

Aus dem Institut für  
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung  
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München  
Geschäftsführender Vorstand:  
Prof. Dr. H.-J. Gabius

Angefertigt unter der Leitung von  
Prof. Dr. Dr. R.G. Erben

**Die Rolle endogener und intravenös verabreichter Knochenmarks-  
zellen im linksventrikulären Remodeling nach Myokardinfarkt**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Kathrin Ines Odörfer  
aus Deggendorf

München 2007

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E.P. Märtlbauer  
Referent: Prof. Dr. Dr. R.G. Erben  
Korreferent/en: Priv. Doz. Dr. Breuer  
Univ.-Prof. Dr. Dr. Sinowatz  
Univ.-Prof. Dr. Gabius  
Priv. Doz. Dr. Scholz

Tag der Promotion: 20. Juli 2007

**Meinen Eltern**

**I. Inhaltsverzeichnis**

I. Inhaltsverzeichnis	I
II. Abbildungsverzeichnis	V
III. Tabellenverzeichnis	VII
IV. Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
2. Literatur	3
2.1 Stammzellen	3
2.1.1 Adulte Stammzellen im Knochenmark	3
2.1.1.1 Hematopoietic Stem Cells	4
2.1.1.2 Mesenchymal Stem Cells	4
2.1.1.3 Subpopulationen	6
2.1.1.3.1 Endothelial Progenitor Cells	6
2.1.1.3.2 Side Population Cells	7
2.1.1.3.3 Multipotent Adult Progenitor Cells	7
2.1.1.3.4 Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible Cells	8
2.1.1.3.5 Tissue Committed Stem Cells	8
2.1.1.3.6 Very Small Embryonic-Like Stem Cells	8
2.1.2 Gewebslokalisierte adulte Stammzellen	9
2.2 Plastizität adulter Stammzellen	10
2.3 Gewebe-Turnover und -Regeneration durch adulte Stammzellen	12
2.4 Myokardinfarkt	13
2.4.1 Definition	13
2.4.2 Remodeling	13
2.4.2.1 Inflammatorische Phase des Remodelings	14
2.4.2.1.1 Initiale Zytokinfreisetzung	15
2.4.2.1.2 Effekte der Zytokine	16
2.4.2.1.3 Leukozytäre Infiltration des Ischämie-Gebiets	18
2.4.2.2 Proliferative Phase	19
2.4.2.3 Reifungsphase	20
2.4.3 Funktionelle Veränderungen	21
2.5 Turnover und Regeneration des adulten Herzmuskels	21
2.6 Autologe Stammzellen als Therapie des akuten Myokardinfarkts	23

---

---

2.6.1 Therapieansätze	23
2.6.1.1 Zelluläre Myokard-Plastik	23
2.6.1.2 Vaskularisierung des Infarktgebiets	25
2.6.1.3 Apoptose-Schutz	26
2.6.1.4 Zytokin-Therapie	26
2.6.1.5 Immunmodulatorischer Effekt	27
2.6.2 Status quo der klinischen Forschung	28
2.7 Infarkt-Modell Ratte	29
2.8 Modell der hPLAP-transgenen Ratte	30
2.9 Zielsetzung der Arbeit	33
3. Material und Methoden	34
3.1 Versuchstiere	34
3.1.1 Tierhaltung	34
3.1.2 hPLAP-transgene Fischer 344 Ratte	34
3.1.2.1 Zucht	34
3.1.2.2. Histochemische Genotypisierung	35
3.2 Tiermodell	36
3.2.1 Toleranz-Induktion gegenüber dem Marker-Enzym	36
3.2.1.2 Letale Bestrahlung	36
3.2.1.3 Gewinnung der Knochenmarkszellen	36
3.2.1.4 Durchführung der Knochenmarktransplantation	37
3.3 Myokardinfarkt-Modell	37
3.3.1 Versuchsaufbau	37
3.3.2 Infarkt-Induktion	39
3.3.3 Zell-Applikation	41
3.3.4 Probenentnahme	41
3.3.5 Histologische Aufarbeitung der Herzen	42
3.3.5.1 Entwässerung und Einbettung	42
3.3.5.2 Erstellen der histologischen Schnitte	43
3.3.5.3 Histochemie zum Nachweis hPLAP-positiver Zellen	43
3.3.5.4 Masson-Trichrom-Färbung	43
3.3.5.5 Bestimmung der Infarkt-Größen mittels Planimetrie	44
3.3.4 Echokardiographische Untersuchung	44
3.4 Modifizierung des Tiermodells	45

---

---

3.4.1 Vorversuch	46
3.4.2 Toleranz-Erzeugung bei neonatalen Wildtyp-Ratten	46
3.4.3 Hauttransplantation	46
3.4.3.1 Gewinnung der Hauttransplantate	47
3.4.3.2 Durchführung der Hauttransplantation	47
3.4.3.3 Entnahme von Hautbiopsaten	48
3.4.4 Durchflusszytometrie	48
3.4.5 Organhistologie	48
3.5 Modifiziertes Myokardinfarkt-Modell	49
3.6 Statistik	49
4. Ergebnisse	50
4.1 Myokardinfarkt-Modell	50
4.1.1 Histologie	51
4.1.1.1 Planimetrie	51
4.1.1.2 Histochemischer Nachweis hPLAP-positiver Zellen	53
4.1.2 Echokardiographie	57
4.2 Modifizierung des Tiermodels	65
4.2.1 Ergebnisse aus dem Vorversuch	65
4.2.2 Ergebnisse der Hauttransplantationen in neonatal tolerante Empfänger	65
4.2.3 Durchflusszytometrie	66
4.2.4 Organhistologie	67
4.3 Modifiziertes Myokardinfarkt-Modell	68
5. Diskussion	70
5.1 Myokardinfarkt-Modell	70
5.1.1. Diskussion des Versuchsaufbaus	70
5.1.1.1 Infarktinduktion	70
5.1.1.2 Zeitpunkt der Zell-Verabreichung und Art der Applikation	70
5.1.1.3 Vermeidung von Chimärismus bei den neonatal toleranten F344 Ratten	71
5.1.2 Diskussion der Resultate	72
5.1.2.1 Myokardiale Differenzierung endogener Knochenmarkszellen	72
5.1.2.2 Rekrutierung von Knochenmarkszellen in das Ischämie-Gebiet	73
5.1.2.3 Schicksal intravenös verabreichter Knochenmarkszellen	74
5.1.2.4 Effekt der Zell-Therapie auf die kardiale Funktionalität	75
5.1.2.5 Einfluss der Zell-Therapie auf die Infarktgröße	76

---

I. Inhaltsverzeichnis	IV
5.1.3 Hypothesen zur Wirkweise transplantierte Knochenmarkszellen	78
5.2 Modifiziertes Tiermodell	79
5.3 Ausblick	80
6. Zusammenfassung	82
7. Summary	83
8. Literaturverzeichnis	84
9. Danksagung	120
10. Lebenslauf	122

---

**II. Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Konzept der Stammzellplastizität (nach BLAU et al., 2001)	10
Abb. 2: Inflammatorische Vorgänge am ischämischen Myokard	17
Abb. 3: Darstellung der A. coronaria sinistra	30
Abb. 4: Knochenmark einer hPLAP-positiven Ratte (A) und einer Wildtyp Ratte (B)	32
Abb. 5: Versuchsplan Myokardinfarkt-Modell	39
Abb. 6: Unterteilung des fixierten Herzens in 4 Sektionen	42
Abb. 7: Prozentualer Anteil des Infarktgebiets am linken Ventrikel	52
Abb. 8: Verhältnis von Fläche des linken Ventrikels zu gesamter Herzfläche	52
Abb. 9: Myokard Baseline, hPLAP-positives Endothel	53
Abb. 10: Perivaskuläre Lokalisation hPLAP-positiver Zellen	53
Abb. 11: hPLAP-positives Endokard	54
Abb. 12: hPLAP-positives Epikard	54
Abb. 13: Leukozytäre Infiltration des Infarktgebiets	55
Abb. 14: hPLAP-positives Endothel im Infarkt	55
Abb. 15: Vergleichende Darstellung des hPLAP-positiven Zellinfiltrats im Infarktgebiet	57
Abb. 16: EF vor (-2), 1 Woche nach Infarktinduktion (0) und 1 Woche nach BMC- bzw. Puffer- Injektion	59
Abb. 17: FS vor (-2), 1 Woche nach Infarktinduktion (0) und 1 Woche nach BMC- bzw. Puffer-Injektion	59
Abb. 18: LVDd vor (-2), 1 Woche nach Infarktinduktion (0) und 1 Woche nach BMC- bzw. Puffer-Injektion	60
Abb. 19: LVDs vor (-2), 1 Woche nach Infarktinduktion (0) und 1 Woche nach BMC- bzw. Puffer-Injektion	60
Abb. 20: EF vor, 1 Woche nach Infarktinduktion und 4 Wochen nach BMC- bzw. Puffer-Injektion	61
Abb. 21: FS vor, 1 Woche nach Infarktinduktion und 4 Wochen nach BMC- bzw. Puffer-Injektion	61
Abb. 22: LVDd vor, 1 Woche nach Infarktinduktion und 4 Wochen nach BMC- bzw. Puffer-Injektion	62
Abb. 23: LVDs vor, 1 Woche nach Infarktinduktion und 4 Wochen nach BMC- bzw. Puffer-Injektion	62

---



---

Abb. 24: EF vor (-2), 1 Woche nach Infarktinduktion (0), 8 (8) und 16 (16) Wochen nach BMC- bzw. Puffer-Injektion	63
Abb. 25: FS vor (-2), 1 Woche nach Infarktinduktion (0), 8 (8) und 16 (16) Wochen nach BMC- bzw. Puffer-Injektion	63
Abb. 26: LVDd vor (-2), 1 Woche nach Infarktinduktion (0), 8 (8) und 16 (16) Wochen nach BMC- bzw. Puffer-Injektion	64
Abb. 27: LVDs vor (-2), 1 Woche nach Infarktinduktion (0), 8 (8) und 16 (16) Wochen nach BMC- bzw. Puffer-Injektion	64
Abb. 28: Hautbiopsat: Übergang Empfänger-Haut (unten, rosa) zu hPLAP-positivem Transplantat (oben, blau)	66
Abb. 29: Overlay Histogramm Durchflusszytometrie	67
Abb. 30: Infarktgebiet einen Tag nach BMC-Injektion	68
Abb. 31: Vereinzelte hPLAP-positive Spenderzellen im Infarktgebiet 1 Tag nach BMC-Injektion	69

---

**III. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Gruppeneinteilung Myokardinfarkt-Modell	38
Tabelle 2: Gruppeneinteilung des modifizierten Myokardinfarkt-Modells	49
Tabelle 3: Gruppengrößen Modell Myokardinfarkt	51
Tabelle 4: Endgültige Gruppengrößen Modell Myokard-Infarkt	51

---

**IV. Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ALCAM	Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule
Ang -1 und -2	Angiopoietin-1 und -2
AP	Alkalische Phosphatase
APES	3-Amino-Propylethoxysilane
B	Baseline
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BMC	Bone Marrow Cell
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CINC	Cytokine-Inducible Neutrophil Chemotactic Factor
CSC	Cardiac Stem Cell
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ENA-78	Epithelial Neutrophil Activating Protein-78
EPC	Endothelial Progenitor Cell
ES	Embryonale Stammzelle
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
GCAP	Germ Cell Alkalische Phosphatase
G-CSF	Granulocyte-Colony-Stimulating Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
Gy	Gray

---

---

hPLAP	humane Plazentäre Alkalische Phosphatase
HSC	Hämatopoietische Stammzelle
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-Inducible Factor
IAP	Intestinale Alkalische Phosphatase
ICAM	Intracellular Adhesion Molecule
IG	Infarktgröße
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
IP-10	Interferon-Inducible Protein-10
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
LFA-3	Lymphocyte Functional Antigen-3
LV	Linker Ventrikel
M	Molarität
M.	Musculus
MAPC	Multipotential Adult Progenitor Cell
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	Major Histocompatibility Complex
MHz	Megahertz
MIAMI Cell	Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible Cell
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction
mM	millimolar
MMA	Methylmetacrylat
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitroblautetrazolium
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor- $\kappa$ B
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
NO	Nitric Oxid

---

---

OP	Operation
ORS	Reactive Oxygen Species
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
PFA	Platelet-Activating Factor
PPAR- $\gamma$	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Raumtemperatur
SP-Cell	Side Population Cell
SDF-1	Stromal-Derived Factor-1
SDF-1 $\alpha$	Stem Cell-Derived Factor-1 $\alpha$
STAT	JAK-Signal Transducer and Activator of Transcription
TCSC	Tissue Committed Stem Cell
TGF- $\beta$ 1	Transforming Growth Faktor-beta 1
TIMP	Tissue Inhibitors of Metalloproteinase
TNAP	Tissue Non-Specific Alkalische Phosphatase
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
TRADD	TNF Receptor-Associated Death Domain Protein
TNF-R1	Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor 1
TNM-Puffer	Tris-NaCl-MgCl <sub>2</sub> -Puffer
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VE	Versuchsende
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
VSEL Cell	Very Small Embryonic-Like Cell
ZNS	Zentrales Nervensystem

---

## 1. Einleitung

Das therapeutische Potenzial adulter Stammzellen ist seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Die Grundlagenforschung der letzten Jahre erbrachte, dass es neben der seit langem bekannten hämatopoietischen Stammzelle eine Vielzahl weiterer Stammzelltypen im adulten Organismus gibt. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine *in vitro* Differenzierung dieser Stammzellen zu verschiedensten reifen Zelltypen möglich ist. Der Gedanke lag nahe, das Potenzial der adulten Stammzellen zu Therapiezwecken einzusetzen. Hierfür erachtete man insbesondere die mesenchymalen Stammzellen als äußerst geeignet, da sie leicht zu isolieren und einfach zu kultivieren sind.

Viele Menschen sterben jährlich akut am Herzinfarkt oder aber an dessen Folgen. Standardtherapien sind nicht in der Lage, langfristig die Entwicklung einer Herzinsuffizienz zu verhindern. Seit Anfang des 21. Jahrhunderts, als Arbeiten über die *in vitro* (MAKINO et al., 1999) und *in vivo* (ORLIC et al., 2001) Differenzierung adulter Stammzellen aus dem Knochenmark zu Kardiomyozyten publiziert worden waren, ist das Interesse an adulten Stammzellen als zusätzliches Therapeutikum des Myokardinfarkts beim Menschen sehr groß.

Äußerst kontrovers wird allerdings diskutiert, ob es tatsächlich *in vivo* zu einer myokardialen Differenzierung von Knochenmarkszellen kommt. Nicht ausreichend geklärt ist ebenso, welche Zellpopulationen des Knochenmarks geeignet sind für die Zelltherapie, ob eine vorherige Kultivierung und Vordifferenzierung von Vorteil ist, und in welcher Anzahl, zu welchem Zeitpunkt und mittels welcher Applikationsart diese Zellen verabreicht werden müssen, um klinisch relevanten Nutzen aufzuweisen. Einige klinische Studien am Menschen haben gezeigt, dass die Applikation autologer Knochenmarkstransplantate sicher ist (ASSMUS et al., 2002; FUCHS et al., 2003). Die Ergebnisse dieser Studien hinsichtlich kardialer Funktionalität und myokardialer Perfusion differieren jedoch stark. Offensichtlich ist weitere präklinische Forschung nötig, um die Effektivität und die tatsächliche Wirkweise der Zell-Therapie zur Behandlung des akuten Herzinfarkts zu klären (LEE et al., 2004; DAVANI et al., 2005; AKAR et al., 2006).

---

Hierfür ist die Etablierung geeigneter Tiermodelle nötig. Die vorliegende Arbeit hat es sich zum Ziel gemacht, die Rolle endogener und exogen verabreichter Knochenmarkszellen im Infarktgeschehen zu beleuchten. Dazu wurden Fischer 344 Inzuchtratten letal bestrahlt und mit Knochenmark transgener Fischer 344 Ratten, welche das Marker-Enzym humane Plazentäre Alkalische Phosphatase (hPLAP) ubiquitär unter dem R26-Promotor exprimieren (KISSEBERTH et al., 1999) rekonstituiert. Dieses hitzestabile Marker-Enzym besitzt den großen Vorteil, sowohl Paraffin- als auch Kunststoff-Einbettung zu überdauern, so dass damit eine sensitive und zugleich sichere Detektion markierter Zellen in Gewebeschnitten möglich ist. In diesen Knochenmark-transplantierten Tieren sollte gezeigt werden, inwieweit Knochenmarkszellen in die Entzündungsreaktionen und den Heilungsprozess nach Myokardinfarkt, der durch 30minütige Ligation der linken Koronararterie induziert wurde, involviert sind. Des Weiteren sollte demonstriert werden, ob die intravenöse Verabreichung von Knochenmarkszellen eine Woche nach Infarktinduktion positive Effekte auf die Abheilung des Infarkts und die Funktionalität des Herzmuskels ausübt und ob eine *in vivo* Differenzierung von Knochenmarkszellen zu Kardiomyozyten bestätigt werden kann. Ein drittes Ziel dieser Studie war es, ein Marker-tolerantes Tiermodell zu generieren, welches, unter Verzicht auf letale Bestrahlung und Knochenmarkstransplantation, die spezifische Verfolgung transplantierte Zellen in immunkompetenten Tieren ohne die Gefahr von Abstoßungsreaktionen erlaubt. Dieses Modell sollte in Folge genutzt werden, um zu klären, ob intravenös verabreichte Knochenmarkszellen in den geschädigten Herzmuskel gelangen und ob sie dort aktiv in die Infarktheilung einbezogen werden.

---

## 2. Literatur

### 2.1 Stammzellen

Als Stammzellen im Allgemeinen bezeichnet man unreife Zellen, die zu unbegrenzter Selbsterneuerung und weiterer Differenzierung fähig sind. Primär unterscheidet man embryonale und adulte Stammzellen. Aus einer totipotenten embryonalen Stammzelle (ES), der befruchteten Zygote, bilden sich alle weiteren somatischen Zellen eines Individuums. Die Forschung um die ES ist ethisch sehr umstritten. Zudem zeigte sich, dass ES eine starke Neigung zur tumorösen Entartung aufweisen (ERDO et al., 2003). Die adulte Stammzelle hingegen kann zumeist auf sehr einfache Weise gewonnen werden, die Zellen lassen sich *ex vivo* gut expandieren und können ohne zusätzliche Immunsuppression als autologes Transplantat dem Patienten, der zugleich Spender als auch Empfänger ist, verabreicht werden (ZANDER et al., 2002). Die Gefahr der Entstehung von Neoplasien ist sicherlich geringer anzusehen als bei den ES, allerdings zeigten Studien von RUBIO et al. (2005), dass nach Langzeitkultivierung auch adulte Stammzellen zu spontaner Transformation neigen.

In den folgenden Ausführungen möchte ich mich auf die adulten Stammzellen beschränken, da diese pluripotenten Zellen einen zentralen Punkt meiner Untersuchungen einnehmen.

#### *2.1.1 Adulte Stammzellen im Knochenmark*

Das Knochenmark stellt das Speicherorgan einer Vielzahl adulter Stammzellen dar. In den letzten Jahren wurden neben den seit langem bekannten hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen eine Reihe von Subpopulationen adulter Stammzellen beschrieben, wobei allerdings unklar ist, ob es sich bei den charakterisierten Zellpopulationen verschiedener Arbeitsgruppen nicht um identische Populationen handelt.

---



### 2.1.1.1 Hematopoietic Stem Cells

Bereits Mitte des 19. Jahrhunderts vermutete Julius COHNHEIM (1867), dass es in differenzierten Geweben zu einer ständigen Erneuerung von Zellen kommt und dass es für diesen Turnover im adulten Organismus Stammzellen geben muss. Die Quelle dieser Zellen vermutete er im Knochenmark. Die Existenz einer adulten multipotenten Stammzelle für die Blutbildung, die hämatopoietische Stammzelle (HSC), wurde erstmalig 1906 von Alexander MAXIMOV beschrieben. Hämatopoietische Stammzellen sind zuständig für die ständige Regeneration aller Zellen des Blut- und Immunsystems (LAGASSE et al., 2001). Lediglich 0,01-0,05% aller Knochenmarkszellen sind als HSCs zu bezeichnen (HARRISON et al., 1990). Seit bereits mehr als 25 Jahren sind diverse Methoden etabliert, die diese Zellen für autologe und allogene Knochenmarktransplantationen (KMT) nutzen (ZANDER et al., 2002). Eine Isolierung der HSCs ist zum einen durch Knochenmarkspunktion, zum anderen durch deren Mobilisierung möglich. Zu einer Mobilisierung adulter Stammzellen aus dem Knochenmark in die Zirkulation kommt es durch Faktoren wie den Stem Cell Faktor (SCF) und den Granulocyte-Colony Stimulating Faktor (G-CSF). Mittels Diaphrese werden infolge die peripher zirkulierenden HSCs aus dem Blut des Spenders für die Transplantation isoliert.

### 2.1.1.2 Mesenchymal Stem Cells

Vor circa 30 Jahren entdeckten Friedenstein und Kollegen eine weitere im Knochenmark (KM) residierende Zellpopulation adulter Stammzellen: die mesenchymalen Stammzellen (MSC). Als Synonyme für diese Zellpopulation werden auch die Begriffe Marrow Stromal Cells und Skeletal Stem Cells verwendet (BIANCO et al., 2001). Charakteristika dieser Zellen sind Plastikadhärenz, hohe Proliferationsraten sowie die Fähigkeit, *in vivo* und *in vitro* zu Chondrozyten, Osteoblasten und Adipozyten zu differenzieren (FRIEDENSTEIN et al., 1976; FRIEDENSTEIN et al., 1987). Die Beobachtungen FRIEDENSTEINs und seiner Kollegen konnten durch andere Arbeitsgruppen bestätigt werden. Zudem zeigte man, dass MSCs unter geeigneten Kulturbedingungen und ebenso *in vivo* in der Lage sind, neben Chondro-, Adipozyten und Osteoblasten unter anderem zu Muskelzellen (WAKITANI et al., 1995; FERRARI

et al., 1998), Vorläuferzellen neuronaler Zellen (MEZEY et al., 2000; WOODBURY et al., 2000; ZHAO et al., 2002), Kardiomyozyten (MAKINO et al., 1999; ORLIC et al., 2001) und Hepatozyten (PETERSON et al., 1999; LAGASSE et al., 2000; THEISE et al., 2000) zu differenzieren. Ein weiteres Charakteristikum von MSCs ist ihre Heterogenität: Kultiviert man MSCs, die von einer einzigen ursprünglich isolierten MSC stammen, zeigt sich eine starke morphologische Heterogenität der Zellklone (METS & VERDONK, 1981). So kann man in frühen monoklonalen MSC-Kulturen 3 unterschiedliche Zellphänotypen beobachten: Kleine, sehr schnell teilende Zellen (RS-Zellen: rapidly self-renewing), Zellen mit spindelförmiger Morphologie und größere Zellen mit verminderter Replikationsgeschwindigkeit. Solange die Zellen in geringer Dichte kultiviert werden, überwiegen die kleinen RS- und die spindelförmigen Zellen. Diesen spricht man das größere Differenzierungspotential zu und sie werden als Vorstufen der größeren, reiferen Zellen angesehen. Wird das Hayflick Limit von 50 Populationsverdoppelungen überschritten, dominieren die größeren, reiferen Zellen, die ihre Teilung einstellen (BRUDER et al., 1997; DIGIROLAMO et al., 1999).

Neben dem ihnen eigenen Stammzellpotenzial obliegt den MSCs die wichtige Funktion, essentielle regulatorische Faktoren und Zytokine für die Proliferation und Differenzierung der HSCs bereitzustellen (DEXTER et al., 1977; GORDON et al., 1990; HAYNESWORTH et al., 1996; WEIMAR et al., 1998). Lediglich 0,001-0,01% aller Knochenmarkszellen repräsentieren MSCs (PITTENGER et al., 2004), deren Mobilisierung in die Zirkulation ebenfalls durch Gabe von Granulocyte-Colony Stimulating Faktor möglich ist.

