensive scar formation and regression during heart regeneration after cryoinjury in zebrafish. *Development.* 2011;138(9):1663-74.
55. Jopling C, Sleep E, Raya M, Marti M, Raya A, Belmonte JC. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature.* 2010;464(7288):606-9. PMID: 2846535.
56. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science.* 2009;324(5923):98-102. PMID: 2991140.
57. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003;114(6):763-76.
58. Kajstura J, Gurusamy N, Ogorek B, Goichberg P, Clavo-Rondon C, Hosoda T, et al. Myocyte turnover in the aging human heart. *Circ Res.* 2010;107(11):1374-86.
59. Hsieh PC, Segers VF, Davis ME, MacGillivray C, Gannon J, Molkentin JD, et al. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med.* 2007;13(8):970-4. PMID: 2754571.
60. Chong JJ, Chandrakanthan V, Xaymardan M, Asli NS, Li J, Ahmed I, et al. Adult Cardiac-Resident MSC-like Stem Cells with a Proepicardial Origin. *Cell Stem Cell.* 2011;9(6):527-40.
61. Porrello ER, Olson EN. Building a new heart from old parts: stem cell turnover in the aging heart. *Circ Res.* 2010;107(11):1292-4.
62. Mansour S, Roy DC, Bouchard V, Stevens LM, Gobeil F, Rivard A, et al. One-Year Safety Analysis of the COMPARE-AMI Trial: Comparison of

Intracoronary Injection of CD133 Bone Marrow Stem Cells to Placebo in Patients after Acute Myocardial Infarction and Left Ventricular Dysfunction. *Bone Marrow Res.* 2011;2011:385124. PMID: 3200002.

63. Tendera M, Wojakowski W, Ruzyllo W, Chojnowska L, Kepka C, Tracz W, et al. Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34+CXCR4+ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial. *Eur Heart J.* 2009;30(11):1313-21.

64. Mansour S, Roy DC, Bouchard V, Nguyen BK, Stevens LM, Gobeil F, et al. COMPARE-AMI trial: comparison of intracoronary injection of CD133+ bone marrow stem cells to placebo in patients after acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction: study rationale and design. *J Cardiovasc Transl Res.* 2010;3(2):153-9.

65. Erbs S, Linke A, Schachinger V, Assmus B, Thiele H, Diederich KW, et al. Restoration of microvascular function in the infarct-related artery by intracoronary transplantation of bone marrow progenitor cells in patients with acute myocardial infarction: the Doppler Substudy of the Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction (REPAIR-AMI) trial. *Circulation.* 2007;116(4):366-74.

66. Gyongyosi M, Lang I, Dettke M, Beran G, Graf S, Sochor H, et al. Combined delivery approach of bone marrow mononuclear stem cells early and late after myocardial infarction: the MYSTAR prospective, randomized study. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2009;6(1):70-81.

67. Schachinger V, Assmus B, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, et al. Intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells abrogates adverse left ventricular remodelling post-acute myocardial infarction: insights from the reinfusion of enriched progenitor cells and infarct remodelling in acute myocardial infarction (REPAIR-AMI) trial. *Eur J Heart Fail.* 2009;11(10):973-9.

68. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355(12):1210-21.

69. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet.* 2006;367(9505):113-21.

70. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355(12):1199-209.

71. Huikuri HV, Kervinen K, Niemela M, Ylitalo K, Saily M, Koistinen P, et al. Effects of intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells on left

ventricular function, arrhythmia risk profile, and restenosis after thrombolytic therapy of acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2008;29(22):2723-32.

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

73. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol.* 2002;3(7):687-94.

74. Harada M, Qin Y, Takano H, Minamino T, Zou Y, Toko H, et al. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med.* 2005;11(3):305-11.

75. Takano H, Qin Y, Hasegawa H, Ueda K, Niitsuma Y, Ohtsuka M, et al. Effects of G-CSF on left ventricular remodeling and heart failure after acute myocardial infarction. *J Mol Med.* 2006;84(3):185-93.

76. Kojima H, Otani A, Oishi A, Makiyama Y, Nakagawa S, Yoshimura N. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates oxidative stress-induced apoptosis in vascular endothelial cells and exhibits functional and morphologic protective effect in oxygen-induced retinopathy. *Blood.* 2011;117(3):1091-100.

77. Nguyen YK. Granulocyte colony stimulating factor. *J Fla Med Assoc.* 1994;81(7):467-9.

78. Lopez AF, Hercus TR, Ekert P, Littler DR, Guthridge M, Thomas D, et al. Molecular basis of cytokine receptor activation. *IUBMB Life.* 2010;62(7):509-18.

79. Beekman R, Touw IP. G-CSF and its receptor in myeloid malignancy. *Blood.* 2010;115(25):5131-6.

80. Yang J, van Oosten AL, Theunissen TW, Guo G, Silva JC, Smith A. Stat3 activation is limiting for reprogramming to ground state pluripotency. *Cell Stem Cell.* 2010;7(3):319-28.

81. Christopherson KW, 2nd, Uralil SE, Porecha NK, Zabriskie RC, Kidd SM, Ramin SM. G-CSF- and GM-CSF-induced upregulation of CD26 peptidase downregulates the functional chemotactic response of CD34+CD38- human cord blood hematopoietic cells. *Exp Hematol.* 2006;34(8):1060-8.

82. Nervi B, Link DC, DiPersio JF. Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *J Cell Biochem.* 2006;99(3):690-705.

83. Lo Celso C, Scadden DT. The haematopoietic stem cell niche at a glance. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 21):3529-35. PMID: 3215569.

84. McCollough ML, Grimwood RE, Grabski WJ. Dominant dystrophic epidermolysis bullosa with intraepidermal type VII collagen. *J Am Acad Dermatol.* 1991;24(3):512.

85. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature.* 2010;466(7308):829-34.

86. Ferraro F, Celso CL, Scadden D. Adult stem cells and their niches. *Adv Exp Med Biol.* 2010;695:155-68.
87. Engelmann MG, Theiss HD, Hennig-Theiss C, Huber A, Wintersperger BJ, Werle-Ruedinger AE, et al. Autologous bone marrow stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor after subacute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing late revascularization: final results from the G-CSF-STEMI (Granulocyte Colony-Stimulating Factor ST-Segment Elevation Myocardial Infarction) trial. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(8):1712-21.
88. Engelmann MG, Theiss HD, Theiss C, Henschel V, Huber A, Wintersperger BJ, et al. G-CSF in patients suffering from late revascularised ST elevation myocardial infarction: final 1-year-results of the G-CSF-STEMI Trial. *Int J Cardiol.* 2010;144(3):399-404.
89. Zohlnhofer D, Ott I, Mehilli J, Schomig K, Michalk F, Ibrahim T, et al. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2006;295(9):1003-10.
90. Ripa RS, Jorgensen E, Wang Y, Thune JJ, Nilsson JC, Sondergaard L, et al. Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte-colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute ST-elevation myocardial infarction: result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial. *Circulation.* 2006;113(16):1983-92.
91. Engelmann MG, Theiss HD, Theiss C, Huber A, Wintersperger BJ, Werle-Ruedinger AE, et al. G-CSF in patients suffering from late revascularized ST elevation myocardial infarction: analysis on the timing of G-CSF administration. *Exp Hematol.* 2008;36(6):703-9.
92. Kim CH, Broxmeyer HE. In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment. *Blood.* 1998;91(1):100-10.
93. Cui X, Chen J, Zacharek A, Li Y, Roberts C, Kapke A, et al. Nitric oxide donor upregulation of stromal cell-derived factor-1/chemokine (CXC motif) receptor 4 enhances bone marrow stromal cell migration into ischemic brain after stroke. *Stem Cells.* 2007;25(11):2777-85. PMID: 2792206.
94. Askari AT, Penn MS. Stromal cell-derived factor-1 mediates stem cell homing and tissue regeneration. *Discov Med.* 2003;3(18):46-7.
95. Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet.* 2003;362(9385):697-703.
96. Caruz A, Samsom M, Alonso JM, Alcamí J, Baleux F, Virelizier JL, et al. Genomic organization and promoter characterization of human CXCR4 gene. *FEBS Lett.* 1998;426(2):271-8.
97. Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med.* 1997;185(1):111-20. PMID: 2196104.