Eine weitere Besonderheit der MSC liegt in ihrer vernachlässigbaren Immunogenität. Humane mesenchymale Stammzellen exprimieren eine Reihe von Oberflächenmolekülen wie Thy-1 (CD90), Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM, CD106), Intercellular Adhesion Molecule 1 und 2 (ICAM-1 und ICAM-2), Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM, CD166), Lymphocyte Functional Antigen-3 (FLA-3, CD58) und eine Reihe von Integrinen, die Rückschlüsse auf eine Interaktion zwischen MSC und T-Zelle zulassen könnten. Allerdings zeigten Experimente von BARTHOLOMEW et al. (2002) sowohl in vitro als auch in vivo das immunsuppressive Potenzial adulter mesenchymaler Stammzellen. Es konnte die Dosis-abhängige Minderung der Proliferation in Mixed-Lymphocyte Reaction (MLR) und in Proliferations Assays durch Zu-

---

gabe von MSCs demonstriert werden. Ob diese Verringerung der Lymphozyten-Proliferation über direkten Zell-Zellkontakt mittels VCAM, ICAM oder LFA-3 (PITTENGER et al., 1999; MAJUMDAR et al., 2003) oder aber über Zytokine vermittelt wird, ist nicht geklärt (DI NICOLA et al., 2002; TSE et al., 2003). Selbst in/nach Differenzierung zu Adipo-, Chondrozyten oder Osteoblasten behalten MSCs diese Fähigkeit zur Reduktion der lymphozytären Proliferation (LE BLANC et al., 2003). *In vivo* zeigt sich das immunsuppressive Potenzial in verlängerter Überlebenszeit allogener Hauttransplantate nach einmaliger intravenöser Verabreichung von MSCs (BARTHOLOMEW et al., 2002).

### 2.1.1.3 Subpopulationen

Verschiedene Arbeitsgruppen berichten in den letzten Jahren über neu charakterisierte Subpopulationen aus dem Knochenmark. Auch diese Populationen lassen sich *ex vivo* expandieren und verfügen über die Fähigkeit zu gewebeübergreifender Differenzierung. Beschrieben wurden in diesem Zusammenhang: Endothelial Progenitor Cells, Side Population Cells, Multipotent Adult Progenitor Cells, Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible Cells, Tissue Committed Stem Cells und die Very Small Embryonic-Like Cells (Reviewed in KUCIA et al., 2005b).

#### 2.1.1.3.1 Endothelial Progenitor Cells

Die Endotheliale Progenitorzelle EPC entwickelt sich vermutlich ebenso wie die HSC aus dem Hämangioblasten (RIBATTI et al., 2002) und wird bei Bedarf aus dem Knochenmark in die Zirkulation mobilisiert (SHINTANI et al., 2001). Eine Isolierung kann ebenfalls sowohl aus dem Knochenmark als auch aus dem peripheren Blut erfolgen. Die Charakterisierung erfolgt über die Expression von CD34, CD133 und des Vascular Endothelial Growth Factor Receptors 2 (VEGF-R2), welcher auch als Kinase Insert Domain Receptor (KDR) oder Flk-1 bezeichnet wird. Im Lauf der Differenzierung endet die CD133-Expression, stattdessen wird CD31 exprimiert (ASAHARA et al., 1997; GEHLING et al., 2000; PEICHEV et al., 2000; HRISTOV et al., 2003; ASAHARA et al., 2004). Die Differenzierung von EPCs zu Gefäßendothel konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden (ISNER et al., 2001; QUIRICI et al.,

---

2001; ASSMUS et al., 2002; KAWAMOTO et al., 2003). Einige Studien legen nahe, dass es durch physisches Training zu einem Anstieg (ADAMS et al., 2004) und durch Faktoren wie Rauchen, Diabetes oder Hypertension zu einer Verminderung der EPCs in der Zirkulation kommt (VASA et al., 2001).

#### 2.1.1.3.2 Side Population Cells

Die Side Population-Zellen,  $CD34^{-}/low$   $c\text{-Kit}^{+}$   $Sca\text{-}1^{+}$ , werden als Subpopulation der HSCs betrachtet und sind durch Expression des ABCG2-Transporters dazu fähig, Hoechst Farbstoff 33258 und Rhodamine 123 auszuschleusen (GOODELL et al., 1997; SCHARENBERG et al., 2002). Eine Isolierung dieser Zellen wurde nicht nur aus dem Knochenmark, sondern auch aus Muskel und anderen Geweben gezeigt (McKINNEY-FREEMAN et al., 2002; MAJKA et al., 2003).

#### 2.1.1.3.3 Multipotent Adult Progenitor Cells

Die MAPCs,  $CD13^{+}$   $Flk1^{dim}$   $c\text{-kit}^{-}$   $CD44^{-}$   $CD45^{-}$   $MHC\ class\ I^{-}$   $MHC\ class\ II^{-}$ , lassen sich aus Kulturen mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark isolieren (REYES et al., 2001; Jiang et al., 2002). REYES et al. (2001) zeigten, dass diese Zellen sich nicht nur zu mesenchymalen sondern auch zu endothelialen, neuroectodermalen und endodermalen Zelltypen differenzieren lassen. In einer Studie demonstrierten JIANG et al. (2002), dass MAPCs nicht nur aus Knochenmark, sondern auch aus Muskel und Gehirn von Mäusen isoliert werden können. Diese Zellen unterscheiden sich in ihrem Phänotyp, ihrer Morphologie und ihrem Expressionsmuster nicht von den aus dem Knochenmark isolierten MAPCs. Die Tatsache, dass MAPCs weder Major Histocompatibility Complex (MHC) Klasse I noch MHC Klasse II exprimieren, macht sie für allogene Transplantationen verfügbar, allerdings birgt das Fehlen der MHC I Expression zugleich die Gefahr der Elimination durch Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen) des Empfängers (VERFAILLIE et al., 2002; VERFAILLIE et al., 2003).

---

#### 2.1.1.3.4 Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible Cells

Die Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible Cells (MIAMI) werden ebenfalls als Subpopulation der humanen MSCs angesehen. D'IPPOLITO et al. (2004) zeigte, dass auch diese Zellpopulation *in vitro* in der Lage ist, in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Ebenfalls ließ sich, wie bei ES, unbegrenzte Kultivierung der Zellen und die Expression von Stammzell-Markern (Oct-4, Rex-1) nachweisen.

#### 2.1.1.3.5 Tissue Committed Stem Cells

Eine weitere den adulten Stammzellen zuzuordnende Zellpopulation wird als Tissue Committed Stem Cells (TCSC) bezeichnet. KUCIA et al. (2004) vertreten die Hypothese, dass die sehr kleinen (~5-7 µm) CXCR4-positiven TCSCs in ähnlicher Weise wie die HSCs während der embryonalen Entwicklung von der fetalen Leber in die Knochenmarkshöhle einwandern. Die Aktivierung der Zellen geschieht durch die Freisetzung von  $\alpha$ -Chemokinen wie den Stromal-Derived Factor-1 (SDF-1), welcher durch Osteoblasten, Knochenmarksfibroblasten und endotheliale Zellen sezerniert wird. Für diese Hypothese spricht die Tatsache, dass die Isolierung der TCSCs aus dem Knochenmark mittels eines SDF-1-Gradienten durchgeführt werden kann. Eine Unterscheidung in humane HSCs und humane TCSCs ist durch die unterschiedliche Expression von CD45 möglich (KUCIA et al., 2005).

#### 2.1.1.3.6 Very Small Embryonic-Like Stem Cells

Die Very Small Embryonic-Like Stem Cells (VSEL) wurden 2006 von KUCIA et al. beschrieben. Diese homogene Population seltener Sca-1<sup>+</sup> lin<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup> Zellen exprimiert Marker pluripotenter Stammzellen wie SSEA-1, Oct-4, Nanog oder Rex-1, enthält Euchromatin, welches typisch für ES ist, und zeigt *in vitro* das Potenzial zur Differenzierung in Zellen aller drei Keimblatt-Linien. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Anzahl dieser Zellen im Knochenmark mit zunehmendem Alter abnimmt. Es ist sehr wohl denkbar, dass die VSELs bei der Isolierung von MSCs nach üblichen Protokollen mitisoliert werden, da sie Adhärenz zu Fibroblasten aufweisen.

### 2.1.2 Gewebslokalisierte adulte Stammzellen

Jahre nach Entdeckung adulter Knochenmarks-Stammzellen wurde vielfach gezeigt, dass diese nicht nur im Knochenmark, sondern ebenso in verschiedensten Organ-systemen residieren. So wurden adulte Stammzellen zum Beispiel in

- Haut (WATT, 1998; LAVKER et al., 2000; TAYLOR et al., 2000)
- Zentralem Nervensystem (REYNOLDS and WEISS, 1992; GAGE et al., 1995; GAGE et al., 2000, )
- Muskel (SCHULTZ & MCCORMICK, 1994; KAWADA et al., 2001)
- Leber (MICHALOPOULOS & DEFRANCES, 1997; ALISON & SARRAF, 1998; KUBOTA and REID, 2000; SELL, 2001)
- Plazenta (MIAO et al., 2006)
- Milchdrüse (WELM et al., 2002) und
- Herzmuskel (BELTRAMI et al., 2003; OH et al., 2003) nachgewiesen.

Unklar ist, ob es in einem Organismus zwei unabhängige „Stammzellsysteme“ gibt oder ob die im Gewebe residierenden Zellen aus dem Knochenmark stammen und in weiterer Folge über die Zirkulation ihren Platz in den Nischen des jeweiligen Organs aufsuchen.

Verschiedene Arbeiten demonstrierten die Existenz peripher zirkulierender Stammzellen (ZVAIFLER et al., 2000; KUCIA et al., 2004a; KUCIA et al., 2004b; KUCIA et al., 2005a). So wurde sowohl die Existenz zirkulierender pluripotenter Stammzellen (ZHAO et al., 2003) als auch die zirkulierender HSCs (HUSS et al., 2000) sowie Endothelialer Vorläuferzellen (ASAHARA et al., 1997; SHI et al., 1998; WOJAKOWSKI et al., 2004) nachgewiesen.

## 2.2 Plastizität adulter Stammzellen

Wie bereits erläutert, verfügen adulte Stammzellen über das Potenzial zu multipotenter Differenzierung. Diese Fähigkeit wird auch als Plastizität bezeichnet. BIANCO et al. (2001) unterscheidet zwei Arten der Plastizität:

- Orthodoxe Plastizität

Als orthodox wird beispielsweise die Differenzierung von HSCs zu Blutzellen bezeichnet, von MSCs zu Chondro- und Adipozyten sowie zu Osteoblasten, von undifferenzierten zu gewebespezifisch differenzierten Zellen; eine Differenzierung, die sich immer innerhalb der Keimblattgrenzen abspielt. Demzufolge entwickeln sich aus MSC spezifische Zellen des mesodermalen Keimblatts.

- Unorthodoxe Plastizität

Als unorthodoxe Plastizität wird sowohl die Differenzierung über Keimblattgrenzen hinweg als auch die Rückdifferenzierung von einer ausgereiften Zelle zu einer undifferenzierteren Stufe bezeichnet.

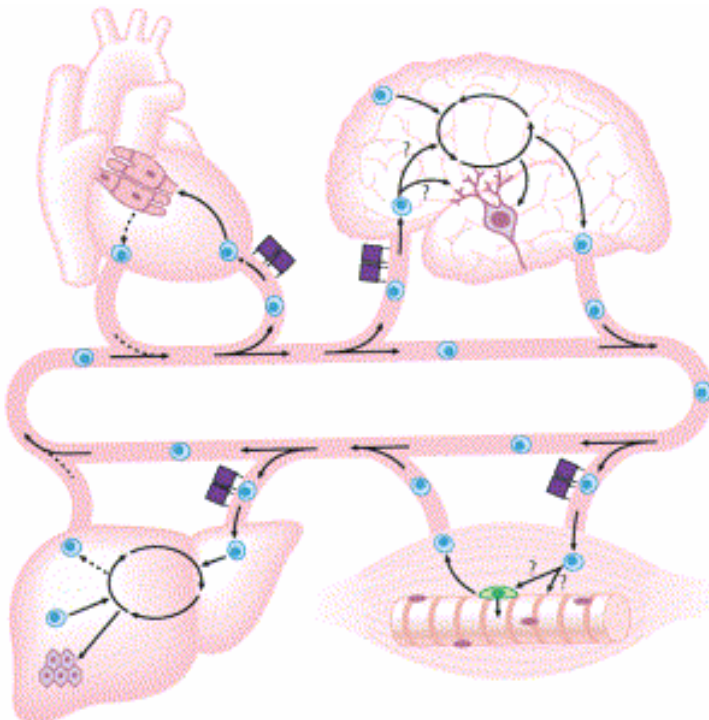


Abb. 1: Konzept der Stammzellplastizität (nach BLAU et al., 2001)

Wie BLAU et al. bedenkt (2001), ist es notwendig geworden, sich von den bisherigen Vorstellungen der Zell-Differenzierung, die nur in vorgezeichneten Bahnen und in eine Richtung, von unreif zu hoch spezialisiert, abläuft, zu trennen.

Immer wieder kritisch diskutiert wird, ob es sich bei dieser Plastizität der Adulten Stammzellen um eine tatsächliche Differenzierung der Zellen handelt. Erstaunliche Ergebnisse bringen die Studien von BJORNSON et al. (1999) und JACKSON et al. (1999). Diese demonstrierten, dass es nach letaler Bestrahlung durch Injektion adulter gewebe-spezifischer Stammzellen zu einer völligen hämatopoietischen Rekonstitution der Tiere kommt. Die Ergebnisse ihrer Versuche lassen vermuten, dass es zu einer Dedifferenzierung bereits vordifferenzierter gewebe-spezifischer Zellen kommen kann. So zeigten HOCHEDLINGER et al. (2003) durch Klonierungsexperimente, dass die DNA ausdifferenzierter somatischer Zellen dedifferenzierbar ist zu einem „jungfräulichen Typ“ der DNA, wie sie bei frühen ES zu sehen ist. Ob Enzyme wie Demethylasen, die für diese Dedifferenzierung nötig sind, auch von differenzierten Stammzellen exprimiert werden können ist bis dato nicht gezeigt.

Bei Amphibien allerdings scheinen De- und Redifferenzierung die hauptsächlichen Mechanismen in der Organregeneration zu sein (STOCUM, 2004).

Ob nun die Plastizität der adulten Stammzellen auf einer tatsächlichen Differenzierung (SATO et al., 2005) bzw. einer Transdifferenzierung oder aber auf Zellfusion (TERADA et al., 2002; YING et al., 2002; ALVAREZ-DOLADO et al., 2003; CAMARGO et al., 2004; NYGREN et al., 2004; DREYFUS et al., 2004; NOISEUX et al., 2006) basiert, muss weiter erforscht werden. Es ist sehr wohl denkbar, dass die zu beobachtende Plastizität nicht auf einem einzigen der aufgeführten Mechanismen beruht. Als Beispiel hierfür möchte ich die folgende Studie anführen: SPEES et al. (2003) zeigten, dass es bei Kokultivierung von MSC mit durch Hitze inaktivierten alveolären Epithelzellen sowohl zu Differenzierung als auch zu Fusion der MSCs mit den Epithelzellen kam. Die resultierenden Zellen wiesen spezifische Expressionsmuster und morphologische Charakteristika epithelialer Zellen auf. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass sowohl Differenzierung als auch Zellfusion eine entscheidende Rolle spielen in den Beobachtungen vieler Forscher, welche über eine beobachtete Differenzierung von adulten Stammzellen berichten.

---



### 2.3 Gewebe-Turnover und -Regeneration durch adulte Stammzellen

Aus der Literatur ist bekannt, dass es im adulten Organismus zu einer ständigen Gewebeerneuerung kommt. KRAUSE et al. (2001) zeigten, dass es dabei zu einer Rekrutierung von Zellen aus dem Knochenmark kommt. Ich möchte nun anhand ausgewählter Beispiele aus der Literatur die Differenzierung adulter Stammzellen im Kontext des physiologischen Zell-Turnovers und der Regeneration beleuchten.

BRAZELTON et al. (2000) zeigten durch Transplantation GFP positiver Knochenmarkszellen in letal bestrahlte Wildtyp Tiere das Auftreten GFP positiver Zellen im ZNS. Die Zellen wurden vor allem im Bulbus olfactorius, einem Ort starker neuraler Regeneration, detektiert (0,2-0,3% aller Neuronen). Circa 20% dieser Zellen exprimierten neuronale Proteine und der Großteil wies einen Makrophagen/Microglialen Phänotyp auf.

KOTTON et al. (2001) beschreiben, dass frisch isolierte und kultivierte Knochenmarkszellen spezifische Marker für Typ I Pneumozyten, T1 $\alpha$  und Aquaporin-5, exprimieren. Des Weiteren demonstrierten sie nach Lungen-Schädigung durch Bleomycin die Differenzierung systemisch verabreichter lac-Z positiver plastik-adhärenter Knochenmarkszellen zu Zellen, die morphologisch und molekular als Typ I Pneumozyten des alveolären Epithels zu beschreiben sind. Tiere, bei denen keine Schädigung der Lunge erfolgte, zeigten lediglich eine geringe Besiedlung der Lunge durch die verabreichten Zellen. Zudem konnte nur eine geringe Zahl an Zellen in der Milz, nicht aber in Leber und Herz nachgewiesen werden.

LAGASSE et al. (2000) zeigten die Fähigkeit adulter Stammzellen zur Differenzierung zu Hepatozyten auf. Es wurden weibliche, letal bestrahlte Mäuse verwendet, die unter einer hereditären Tyrosinämie Typ I leiden. Diese Mäuse entwickeln unbehandelt ein fortschreitendes Leberversagen. 7 Monate nach systemischer Injektion von HSCs lacZ positiver männlicher Spender, zeigte sich, dass ca. 30-50% der Lebermasse durch vom Spender stammende Zellen ersetzt worden war. Es konnte sowohl die Präsenz des Reportergens, des Y-Chromosoms und die Funktionalität der Zellen nachgewiesen werden.

Ein Beispiel für die Regeneration von Muskel stellen die Studien von BITTNER et al. (1999) und GUSSONI et al. (1999) dar, die mit einem Modell für die Duchenne'sche Muskeldystrophie, der mdx-Maus, durchgeführt wurden. Es konnte demonstriert werden, dass es nach Transplantation männlichen, gesunden Knochenmarks in weibli-

---

che mdx-Mäuse zur Rekrutierung von Zellen aus dem Knochenmark und zur Produktion des fehlenden Proteins Dystrophin kam, was zu einer erfolgreichen Therapieung des Krankheitsbilds der mdx-Maus führte.

All diese Beispiele, die einen Einblick geben sollen, wie weit sich die scheinbar unbegrenzten regenerativen Fähigkeiten der adulten Stammzelle potentiell erstrecken, stellen nur einen sehr kleinen Teil der publizierten Arbeiten in diesem Bereich dar.

## 2.4 Myokardinfarkt

Der akute Herzinfarkt lag 2005 in Deutschland mit 7,4% an Platz 2 der häufigsten Todesursachen. Insgesamt basierten 23% aller Todesfälle auf koronaren Herzkrankheiten (Statistisches Bundesamt Deutschland). Es ist somit nachvollziehbar, dass eine verbesserte Therapie des Myokardinfarkts sowohl im Interesse des Patienten als auch in wirtschaftlichem Interesse liegt.

### *2.4.1 Definition*

Der akute Myokardinfarkt (MI) ist definiert als Verlust von Herzmuskelzellen durch Nekrose infolge eines Ischämiegeschehens. Eine Ischämie entsteht durch verminderte bzw. ausbleibende Gewebepfusion und wird als Zustand der Imbalance von Sauerstoff-/Substratangebot und Bedarf für die Aufrechterhaltung physiologischer Funktionen bezeichnet. Ab einer Dauer von 30 Minuten ohne Blutversorgung kommt es im Gewebe zu irreversiblen Zellschädigungen. Die Klassifizierung von Infarkten wird aufgrund ihrer Größe und ihrer Lokalisation vorgenommen. Infarkte bis zu einer Größe von 10% des linken Ventrikels (LV) werden als kleiner, zwischen 10 und 30% als mittlerer und ab 30% des LV als großer Infarkt bezeichnet (ALPERT et al., 2000).

### *2.4.2 Remodeling*

Die Mechanismen, die durch einen Ischämie-Prozess hervorgerufen werden, sind mannigfaltig, sowohl auf zellulärer als auch auf molekularer Ebene. Nach Einsetzen

---

der Ischämie kommt es zur Nekrose von Herzmuskelzellen und Aktivierung der inflammatorischen Kaskade. Dem primären Zelluntergang folgt die Hypertrophie von Herzmuskelzellen und ein sekundärer Untergang derselben. Die Infarkttheilung unterteilt sich in drei zeitlich nicht voneinander abgrenzbare Stadien: Die inflammatorische, die proliferative und die Reifungsphase (FRANGIOGIANNIS et al., 2006). In der inflammatorischen Phase kommt es zur Rekrutierung von Leukozyten und Phagozytose des toten Zellmaterials. Die proliferative Phase dient zum Ersatz der verlorengegangenen Muskelzellen durch Granulationsgewebe, das in der anschließenden Reifungsphase durch kollagenreiches Narbengewebe ersetzt wird. All diese Umbauvorgänge am geschädigten Herzen werden als Remodeling bezeichnet. Das Ausmass des Remodelings ist direkt proportional zum ursprünglichen Insult und abhängig davon, ob es zu einer Reperfusion des ischämischen Gebiets kommt (PFEFFER et al., 1991). Studien haben gezeigt, dass sich der im Zuge des Remodelings abspielende Entzündungsprozess durch Reperfusion des Infarkts verstärkt (ENTMANN et al., 1994). Allerdings wurde zugleich deutlich, dass das Stattfinden der Reperfusion essentiell für die Einleitung ein rasches Ablaufen des Heilungsprozesses ist (HIRAYAMA et al., 1993). Im zeitlichen Verlauf unterscheidet man das frühe und das späte Remodeling, wobei sich ersteres in den ersten drei Tagen nach Infarkt abspielt und vor allem den Infarkt selbst und die umgebende Peri-Infarktzone, auch Border Zone genannt, betrifft. Das späte Remodeling setzt ab dem dritten Tag ein und beinhaltet Prozesse, die den gesamten Herzmuskel betreffen (TIYYAGURA et al., 2006), wie die kompensatorische Hypertrophie kardialer Zellen sowie die Dilatation des linken Ventrikels infolge verminderter Kontraktilität und Auswurfleistung des Herzens.

#### 2.4.2.1 Inflammatorische Phase des Remodelings

Die Aktivierung inflammatorischer Prozesse beginnt augenblicklich mit Einsetzen der Gewebeschädigung.

In den 70er Jahren zeigte sich aus Versuchen an Hunden, dass es durch antiinflammatorische Therapie zu einer verminderten Narbenbildung bei den Tieren nach MI kommt (LIBBY et al., 1973). In einer klinischen Studie mit Gabe von Methylprednisolon zusätzlich zur Therapie des Herzinfarkts kam es allerdings bei den Patienten zur Ausbildung ventrikulärer Arrhythmien und einer verstärkten Infarktausdehnung (ROBERTS et al., 1976). Es wurde offensichtlich, dass der Entzündungsprozess es-

---

sentiell für eine schnelle Infarktheilung ist (KLONER et al., 1978; JUGDUTT, 1997), auch wenn die Reperfusion und die damit gekoppelte Verstärkung der Entzündungsantwort in zeitlichem Abstand zum Infarkt geschieht, was als Late Reperfusion bezeichnet wird (TOPOL et al., 1992).

Kurz zusammengefasst umfasst der inflammatorische Prozess folgende Abläufe:

- Infiltration des ischämischen Myokards durch Leukozyten
- Resorption nekrotischer/apoptotischer Zellen
- Induktion der Proliferationsphase

#### 2.4.2.1.1 Initiale Zytokinfreisetzung

Unmittelbar nach Auftreten des Infarkts kommt es zur Expression der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6) und Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Als Stimulus für die Freisetzung der genannten Faktoren dienen zum einen mechanischer Stress, das Ischämie-Geschehen selbst sowie die Entstehung freier Radikale. Ist der Infarkt sehr groß, kann die Freisetzung dieser Zytokine über Wochen andauern (IRWIN et al., 1999; DETEN et al., 2002). Mechanischer Stress im Myokard wird über Mechanosensoren ermittelt, daraufhin folgen drei mögliche Signal-Transduktions-Kaskaden über

- Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)
- JAK-Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) und
- Calcineurin-abhängige Signalkaskaden.

Durch den Zustand der Hypoxie kommt es zur Bildung freier Radikale, auch Reactive Oxygen Species (ROS) genannt, was wiederum die Freisetzung von Zytokinen mediert und zu einer direkten Schädigung von Kardiomyozyten und Endothel führt (DHALLA et al., 2000; LEFER et al., 2000). Während gesundes Myokard in der Lage ist, der Entstehung und Eliminierung freier Radikale über enzymatische Abbauege entgegenzuwirken, stehen diese Mechanismen dem geschädigten Herzen nur eingeschränkt zur Verfügung (FRANGOGIANNIS et al., 2006).

Ein weiterer durch Stress induzierter Entzündungsregulator ist der Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ). Tierexperimentelle Studien konnten zeigen, dass die Antagonisierung von PPAR- $\gamma$  zu einer signifikanten Minderung der Zytokin-Freisetzung führt (YUE et al., 2001; SHIOMI et al., 2002).