98. Molyneaux KA, Zinszner H, Kunwar PS, Schaible K, Stebler J, Sunshine MJ, et al. The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development*. 2003;130(18):4279-86.
99. Chiriac A, Terzic A, Park S, Ikeda Y, Faustino R, Nelson TJ. SDF-1-enhanced cardiogenesis requires CXCR4 induction in pluripotent stem cells. *J Cardiovasc Transl Res*. 2010;3(6):674-82.
100. Bongers J, Lambros T, Ahmad M, Heimer EP. Kinetics of dipeptidyl peptidase IV proteolysis of growth hormone-releasing factor and analogs. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1122(2):147-53.
101. Christopherson KW, 2nd, Cooper S, Broxmeyer HE. Cell surface peptidase CD26/DPPIV mediates G-CSF mobilization of mouse progenitor cells. *Blood*. 2003;101(12):4680-6.
102. Christopherson KW, 2nd, Hangoc G, Broxmeyer HE. Cell surface peptidase CD26/dipeptidylpeptidase IV regulates CXCL12/stromal cell-derived factor-1 alpha-mediated chemotaxis of human cord blood CD34+ progenitor cells. *J Immunol*. 2002;169(12):7000-8.
103. Christopherson KW, 2nd, Hangoc G, Mantel CR, Broxmeyer HE. Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26. *Science*. 2004;305(5686):1000-3.
104. Ghadge SK, Muhlstedt S, Ozcelik C, Bader M. SDF-1alpha as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction. *Pharmacol Ther*. 2011;129(1):97-108.
105. (NIH) USNIoH. Publication No. 85-23.
106. Pusic I, DiPersio JF. Update on clinical experience with AMD3100, an SDF-1/CXCL12-CXCR4 inhibitor, in mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells. *Curr Opin Hematol*. 2010;17(4):319-26.
107. Pulliam AC, Hobson MJ, Ciccone SL, Li Y, Chen S, Srouf EF, et al. AMD3100 synergizes with G-CSF to mobilize repopulating stem cells in Fanconi anemia knockout mice. *Exp Hematol*. 2008;36(9):1084-90.
108. Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S, Campbell T, Ito S, Mantel C. AMD3100 and CD26 modulate mobilization, engraftment, and survival of hematopoietic stem and progenitor cells mediated by the SDF-1/CXCL12-CXCR4 axis. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1106:1-19.
109. Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E, Wood B, Hubel K, Cooper S, et al. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood*. 2003;102(8):2728-30.
110. Theiss HD, Vallaster M, Rischpler C, Krieg L, Zaruba MM, Brunner S, et al. Dual stem cell therapy after myocardial infarction acts specifically by enhanced homing via the SDF-1/CXCR4 axis. *Stem Cell Res*. 2011;7(3):244-55.
111. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182(3):311-22.
112. Newman PJ. The biology of PECAM-1. *J Clin Invest*. 1997;99(1):3-8. PMID: 507759.

113. Ismail JA, Poppa V, Kemper LE, Scatena M, Giachelli CM, Coffin JD, et al. Immunohistologic labeling of murine endothelium. *Cardiovasc Pathol.* 2003;12(2):82-90.
114. Mikaelian I, Nanney LB, Parman KS, Kusewitt DF, Ward JM, Naf D, et al. Antibodies that label paraffin-embedded mouse tissues: a collaborative endeavor. *Toxicol Pathol.* 2004;32(2):181-91.
115. Lan K, Verma SC, Murakami M, Bajaj B, Robertson ES. Isolation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). *Curr Protoc Microbiol.* 2007;Appendix 4:Appendix 4C.
116. Zhou YY, Wang SQ, Zhu WZ, Chruscinski A, Kobilka BK, Ziman B, et al. Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes: methods for cellular genetic physiology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279(1):H429-36.
117. Scharpe S, De Meester I, Vanhoof G, Hendriks D, van Sande M, Van Camp K, et al. Assay of dipeptidyl peptidase IV in serum by fluorometry of 4-methoxy-2-naphthylamine. *Clin Chem.* 1988;34(11):2299-301.
118. Busso N, Wagtmann N, Herling C, Chobaz-Peclat V, Bischof-Delaloye A, So A, et al. Circulating CD26 is negatively associated with inflammation in human and experimental arthritis. *Am J Pathol.* 2005;166(2):433-42. PMID: 1602320.
119. Naiyer AJ, Jo DY, Ahn J, Mohle R, Peichev M, Lam G, et al. Stromal derived factor-1-induced chemokinesis of cord blood CD34(+) cells (long-term culture-initiating cells) through endothelial cells is mediated by E-selectin. *Blood.* 1999;94(12):4011-9.
120. Charwat S, Gyongyosi M, Lang I, Graf S, Beran G, Hemetsberger R, et al. Role of adult bone marrow stem cells in the repair of ischemic myocardium: current state of the art. *Exp Hematol.* 2008;36(6):672-80.
121. Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, Hangoc G, Cooper S, Plett PA, et al. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med.* 2005;201(8):1307-18. PMID: 2213145.
122. Sivan-Loukianova E, Awad OA, Stepanovic V, Bickenbach J, Schatteman GC. CD34+ blood cells accelerate vascularization and healing of diabetic mouse skin wounds. *J Vasc Res.* 2003;40(4):368-77.
123. Chicha L, Feki A, Boni A, Irion O, Hovatta O, Jaconi M. Human pluripotent stem cells differentiated in fully defined medium generate hematopoietic CD34- and CD34+ progenitors with distinct characteristics. *PLoS One.* 2011;6(2):e14733. PMID: 3045374.
124. Steinhauser ML, Lee RT. Cardiovascular regeneration: pushing and pulling on progenitors. *Cell Stem Cell.* 2009;4(4):277-8.
125. Zisa D, Shabbir A, Mastri M, Taylor T, Aleksic I, McDaniel M, et al. Intramuscular VEGF activates an SDF1-dependent progenitor cell cascade and an SDF1-independent muscle paracrine cascade for cardiac repair. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301(6):H2422-32. PMID: 3233810.