#### 2.4.2.1.2 Effekte der Zytokine

Die Wirkung von TNF- $\alpha$  zeigt sich ambivalent. Zum einen induziert TNF- $\alpha$  über Bindung an Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor 1 (TNF-R1) Apoptose. Dabei kommt es zur Rekrutierung eines Proteins, das als TNF Receptor-Associated Death Domain Protein (TRADD) betitelt wird, was schließlich über Aktivierung von Caspase 8 zur Einleitung apoptotischer Vorgänge führt (MAC EWAN, 2002). Alternativ besteht die Möglichkeit einer Aktivierung von Factor Associated with Neutral Sphingomyelinase (FAN) (ADAM-KLAGES et al., 1996), was über die Generierung von Ceramid zu einer erhöhten Freisetzung von ROS führt und wiederum die Apoptose myokardialer Zellen mediiert (JARVIS et al., 1994).

Ebenso zeigten Studien, dass die Verabreichung von exogenem TNF- $\alpha$  direkte negativ inotrope Effekte ausübt und sich in einer progressiven linksventrikulären Dysfunktion des Herzens äußert (BOZKURT et al., 1998). Ein weiterer Effekt von TNF- $\alpha$  ist dessen Wirkung auf endotheliale Zellen. Es wurde demonstriert, dass TNF- $\alpha$  *in vitro* die Stickstoffmonoxid-Synthese in endothelialen Zellen inhibiert, wodurch es ebenfalls zu verstärkter Apoptose kommt (AGNOLETTI et al., 1999).

Im Gegensatz zu den Apoptose-stimulierenden Effekten von TNF- $\alpha$ , konnten zugleich zytoprotektive Wirkungen gezeigt werden, die vor allem durch Aktivierung von NF- $\kappa$ B vermittelt werden. Im inaktiven Zustand findet sich NF- $\kappa$ B an seinen zytoplasmatischen Inhibitor I $\kappa$ B gebunden. Durch einen geeigneten Stimulus kommt es zur Phosphorylierung und Degradation von I $\kappa$ B, wodurch NF- $\kappa$ B frei wird und in den Zellkern transloziert, wo es die Transkription seiner Zielgene reguliert (CHANDRASEKAR et al., 1997). Studien an transgenen Mäusen, die kardiomyozytär ein mutiertes I $\kappa$ B exprimieren, welches die Translokation von NF- $\kappa$ B zum Nukleus hin verhindert, zeigten nach Induktion myokardialer Infarkte eine Zunahme der Infarktgrößen und erhöhte Apoptoseraten der Herzmuskelzellen (MISRA et al., 2003).

---

Desweiteren mediiert NF- $\kappa$ B auch die Transkription anti-inflammatorischer Gene und die Apoptose von Leukozyten (LAWRENCE et al., 2001; KARIN et al., 2002).

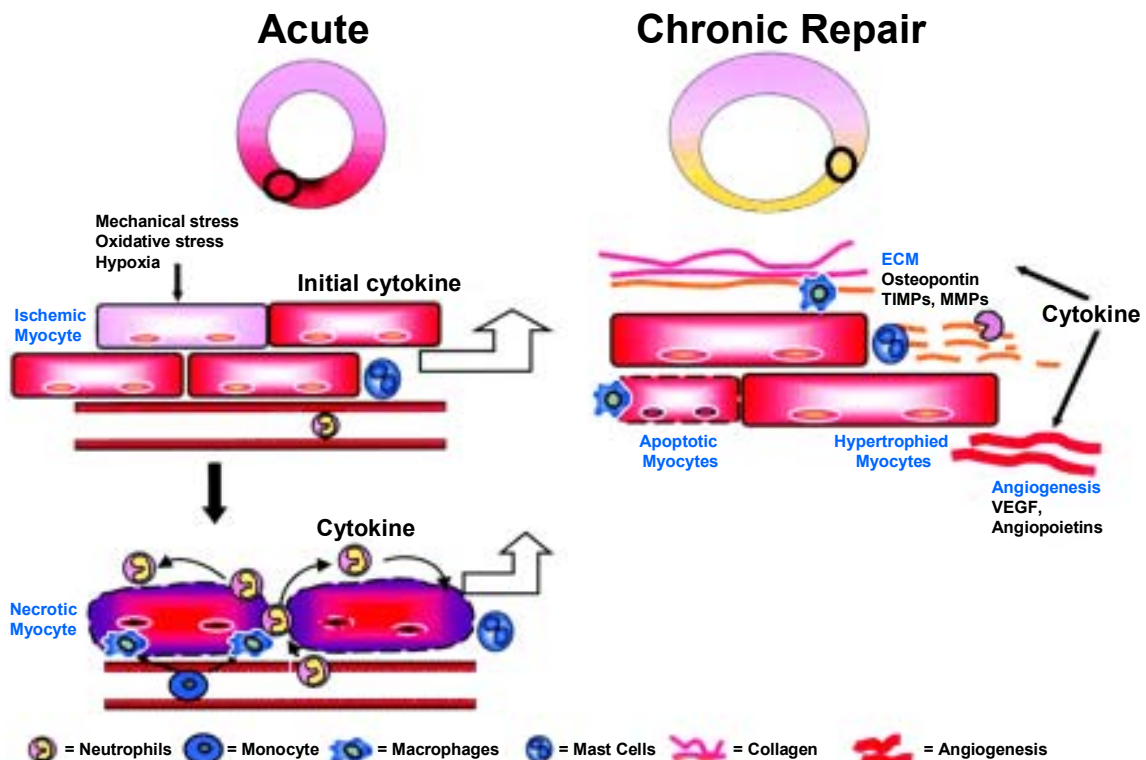


Abb. 2: Inflammatorische Vorgänge am ischämischen Myokard

Nach initialer Zytokinfreisetzung kommt es zu transendothelialer Migration von Neutrophilen Granulozyten, Monozyten bzw. Makrophagen und Mastzellen. Geschädigte Myozyten unterliegen nekrotischen oder apoptotischen Mechanismen. In der chronischen Phase kommt es zur Bildung extrazellulärer Matrix (ECM), zu weiterer Apoptose und Hypertrophie von Myozyten sowie zur Induktion der Angiogenese (nach NIAN et al., 2004).

Wie bereits erwähnt entfaltet TNF- $\alpha$  sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Wirkung. Eine Studie von KURRELMAYER et al. (2000) demonstrierte, dass es bei Mäusen ohne TNF-Rezeptor nach Infarktinduktion zu einer signifikant vergrößerten Infarktfläche und erhöhter Apoptose der Kardiomyozyten kommt. Die proinflammatorische Wirkung geschieht in erster Linie über die Aktivierung neutrophiler Granulozyten und die Induktion des Angiotensin II Typ 1 Rezeptors auf myokardialen Fibroblasten und Makrophagen (SCHLAYER et al., 1988; GURANTZ et al., 2005). Effekte von Angiotensin II liegen in Fibroblasten-Proliferation und der Synthese extrazellulärer Matrixproteine. Somit spielt TNF- $\alpha$  über Angiotensin II eine wichtige Rolle bei der Regulation des strukturellen Umbaus des linken Ventrikels (PENG et al., 2002).

#### 2.4.2.1.3 Leukozytäre Infiltration des Ischämie-Gebiets

Eine entscheidende Rolle der Zytokine ist in der Rekrutierung leukozytärer Zellen zu sehen. Weitere Faktoren, die eine Aktivierung der Leukozyten bewirken, wären der Platelet-Activating Faktor (PAF) und Chemokine wie der Cytokine-Inducible Neutrophil Chemotactic Factor (CINC), das Epithelial Neutrophil Activating Protein-78 (ENA-78) und andere (JAESCHKE et al., 1997). Die entscheidende Rolle der Leukozyten zeigen verschiedene Studien.

Neutrophile Granulozyten-depletierte Tiere bilden nach Infarktinduktion geringere Infarktgrößen aus als nicht-depletierte, was vermuten lässt, dass ein erheblicher Anteil der Herzmuskelschädigung nach Reperfusion den neutrophilen Granulozyten und ihrer Zytotoxizität zuzuschreiben ist (JOLLY et al., 1986; LITT et al., 1989). Nach Aktivierung dieser kommt es durch Interaktion mit Selektinen (BOSSE et al., 1994) und  $\beta$ 2-Integrinen zu transendothelialer Migration, was in neutrophiler Infiltration des ischämischen Bereichs resultiert (ADAMS et al., 1994; EBNET et al., 1999). Über eine Mac-1-ICAM-1-Interaktion ist es den Granulozyten möglich, an parenchymalen Zellen zu adhären (FRANGOGIANNIS et al., 2002) und diese durch direkte zytotoxische Einwirkung zu schädigen, was durch die erneute Freisetzung freier Radikale und von Proteasen geschieht (JAESCHKE et al., 1997).

Auch Monozyten werden über Chemotaxis an den Ort der Ischämie rekrutiert, vermittelt über C5a, Transforming Growth Faktor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) und Monocyte Chemoattractant Protein (MCP-1) (BIRDSALL et al., 1997). Kommt es zu keiner Reperfusion des Gewebes, bleibt die Induktion von MCP-1 aus und eine verminderte monozytäre Einwanderung ist die Folge. Die Rolle der Monozyten, die im Infarktgewebe zu Makrophagen differenzieren, liegt in erster Linie neben der Bereitstellung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (WEIHRAUCH et al., 1995) in der Phagozytose des nekrotischen Gewebes und apoptotischer Myo- und Leukozyten (HASLETT et al., 1999). Für die Infarktheilung ist die Beseitigung des Leukozyteninfiltrats und die beginnende Suppression des inflammatorischen Prozesses von großer Bedeutung.

Ein wichtiger Faktor in der Unterdrückung der Entzündungsreaktion ist Interleukin 10 (IL-10), dessen Expressionspeak bei 96 bis 120 Stunden nach Einsetzen der Reperfusionphase liegt (FRANGIOGIANNIS et al., 2000). IL-10-defiziente Mäuse wiesen nach Infarkt-Induktion eine deutlich verstärkte Entzündungsreaktion auf, ersichtlich in

vermehrtem Leukozyten-Infiltrat und erhöhten Plasma-Konzentrationen von TNF- $\alpha$  (YANG et al., 2000).

Wesentlich beteiligt am extrazellulären Matrix-Umbau sind die Matrix-Metalloproteinasen (MMP), insbesondere MMP-2, MMP-3, MMP-9 und MMP-13, sowie deren Inhibitoren, die Tissue Inhibitors of Metalloproteinase (TIMP). Im myokardialen Interstitium lokalisiert werden die inaktiven MMPs innerhalb von Minuten nach Einsetzen der Ischämie über pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  aktiviert, was in der Degradation extrazellulärer Matrix resultiert. Im weiteren Verlauf des postischämischen Geschehens kommt es zu einem Überwiegen der TIMP-Aktivität, wodurch es zur Akkumulation von de novo synthetisierten Matrix-Proteinen kommt (SIWIK et al., 2000). Der Übergang zur proliferativen Phase wird eingeleitet.

#### 2.4.2.2 Proliferative Phase

Zur Aktivierung von Mastzellen kommt es in erster Linie durch die gemeinsame Wirkung von Stammzell Faktor (SCF), Komplement 3a (C3a) und C5a (MEININGER et al., 1992). Die Rolle der Mastzellen im Infarktgeschehen liegt in der Synthese von Substanzen wie Histamin und Tryptase, welche Fibroblasten zu Proliferation und Kollagen-Synthese stimulieren (RUOSS et al., 1991; GRUBER et al., 1997). Eine weitere Aufgabe obliegt ihnen in der Produktion von Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  (PENNINGTON et al., 1992), Basic Fibroblast Growth Faktor bFGF (QU et al., 1995) und Vascular Endothelial Growth Faktor VEGF (BOESIGER et al., 1998), welche neben der Fibroblasten-Stimulation auch als Stimulus für die Angiogenese fungieren (SHIOTA et al., 2003).

TGF- $\beta$  spielt eine Schlüsselrolle im Übergang des Infarktgebiets von der Entzündung zur Fibrosierung. In experimentellen Studien wurde gezeigt, dass sich eine frühe Inhibierung von TGF- $\beta$  in erhöhter Mortalität und verstärkter linksventrikulärer Dilatation auswirkt (IKEUCHI et al., 2004). Vornehmlich lokalisiert in der Border Zone (DEAN et al., 2005), werden TGF- $\beta$ 1 und  $\beta$ 2 sehr früh und TGF- $\beta$ 3 erst später im Infarktgeschehen hochreguliert (DETEN et al., 2001). Zum einen unterdrückt TGF- $\beta$  die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen durch mononukleäre und endothelia-



le Zellen und fördert zum anderen die Synthese extrazellulärer Matrixproteine wie Kollagen, Fibronectin oder Tenascin (BASSOLS et al., 1988).

Wie unter 2.4.2.1 besprochen, kommt es nach Abklingen der Entzündungsreaktion zur Produktion von Matrixproteinen und somit zur Einleitung der proliferativen Phase. Eine daran beteiligte Zelle, der  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin positive Myofibroblast wurde von WILLEMS und Kollegen charakterisiert (1994). Lokalisiert vornehmlich in der Border Zone fungiert der Myofibroblast im Laufe der Infarktheilung als Hauptquelle für kollagene mRNA (SQUIRES et al., 2005). Die Differenzierung vom Fibroblasten hin zum Myofibroblasten ist wohl letztendlich ein multifaktorielles Geschehen. TGF- $\beta$  ist hierin einer der Schlüsselfaktoren (DESMOULIERE et al., 1993; SERINI et al., 1998). Ein weiterer Stimulus der Myofibroblasten-Differenzierung ist die „relative Hyperoxie“, die nach Reperfusion im Infarktgebiet herrscht und ebenso die Fibroblasten zur Differenzierung anregt (ROY et al., 2003).

#### 2.4.2.3 Reifungsphase

Während der Reifungsphase im Laufe der Infarktheilung kommt es zur Apoptose der Myofibroblasten und zum Austausch des Granulationsgewebes durch kollagenes Narbengewebe (FRANGOGIANNIS et al., 2006).

Ein wichtiger Punkt für eine schnelle Abheilung des Infarkts ist eine ausreichende Versorgung des Narbengebiets durch Bildung neuer Gefäße, was unter anderem über Chemokine reguliert wird. Nach Ischämie kommt es durch TNF- $\alpha$  Freisetzung von Mastzellen zur vermehrten endothelialen Expression des Interferon-Inducible Proteins-10 (IP-10). IP-10 fungiert als potenter angiostatischer Faktor, dessen Freisetzung circa 24 Stunden nach Einsetzen der Reperfusion durch TGF- $\beta$  reprimiert wird (NIAN et al., 2004). Zusätzlich mediiert TGF- $\beta$  die Freisetzung angiogenetischer Wachstumsfaktoren wie bFGF und VEGF durch endotheliale und glatte Muskelzellen (LEE et al., 2000). Die Induktion von VEGF wird neben TGF- $\beta$  durch den Hypoxia-Inducible Factor (HIF-1 $\alpha$ ) mediiert. Dadurch kommt es letztendlich zur Einsprossung von Gefäßen in das Infarktgebiet (FUKUDA et al., 2004). Gleichzeitig bewirkt VEGF die erhöhte Expression von Angiopoietin 2 (Ang-2), wohingegen die Expression von Angiopoietin 1 (Ang-1) unterdrückt wird (SANDHU et al. 2004). Angiopoietin 1 und 2 stellen Liganden der Tie2-Rezeptor Tyrosin Kinase dar, welche auf Endothelzellen

und endothelialen Vorläuferzellen lokalisiert ist. Das Binden von Ang-1 an Tie-2 resultiert in endothelialer Inaktivität, während die Bindung von Ang-2 an Tie-2, Ang-2 als endogener Antagonist von Ang-1, zur Aktivierung der Endothelzellen und somit zur Induktion der Angiogenese führt (CONWAY et al., 2001).

#### 2.4.3 Funktionelle Veränderungen

Infolge der entzündlichen Reaktionen und der Umbauprozesse im Infarktgebiet kommt es zu einer Reihe von Veränderungen in der Morphologie und Funktionalität des Herzens. Eine der ersten Veränderungen am geschädigten Herzmuskel besteht in der Ausdehnung des Infarkts, auch Infarkt-Expansion genannt, verursacht durch Zellrupturen und Überdehnung der Myozyten. Die Klinik reicht von klinisch unauffälligen bis hin zu massiven Veränderungen mit Bildung von Aneurysmen oder gar der Ruptur des linken Ventrikels (WEISMAN et al., 1988). Als Kompensationsmechanismus zur verminderten Kontraktilität des infarzierten Muskels kommt es zu einer Hypertrophie des übrigen intakten Myokards (GOLDMAN et al., 1995), allerdings kann die dadurch verbesserte Funktionalität auf lange Sicht nicht aufrechterhalten werden. Mit der Zeit kommt es zu kontraktile Dysfunktion mit zunehmender Versteifung des Myokards durch vermehrten Einbau von Kollagen nicht nur im Infarkt, sondern auch im „gesunden“ umliegenden Myokard. Die eingeschränkte Funktionalität des Herzens äußert sich in systolischer und diastolischer Volumenerweiterung des linken Ventrikels, verminderter Auswurfleistung und fortschreitender Dekompensation, die letztendlich in myokardialer Insuffizienz resultiert.

#### 2.5 Turnover und Regeneration des adulten Herzmuskels

Lange Zeit dachte man, dass das Herz an sich nicht zu einer Regeneration fähig ist und sich somit beim adulten Säuger, im Gegensatz zu Amphibien und Fischen (POSS et al. 2002), in einem postmitotischen Zustand befindet (SOONPAA et al., 1998; MACLELLAN et al., 2000). In den letzten Jahren wurde diese These aber heftigst diskutiert und die zugrundeliegende Datenlage gestaltet sich äußerst kontrovers. Interessante Daten stammen aus dem Bereich der Organtransplantation. Man konnte nach Transplantation weiblicher Spenderherzen in männliche Empfänger die

---

Existenz männlicher Kardiomyozyten nachweisen (BAYES-GENIS et al., 2002; LAFLAMME et al., 2002; MULLER et al., 2002; QUAINI et al., 2002). Bei BAYES-GENIS et al. zeigte sich, dass der kardiale Chimärismus, das heisst der Grad an vom Empfänger stammenden Kardiomyozyten am gesamten Herzmuskel, bei 1-2% liegt. Auch LAFLAMME et al. und MULLER et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen (0,02-1%). GLASER et al. (2002) jedoch konnten keine vom Empfänger stammenden Kardiomyozyten detektieren, sie sahen lediglich glatte Muskelzellen im Gefäßsystem.

In einer Studie von DEB et al. (2003) untersuchte man verschiedene Organe nach Knochenmarktransplantation eines männlichen Spenders in einen weiblichen Empfänger. In diesem Fall konnten männliche differenzierte Zellen sowohl im Herzen, als auch in Leber und Skelettmuskel identifiziert werden. DEB et al. konnten außerdem ausschließen, dass die neu entstandenen Kardiomyozyten durch Zellfusion entstanden waren.

Schon aus diesen humanen Transplantations-Daten wird ersichtlich, dass das Auftreten einer Differenzierung adulter Stammzellen zu Kardiomyozyten umstritten ist. Des Weiteren lassen die Studien von BAYES-GENIS et al., LAFLAMME et al., MULLER et al. und QUAINI et al. die Schlussfolgerung zu, dass es zu einer Einwanderung herzfremder Vorläuferzellen aus dem Knochenmark oder aus anderen Organen kommen könnte, welche in der Lage sind, im Herzen selbst zu Kardiomyozyten zu differenzieren.

Die These der Möglichkeit zur kardialen Regeneration wird durch zwei weitere Arbeiten untermauert. Zum einen zeigten KAJSTURA und Kollegen (1998), dass es im Endstadium der Herzinsuffizienz beim Menschen zur Proliferation von Kardiomyozyten kommt, zum anderen demonstrierte BELTRAMI et al. (2001) über Expressionsnachweis von Ki-67, dass sich nach Myokardinfarkt ein geringer Prozentsatz der Kardiomyozyten im Peri-Infarktgebiet in Mitose befindet.

Weitere Arbeiten von BELTRAMI et al. (2003) und OH et al. (2003) zeigen, dass eine Isolierung kardialer Stammzellen aus dem adulten Herzen möglich ist. Diese Zellen, die Cardiac Stem Cells (CSC), sind aber offensichtlich im Falle eines Infarkts nicht in der Lage, in ausreichendem Maße zu einer Regeneration des Herzmuskels beizutragen (PITTENGER et al., 2004; TORELLA et al., 2006).

Hierzu gibt es eine interessante Studie von PALLANTE et al. (2007), die *in vitro* zeigte, dass die Differenzierung von Knochenmarkszellen zu Kardiomyozyten vor allem über den Platelet Derived Growth Factor- $\alpha$  (PDGF- $\alpha$ ) und seinen Rezeptor mediiert wird. Deren Expressionslevel wurden in weiterer Folge in kultivierten Knochenmarkszellen juveniler und alter Ratten verglichen und man kam zu dem Resultat, dass es bei den Zellen der alten Tiere zu einer reduzierten Expression des PDGF-Rezeptors und somit zu einem gestörten PDGF-Signaling kommt. Infolgedessen war eine deutliche Reduktion der kardiomyozytären Differenzierung zu beobachten.

## 2.6 Autologe Stammzellen als Therapie des akuten Myokardinfarkts

Wie bereits erwähnt, stellt der akute Myokardinfarkt eine weit verbreitete Krankheit mit hoher Mortalitätsrate dar. Kommt es nicht zum sofortigen Tod des Patienten, ist als Folge mit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz oder anderen Komplikationen wie Aneurysmen-Bildung zu rechnen. Seit einigen Jahren bemüht man sich, Stammzellen als Therapeutikum zu erforschen bzw. bereits in klinischen Studien einzusetzen. Die adulten Stammzellen bieten sich aufgrund ihres großen Potenzials und der Möglichkeit der Isolierung, Kultivierung und autologen Transplantation an. Zunächst muss man sich jedoch die Frage stellen, was transplantierte Stammzellen am infarzierten Herzmuskel leisten sollen. Denkbar wäre zum einen, Ersatz für die untergegangenen Kardiomyozyten zu generieren. Ein zweiter Ansatz läge in der Bereitstellung von Zellen, die ihren Beitrag zur Neovaskularisierung beisteuern, aktiv oder passiv durch Sekretion angiogener Faktoren. Im folgenden Text wird der Status quo der Forschung im präklinischen Bereich und die Ergebnisse aus bereits durchgeführten klinischen Studien besprochen.

### *2.6.1 Therapieansätze*

#### 2.6.1.1 Zelluläre Myokard-Plastik

Mit der Entdeckung potenter adulter Stammzellen, der Möglichkeit ihrer Kultivierung und der Erkenntnis, dass diese Zellen sich *in vitro* durch die Zugabe von 5-

---

Azacytidine, einem DNA-Demethylans, zu Kardiomyozyten differenzieren lassen (MAKINO et al., 1999), rückten diese Zellen als mögliches Therapeutikum für ischämische Erkrankungen, wie den Myokardinfarkt, ins Blickfeld. Zudem zeigten CONDORELLI et al. (2001) die *in vitro*-Differenzierung endothelialer Zellen zu kontraktiven Kardiomyozyten. Die Idee der zellulären Myokard-Plastik war geschaffen. Hierbei steht nicht nur im Vordergrund, das Ausmaß der Narbenbildung zu reduzieren, sondern zugleich Ersatz für nekrotische Myokardzellen und untergegangenes Endothel bereitzustellen (ORLIC et al., 2001).

Die ideale Zelle für diesen Therapieansatz sollte folgende Funktionen erfüllen:

- Fähigkeit zur Proliferation
- Differenzierung zur kontraktiven Herzmuskelzelle
- Elektromechanische Kopplung an die Nachbarzellen
- Leichte Isolierbarkeit und Kultivierung (SIEPE et al., 2005)

Als erste zeigten ORLIC et al. (2001) nach Gabe  $\text{Lin}^- \text{c-kit}^+$  Knochenmarkszellen in das an den Infarkt angrenzende Myokard die Differenzierung der injizierten Zellen zu Kardiomyozyten und Endothelzellen. Während eine Reihe weiterer Forscher zu dem Resultat kamen, dass *in vivo* die Differenzierung adulter Stammzellen zu Kardiomyozyten möglich ist (TOMITA et al., 1999; JACKSON et al., 2001; ORLIC et al., 2001b; SHAKE et al., 2002; TOMA et al., 2002; BITTIRA et al., 2003; KAJSTURA et al., 2005; UEMURA et al., 2006), bestreiten diese These eine Reihe anderer Arbeitsgruppen (TERADA et al., 2002; BALSAM et al., 2004; MURRY et al., 2004; NYGREN et al., 2004; YOSHIOKA et al., 2005). So erklärten NYGREN und Kollegen (2004) die beobachteten Differenzierungen durch das Stattfinden von Zellfusion zwischen endogenen Herzmuskelzellen und den verabreichten Stammzellen. Während ORLIC et al. die Differenzierung von HSCs zu Endothelzellen und Kardiomyozyten beschrieben, konnten BALSAM et al. (2004) diese Beobachtung nicht bestätigen. Diese Arbeitsgruppe arbeitete mit drei unterschiedlichen Knochenmarks-Subpopulationen. Die Zellen, die nach Transplantation im Herzen nachgewiesen werden konnten, trugen jedoch nicht kardiale Marker, sondern vornehmlich CD45 und/oder Marker für B- (B220) und T-Lymphozyten (CD3).

### 2.6.1.2 Vaskularisierung des Infarktgebiets

Therapieansätze zur Verbesserung der klinischen Symptomatik nach Myokardinfarkt müssen allerdings nicht zwingend in der Generierung neuen Myokards liegen. Ein zweiter Ansatz läge in dem Bemühen, nach erfolgter Reperfusion die Wiederherstellung einer physiologischen Gewebepfusion zu fördern.

Verschiedene Studien zeigten, dass es durch Gabe von Knochenmarkszellen zu einer verbesserten Neovaskularisierung des Infarktgebiets und der Border Zone kommt (TANG et al., 2004). Die direkten Folgen dieser verstärkten Gefäßbildung resultierten in verbesserter Perfusion des geschädigten Herzmuskels, wodurch bereits geschädigte, hypertrophe Kardiomyozyten vor dem Zelltod bewahrt werden konnten (SCHUSTER et al., 2004, TANG et al., 2005). Infolgedessen kann man mit einer verringerten Apoptoserate rechnen, mehr funktionelles, kontraktiles Myokard bleibt erhalten, weniger Kollagen wird eingelagert und somit wird 1. die Infarktgröße reduziert und 2. der Fibrosierung des linken Ventrikels, und somit einer verringerten Kontraktibilität, vorgebeugt.

SCHUSTER et al. (2004) konnten zudem zeigen, dass nach intravenöser Gabe CD34<sup>+</sup> mononukleärer Zellen die Induktion myokardialer Zellteilungen zu beobachten war (doppelt positiv für Troponin I und Ratten-Ki-67). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Neovaskularisierung zum einen auf die parakrine Funktion der transplantierten Zellen (KOBAYASHI et al., 2000) und zum anderen auf ihre eigene Inkorporation in die neuen Gefäßstrukturen zurückzuführen ist (KAMIHATA et al., 2001; KAWAMOTO et al., 2001; KOCHER et al., 2001; KAMIHATA et al., 2002; BITTIRA et al., 2003; SCHUSTER et al., 2004).

TANG et al. (2005) demonstrierten, dass es nach Transplantation von MSCs zu erhöhter Expression von bFGF, VEGF und SDF-1 $\alpha$  am infarzierten Herzen kommt. Nach ASKARI et al. (2003) induzierte SDF-1 $\alpha$  die Rekrutierung endothelialer Vorläuferzellen und somit die Neovaskularisierung, was sich in dieser Studie wiederum positiv auf die Funktionalität des Herzens auswirkte. Die erhöhte Durchblutung im Infarktgebiet und der angrenzenden Border Zone äußerte sich neben einer verringerten Infarktgröße in reduzierter Fibrosierung des Narbengewebes und in Folge in einer Verbesserung der kardialen Funktion (KAMIHATA et al., 2001; KOCHER et al., 2001; KAMIHATA et al., 2002; ITESCU et al., 2003; SCHUSTER et al., 2004; TANG et al., 2004).

---

### 2.6.1.3 Apoptose-Schutz

Ein wichtiger Aspekt ist sicherlich in dem nachgewiesenen anti-apoptotischen Effekt der Knochenmarkszellen zu sehen. Kardiomyozyten weisen *in vitro* nach 4 Stunden der Anoxie hohe Apoptoseraten auf. Kultiviert man allerdings die Zellen unter äquivalenten Bedingungen mit Knochenmarkszellen, wirkt sich dies in einer Reduktion der durch TUNEL- oder Annexin V-Färbung visualisierten Apoptoserate aus (UEMURA et al., 2006). Der Mechanismus beruht offensichtlich auf der Aktivierung der Signaltransduktion über Akt, ein Gen dessen anti-apoptotischer Effekt gezeigt wurde (Reviewed in FRANKE et al., 1997). Ebenso konnte der zellschützende Effekt von Akt auf Modelle der Myokard-Ischämie übertragen werden (FUJIO et al., 2000; MATSUI et al., 2001).

### 2.6.1.4 Zytokin-Therapie

Neben der direkten Verabreichung reiner Knochenmarkszellen oder vordifferenzierter Progenitorzellen wurden in verschiedenen Arbeiten die Auswirkungen von Zytokin-Therapien untersucht.

TAKAHASHI und Kollegen (1999) zeigten, dass es durch exogene Gabe von Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) zur Mobilisierung endothelialer Progenitorzellen an den Ort der Ischämie kommt, was sich in verstärkter Neovaskularisierung auswirkte. Auch die Gabe von Stem Cell Factor (SCF) und Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) führte zur Rekrutierung adulter Stammzellen aus dem Knochenmark zum Entzündungsherd hin. Des Weiteren wurde gezeigt, dass es zur Integration dieser mobilisierten Knochenmarkszellen in das geschädigte Myokard kam, was wiederum zu einer verbesserten Leistung des Herzmuskels führte (ORLIC et al., 2001b; DAWN et al., 2006).

*In vitro* konnte demonstriert werden, dass Knochenmarkszellen auf Anoxie mit einer starken Induktion der Zytokin-Freisetzung reagieren, vor allem VEGF, bFGF, SDF und auch Insulin-like Growth Factor (IGF), wohingegen bei Kardiomyozyten keine erhöhte Zytokinausschüttung nachgewiesen werden konnte (UEMURA et al., 2006). Somit könnten verabreichte Knochenmarkszellen bzw. MSCs als lebende Zytokin-Lieferanten dienen.

---

Einen ähnlichen Effekt sehen auch YOSHIOKA et al. (2005). Nach Transplantation CD34<sup>+</sup> Zellen konnte eine Erhöhung der VEGF-Level gezeigt werden, was sich wiederum in verbesserter Funktionalität des Herzmuskels widerspiegelte.

Allerdings muss man hierbei an das durchschnittliche Alter der Myokardinfarkt-Patienten denken. Studien zeigten, dass es bei infarzierten alten Ratten zu einem weitaus reduzierten Ansprechen auf die Zytokin-Therapie kommt, so dass die Reduktion der Apoptoserate im Vergleich zu jungen Ratten unerheblich war. Demzufolge konnte bei den alten Ratten keine Verminderung der Ventrikeldilatation als auch der Myozyten-Hypertrophie nachgewiesen werden (LEHRKE et al., 2006). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass gerade bei alten Menschen, die den weitaus größten Anteil der vom Myokardinfarkt betroffenen Patienten ausmachen, die Zytokin-Therapie von weniger großem Nutzen sein könnte.

#### 2.6.1.5 Immunmodulatorischer Effekt

Ein weiterer Punkt, der gerade erst in den letzten Jahren Beachtung fand, ist die Auswirkung von MSCs auf das Immunsystem. THUM et al. (2005) erklärten den oft beobachteten positiven Effekt auf Infarktgröße und Funktionalität des Herzens nach Stammzell-Transplantation dahingehend, dass ein großer Anteil der transplantierten Zellen sich nicht im Gewebe ansiedeln kann, diese in Folge in Apoptose eintreten und dass eben diese zusätzlichen apoptotischen Zellen die gesteigerte Expression anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  medieren. Auch muss man bei der Transplantation von Zellen immer mit einem gewissen Prozentsatz an Zellen rechnen, die bereits zum Zeitpunkt der Zell-Gabe apoptotisch in den Empfänger gelangen.

Einen anderen Angriffspunkt lässt die Arbeit von BARTHOLOMEW et al. (2002) denkbar erscheinen. Man zeigte in einem Hauttransplantations-Modell an Primaten eine signifikante Verlängerung der Abstoßungsreaktion allogener Transplantate nach einmaliger intravenöser Verabreichung von MSCs. Es wird angenommen, dass die MSCs ihre immunmodulatorischen Fähigkeiten entfalten und somit eine verzögerte Abstoßungsreaktion medieren. So könnten die MSCs auch am Herzen eine überschießende Entzündungsreaktion eindämmen und zu einem schnelleren Abheilen des Infarkts und einer Verminderung der Infarktgröße führen.

---



Anhand all der angeführten Beispiele, die die Forschung in den letzten Jahren hervorgebracht hat, wird ersichtlich, dass die Frage der Effektivität der Zelltherapie selbst in der präklinischen Forschung äußerst heftig diskutiert wird. Zum einen sind die Mechanismen, denen zum Teil beobachtete positive Effekte der Zelltherapie zuschreiben sind, nicht geklärt, zum anderen kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren handelt, was eine Aufklärung der spezifischen Wirkungsweisen grundlegend erschwert.

### *2.6.2 Status quo der klinischen Forschung*

Trotz der umstrittenen Datenlage in der präklinischen Forschung wurden bereits klinische Studien durchgeführt. Die erste Studie, welche die Anwendung adulter Knochenmarksstammzellen als zusätzlichen Behandlungsansatz zu Katheterisierung und medikamenteller Therapie für den akuten Herzinfarkt untersuchte, wurde 2002 veröffentlicht. Es wurde der Effekt intrakoronar verabreichter mononukleärer Knochenmarkszellen, beziehungsweise peripher zirkulierender Progenitorzellen, auf den Remodeling-Prozess untersucht. ASSMUS et al. (2002) konnten zeigen, dass die Zelltherapie zu verbesserter Funktionalität und erhöhter Kontraktilität sowie Vitalität des Myokards führte. Eine Reihe weiterer Studien kam zu äquivalenten Ergebnissen (STRAUER et al., 2002; STAMM et al., 2003; FERNANDEZ-AVILES et al., 2004; SCHÄCHINGER et al., 2004; WOLLERT et al., 2004). STRAUER et al. (2005) verwiesen zudem auf den positiven Effekt der autologen intrakoronaren Zelltherapie bei chronischem Herzinfarkt, d.h. der Verabreichung adulter Stammzellen Monate nach Erstversorgung des akuten Herzinfarkts.

Während all diese Daten ein euphorisches Bild der Zelltherapie zeichneten, wurden gerade im Jahr 2006 zwei Studien veröffentlicht, welche die Euphorie dämpften. Sowohl JANSSENS et al. (2006) als auch LUNDE et al. (2006) kamen zu dem Resultat, dass die Transplantation autologer Knochenmarkszellen keinen Effekt auf die Funktionalität des geschädigten Herzmuskels ausübte. Während JANSSENS et al. zumindest eine Reduktion der Infarktgröße nach Zelltransfer beobachtete, konnten LUNDE et al. keinen Unterschied zwischen der Zelltherapie- und der Kontrollgruppe nachweisen. Analog dazu zeigten Daten von MEYER et al. (2006), dass der zunächst beobachtete positive Effekt der Zelltherapie der BOOST-Studie nach 6 Mona-

ten (WOLLERT et al., 2004) sich nach Fortsetzung der Studie nach 18 Monaten egalisierte.

Demnach gestaltet sich die Datenlage in der klinischen ebenso kontrovers wie in der präklinischen Forschung. Weitere Studien sind nötig, um sich Klarheit zu verschaffen, ob die Stammzelltherapie im Falle des akuten Myokardinfarkts tatsächlich von klinischer Relevanz ist.

### 2.7 Infarkt-Modell Ratte

Ein etabliertes Tiermodell zur Simulierung des Vorderwandinfarkts beim Menschen stellt die Induktion einer myokardialen Ischämie bei der Ratte dar. Die Infarktinduktion erfolgt durch Ligation der proximalen linken Koronararterie, der Arteria coronaria sinistra (MICHAEL et al., 1995; siehe Abb. 3). Beim Menschen stellt der Vorderwandinfarkt die am häufigsten auftretende Infarktform dar. Die pathophysiologischen Veränderungen am Mäuse- und Rattenherz bis hin zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz sind mit denen am humanen Herzen zu vergleichen (GOLDMAN et al., 1995). Es existieren sowohl Modelle, die eine permanente Ligation vorsehen, als auch solche, bei denen die Gewebe-Reperfusion durch Lösen der mindestens 30 Minuten andauernden Ligation eingeleitet wird. Man weiß, dass es ab 30 Minuten zu einer irreversiblen Schädigung der Kardiomyozyten kommt. Da die kollaterale Blutversorgung sowohl bei der Ratte als auch bei der Maus verglichen zu anderen Säugetieren sehr spärlich ist (AHN et al., 2004), können Infarktgrößen von bis zu 50% des linken Ventrikels erreicht werden. Die Tiere zeigen auch bei Induktion solch großflächiger Infarkte keine klinische Symptomatik.

FISHBEIN et al. (1978) demonstrierten, dass es in den ersten drei Wochen nach Infarkt zu einer akuten Entzündungsreaktion kommt, die dann in einen chronischen Entzündungsprozess übergeht. Es kommt zur Resorption nekrotischen Gewebes, Gefäßproliferation und Kollageneinlagerungen. Dieses Remodeling resultiert wie auch beim Menschen in der Bildung von Narbengewebe.

Somit stellt das Ligations-Modell der Ratte ein überaus aussagekräftiges Modell für Prozesse am infarzierten Herzen dar.

---

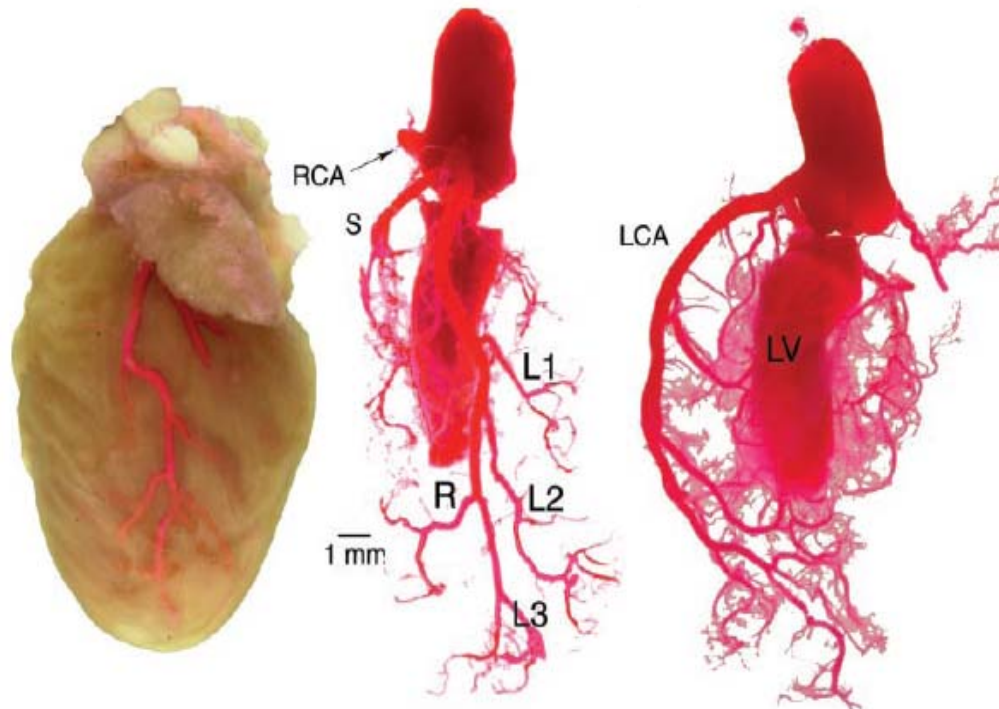


Abb. 3: Darstellung der A. coronaria sinistra  
Left Coronary Artery (LCA); RCA: right coronary artery; Korrosionspräparat (nach AHN et al., 2004)

### 2.8 Modell der hPLAP-transgenen Ratte

Um in Transplantations-Modellen eine Aussage über das Schicksal transplanteder Zellen oder Organe machen zu können, ist ein geeigneter Zell-Marker erforderlich. Der ideale Marker sollte verschiedene Charakteristika erfüllen. Zum einen darf er keinen Einfluss auf die Ontogenese des Organismus ausüben, sollte auch nach Zellteilungen stabil bleiben und mit einfachen Methoden sowohl in lebenden Zellen als auch in fixierten Geweben nachzuweisen sein. In diesem Bereich gibt es eine Vielzahl verschiedener Ansätze, die je nach Fragestellung unterschiedlich geeignet sind, jedoch alle Stärken und Schwächen aufweisen.

Zum einen besteht die Möglichkeit, Zellen mittels diverser Farbstoffe zu markieren. So integriert sich beispielsweise Hoechst Farbstoff 33258 in doppelsträngige DNA (TOURBAH et al., 1991). Da es jedoch bei der Zellteilung verloren geht, eignet es sich lediglich als Marker für nicht-proliferierende Zellen.

Auch bei anderen Labeling-Techniken, wie mit BrdU, Tritium-markiertem Thymidin oder Dil als Agens, kommt es nach einigen Mitosen zu einem Verlust beziehungsweise zu einer Abschwächung des Signals (MUTJABA et al., 2001).

Eine Alternative ist eine Transfektion der Zellen mit rekombinanten, Reporter-Gen tragenden Viren. Ein Problem hierbei ist aber in der geringen Transfektions-Effizienz und in der Tatsache, dass es oft zu einer Inaktivierung der viral-transduzierten Marker-Gene kommt, zu sehen (NAVIAUX et al., 1992).

Ein weiterer Ansatz basiert auf der Konstruktion transgener Tiere, die entweder ubiquitär oder gewebespezifisch einen geeigneten Marker exprimieren. Beispiele für diesen Ansatz wären transgene Tier-Modelle, in denen die Tiere Marker wie das Green Fluorescent Protein (GFP),  $\beta$ -Galactosidase, Luciferase oder humane Plazentäre Alkalische Phosphatase (hPLAP) exprimieren. Auch diese Marker besitzen Vor- und Nachteile. Die weiteren Ausführungen beschränken sich auf die Alkalische Phosphatase, den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Marker für die histochemische Detektion transplanterter Zellen.

Im humanen Organismus existieren vier Isoenzyme der Familie der Alkalischen Phosphatasen (AP). Demnach gibt es eine gewebeunspezifische AP (TNAP Tissue Non-Specific AP) und drei gewebespezifische APs: die Intestinale AP (IAP), die Keimzellen-AP (GCAP, Germ Cell AP) und die Plazentäre AP (PLAP, respective PAP) (LE DU et al., 2002). Die humane Plazentäre AP (hPLAP) wird exklusiv in der Plazenta von Primaten und von gewissen malignen Tumorzelllinien exprimiert (BANHAM et al., 1981).

Um hPLAP als Marker-Enzym für Transplantationsmodelle nutzen zu können, generierten KISSEBERTH et al. (1999) die hPLAP-transgene Fischer 344 Ratte.

Aus früheren Studien ist bekannt, dass es unter Verwendung des ROSA  $\beta$ geo 26 (R26) Promotors zu einer stabilen und ubiquitären Expression des jeweiligen Transgens kommt (ZAMBROWICZ et al., 1997). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Expression von hPLAP unter dem R26 Promotor keinerlei Einfluss auf die Ontogenese der Tiere ausübt (KISSEBERTH et al., 1999).

Doch was macht nun hPLAP zu einem guten Marker? Aufgrund seiner Hitzestabilität behält hPLAP, im Gegensatz zu GFP oder LacZ, seine enzymatischen Eigenschaften sowohl nach Paraffineinbettung (KISSEBERTH et al., 1999) als auch nach Kunststoffeinbettung (UNGER et al., submitted), was ein breites Anwendungsspektrum ermöglicht. Das Enzym Alkalische Phosphatase wird in vielen Zellen des Körpers exprimiert, allerdings unterscheidet sich hPLAP in ihrer Hitzestabilität von den übrigen APs (LE DU et al., 2002). So können endogene APs durch 30 minütige

---

Hitzebehandlung inaktiviert werden und der Enzymnachweis, und somit die Darstellung transgener Zellen, kann durch einfache histochemische Techniken erfolgen (BOSSI et al., 1993, MUTJABA et al., 2001). Abbildung 4 zeigt Knochenmark eines transgenen Tiers im Vergleich zu einem Wildtyp.

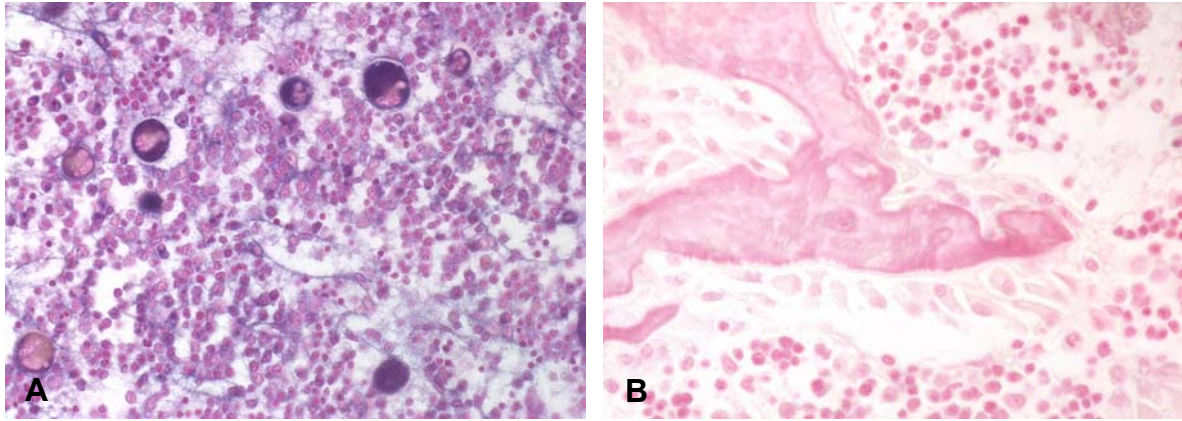


Abb. 4: Knochenmark einer hPLAP-positiven Ratte (A) und einer Wildtyp Ratte (B)  
Originalvergrößerung 200fach

Verschiedene Autoren konnten bereits den geeigneten Einsatz der hPLAP-transgenen Fischer Ratte als Transplantations-Modell für die Verfolgung neuronaler Vorläuferzellen zeigen (MUTJABA et al., 2001; LEPORE et al., 2006a; LEPORE et al., 2006b; MOSHER et al., 2006).

Der Stamm der Fischer 344 Ratte ist ein Inzuchtstamm. hPLAP-transgene Tiere unterscheiden sich lediglich in der ubiquitären membranständigen Expression der humanen Plazentären AP von den Wildtyp Fischer 344 Ratten.

Man weiss, dass membranständige sowie auch intrazelluläre Expression eines fremden Marker-Proteins zur Abstoßung dieser Zellen nach Transplantation seitens des Empfängers führt (ROSENZWEIG et al., 2001). Dieses Problem kann überwunden werden, indem Toleranz gegenüber dem Marker durch letale Bestrahlung und nachfolgende Transplantation des Empfängers mit Marker-exprimierendem Knochenmark erzeugt wird (HEIM et al., 2000). Diese Methode wurde in der Folge gewählt, um Toleranz gegenüber hPLAP-exprimierenden Zellen zu erzeugen. Somit verfügt man über ein Tiermodell, in dem die Übertragung von Zellen in immunkompetente Empfänger, ohne zusätzliche Immunsuppression und ohne die Gefahr einer immunmedierten Abstoßungsreaktion, möglich ist.

### 2.9 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Anwendung des Modells der letal bestrahlten und mittels hPLAP-positivem Knochenmark rekonstituierten Fischer 344 Ratte am Beispiel eines Myokardinfarkt-Modells zu demonstrieren. Es sollte gezeigt werden, welche Rolle Knochenmarkszellen im inflammatorischen Prozess und in der nachfolgenden Abheilung nach Myokardinfarkt spielen. Weiters sollte untersucht werden, inwieweit sich die intravenöse Verabreichung von  $1 \times 10^7$  Knochenmarkszellen eine Woche nach Infarktinduktion positiv auf das Herz-Remodeling auswirkt und ob tatsächlich eine *in vivo* Differenzierung zu Kardiomyozyten bestätigt werden kann.

Ein zweites Ziel dieser Arbeit war die Optimierung des bestehenden Tiermodells. Die Idee war, durch subkutane Injektion hPLAP-positiven Vollbluts in der postnatalen Phase, zu einem Zeitpunkt, da das Immunsystem des Neugeborenen noch nicht vollständig ausgereift ist, belastbare Toleranz gegenüber dem Marker-Enzym hPLAP zu induzieren (BUTLER et al., 2000; PETIT et al., 2004). Somit hätte man ein Tiermodell geschaffen, mit dem es möglich ist, in immunkompetenten, Marker-toleranten und zudem Background-freien Tieren, das Schicksal von transplantierten Zellen oder gar Organen nachzuverfolgen.