126. Kanki S, Segers VF, Wu W, Kakkar R, Gannon J, Sys SU, et al. Stromal cell-derived factor-1 retention and cardioprotection for ischemic myocardium. *Circ Heart Fail.* 2011;4(4):509-18.
127. Shohet RV, Garcia JA. Keeping the engine primed: HIF factors as key regulators of cardiac metabolism and angiogenesis during ischemia. *J Mol Med.* 2007;85(12):1309-15.
128. Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, et al. Peripheral blood levels of matrix metalloproteases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32(2):368-72.
129. Peterson JT, Li H, Dillon L, Bryant JW. Evolution of matrix metalloprotease and tissue inhibitor expression during heart failure progression in the infarcted rat. *Cardiovasc Res.* 2000;46(2):307-15.
130. De La Luz Sierra M, Yang F, Narazaki M, Salvucci O, Davis D, Yarchoan R, et al. Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity. *Blood.* 2004;103(7):2452-9.
131. Sauve M, Ban K, Momen MA, Zhou YQ, Henkelman RM, Husain M, et al. Genetic deletion or pharmacological inhibition of dipeptidyl peptidase-4 improves cardiovascular outcomes after myocardial infarction in mice. *Diabetes.* 2010;59(4):1063-73. PMID: 2844815.
132. Mohty M, Duarte RF, Croockewit S, Hubel K, Kvalheim G, Russell N. The role of plerixafor in optimizing peripheral blood stem cell mobilization for autologous stem cell transplantation. *Leukemia.* 2011;25(1):1-6.
133. De Clercq E. The AMD3100 story: the path to the discovery of a stem cell mobilizer (Mozobil). *Biochem Pharmacol.* 2009;77(11):1655-64.
134. Hartmann TN, Grabovsky V, Pasvolsky R, Shulman Z, Buss EC, Spiegel A, et al. A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34+ cells. *J Leukoc Biol.* 2008;84(4):1130-40.
135. Kalatskaya I, Berchiche YA, Gravel S, Limberg BJ, Rosenbaum JS, Heveker N. AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Mol Pharmacol.* 2009;75(5):1240-7.
136. Cai CL, Martin JC, Sun Y, Cui L, Wang L, Ouyang K, et al. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature.* 2008;454(7200):104-8.
137. Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, Wu SM, Domian I, Rivera-Feliciano J, et al. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature.* 2008;454(7200):109-13. PMID: 2574791.
138. Smart N, Bollini S, Dube KN, Vieira JM, Zhou B, Davidson S, et al. De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. *Nature.* 2011;474(7353):640-4.
139. Rossi DJ, Jamieson CH, Weissman IL. Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell.* 2008;132(4):681-96.
140. Beerman I, Bhattacharya D, Zandi S, Sigvardsson M, Weissman IL, Bryder D, et al. Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic

lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(12):5465-70. PMID: 2851806.

141. Mangge H, Almer G, Truschnig-Wilders M, Schmidt A, Gasser R, Fuchs D. Inflammation, adiponectin, obesity and cardiovascular risk. *Curr Med Chem*. 2010;17(36):4511-20.

142. Hang CT, Yang J, Han P, Cheng HL, Shang C, Ashley E, et al. Chromatin regulation by Brg1 underlies heart muscle development and disease. *Nature*. 2010;466(7302):62-7. PMID: 2898892.

143. Brunner S, Huber BC, Fischer R, Groebner M, Hacker M, David R, et al. G-CSF treatment after myocardial infarction: impact on bone marrow-derived vs cardiac progenitor cells. *Exp Hematol*. 2008;36(6):695-702.

144. Deindl E, Zaruba MM, Brunner S, Huber B, Mehl U, Assmann G, et al. G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis. *FASEB J*. 2006;20(7):956-8.

145. Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovasc Res*. 2009;81(3):482-90. PMID: 2639132.

146. Hori M, Nishida K. Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2009;81(3):457-64.

147. Theiss HD, Brenner C, Engelmann MG, Zaruba MM, Huber B, Henschel V, et al. Safety and efficacy of SITAgliptin plus GRanulocyte-colony-stimulating factor in patients suffering from Acute Myocardial Infarction (SITAGRAMI-Trial)--rationale, design and first interim analysis. *Int J Cardiol*. 2010;145(2):282-4.

7. Veröffentlichungen

7.1. Publikationen in Fachzeitschriften

Teile der Arbeit wurden in folgenden wissenschaftlichen Magazinen veröffentlicht:

- Migration of bone marrow-derived cells and improved perfusion after treatment with Erythropoietin in a murine model of myocardial infarction.
Brunner S, Huber BC, Weinberger T, Vallaster M, Wollenweber T, Gerbitz A, Hacker M, Franz WM.
J Cell Mol Med. 2012 Jan; 16(1) 152-9. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01286.x.
- Dual stem cell therapy after myocardial infarction acts specifically by enhanced homing via the SDF-1/CXCR4 axis.
Theiss HD, Vallaster M, Rischpler C, Krieg L, Zaruba MM, Brunner S, Vanchev Y, Fischer R, Gröbner M, Huber B, Wollenweber T, Assmann G, Mueller-Hoecker J, Hacker M, Franz WM.
Stem Cell Res. 2011 Nov;7(3):244-55
- Parathyroid hormone is a DPP-IV inhibitor and increases SDF-1-driven homing of CXCR4(+) stem cells into the ischaemic heart.
Huber BC, Brunner S, Segeth A, Nathan P, Fischer R, Zaruba MM, Vallaster M, Theiss HD, David R, Gerbitz A, Franz WM.
Cardiovasc Res. 2011 Jun 1;90(3):529-37. Epub 2011 Jan 18.
- Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction.
Zaruba MM, Theiss HD, Vallaster M, Mehl U, Brunner S, David R, Fischer R, Krieg L, Hirsch E, Huber B, Nathan P, Israel L, Imhof A, Herbach N, Assmann G, Wanke R, Mueller-Hoecker J, Steinbeck G, Franz WM.
Cell Stem Cell. 2009 Apr 3;4(4):313-23.
- Parathyroid hormone effectively induces mobilization of progenitor cells without depletion of bone marrow.
Brunner S, Zaruba MM, Huber B, David R, Vallaster M, Assmann G, Mueller-Hoecker J, Franz WM.
Exp Hematol. 2008 Sep;36(9):1157-66. Epub 2008 May 27.
- G-CSF treatment after myocardial infarction: impact on bone marrow-derived vs cardiac progenitor cells.
Brunner S, Huber BC, Fischer R, Groebner M, Hacker M, David R, Zaruba MM, Vallaster M, Rischpler C, Wilke A, Gerbitz A, Franz WM.
Exp Hematol. 2008 Jun;36(6):695-702. Epub 2008 Mar 17.