Als nächstes Ziel sollte mittels des modifizierten Modells der neonatal Marker-toleranten Fischer 344 Ratte gezeigt werden, ob es nach intravenöser Verabreichung von Knochenmarkszellen eine Woche nach Infarktinduktion zu einer Rekrutierung eben dieser Zellen in das Infarktgebiet kommt und ob sich diese exogen zugeführten Zellen langfristig im geschädigten Herzmuskel ansiedeln.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Versuchstiere

Für alle nachfolgend beschriebenen Versuche wurden insgesamt 78 Fischer 344 Ratten bzw. die hPLAP-transgene Fischer 344 Mutante als Spendertiere verwendet. Alle Tierversuche wurden mit Genehmigung der universitären Ethikkommission der Veterinärmedizinischen Universität Wien und unter Einhaltung der GSP durchgeführt. Die Genehmigung der Tierversuche, GZ:BMBWK-68.205/0055-BrGT/2005, erfolgte durch das Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft und Kultur, Österreich.

##### *3.1.1 Tierhaltung*

Die Ratten wurden in den Tierräumen des Instituts für Pathophysiologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien in Makrolon Typ IV Käfigen gehalten. Die Temperatur im Tierraum betrug im Durchschnitt 24°C, die relative Luftfeuchtigkeit ca. 55%. Über die gesamte Versuchsdauer hinweg wurde ein konstantes Lichtprogramm mit jeweils 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit eingehalten. Futter und Trinkwasser wurden jederzeit ad libitum angeboten. Zuchttiere und Jungratten bis zu einem Alter von 3 Monaten erhielten Zuchtfutter der Firma Ssniff (V 1324-000), die übrigen Tiere Erhaltungsfutter (V 1534-000).

##### *3.1.2 hPLAP-transgene Fischer 344 Ratte*

###### *3.1.2.1 Zucht*

Die hPLAP-transgene Fischer 344 Rattenlinie wurde uns freundlicherweise von Eric P. Sandgren (Department of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin, USA) zur Verfügung gestellt. Ausgehend von 3 weiblichen R26-hPLAP-transgenen Fischer 344 Ratten wurde die Zuchtlinie durch Kreuzung mit männlichen Wildtyp Fischer 344 Ratten

---

etabliert. Die aus dieser ursprünglichen Verpaarung stammende heterozygote F1-Generation (tg/wt) wurde weiter mit Wildtyp Fischer 344 Ratten verpaart (wt/wt). Dabei war es ohne Belang, welches Elternteil das Transgen trug, da es sich um einen autosomalen Erbgang handelte. Somit erhielt man je Wurf ca. 50% Wildtyp und ca. 50% hPLAP-heterozygot-transgene Fischer 344 Ratten.

### 3.1.2.2. Histochemische Genotypisierung

Den Ratten wurde nach dem Absetzen von der Mutter im Alter von 3 Wochen durch Punktion der lateralen Schwanzvene ein Tropfen Blut entnommen und auf Filterpapier verbracht. Um die Inaktivierung der endogenen hitzelabilen Alkalischen Phosphatasen zu gewährleisten, wurde das Filterpapier 30 Minuten im Wärmeschrank bei einer Temperatur von 65°C erhitzt. Nach 5minütiger Inkubation in TNM-Puffer (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5) wurde das Filterpapier in TNM-Puffer, dem das Substrat BCIP (0,175 mg/ml Puffer, 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und der Farbstoff NBT (0,45 mg/ml Puffer, Nitroblautetrazolium, Sigma-Aldrich, Steinheim) zugesetzt wurde, mindestens 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. War Enzymaktivität der hitzestabilen humanen Plazentären Alkalischen Phosphatase in der Probe vorhanden, kam es zu einer Dephosphorylierung und Oxidation von BCIP, wobei NBT als Oxidationsmittel diente. Sowohl BCIP als auch NBT wurden durch diese Reaktion zu einem blauen Farbstoff oxidiert beziehungsweise reduziert. Somit konnten Tiere, deren Blutproben sich blau anfärbten, als transgen und solche, deren Blutproben rötlich blieben, als Wildtypen identifiziert werden. Dieser histochemische Nachweis wurde zu Anfang parallel zur PCR erstellt, um die Methodik zu verifizieren. Da es keine Diskrepanz zwischen den histochemisch erstellten Genotypisierungs-Daten und den PCR-Daten gab, ging man dazu über, für die routinemäßige Genotypisierung die histochemische zu wählen, da sie zeit- und kostengünstiger ist.



### 3.2 Tiermodell

#### *3.2.1 Toleranz-Induktion gegenüber dem Marker-Enzym*

Um eine Toleranz der Wildtyp Tiere gegenüber dem Marker-Enzym hPLAP zu erzeugen, wurden die Versuchstiere zunächst letal bestrahlt und daraufhin mit hPLAP-transgenen Knochenmarkszellen transplantiert. Das Ergebnis waren Tiere, die sich in Folge tolerant gegenüber Zellen oder Organen hPLAP-transgener Ratten zeigten.

Um eine Infektion bei den Ganzkörper-bestrahlten und knochenmarktransplantierten Tieren in der aplastischen Phase zu verhindern, wurden diese eine Woche lang unter Antibiose gestellt (2x täglich 5 mg/kg Baytril 2,5%® s.c., Wirkstoff Enrofloxacin, Bayer Health Care, Leverkusen)

##### 3.2.1.2 Letale Bestrahlung

Zur Vorbereitung auf die Knochenmarkstransplantation wurden die Versuchstiere einmalig mit einer Dosis von 8 Gray Ganzkörper-bestrahlt. Für diese Behandlung stand der Linearbeschleuniger der Veterinärmedizinischen Universität Wien zur Verfügung (Siemens Primus, Dosisleistung 200 Monitor units/min). Nach Durchführung der Bestrahlung am Vormittag, erfolgte am Nachmittag des selben Tages und am Vormittag des darauf folgenden Tages die Knochenmarkstransplantation mit Knochenmark hPLAP-transgener Spendertiere.

##### 3.2.1.3 Gewinnung der Knochenmarkszellen

hPLAP-transgene Spendertiere wurden unter Narkose durch Blutentzug aus der Aorta abdominalis getötet. Als Narkose wurde eine peritoneal verabreichte Injektionsnarkose mit Ketamin (50 mg/kg Ketazol®, Gräub AG, Bern, Schweiz)/Xylazin (10 mg/kg Xylazol®, Gräub AG) gewählt. Unmittelbar nach Entbluten des Tieres wurden Humeri, Femora und Tibien entnommen und die Muskulatur abpräpariert. Mit einer Tischsäge wurden Humerus und Femur in zwei Teile gesägt. Von der Tibia wurde lediglich der proximale Anteil weiter verwendet. Die Knochenmarkshöhle wurde je-

---

weils durch Absägen der Epiphysen eröffnet. Durch kurzes Anzentrifugieren der Knochenanteile (3000 U/min) wurde das Knochenmark in Probengefäße überführt. Es erfolgte die Resuspendierung in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS). Um eine Einzelzellsuspension zu erhalten wurde die Suspension durch eine Kanüle der Größe 27G und ein engmaschiges Sieb gedrückt. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Aufbewahrung der Knochenmarkszellsuspension auf Eis. Die Auszählung der Zellen erfolgte in einer Neubauer Zählkammer. Neben der Zellkonzentration wurde der Prozentsatz an toten Zellen, welcher durchwegs unter 5% lag, durch Lebend-Tot-Färbung mit Trypanblau bestimmt.

#### 3.2.1.4 Durchführung der Knochenmarktransplantation

Die Knochenmarkszellen wurden wie oben beschrieben von einem hPLAP-transgenen Spender gewonnen. Um ein sicheres Punktieren der lateralen Schwanzvene gewährleisten zu können, mussten die Tiere mittels einer Kriechröhre fixiert werden. Nach Hyperämisierung des Schwanzes mit warmem Wasser und Desinfektion, wurde unter gleichzeitiger Stauung des Gefäßes in eine der beiden lateralen Schwanzvenen ein Venenverweilkatheter (Introcan-W 24G, Braun, Melsungen, Deutschland) eingeführt. Nachdem der korrekte Sitz des Katheters durch Gabe von ca. 0,1 ml PBS überprüft worden war, wurden  $4 \times 10^6$  hPLAP-positive Knochenmarkszellen in einem Volumen von 300  $\mu$ l intravenös injiziert.

### 3.3 Myokardinfarkt-Modell

#### 3.3.1 Versuchsaufbau

Alle Tiere für diesen Versuch, durchwegs weibliche Ratten, stammten aus der Instituts-eigenen Fischer 344 Zucht. Als Spender wurden wiederum wie beschrieben hPLAP-transgene syngene Tiere verwendet. Zunächst erfolgte in einem Alter von 14 Wochen die letale Bestrahlung und Knochenmarktransplantation der Wildtyp-Empfänger. Hierauf wurden die Tiere in vier Gruppen unterteilt. Bei den Tieren der Gruppe 1 und 2 wurden Infarkte induziert, die Gruppen 3 und 4 dienten als Kontroll-

---

tiere (Sham), bei denen lediglich eine Scheinoperation mit Eröffnung von Thorax und Perikard durchgeführt wurde. Die OPs wurden drei Wochen nach Bestrahlung und Knochenmarktransplantation ausgeführt. Gruppe 1 und 3 erhielten sieben Tage nach Infarktinduktion (MI) bzw. Scheinoperation  $1 \times 10^7$  hPLAP-positive Knochenmarkszellen intravenös verabreicht. Die Gruppen 2 und 4 bekamen lediglich die äquivalente Menge an Puffer injiziert. Tabelle 1 ist die Gruppeneinteilung schematisch dargestellt zu entnehmen.

Tabelle 1: Gruppeneinteilung Myokardinfarkt-Modell

Gruppe 1	Ligation der Koronararterie	$1 \times 10^7$ hPLAP-positive BMC
Gruppe 2	Ligation der Koronararterie	Puffer-Injektion
Gruppe 3	Sham-OP	$1 \times 10^7$ hPLAP-positive BMC
Gruppe 4	Sham-OP	Puffer-Injektion

BMCs: Bone Marrow Cells, Sham-OP: Schein-OP

Die Versuchsenden (VE) mit Entnahme der Herzen erfolgten zu drei verschiedenen Zeitpunkten: 1, 4 und 16 Wochen nach Zell-Gabe beziehungsweise Puffer-Injektion. Somit ergaben sich insgesamt 12 Untergruppen. Für die Infarktgruppen wurde aufgrund der erwarteten höheren Ausfallrate  $n = 4$  veranschlagt, für die Sham-Gruppen  $n = 3$ .

Ultraschall-Untersuchungen wurden für alle Gruppen 1 Woche nach Induktion des Myokardinfarkts bzw. nach Scheinoperation veranschlagt. Die 2. Examination erfolgte einen Tag vor dem jeweiligen Versuchsende. Bei den Tieren, die 16 Wochen nach Zell- bzw. Puffer-Injektion getötet werden sollten, wurde ein zusätzlicher Ultraschall-Termin nach 8 Wochen angesetzt. Eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus ist Abb. 5 zu entnehmen.

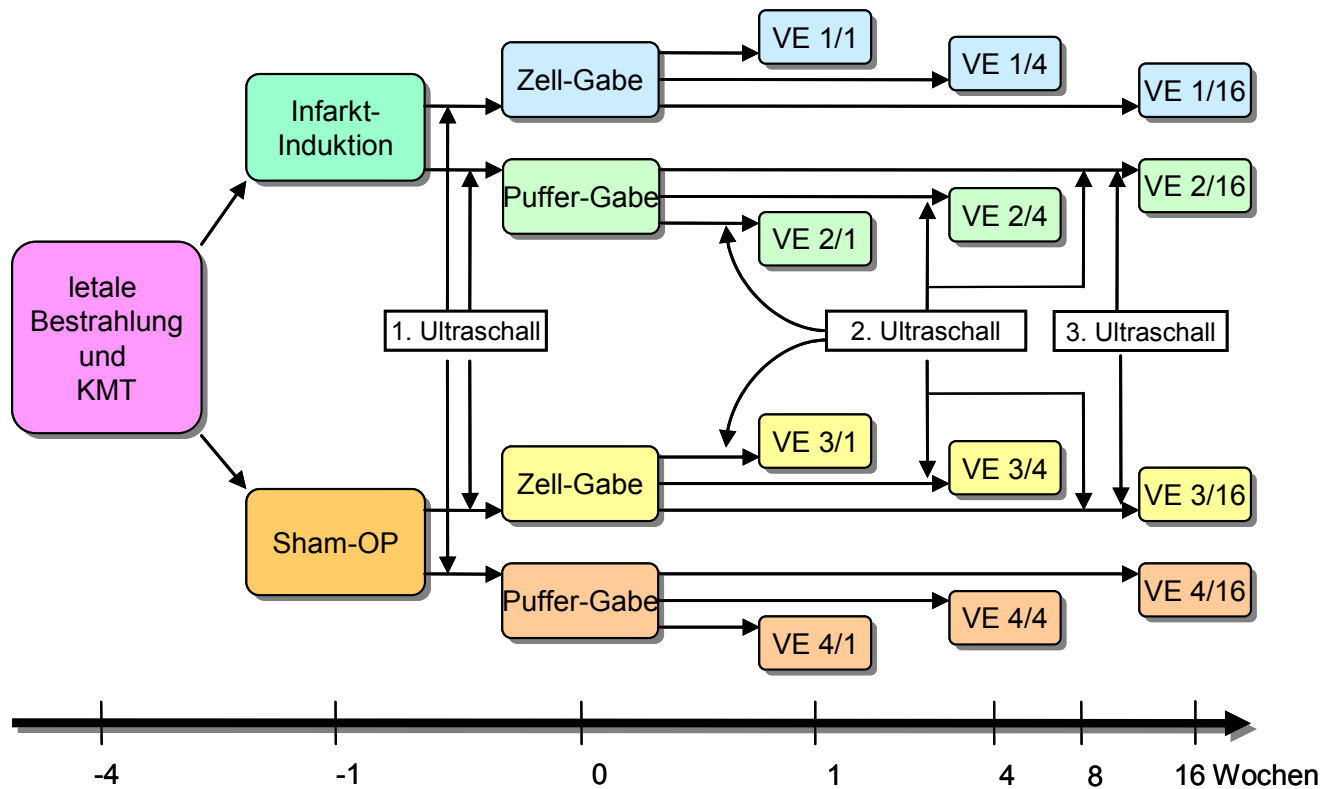


Abb. 5: Versuchsplan Myokardinfarkt-Modell

### 3.3.2 Infarkt-Induktion

Den Tieren wurde durch 30minütige Ligation der Arteria coronaria sinistra und nachfolgende Reperfusion eine irreversible Schädigung des Herzmuskels zugefügt und dementsprechend ein Vorderwand-Infarkt induziert. Die Tiere wurden hierzu am Abend vor der Operation (OP) mit Carprofen (Rimadyl®, 4,4 mg/kg, s.c., Pfizer Pharma, Karlsruhe, Deutschland) vorbehandelt. Die Narkose der Tiere wurde mit einer antagonisierbaren Injektionsnarkose, bestehend aus Medetomidin (Domitor®, 0,15 mg/kg, Pfizer Pharma), Fentanyl (Fentanyl-Janssen®, 0,005 mg/kg, Janssen-Cilag Pharma, Wien, Österreich) und Midazolam (Dormicum®, 2 mg/kg, Roche Austria GmbH, Wien, Österreich), intramuskulär (i.m.) verabreicht, durchgeführt. Nachdem die linke Thorax-Seite der Ratte geschoren, die Augen mit Bepanthen® Augen- und Nasensalbe (Fa. Roche Austria GmbH) benetzt worden waren, wurde das Tier mittels eines Teflon-Katheters (Vasofix 17G, Braun) intubiert. Die Lagerung der Ratte erfolgte auf der rechten Seite, Bauch zum Operateur zeigend, auf einer bei 37°C gehaltenen Wärmeplatte (13501, Medax GmbH, Kiel, Deutschland). Während der gesamten Dauer der OP war das Tier an ein Beatmungsgerät der Firma Hallowell EMC

(Modell AWS, Völker, Kaltenkirchen, Deutschland) angeschlossen und mit 100% Sauerstoff kontrolliert beatmet. Der korrekte Sitz des Tubus wurde überprüft, das Beatmungsgerät auf eine Rate von 54 Atemzügen pro Minute mit einem Volumen von 8 ml eingestellt und die Ratte an ein Pulsoxymeter (Nonin 9700 V, Nonin Medical Inc., Plymouth, USA) durch Anbringen der Klemme an einem der Hinterbeine angeschlossen. Nun folgte die Vorbereitung des Tieres mit Desinfektion der Haut mit Braunol® (Braun) und 70% Alkohol. Nachdem die chirurgische Toleranz geprüft worden war und keine Stellreflexe mehr auszulösen waren, konnte die OP mit einem Hautschnitt zwischen 3. und 4 Rippe begonnen werden. Die Unterhaut wurde stumpf mobilisiert, der Musculus (M.) cutaneus trunci, Anteile des M. latissimus dorsi und des M. serratus ventralis durchtrennt und die Rippen freigelegt. Die Eröffnung des Thorax erfolgte durch stumpfes Durchtrennen der Mm. intercostales zwischen 3. und 4. Rippe. Nun wurde vorsichtig ein Wundspreizer eingeführt und das Perikard mit einem Mikrodissektor eröffnet. Zur Induktion der Ischämie wurde die Arteria coronaria sinistra möglichst weit proximal umstochen (Vicryl 6-0, TF-Nadel, Ethicon, Johnson & Johnson Intl., St-Stevens-Woluwe, Belgien) und vorsichtig ein chirurgischer Knoten vorgelegt. Nachdem ein Stück Prolene 4-0 (Ethicon) in den Knoten geschoben worden war, um das spätere Lösen der Ligation zu erleichtern, wurde der Knoten vorsichtig festgezogen. Der Sitz der Ligatur ließ sich durch Erblässen des Herzmuskels verifizieren. Die Ligation erfolgte für 30 Minuten. Während dieser Zeit wurde der Wundspreizer entfernt und der Brustkorb mittels eines mit PBS angefeuchteten Tupfers verschlossen. Falls es aufgrund fallender Sauerstoffsättigung notwendig wurde, konnte im Einzelfall eine Zwischenblähung der Lunge erfolgen. Alle 5 Minuten wurden Herzfrequenz und Sauerstoff-Sättigung im OP-Protokoll vermerkt. Kurz vor Verstreichen der 30minütigen Ligation, wurde der Tupper entfernt, der Wundspreizer wiederum eingeführt. Mit einer Pinzette erfasste man vorsichtig, ohne Zug, die Ligation. Mit dem Mikrodissektor wurde vorsichtig der Ligrations-Knoten gelöst, ohne dabei das Myokard zu beschädigen. Auch hier war die Reperfusion des Myokards makroskopisch zu sehen. Sowohl Vicryl- als auch Prolene-Faden wurden entfernt. Der Verschluss des Brustkorbs erfolgte mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl 4-0) zunächst über 2-4 Knopfhefte um jeweils die craniale und die kaudale Rippe. Vor dem Verknoten wurde die Lunge gebläht, um einem Pneumothorax entgegenzuwirken. Danach wurde die Muskulatur ebenfalls mit Vicryl 4-0 in fortlaufender Naht adaptiert. Es folgte die fortlaufende Naht des subkutanen Fettgewebes. Die Haut

---

wurde mit nicht resorbierbarem Prolene 4-0 in 2-3 U-Heften geschlossen. Nach Beendigung der OP bekam das Tier sowohl das Narkose-Antidot, bestehend aus Atipamezol (Antisedan®, 0,75 mg/kg, Pfizer), Flumazenil (Anexate®, 0,2 mg/kg, La Roche) und Naloxonhydrochlorid (Naloxon®, 0,12 mg/kg, Orpha-Devel, Purkersdorf, Österreich), als auch Antibiose (2x täglich 5 mg/kg Baytril 2,5%®) und Analgetikum (1x täglich 4,4 mg/kg Rimadyl®) s.c. verabreicht. Die Wunde wurde mit bakteriostatischem Aluminiumspray (Silber-Spray, Heiland Vet GmbH, Hamburg, Deutschland) bedeckt. Sobald das Tier Schluckreflexe zeigte, wurde es von Beatmungsmaschine und Pulsoxymeter abgekoppelt und extubiert. Im Anschluss daran bekam das Tier Novalgine® (Metamizol, Aventis Pharma GmbH, Wien, Österreich) zur unmittelbaren Analgesie (ca. 0,1 ml oral) und wurde in einen mit Heu gefüllten Käfig verbracht, entweder auf einer Wärmematte oder unter einer UV-Lampe. Die Nachsorge des Tieres, Antibiose und Schmerzmedikation, erfolgte über 3 Tage. Die nicht-resorbierbaren Hautfäden wurden 7 Tage nach OP gezogen.

### 3.3.3 Zell-Applikation

Die praktische Durchführung der Zell-Gabe entsprach weitestgehend dem Vorgehen bei der Knochenmarktransplantation. Die Knochenmarkzellen wurden von einem hPLAP-transgenen Spender gewonnen und in einer Endkonzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen dem jeweiligen Tier verabreicht. Vor Zelinjektion wurde den Tieren ein Vasodilatator, Nitroprussidnatrium (Nipruss®, Schwarz Pharma AG, Monheim, Deutschland), in einer Konzentration von 1 mg/kg verabreicht.

### 3.3.4 Probenentnahme

Der Tod der Versuchstiere erfolgte zum jeweiligen Zeitpunkt 1, 4 und 16 Wochen nach Zell-Applikation unter Ketamin/Xylazin-Narkose durch Blutentzug aus der Aorta abdominalis. Das Herz wurde entnommen, mit PBS gespült und in 40% EtOH fixiert. Nach 2-tägiger Fixierung wurde jedes Herz in 4 äquivalent große Stücke von Apex zu Basis geschnitten.

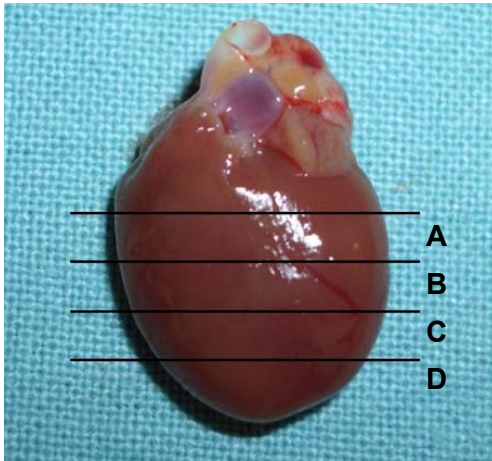


Abb. 6: Unterteilung des fixierten Herzens in 4 Sektionen

### 3.3.5 Histologische Aufarbeitung der Herzen

#### 3.3.5.1 Entwässerung und Einbettung

Die Entwässerung der Organproben und Einbettung in Paraffin vollzog sich nach folgendem Schema bei 4°C:

40% EtOH	3	Tage
70% EtOH	3	Tage

Danach wurden die Organe in eine Histokinette verbracht und die Infiltration wurde wie folgt bei Raumtemperatur fortgesetzt:

70% EtOH	2	Stunden
80% EtOH	2,5	Stunden
96% EtOH	2,5	Stunden
Isopropylalkohol I	2	Stunden
Isopropylalkohol II	2,5	Stunden
Xylol I	2	Stunden
Xylol II	2,5	Stunden
Paraffin I	3	Stunden
Paraffin II	3	Stunden

---

### 3.3.5.2 Erstellen der histologischen Schnitte

Mit einem Rotationsmikrotom der Marke Microm (HM360, Microm International GmbH, Walldorf) wurden 5 µm dicke Querschnitte der 4 Herzanteile angefertigt. Dazu wurden APES-behandelte Objektträger verwendet (Superfrost®, VWR International GmbH, Wien, Österreich).

### 3.3.5.3 Histochemie zum Nachweis hPLAP-positiver Zellen

Die Histochemie zur Anfärbung der hPLAP-positiven Zellen basierte auf demselben Prinzip, welches bereits zur histochemischen Genotypisierung der Tiere unter 3.1.2.2 erläutert wurde. Die Herzschnitte wurden entparaffiniert, über Nacht bei Raumtemperatur (RT) mit BCIP/NBT im Dunkeln inkubiert, am nächsten Morgen mit Kernechtrot (Sigma, Steinheim) gegengefärbt, in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und mit Vectamount® (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) eingedeckt. Die Schnitte wurden anschließend mittels Lichtmikroskop untersucht. Blau angefärbte hPLAP-positive Zellen wurden aufgrund ihrer Quantität, des Zelltyps und der Lokalisation beurteilt.