7.2. Posterpräsentationen

Teile der Arbeit wurden auf wissenschaftlichen Kongressen vorgestellt:

- Brunner S, Theiss HD, Leiss M, Fischer R, Vallaster M, Huber B, Keithahn A, Sauter M, Klingel K, Franz WM. *Circulation and homing of CD34⁺ progenitor cell populations after coxsackievirus B3-induced cardiomyopathy in mice*. Proceedings of the 6th Dutch-German Meeting on Molecular Cardiology 2008.
- Zaruba MM, Mehl U, Theiss HD, Vallaster M, Brunner S, Huber B, David R, Assmann G, Müller-Höcker J, Franz WM. *G-CSF treatment of CD26 knock out mice facilitates homing of CD34⁺/CXCR4⁺ stem cells and attenuates late ischemic cardiomyopathy*. Eur Heart J 2008; 29 (Suppl. 1). P595.
- Vallaster M, Theiss HD, Brunner S, David R, Hirsch E, Zaruba MM and Franz WM. *The effect of combined application of G-CSF and a CD26-inhibitor on stem cell homing, cardiac function and survival after myocardial infarction in mice*. Proceedings of the 3. Congress of the German Stem Cell Society, Stuttgart, 2008.
- Zaruba MM, Mehl U, Theiss HD, David R, Vallaster M, Brunner S, Huber B, Groebner M, Assmann G, Mueller-Hoecker J and Wolfgang-Michael Franz *Loss of CD 26 Function Accumulates Cardiac SDF-1 Protein Yielding Enhanced Stem Cell Homing and Attenuation of Ischemic Cardiomyopathy after Treatment with G-CSF*. Circulation Oct 2008; 118: S_491
- Brunner S, Theiss HD, Leiss M, Fischer R, Vallaster M, Huber BC, Keithahn A, Sauter M, Klingel K and Franz WM. *G-CSF Treatment Improves Cardiac Function In postmyocarditic Cardiomyopathy By Enhanced Circulation And Homing Of CD34⁺ Progenitor Cell Populations*. Circulation Oct 2008; 118: S_876.
- Theiss HD, Vallaster M, Brunner S, Hirsch E, David R, Zaruba MM and Franz.WM. *Combined Application Of G-CSF and a CD26-inhibitor Improves Stem Cell Homing, Cardiac Function and Survival After Myocardial Infarction in a Mouse Model*. Circulation Oct 2008; 118: S_396.
- Theiss HD, Zaruba M, Vallaster M, Mehl U, Brunner S, David R, Krieg L, Frank E, Nathan P, Imhof A, Mueller-Hoecker J, Steinbeck G and Franz.WM. *Genetic or pharmacological CD26/DPP-IV inhibition combined with G-CSF application enhances homing of stem cells and improves survival after acute myocardial infarction*. Proceedings of the 7th Dutch-German Meeting on Molecular Cardiology 2009.
- Frank E, Brunner S, Theiss HD, Leiss M, Fischer R, Vallaster M, Huber BC, David R, Keithahn A, Sauter M, Klingel K and Franz WM. *G-CSF treatment improves left ventricular function in postmyocarditic cardiomyopathy by enhanced circulation and homing of bone marrow-derived stem cells*. Proceedings of the 7th Dutch-German Meeting on Molecular Cardiology 2009.

- Theiss HD, Zaruba M, Vallaster M, Mehl U, Brunner S, David R, Krieg L, Nathan P, Israel L, Assmann G, Mueller-Hoecker J, and Franz.WM. *CD26/DPP-IV inhibition combined with G-CSF is a new therapeutic concept to attenuate ischemic cardiomyopathy*. Keystone Symposia (Suppl.): 2009.
- Theiss HD, Zaruba M, Vallaster M, Mehl U, Brunner S, David R, Krieg L, Frank E, Nathan P, Imhof A, Mueller-Hoecker J, Steinbeck G and Franz.WM. *Genetic or pharmacological CD26/DPP-IV inhibition combined with G-CSF administration enhances homing of stem cells and improves ventricular function after acute myocardial infarction*. 88. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Physiologie 2009.
- Theiss HD, Zaruba M, Vallaster M, Brunner S, David R, Krieg L, Hirsch E, Nathan P, Imhof A, Mueller-Hoecker J, Steinbeck G and Franz.WM. *Genetic or pharmacological CD26/DPP-IV inhibition combined with G-CSF therapy enhances homing of stem cells, left ventricular function and improves survival after acute myocardial infarction*. 1. Workshop Kardiologie Stammzellen und Tissue Engineering der AG Stammzellen der DGK und AG Grundlagenforschung der DGTHG
- Theiss HD, Zaruba M, Vallaster M, Brunner S, David R, Krieg L, Hirsch E, Nathan P, Imhof A, Mueller-Hoecker J, Steinbeck G and Franz.WM. *Combined application of G-CSF and a CD26-inhibitor leads to enhanced stem cell homing, cardiac function and survival after myocardial infarction in a mouse model*. Clin Res Cardiol 98- Suppl 1, April 2009 V822.
- Zaruba M, Theiss HD, Mehl U, Vallaster M, David R, Brunner S, Huber B, Assmann G, Mueller-Hoecker J and Franz.WM. *Loss of CD26 function prevents cardiac SDF-1 cleavage yielding enhanced stem cell homing and attenuation of ischemic cardiomyopathy after treatment with G-CSF*. Clin Res Cardiol 98- Suppl 1, April 2009 V821.
- Vallaster M, Theiss HD, Zaruba M, Mehl U, Brunner S, David R, Krieg L, Frank E, Nathan P, Imhof A, Mueller-Hoecker J, Steinbeck G and Franz.WM. *Enhanced homing of stem cells and improved survival by genetic or pharmacological CD26/DPP-IV inhibition combined with G-CSF application after acute myocardial infarction*. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 2009
- Theiss HD, Zaruba M, Vallaster M, Brunner S, David R, Krieg L, Hirsch E, Nathan P, Mueller-Hoecker J, Steinbeck G and Franz.WM. *G-CSF application combined with CD26-inhibition as a new therapeutic concept enhances stem cell homing and cardiac function after myocardial infarction in mice*. European Heart Journal (2009) 30 (Abstract Supplement), 459.
- Zaruba M, Theiss HD, Mehl U, Vallaster M, David R, Brunner S, Huber B, Assmann G, Mueller-Hoecker J and Franz.WM. *Loss of CD26 function promotes stabilization of SDF-1 protein yielding enhanced stem cell*

- homing and attenuation of ischemic cardiomyopathy after treatment with G-CSF* European Heart Journal (2009) 30 (Abstract Supplement), 500
- Brunner S, Theiss HD, Leiss M, Fischer R, Vallaster M, Huber BC, Keithahn A, Sauter M, Klingel K and Franz WM. *G-CSF treatment in postmyocarditic cardiomyopathy enhances homing of bone marrow-derived progenitor cells and increases the number of resident cardiac progenitor cells.* European Heart Journal (2009) 30 (Abstract Supplement), 458.
 - Theiss HD, Zaruba M, Vallaster M, Mehl U, Brunner S, David R, Krieg L, Nathan P, Israel L, Assmann G, Mueller-Hoecker J, and Franz.WM. *Dual stem cell therapy comprising G-CSF-application and DPP-IV-inhibition improves stem cell homing, cardiac function and survival after MI in mice.* Congress of the German Stem Cell Society, Hannover, 2009.
 - Theiss HD, Zaruba MM, Vallaster M, Mehl U, Brunner S, David R, Krieg L, Nathan P, Israel L, Imhof A, Assmann G, Mueller-Hoecker J and Franz. *Dual stem cell therapy combining G-CSF-application and DPP-IV-inhibition improves stem cell homing, heart function and survival after MI in mice.* Keystone Symposia (Suppl.): 2010.
 - Theiss HD, Vallaster M, Zaruba MM, Brunner S, Huber B, Krieg L, Assmann G, Müller-Höcker J, Franz WM. *CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF increase cardiac stem cell homing and survival after myocardial infarction specifically by the CXCR-4 - SDF-1 axis.* Clin Res Cardiol 99 Suppl 1, April 2010 V502.
 - Krieg L, Theiss HD, Vallaster M, Mueller-Hoecker J and Franz WM. *Combined application of G-CSF and Sitagliptin improves stem cell homing, cardiac function and survival after MI in mice.* Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 2010.
 - Theiss HD, Vallaster M, Brenner C, Zaruba MM, David R, Krieg L, Mansmann U, Wintersperger B, Reiser M, Steinbeck G and Wolfgang-Michael Franz. *Dual stem cell therapy combining G-CSF-application and DPP-IV-inhibition as a novel therapeutic concept after acute myocardial infarction.* Workshop Kardiale Stammzellen und Tissue Engineering der AG Stammzellen der DGK und AG Grundlagenforschung der DGTHG 2010 (Vilm).
 - Theiss HD, Vallaster M, Brenner C, Zaruba MM, David R, Krieg L, Mansmann U, Wintersperger B, Reiser M, Steinbeck G and Wolfgang-Michael Franz. *Dual stem cell therapy comprising G-CSF-application and DPP-IV-inhibition as a novel therapeutic concept after acute myocardial infarction.* Annual congress of ISSCR 2010 San Francisco.
 - Theiss HD, Krieg L, Vallaster M, Mueller-Hoecker J and Franz WM. *Dual stem cell comprising administration of G-CSF and Sitagliptin improves stem cell homing, cardiac function and survival after MI in mice.* European Heart Journal (2010) 38 (Abstract Supplement), 608.