### 3.3.5.4 Masson-Trichrom-Färbung

Durch die Masson Trichrom-Färbung wird das kollagene Bindegewebe, welches den Hauptbestandteil der Infarkt Narbe darstellt, blau angefärbt, wohingegen sich das gesunde Myokard rot darstellt. Je ein Schnitt der in die Auswertung eingehenden 3 Herzebenen wurde entparaffiniert und über Nacht bei RT mit Bouinscher Lösung (Sigma) inkubiert. Es folgten Inkubations- und Färbeschritte mit Weigerts Eisen-Hämatoxylin, Bieberich-Scharlachrot (Sigma), Phosphorwolframsäure/ Phosphormolybdänsäure-Gemisch (Sigma) und Anilinblau (Sigma). Nach Fixierung in 1%iger Essigsäure wurden die Schnitte dehydriert und wiederum mit Vectamount® eingedeckt (ROMEIS 1989).



### 3.3.5.5 Bestimmung der Infarkt-Größen mittels Planimetrie

Für die Planimetrische Ausmessung der Infarktgebiete, des linken Ventrikels und der gesamten Herzfläche wurden die Masson-Trichrom gefärbten Schnitte verwendet. Blau gefärbte Regionen in typischer linksventrikulärer Lokalisation wurden als Infarktregionen definiert. In allen 3 Ebenen wurden sowohl die Infarktfläche als auch die Fläche des linken Ventrikels und des gesamten Myokards berechnet. Die Infarktgröße (IG) pro Ebene resultierte aus dem prozentualen Anteil des Narbengewebes am gesamten linken Ventrikel (LV).

$$IG [\%] = (\text{Fläche Infarkt} / \text{Fläche LV}) \times 100$$

Somit errechnete sich die Größe des Infarkts für jedes einzelne Tier als Mittelwert der in den drei Ebenen bestimmten Infarkt-Größen.

$$IG_{\text{ges}} = (IG_B + IG_C + IG_D) / 3$$

Zudem wurde die Fläche des linken Ventrikels in Relation zur gesamten Herzfläche berechnet.

### 3.3.4 Echokardiographische Untersuchung

Die Echokardiographie erlaubt eine nicht-invasive Untersuchung des gesamten Herzens. Die zyklischen Bewegungsabläufe des Herzens werden dargestellt und eine qualitativ/quantitative Beurteilung von Herzgröße, Wanddicken, Herzklappen und Funktionalität kann erfolgen (SHIMIZU et al., 1998).

Alle Echokardiographischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. vet. med. Mato Markovic von der Abteilung für Kardiologie, Klinik für Interne Medizin und Seuchenlehre, Veterinärmedizinische Universität Wien, durchgeführt. Die Ratten mussten für diese Untersuchung ruhiggestellt werden. In der Literatur ist die Untersuchung am wachen Versuchstier beschrieben, jedoch ist hierzu eine Gewöhnung der Tiere nötig und trotz allem kommt es auch hier zu stressbedingten Abweichungen der Messwerte (YANG et al., 1999; TAKUMA et al., 2001). Aus diesem Grund

---

wird die echokardiographische Untersuchung zumeist unter Narkose durchgeführt (TAN et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Kurzanästhesie mit Isofluran (Baxter, Wien, Österreich) gewählt. Zunächst erfolgte die Narkoseeinleitung bei einer Konzentration von 5% Isofluran unter 100%iger Sauerstoffzufuhr von 2 l/min. Sobald keine Stellreflexe mehr auslösbar waren, wurde die Konzentration des Inhalationsnarkotikums auf 2% gesenkt. Die Ratte wurde auf beiden Thoraxseiten rasiert und das aktuelle Körpergewicht bestimmt. Es wurde das Sonographiegerät Vivid Five (Vigmed Technobiology, USA) mit einem 10 MHz Schallkopf verwendet. Zunächst wurden die Tiere von der rechten Thoraxseite aus examiniert. Es erfolgte in der rechtsparasternalen kurzen Achse die Darstellung des Flussprofils der Pulmonalklappe. Anschließend wurden auf Niveau der Herzbasis die Durchmesser des linken Vorhofs und der Aorta verglichen. Die Beurteilung des linken Ventrikels erfolgte im eindimensionalen M-Mode. Fractional Shortening (FS), Ejection Fraction (EF), linksventrikuläre diastolische (LVDd) und systolische Dimension (LVDs) wurden in 3 aufeinanderfolgenden Zyklen bestimmt. Im Vier- bzw. Fünfkammerblick, von der linken Thoraxseite aus, wurde anschließend die Untersuchung der Aorten- und der Mitralklappe vorgenommen, sowie die Bestimmung der Isovolumetrischen Relaxationszeit (IVRT).

Die echokardiographischen Untersuchungen wurden 1 Woche nach Infarktinduktion bzw. Sham-OP und nachfolgend einen Tag vor den Versuchsenden 1, 4 und 16 Wochen nach Zell- bzw. Puffer-Verabreichung durchgeführt. Bei den Tieren, die 16 Wochen nach Zell-Gabe geopfert wurden, wurde eine zusätzlicher Ultraschall-Termin nach 8 Wochen angesetzt. Als Baseline dienten 6 unbehandelte gesunde Tiere.

### 3.4 Modifizierung des Tiermodells

Die Idee war, durch subkutane Injektion hPLAP-positiven Vollbluts in der postnatalen Phase, zu einem Zeitpunkt, da das Immunsystem des Neugeborenen noch nicht vollständig ausgereift ist, belastbare Toleranz gegenüber dem Marker-Enzym hPLAP zu induzieren (BUTLER et al., 2000; PETIT et al., 2004). Ziel war die Schaffung eines Tiermodells, welches es ermöglicht, in immunkompetenten, Marker-toleranten

---

und zudem Background-freien Tieren das Schicksal von transplantierten Zellen oder gar Organen nachzuverfolgen.

#### *3.4.1 Vorversuch*

In einem Vorversuch wurde die Abstoßungs-Reaktion von Wildtyp Fischer 344 Ratten ( $n = 2$ ) gegenüber einem Hauttransplantat eines hPLAP-tg Spenders getestet. Hierzu wurde Haut transgener Spender wie unter 3.4.3.1 beschrieben präpariert und den Wildtyp-Tieren wie unter 3.4.3.2 erklärt eingepflanzt. Als Positiv-Kontrollen wurden hPLAP-transgene Hauttransplantate transgenen Tieren ( $n = 2$ ) und Wildtyp-Haut sowohl auf Wildtyp-Empfänger ( $n = 2$ ) als auch auf hPLAP-transgene Tiere ( $n = 2$ ) übertragen.

#### *3.4.2 Toleranz-Erzeugung bei neonatalen Wildtyp-Ratten*

Um eine belastbare Toleranz zu erzeugen, wurde neonatalen Ratten, kurz nach der Geburt, 30 $\mu$ l hPLAP-transgenes Vollblut (Gerinnungshemmer EDTA) subkutan verabreicht. Zunächst wurde bei einem Wurf mit 7 Tieren bei 6 Tieren vier Stunden nach Geburt subkutan hPLAP-positives Blut injiziert, das siebte Wurfgeschwister diente als Negativ-Kontrolle.

#### *3.4.3 Hauttransplantation*

Die Haut als stark immunogenes Organ des Körpers, diente in diesem Versuch zur Überprüfung einer belastbaren Toleranz gegenüber dem Marker-Protein hPLAP. Jene 6 Tiere, welche neonatal mit hPLAP-positivem Vollblut behandelt worden waren, und das 7. Tier als Negativkontrolle wurden im Alter von 4 Monaten der Hauttransplantation mit hPLAP-positiver Spenderhaut unterzogen.

---

#### 3.4.3.1 Gewinnung der Hauttransplantate

Für die Hauttransplantationen wurden Vollhauttransplantate verwendet. Das transgene Spendertier wurde durch CO<sub>2</sub> getötet. Es zeigte sich, dass sich die Haut am Bauch am besten als Transplantat nutzen ließ, da man dort in der Lage war, großflächig Haut zu gewinnen und diese leicht von der darunterliegenden Muskulatur zu trennen war. Die Präparation des Transplantats begann durch eine Hautinzision und weitere Freilegung mit einer stumpfen Schere. Soweit möglich wurde das subkutane Fettgewebe vom Transplantat abgelöst. Die präparierte Haut wurde gespannt und mittels Skalpell in ca. 1x1 cm große Stücke geschnitten. Diese Hautstücke wurden auf einen mit NaCl getränkten sterilen Tupfer verbracht und bis zur Implantation auf Eis gelagert.

#### 3.4.3.2 Durchführung der Hauttransplantation

Die Methodik der Hauttransplantation wurde der Literatur entsprechend durchgeführt (COBER et al., 1999). Der Empfänger wurde mit der bereits angeführten antagonisierbaren Injektionsnarkose anästhesiert, die Augen des Tieres mit Bepanthen® benetzt und das Tier für die OP auf eine Wärmematte verbracht. Die Stelle, an die das Transplantat eingepflanzt werden sollte, wurde rasiert und desinfiziert. Mittels Skalpell wurde ein ca. 1x1 cm großes Hautstück entfernt. Als Transplantations-Bett eignete sich am besten die Stelle zwischen den Schulterblättern, da das Tier hier weniger in der Lage war, das Transplantat zu zerstören. Nun wurde das Transplantat eingesetzt, vorzugsweise mit Fellrichtung des Transplantats in entgegengesetzter Richtung zum natürlichen Fellwachstum des Empfängers. Es folgte die spannungsfreie Adaptation der Wundränder mit Hilfe von Gewebekleber (Epiglu®, Mayer-Haake, Wehrheim, Deutschland). Um eine eventuelle Beschädigung des Transplantats durch das Tier selbst zu verhindern, wurde ein beschichtetes Pflaster (Rondopad®, Deweco, Wermelskirchen) mit 4 Knopfheften (Prolene 4-0, Ethicon) an der Haut der Ratte fixiert. Die Nachbehandlung der Tiere erfolgte auf dieselbe Weise wie unter 3.3.2 beschrieben. Das Pflaster konnte nach ca. 3 Tagen oder bei Bedarf auch schon früher durch Lösen der Knopfhefte entfernt werden. Es erfolgte eine tägliche Kontrolle der Transplantate.

---

#### .4.3.3 Entnahme von Hautbiopтатаen

Um das erfolgreiche Anwachsen der transplantierten Hautstücke verifizieren zu können, wurden zu einem späteren Zeitpunkt Hautbiopotate am Übergang von transplan- tierter Haut zu Empfängerhaut entnommen.

#### 3.4.4 Durchflusszytometrie

Für Durchflusszytometrische Untersuchungen wurde den neonatal toleranten Tieren ca. 200µl Vollblut entnommen (Mikrovette® 500 K3E, Sarstedt Ges.m.b.H, Wr. Neu- dorf, Österreich). Als Reaktionsgefäße wurden FACS-Röhrchen benutzt (BD Bio- sciences, Schwechat, Österreich). Es wurden pro Tier 50µl Vollblut mit 2µl primärem Antikörper, Mouse-anti-hPLAP IgG (Clone 8B6, Dako Cytomation GmbH, Wien, Österreich), für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Danach folgten 2 Waschschr- itte mit FACS-Puffer (PBS, FCS, Natriumazid), um überschüssigen, ungebundenen pri- mären Antikörper zu entfernen; die Zentrifugation erfolgte bei 1200 U/min für 4 Minu- ten bei einer Temperatur von 4°C. Hierauf erfolgte die Inkubation mit dem sekundä- ren Antikörper, wiederum auf Eis und in Dunkelheit. In diesem Fall verwendeten wir Ratten-adsorbierten, FITC-markierten Goat-anti-Mouse IgG (Sigma). Wiederum folg- ten 2 Waschschr- itte mit FACS-Puffer. Zur Lyse der Erythrozyten in den Proben ver- wendeten wir 1%ige FACS™ Lysing Solution (BD Biosciences) für 20 min bei Raum- temperatur. Nach zwei weiteren Waschschr- itten wurden die Zellen in 1%igem Para- formaldehyd (PFA) fixiert. Die Analyse erfolgte am Durchflusszytometer FACScan der Firma Becton Dickinson. Pro Tier wurde jeweils eine Probe als Leerkontrolle und eine Isotyp-Kontrolle mitgeführt.

#### 3.4.5 Organhistologie

Es wurden sowohl Hautbiopotate aus dem Bereich der Hauttransplantate entnommen als auch Leber, Niere, Herz, Lunge, Milz, Duodenum, Jejunum, Magen, Gehirn, Mus- kel und Pankreas, um einen eventuellen Background hPLAP-positiver Zellen aus- schließen zu können. Die Infiltration und Einbettung erfolgte in äquivalenter Weise wie bereits unter 3.3.5.1 beschrieben.

---

### 3.5 Modifiziertes Myokardinfarkt-Modell

Zunächst wurden für diesen Versuch 15 neonatal tolerante Fischer 344 Ratten, 7 männliche und 8 weibliche Tiere, wie unter 3.4.2 beschrieben, generiert. Hauttransplantationen und FACS-Analysen wurden in einem Alter von 8 bis 10 Wochen durchgeführt. Die Induktion der Myokardinfarkte erfolgte wie unter 3.3.2 erläutert 3 Wochen nach erfolgter Hauttransplantation. Die Tiere erhielten eine Woche nach Infarkt-induktion, nach vorheriger Verabreichung des Vasodilatators Nitroprussidnatrium,  $1 \times 10^7$  Knochenmarkszellen bzw. Puffer intravenös injiziert. Je 2 Tiere pro Infarkt-Gruppe wurden vier Stunden, einen Tag und eine Woche nach Zell- bzw. Puffer-Gabe getötet und die Organe für die Histologie entnommen. Als Kontrolle dienten scheinoperierte Tiere, denen ebenfalls eine Woche nach Schein-OP Zellen verabreicht wurden. Die Herzen wurden wie unter 3.3.5 beschrieben infiltriert und in Paraffin eingebettet. Mittels Rotationsmikrotom wurden  $5 \mu\text{m}$  dicke histologische Schnitte angefertigt und die Histochemie zum Nachweis hPLAP-positiver Zellen durchgeführt.

Tabelle 2: Gruppeneinteilung des modifizierten Myokardinfarkt-Modells

	VE 4 Stunden nach BMC- bzw. Puffer- Injektion	VE 1 Tag nach BMC- bzw. Puffer- Injektion	VE 1 Woche nach BMC- bzw. Puffer- Injektion
Gruppe 1: MI + BMC	n = 2	n = 2	n = 2
Gruppe 2: MI + Puffer	n = 2	n = 2	n = 2
Gruppe 3: Sham + BMC	n = 1	n = 1	n = n1

MI: Myokardinfarkt, BMC: Bone Marrow Cells, Sham: Schein-OP, VE: Versuchsende

### 3.6 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS 14.0 für Windows. Für jeden einzelnen Parameter wurde pro Gruppe und Faktor Mittelwert und Standardfehler berechnet. Der Vergleich zwischen den Gruppen Infarkt/Scheinoperation erfolgte mittels t-Test. Bei Gruppen mit zwei unterschiedlichen Faktoren (Infarkt und Zellgabe) wurde eine Two-way ANOVA durchgeführt. Als signifikant wurden Ergebnisse mit  $p \leq 0.05$  angenommen.

## 4. Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es am Beispiel einer Myokardinfarkt-Studie zu zeigen, dass das Modell der bestrahlten und mit hPLAP-positivem Knochenmark rekonstituierten Fischer 344 Ratte hervorragend geeignet ist, um die Migration und die Rolle der Knochenmarkszellen im Infarktgeschehen darzustellen. Der zweite Teil dieser Studie zielte darauf ab, Background-freie, Marker-tolerante Empfänger-Tiere zu generieren, so dass die Verfolgung Marker-exprimierender Zellen bzw. die Transplantation von Organen Marker-exprimierender Spender in immunkompetente Tieren möglich ist. Weiters sollte die Anwendung des modifizierten Modells auf das Herzinfarkt-Modell demonstriert werden.

### 4.1 Myokardinfarkt-Modell

Für das Myokardinfarkt-Modell wurden letal bestrahlte und mit hPLAP-positivem Knochenmark transplantierte Tiere verwendet. Die Infarktinduktion erfolgte durch 30minütige Ligation der A. coronaria sinistra mit nachfolgender Reperfusion des ischämischen Gebietes. Die Verabreichung der Knochenmarkszellen (Bone Marrow Cells BMC) bzw. des Puffers (Buffer) erfolgte 1 Woche nach Infarktinduktion.

Von ursprünglich 56 in den Versuch genommenen Tieren verstarben zwei Tiere im Anschluss an Bestrahlung und Knochenmarktransplantation, drei Ratten während der Infarkt-Induktion, zwei scheinoperierte Tiere eine Woche nach Operation, je eine infarzierte Ratte eine Woche und acht Wochen nach Infarkt-Induktion. Daraus ergibt sich eine Ausfallsrate von 9% für die Infarkt-operierten Tiere und eine Ausfallsrate von 4% für die scheinoperierten Tiere. Die daraus resultierenden Gruppengrößen sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Gruppengrößen Modell Myokardinfarkt

	VE 1 Woche nach BMC- bzw. Puffer-Injektion	VE 4 Wochen nach BMC- bzw. Puffer-Injektion	VE 16 Wochen nach BMC- bzw. Puffer-Injektion
Gruppe 1: MI + BMC	n = 4	n = 4	n = 4
Gruppe 2: MI + Puffer	n = 4	n = 6	n = 4
Gruppe 3: Sham + BMC	n = 3	n = 3	n = 3
Gruppe 4: Sham + Puffer	n = 3	n = 3	n = 3

MI: Myokardinfarkt, BMC: Bone Marrow Cells, Sham: Schein-Operation, VE: Versuchsende

#### 4.1.1 Histologie

##### 4.1.1.1 Planimetrie

Mittels Planimetrie der Masson Trichrom-gefärbten Herzschnitte wurden in drei Ebenen die Infarktgrößen ermittelt. Tiere, bei denen die Infarktgrößen als zu gering anzusehen waren (Infarkt  $\leq 6,6\%$  des linken Ventrikels), wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen, woraus sich eine Reduktion der Gruppengrößen wie folgt ergab:

Tabelle 4: Endgültige Gruppengrößen Modell Myokard-Infarkt

	VE 1 Woche nach BMC- bzw. Puffer-Injektion	VE 4 Wochen nach BMC- bzw. Puffer-Injektion	VE 16 Wochen nach BMC- bzw. Puffer-Injektion
Gruppe 1: MI + BMC	n = 4	n = 2	n = 2
Gruppe 2: MI + Puffer	n = 4	n = 3	n = 2
Gruppe 3: Sham + BMC	n = 3	n = 3	n = 3
Gruppe 4: Sham + Puffer	n = 3	n = 3	n = 3

MI: Myokardinfarkt, BMC: Bone Marrow Cells, Sham: Schein-Operation, VE: Versuchsende

Mit Hilfe der Planimetrie konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Infarktgruppen mit und ohne Verabreichung von Knochenmarkszellen bezüglich der Infarktgrößen gezeigt werden. Zu allen drei Tötungszeitpunkten wiesen jene Gruppen,



denen 1 Woche nach Infarktinduktion Knochenmarkszellen intravenös verabreicht worden waren, signifikant verringerte Infarktgrößen auf, wie in Abb. 7 graphisch dargestellt.

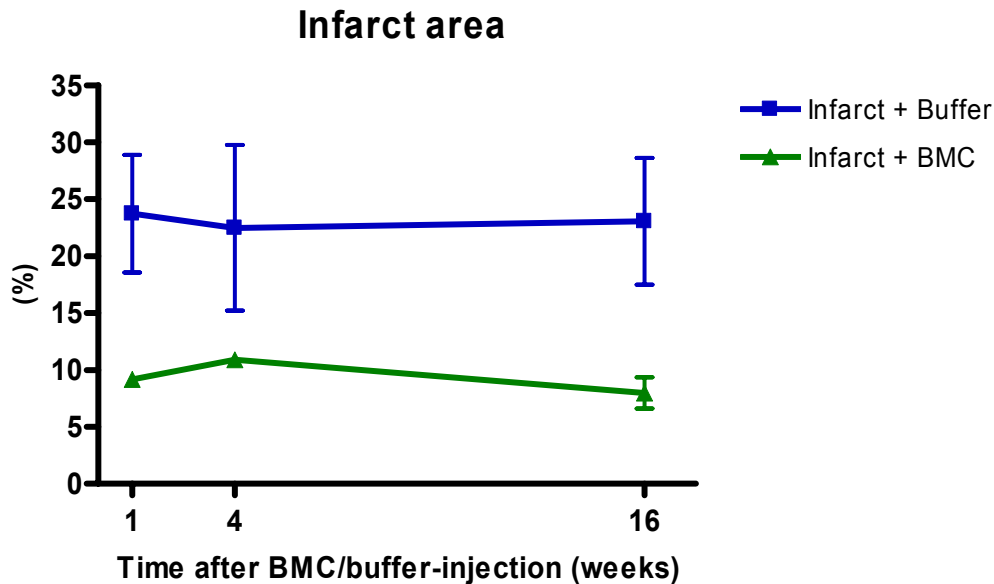


Abb. 7: Prozentualer Anteil des Infarktgebiets am linken Ventrikel zu den Zeitpunkten 1, 4 und 16 Wochen nach Zell- bzw. Puffer-Gabe Infarkt-Gruppen mit Zell-Gabe (grün) gegen Infarkt-Gruppen ohne Zell-Gabe (blau)

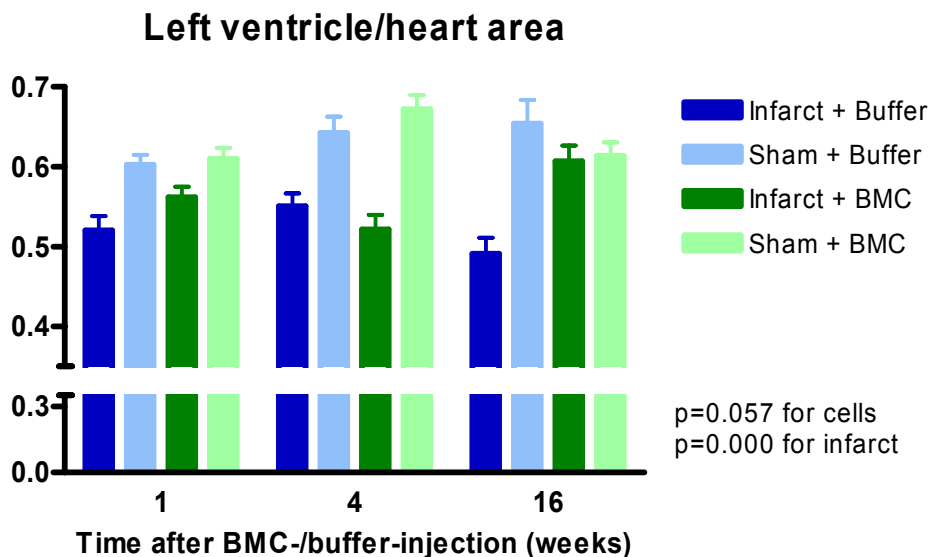


Abb. 8: Verhältnis von Fläche des linken Ventrikels zu gesamter Herzfläche 1, 4 und 16 Wochen nach Zell- bzw. Puffer-Gabe

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Quotient aus Fläche des linken Ventrikels zu gesamter Herzfläche bei den Gruppen mit Zell-Gabe deutlich erhöht ist (siehe Abb. 8). Diese Daten spiegeln eine verminderte Kontraktion des kollagenen Narbengewebes beziehungsweise eine reduzierte Infarktgröße sowie einen reduzierten Untergang linksventrikulären Myokards wider.

#### 4.1.1.2 Histochemischer Nachweis hPLAP-positiver Zellen

Zum Nachweis hPLAP-positiver Zellen im Herzen wurden Paraffinschnitte histochemisch angefärbt.

In den Herzen der Baseline-Tiere, die drei Wochen nach KMT geopfert wurden, ebenso wie in den Herzen der scheinoperierten Tiere konnten lediglich zu einem geringen Prozentsatz hPLAP-positive Zellen detektiert werden, in erster Linie endotheliale und hämatopoietische Zellen. Man kann davon ausgehen, dass diese Beobachtung den physiologischen Zell-Turnover am Herzen widerspiegelt.

Die Anzahl hPLAP-positiver Zellen im Myokard der scheinoperierten Tiere nahm im Verlauf der Studie zu, sodass 16 Wochen nach Sham-OP bzw. 19 Wochen nach Knochenmarktransplantation deutlich mehr Marker-exprimierende Zellen, ebenfalls ausschließlich Endothel und hämatopoietische Zellen, nachzuweisen waren. Abbildung 9 und 10 zeigen das Myokard eines Baseline- und eines Sham-Tieres. Blau angefärbte Zellen repräsentieren hPLAP-positive Zellen, wohingegen die durch Kernechtrot angefärbten restlichen Zellkerne jene des Empfänger-Tieres darstellen.

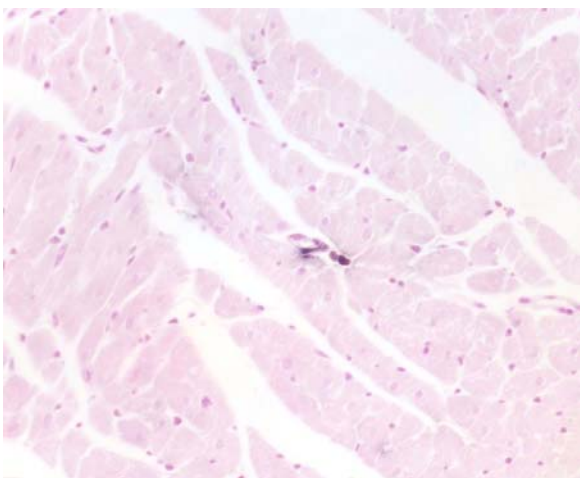


Abb. 9: Myokard Baseline, hPLAP-positives Endothel  
Originalvergrößerung 200fach

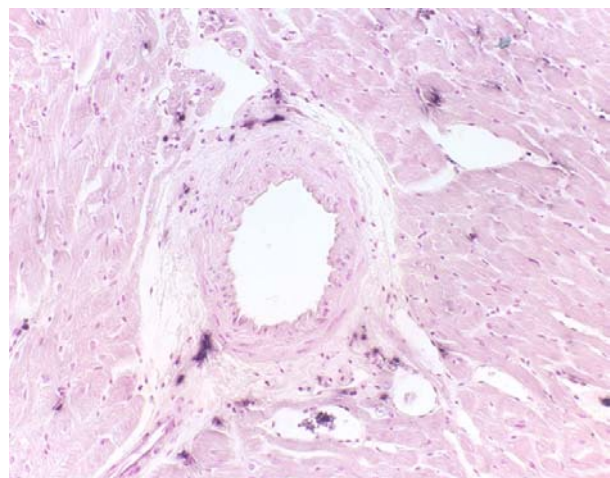


Abb. 10: Perivaskuläre Lokalisation hPLAP-positiver Zellen  
Sham 4 Wochen nach Puffer-Gabe

Originalvergrößerung 200fach

Sowohl bei den Sham-Tieren als auch bei den Infarkt-Tieren (Daten nicht gezeigt) konnten sowohl hPLAP-positive endokardiale als auch hPLAP-positive epikardiale Zellen identifiziert werden, wie aus den Abbildungen 11 und 12 zu ersehen ist.

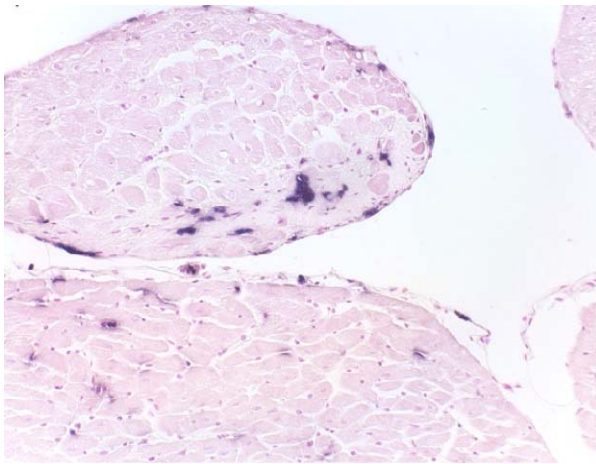


Abb. 11: hPLAP-positives Endokard  
Sham 1 Woche nach Puffer-Injektion  
Originalvergrößerung 200fach

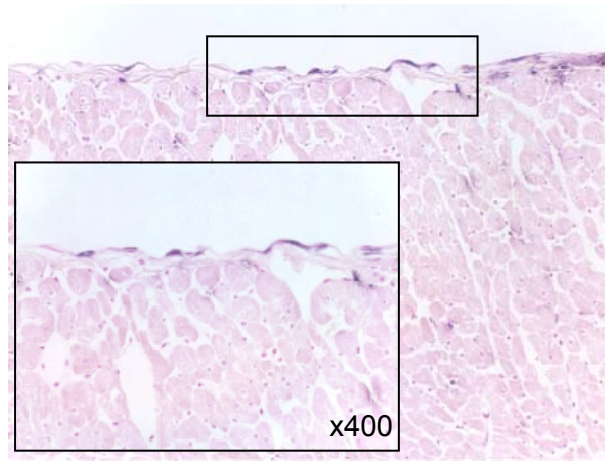


Abb. 12: hPLAP-positives Epikard  
Sham 1 Woche nach BMC-Injektion  
Originalvergrößerung 200fach

Die histologischen Präparate der infarzierten Herzen zeigten bereits ungefärbt unter dem Lichtmikroskop eine deutliche Schädigung des Myokards, was sich in einem Verlust des geordneten strukturellen Aufbaus des Herzmuskels äußerte.

In den infarzierten Herzen war sowohl 1 Woche als auch 4 Wochen nach Zell-Gabe bzw. Puffer-Injektion eine hohe Anzahl hPLAP-positiver Zellen zu finden, welche im Myokard des linken Ventrikels akkumulierten. Die Lokalisation dieser Zellanhäufung stimmte mit der Lokalisation der Infarktgebiete überein. Morphologisch ließen sich insbesondere Leukozyten und Endothelzellen identifizieren. Diese Beobachtung deuteten darauf hin, dass es nach Induktion des Ischämie/Reperfusionsschadens zu einer Rekrutierung von Zellen aus dem Knochenmark kam, welche in Folge in hoher Zahl in das geschädigte Myokard einwanderten (siehe Abb. 13).

Ferner wurden 4 Wochen nach Zell- bzw. Puffer-Gabe sowohl in beiden Infarkt-Gruppen als auch bei den Sham-Tieren vermehrt hPLAP-positive Endothelzellen (siehe Abb. 14), insbesondere in kleineren Kapillaren und venösen Gefäßen detektiert.

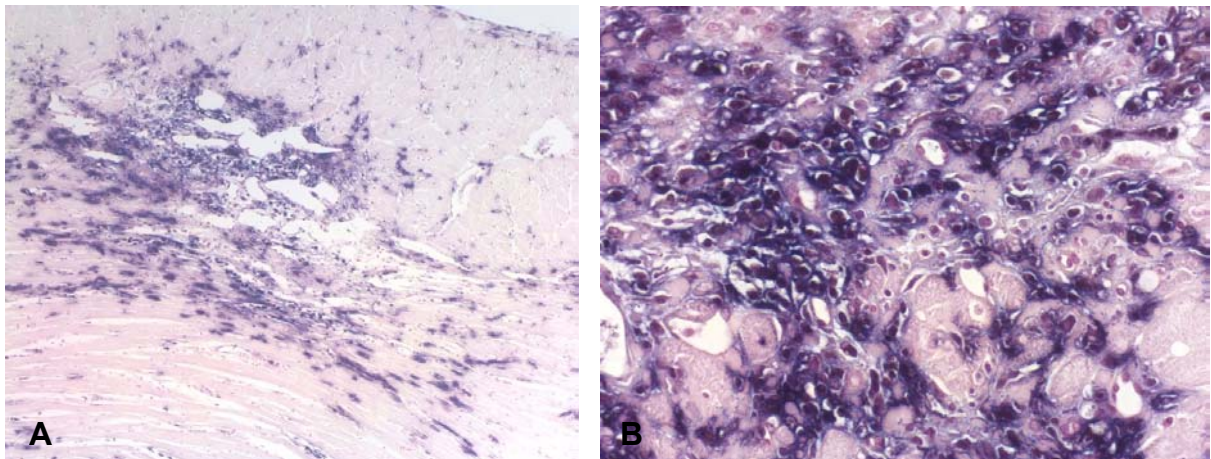


Abb. 13: Leukozytäre Infiltration des Infarktgebiets  
1 Woche nach Puffer-Injektion, Originalvergrößerung 100fach (A) bzw. 200fach (B)

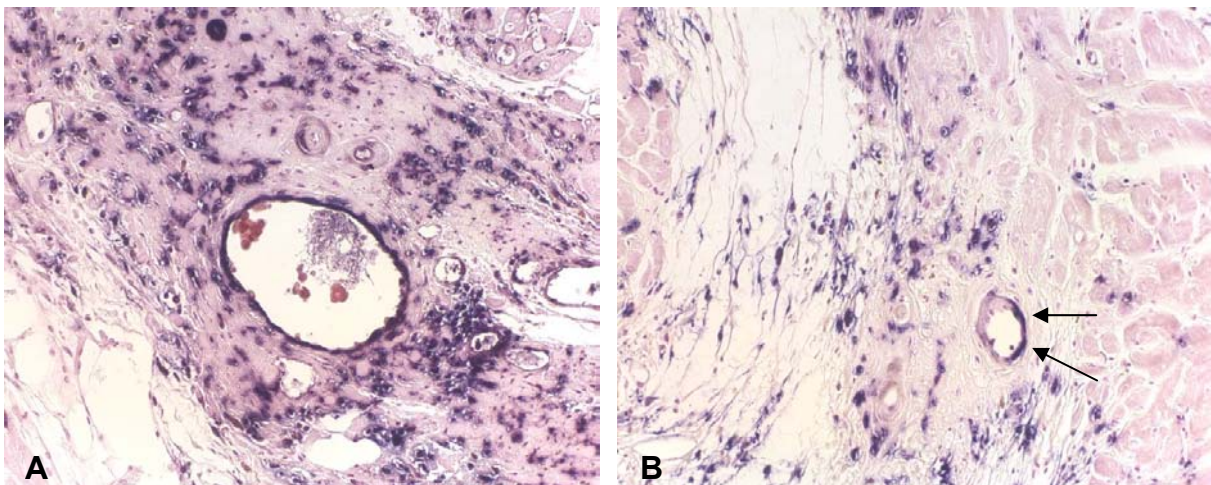


Abb. 14: hPLAP-positives Endothel im Infarkt  
4 Wochen (A) bzw. 4 Monate (B) nach Puffer-Gabe, Originalvergrößerung 200fach

Bei der Gegenüberstellung der Infarkt-Gruppen wurde eine große Diskrepanz zwischen den Infarkt-Gruppen mit und den Infarkt-Gruppen ohne Zell-Gabe bezüglich der Quantität hPLAP-positiver Zellen in den Infarktgebieten offensichtlich. Es zeigte sich sehr deutlich, dass in den Tieren ohne zelluläre Therapie mehr Marker-Protein-exprimierende Zellen, welche durch die Entzündungsreaktion aus dem Knochenmark rekrutiert wurden, in das Infarktgebiet migrierten als bei den Tieren mit Zell-Gabe. Abb. 15 zeigt repräsentativ eine Gegenüberstellung der histochemisch gefärbten Infarktbereiche von Tieren ohne und mit Zell-Therapie 1 (A, D), 4 (B, E) und 16 (C, F) Wochen nach Zell- bzw. Puffer-Gabe.

Ein weiteres Resultat war, dass es 4 Monate nach Infarktinduktion zu einer Reduktion des vornehmlich hPLAP-positiven Zellinfiltrats im Infarktgebiet kam; stattdessen dominierten hPLAP-negative Zellen. Einige wenige mobilisierte Knochenmarkszellen siedelten sich langfristig in der Infarktnarbe als Endothelzellen an. Äußerst selten konnten morphologisch hPLAP-positive Fibrozyten identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

In keinem der untersuchten Herzschnitte konnten hPLAP-positive Kardiomyozyten nachgewiesen werden, weder bei den Sham operierten Tieren noch nach ischämischer Schädigung des Herzmuskels, unabhängig von der intravenösen Verabreichung von Knochenmarkszellen.

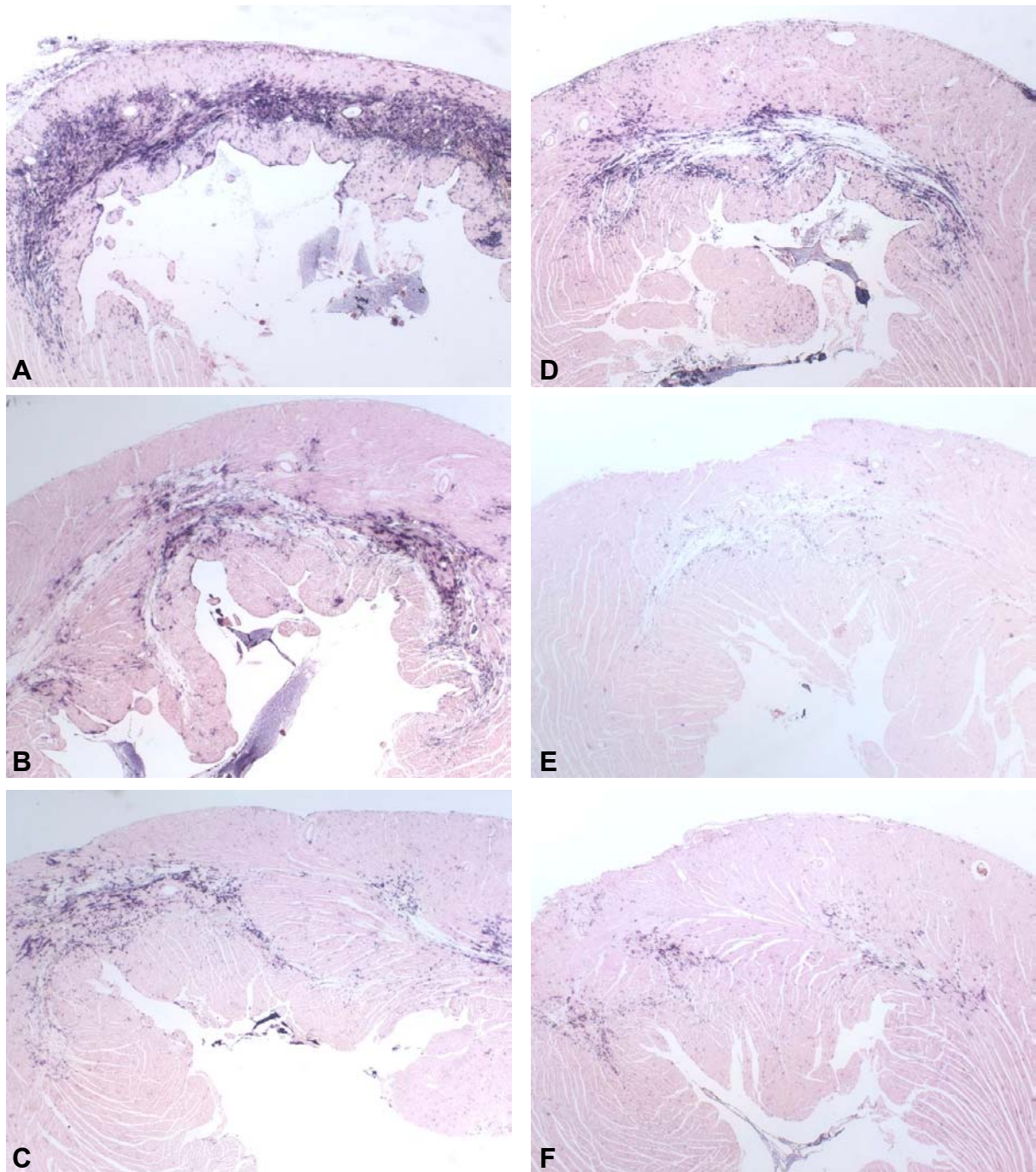


Abb. 15: Vergleichende Darstellung des hPLAP-positiven Zellinfiltrats im Infarktgebiet  
A, B und C: Myokard Infarkt-Tiere 1 (A), 4 (B) und 16 (C) Wochen nach Puffer-Injektion  
D, E und F: Myokard Infarkt-Tiere 1 (D), 4 (E) und 16 (F) Wochen nach BMC-Injektion  
Originalvergrößerung 12,5fach

#### 4.1.2 Echokardiographie

Die echokardiographische Untersuchung wurde durchgeführt, um zum einen einen funktionellen Nachweis für die erfolgreiche Infarktinduktion zu erheben und zum an-

deren, um neben der Histologie Aussagen über eine eventuell verbesserte Herzfunktionalität infolge der Zell-Therapie machen zu können. Zur Beurteilung der Funktionalität wurden die Parameter Ejection Fraction (EF), Fractional Shortening (FS), linksventrikuläre Dimension diastolisch (LVDd) und systolisch (LVDs) herangezogen.

Es zeigte sich, dass eine Woche nach Operation und vor Zell-Verabreichung ein signifikanter Unterschied in der Funktionalität des Herzmuskels zwischen scheinoperierten und Infarkt-Tieren zu sehen war. Sowohl EF, als Maß für die Auswurfleistung des Herzens, als auch FS, als Maß für die Kontraktilität des Herzmuskels, zeigten sich bei den infarzierten Tieren signifikant erniedrigt. Ebenso waren die Dimension des linken Ventrikels sowohl systolisch als auch diastolisch signifikant vergrößert, was sich auf die Dilatation der linken Herzkammer zurückführen lässt. Somit zeigen die echokardiographischen Untersuchungen ganz deutlich, dass Infarkte relevanter Größe induziert wurden, die einen signifikanten Effekt auf die Leistungsfähigkeit des Herzmuskels ausübten. Desweiteren zeigte die Statistik mittels 2facher ANOVA, dass der signifikante Unterschied bezüglich Infarktinduktion bzw. Sham-OP in den 4 ausgewählten Parametern auch im Zeitverlauf 1, 4, 8 und 16 Wochen nach Zell- bzw. Puffer-Gabe bestehen blieb.

Es ergab sich keine signifikante Verbesserung der kardialen Funktionalität in Folge der Zell-Therapie. Lediglich in den Langzeit-Gruppen, bei denen die Echokardiographie 8 und 16 Wochen nach Zell-Gabe durchgeführt worden war, zeigte sich eine tendenzielle Verbesserung bzw. eine Minderung der linksventrikulären Dilatation, was sich in der Reduktion der Parameter LVDd und LVDs äußerte (siehe Abb. 26, 27).

In den Abbildungen 16 bis 27 sind die erhobenen Ultraschalldaten graphisch dargestellt. Mit -2 ist die Baseline-Untersuchung an sechs gesunden Tieren benannt. Der Zeitpunkt 0 stellt den ersten Ultraschalltermin 1 Woche nach Infarktinduktion und vor Verabreichung der Knochenmarkszellen bzw. des Puffers dar. Für die jeweiligen Zeitabschnitte 1, 4 und 16 Wochen nach Zell- bzw. Puffer-Gabe wurden einzelne Graphiken für jeden der 4 Parameter erstellt.

---

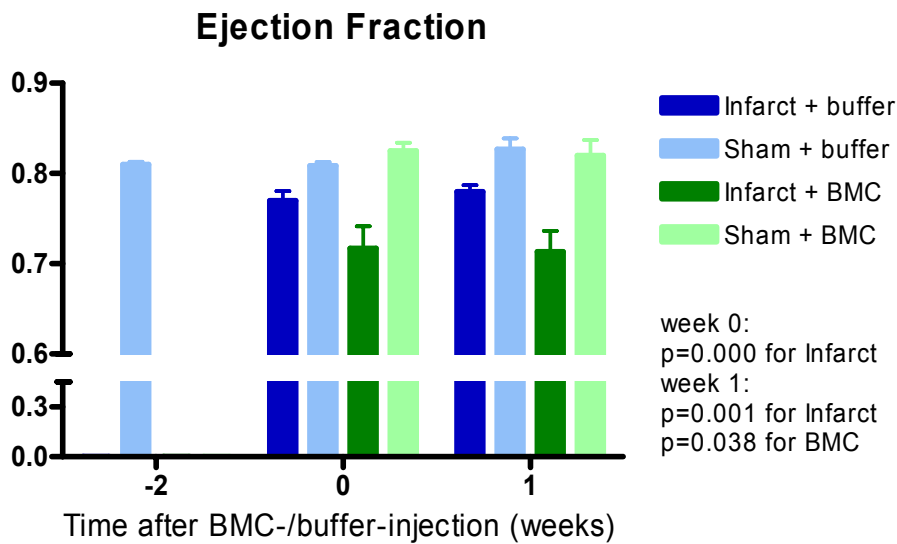


Abb. 16: EF vor (-2), 1 Woche nach Infarktinduktion (0) und 1 Woche nach BMC- bzw. Puffer- Injektion

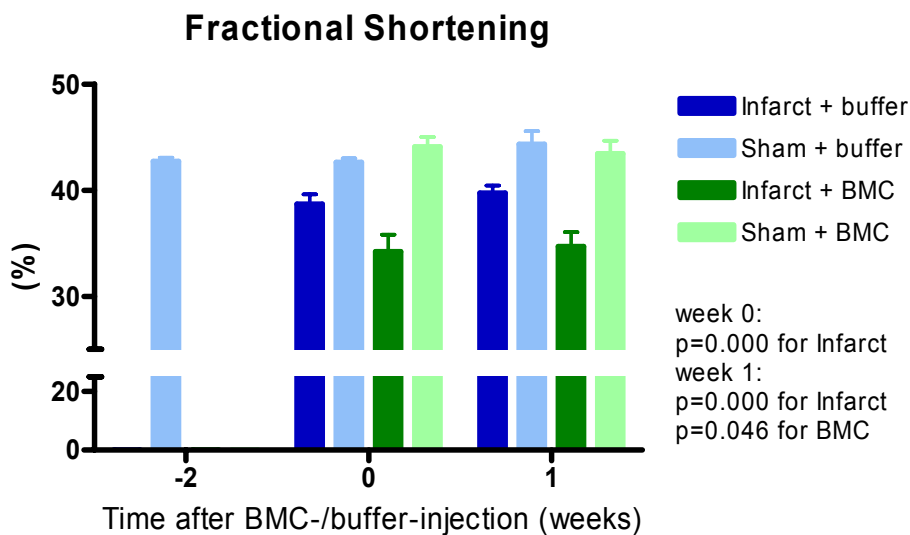


Abb. 17: FS vor (-2), 1 Woche nach Infarktinduktion (0) und 1 Woche nach BMC- bzw. Puffer-Injektion



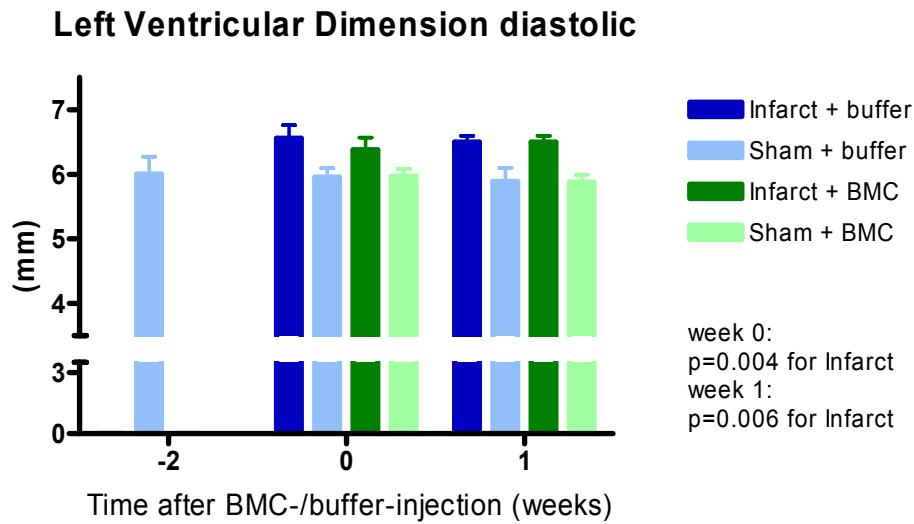


Abb. 18: LVDd vor (-2), 1 Woche nach Infarktinduktion (0) und 1 Woche nach BMC- bzw. Puffer-Injektion