- Theiss HD, Vallaster M, Rischpler C, Brunner S, Krieg L, Mueller-Hoecker J, Hacker M and Wolfgang-Michael Franz. *Dual stem cell therapy after MI works specifically by the CXCR4-SDF1 axis and stimulates myocardial perfusion and resident cardiac stem cells*. European Heart Journal (2010) 38 (Abstract Supplement), 608.
- Theiss HD, Krieg L, Weigand S, Vallaster M, David R, Mueller-Hoecker J, Steinbeck G and Franz WM. *Effects of dual stem cell therapy comprising administration of G-CSF and Sitagliptin on stem cell homing, microRNA-expression, cardiac function and survival after MI in mice*. Keystone Symposia (Suppl.): 2011.
- Theiss HD, Zaruba MM, Brenner C, Vallaster M, Krieg L, Mehl U, Brunner S, David R, Nathan P, Israel L, Imhof A, Assmann G, Mueller-Hoecker J, Mansmann U, Seinbeck G and Franz WM. *Role of the SDF-1-CXCR4 axis in stem cell-based therapies for ischemic cardiomyopathy*. Keystone Symposia (Suppl.): 2011
- Brenner C, Theiss HD, Vallaster M, Krieg L, David R, Hacker M, Mueller-Hoecker J and Franz WM. *Dual stem cell therapy attenuates myocardial damage after MI via enhanced stem cell homing*. Workshop Kardiologie Stammzellen und Tissue Engineering der AG Stammzellen der DGK und AG Grundlagenforschung der DGTHG 2011 (Venedig).

8. Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mich im Laufe der Jahre bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben. Namentlich danke ich dem Leiter der Arbeitsgruppe „Kardiale Stammzellforschung“, Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang-Michael Franz, in dessen Labor und Verantwortungsbereich diese Arbeit über die Jahre hinweg entstehen durfte, sowie meinem Post-Doc Betreuer, Herrn PD Dr. med. Hans Diogenes Theiss, der mir als unmittelbarer Ansprechpartner jederzeit behilflich war. Des weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Jürgen Heesemann und dem FöFoLe-Programm der Ludwig-Maximilians-Universität München, welche diese Arbeit gefördert haben, sowie der Hanns-Seidel-Stiftung e.V. für die Gewährung eines Hochbegabtenstipendiums während der Zeit meines Medizinstudiums. Darüberhinaus danke ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Franz, Herrn Dr. med. Marc-Michael Zaruba, Herrn Dr. med. Stefan Brunner, Herrn Dr. med. Bruno Huber, Herrn Dr. med. Michael Gröbner, den technischen Assistenten Frau Barbara Markieton und Frau Judith Arcifa, sowie der Ph.D. Studentin Frau Julia Jung. Ich danke der Ph.D. Studentin Frau Petra Nathan für die Zusammenarbeit bei der Bestimmung der CD26/DPPIV Enzymaktivität in Serum und Myokard. Ich danke Herrn Dr. rer. nat. Lars Israel aus der Arbeitsgruppe von Axel Imhof für die Zusammenarbeit bei den massenspektrometrischen Analysen. Außerdem bedanke ich mich ganz besonders bei Herrn Felix Fiegel.

Carol my love, you rock!!

Die Arbeit wurde gefördert durch das FöFoLe-Programm der Ludwig-Maximilians-Universität und war Teil des Promotionsstudienganges „Molekulare Medizin und Systembiologie“. Der Autor selbst wurde im Rahmen seines Medizinstudiums gefördert mit einem Hochbegabtenstipendium der Hanns-Seidel-Stiftung e.V.

[Vakatseite]