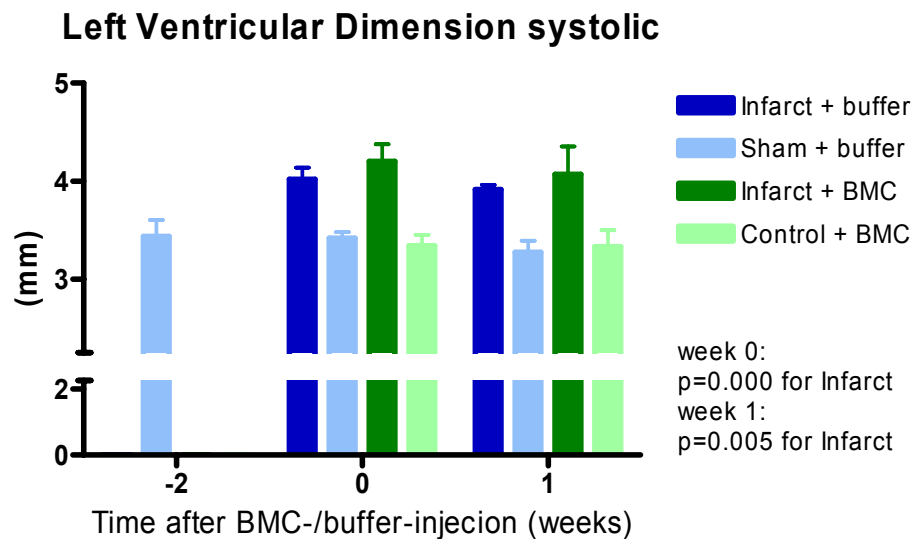


Abb. 19: LVDs vor (-2), 1 Woche nach Infarktinduktion (0) und 1 Woche nach BMC- bzw. Puffer-Injektion

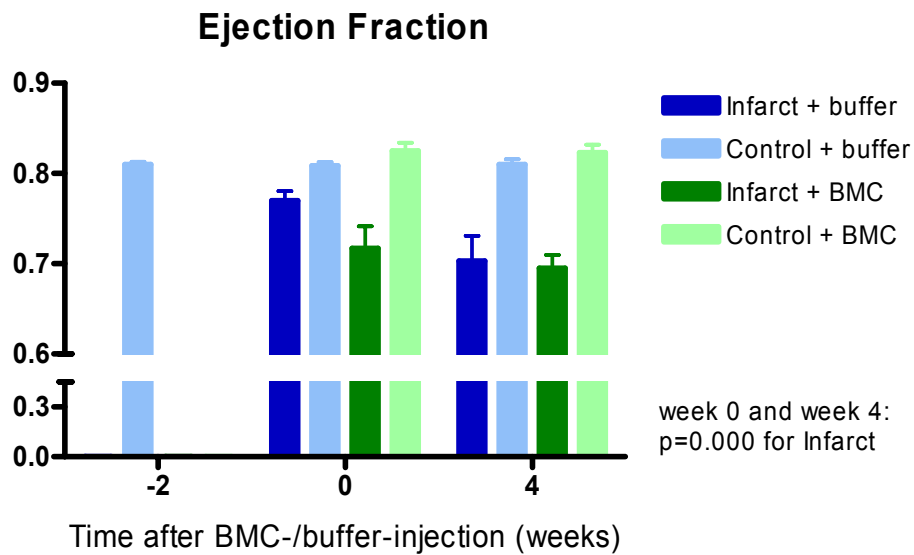


Abb. 20: EF vor, 1 Woche nach Infarktinduktion und 4 Wochen nach BMC- bzw. Puffer-Injektion

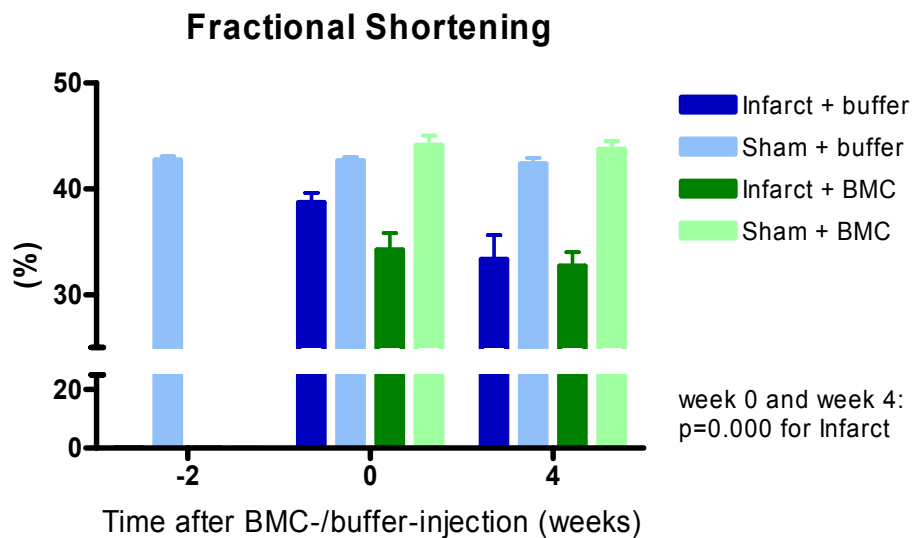


Abb. 21: FS vor, 1 Woche nach Infarktinduktion und 4 Wochen nach BMC- bzw. Puffer-Injektion

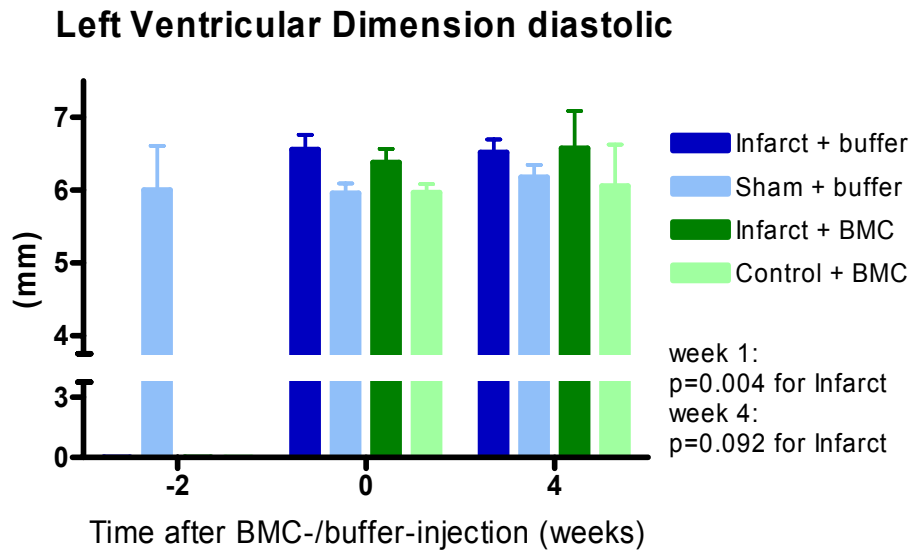


Abb. 22: LVDd vor, 1 Woche nach Infarktinduktion und 4 Wochen nach BMC- bzw. Puffer-Injektion

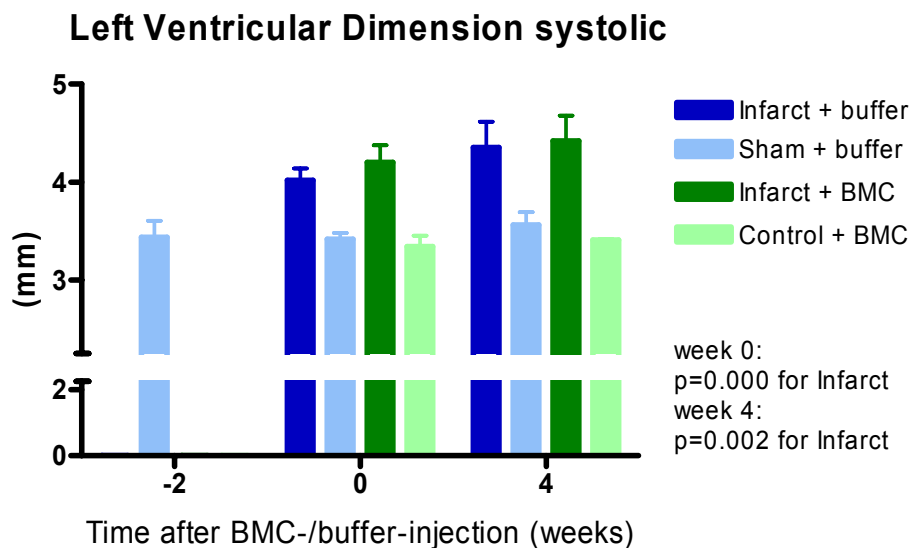


Abb. 23: LVDs vor, 1 Woche nach Infarktinduktion und 4 Wochen nach BMC- bzw. Puffer-Injektion

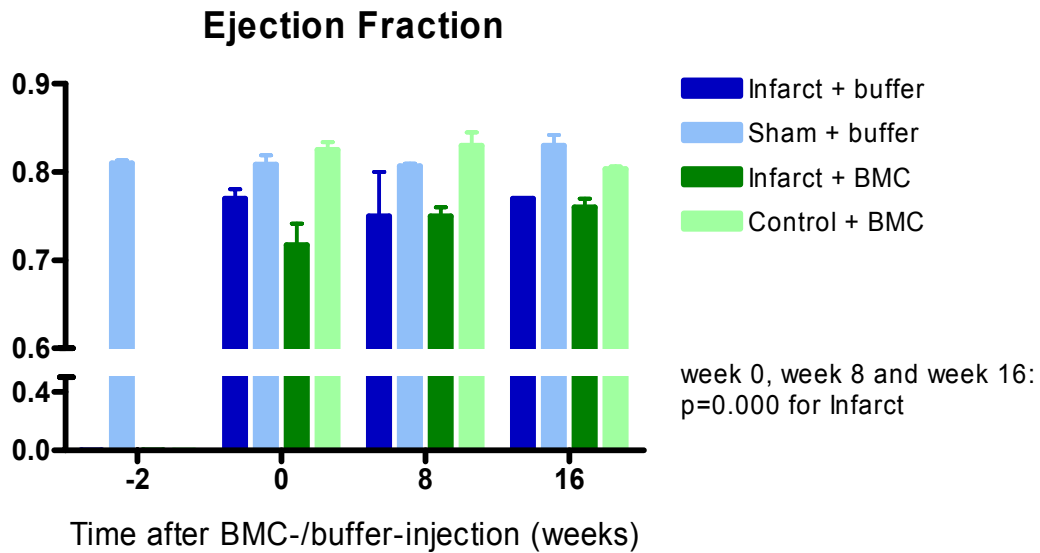


Abb. 24: EF vor (-2), 1 Woche nach Infarktinduktion (0), 8 (8) und 16 (16) Wochen nach BMC- bzw. Puffer-Injektion

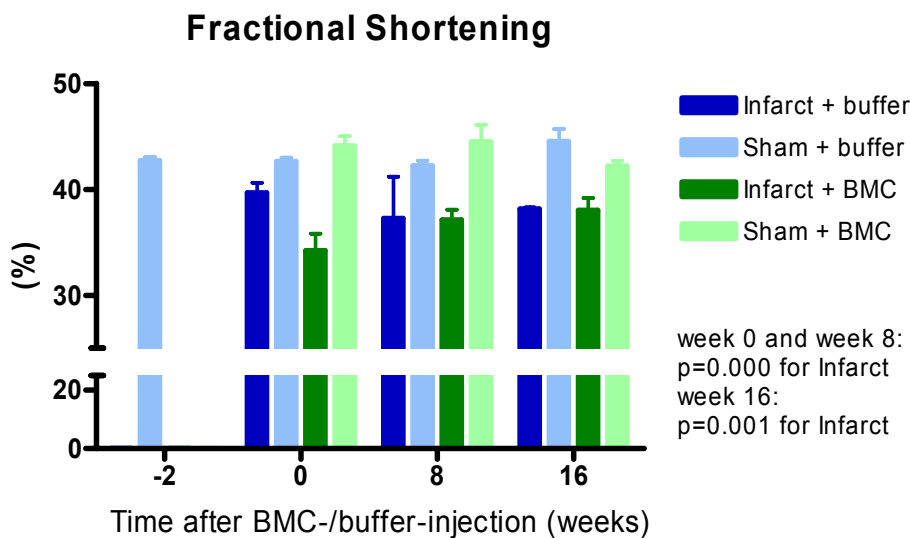


Abb. 25: FS vor (-2), 1 Woche nach Infarktinduktion (0), 8 (8) und 16 (16) Wochen nach BMC- bzw. Puffer-Injektion

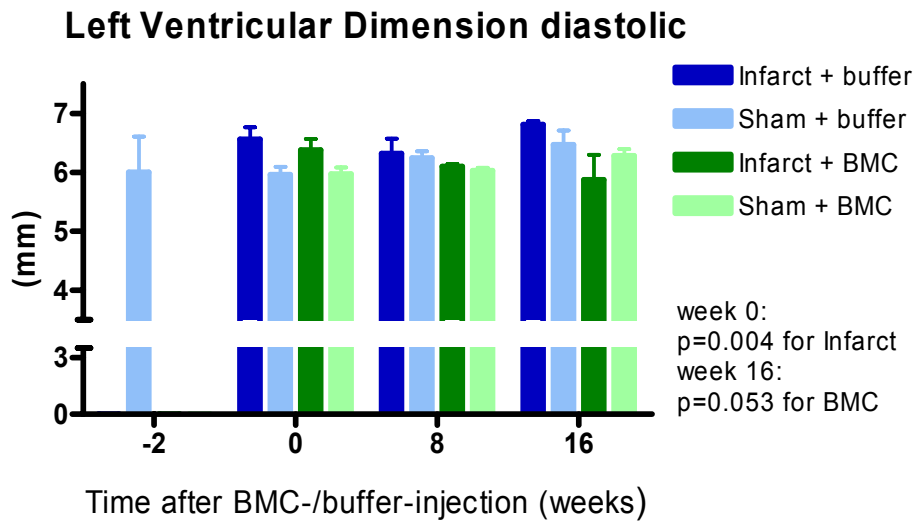


Abb. 26: LVDd vor (-2), 1 Woche nach Infarktinduktion (0), 8 (8) und 16 (16) Wochen nach BMC- bzw. Puffer-Injektion

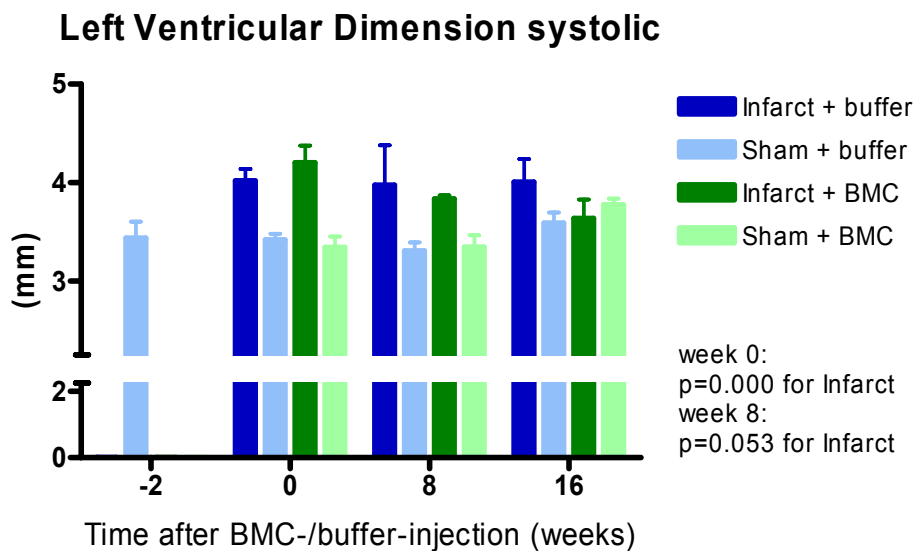


Abb. 27: LVDs vor (-2), 1 Woche nach Infarktinduktion (0), 8 (8) und 16 (16) Wochen nach BMC- bzw. Puffer-Injektion

## 4.2 Modifizierung des Tiermodells

Im bisherigen Tiermodell wurde Toleranz gegenüber dem Marker-Protein hPLAP durch die letale Bestrahlung und Transplantation hPLAP-positiven Knochenmarks erzeugt. Dieses Modell eignet sich zur Verfolgung der Marker-exprimierenden Knochenmarkszellen, allerdings ist eine spezifische Verfolgung einzeln verabreichter Zellen wie Organe nicht möglich, da nicht zwischen eben jenen Zellen und den hPLAP-positiven Zellen aus dem Knochenmark unterschieden werden kann. Ziel war es, die neonatale Phase, in der das Immunsystem des jungen Organismus noch nicht vollständig ausgereift ist, zu nutzen und durch subkutane Injektion hPLAP-positiver peripherer Blutzellen in neonatale Wildtyp-Tiere Marker-tolerante und zugleich Background-freie Tiere zu generieren.

### *4.2.1 Ergebnisse aus dem Vorversuch*

Wie erwartet war bei der Transplantation hPLAP-transgener Spenderhaut in naive Wildtyp-Tiere eine starke Abstoßungsreaktion zu beobachten. Bei 2 von 2 Tieren kam es ab Tag 6 zur Nekrose des Transplantats. Bei den Wildtyp-Tieren und den hPLAP-transgenen Tieren, die ein Hauttransplantat eines Wildtyp-Spenders, und bei den hPLAP-transgenen Tieren mit hPLAP-positivem Transplantat wurde keine Abstoßungsreaktion gesehen und das Transplantat heilte reizlos ein, was später auch durch histologische Untersuchung der Hautbiopsate vom Übergang Empfänger-Spender-Haut bestätigt werden konnte.

### *4.2.2 Ergebnisse der Hauttransplantationen in neonatal tolerante Empfänger*

Als Nachweis, ob die Injektion hPLAP-positiven Vollbluts kurz nach der Geburt, zu einem Zeitpunkt, da das Immunsystem noch nicht vollständig ausgereift ist, zu einer belastbaren Marker-Toleranz führt, wurde ein Wildtyp-Wurf mit sechs Tieren dieser Behandlung unterzogen. Das siebte Wurfgeschwister diente als Negativ-Kontrolle und bekam keine subkutane Vollblut-Injektion.

Im Alter von 4 Monaten wurde allen sieben Tieren Haut eines hPLAP-positiven Spenders transplantiert. Es konnte das erfolgreiche Anwachsen der hPLAP-positiven

---

Hauttransplantate bei allen sechs behandelten neonatal toleranten Tieren gezeigt werden, ohne Anzeichen von Entzündungsreaktionen, wohingegen das Kontrolltier das Hauttransplantat abstieß. In Abb. 28 ist der Übergang des Hautbiopsats von der hPLAP-positiven Spenderhaut (oben, blau) zur hPLAP-negativen Empfängerhaut (unten, rosa) zu sehen. Des Weiteren ist das Einwandern hPLAP-positiver endotheliale Zellen vom Transplantat in die Empfängerhaut hinein zu beobachten.

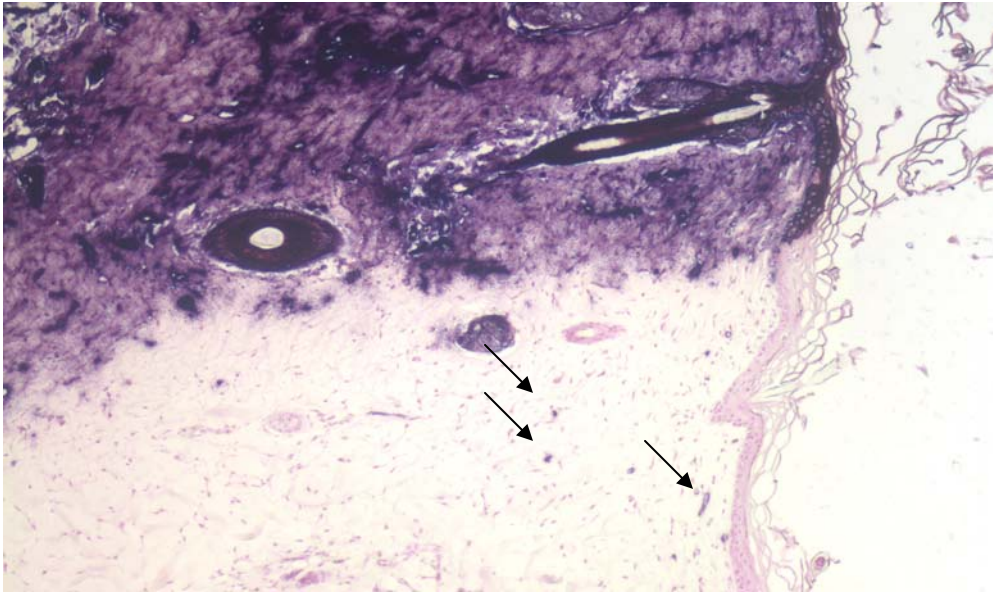


Abb. 28: Hautbiopsat: Übergang Empfänger-Haut (unten, rosa) zu hPLAP-positivem Transplantat (oben, blau)  
hPLAP-positive Endothelzellen in der Empfängerhaut sind mittels Pfeilen markiert  
Originalvergrößerung 200fach

#### 4.2.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde neben der Hauttransplantation, welche zu einer Überprüfung der belastbaren Toleranz diente, routinemäßig durchgeführt, um einen Background hPLAP-positiver hämatopoietischer Zellen, so wie es bei den bestrahlten und mit hPLAP-positivem Knochenmark transplantierten Tieren der Fall ist, ausschließen zu können.

Bei 5 von 6 neonatal toleranten Tieren konnten keine hPLAP-positiven Zellen detektiert werden und die Ergebnisse der Durchflusszytometrie waren mit jenen der Wildtyp-Kontrolle vergleichbar (siehe Abb. 29). Das Blut eines von 6 Tieren allerdings enthielt Zellen, die durch den hPLAP-Antikörper markiert wurden und somit als

hPLAP-positiver Background zu werten waren (Daten nicht gezeigt). Im Laufe der weiteren Untersuchungen kam es bei insgesamt 3 von 29 neonatal toleranten Tieren zu diesem Phänomen. Die Vermutung lag nahe, dass diese hPLAP-positiven Zellen von proliferierenden, zirkulierenden Vorläuferzellen aus dem lediglich Gerinnungs-gehemmten, jedoch nicht Proliferations-gehemmten, hPLAP-positiven Vollblut, welches für die Toleranz-Induktion verwendet worden war, stammten. Daher gingen wir in weiterer Folge dazu über, das Spender-Blut vor Verabreichung zu bestrahlen. Infolge dieser Modifikation erwiesen sich alle weiteren getesteten Tiere als Background-frei.

Somit dient die Durchflusszytometrie als Kontrolle, um Tiere mit hPLAP-positivem Background von weiteren Versuchen ausschließen zu können.

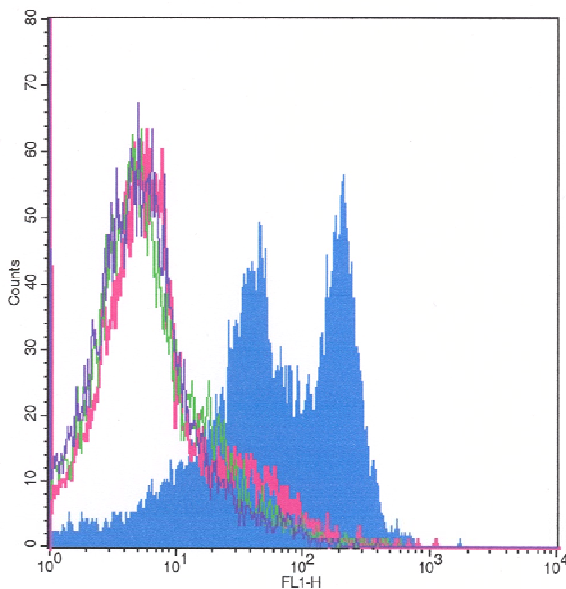


Abb. 29: Overlay Histogramm Durchflusszytometrie hPLAP-positives Tier (blau) gegen Wildtyp (pink) und neonatal tolerante Tiere (grün und lila)

#### 4.2.4 Organhistologie

Die histologische Aufarbeitung von Organen der Tiere, bei denen neonatal Toleranz gegenüber hPLAP induziert wurde, wurde ebenfalls wie die Durchflusszytometrie anfangs als Kontrolle durchgeführt, um einen Background hPLAP-positiver Zellen in diesen Tieren ausschließen zu können.



Die Organe der neonatal toleranten Tiere wiesen nach Histochemie zur Detektion hPLAP-positiver Zellen ein identisches Bild zu den Wildtyp-Tieren auf. Es konnten keine hPLAP-positiven Zellen identifiziert werden, lediglich bei den Tieren, die bereits in der Durchflusszytometrischen Untersuchung durch einen Background hPLAP-positiver leukozytärer Zellen aufgefallen waren, konnten in geringem Ausmaß Marker-positive Zellen angefärbt werden.

#### 4.3 Modifiziertes Myokardinfarkt-Modell

Die Nutzung neonatal Marker-toleranter, Background-freier Tiere zur weiteren Verfolgung intravenös verabreichter Knochenmarkszellen nach erfolgtem Myokardinfarkt brachte weitere Ergebnisse: Eine Woche nach Infarktinduktion wurden  $1 \times 10^7$  hPLAP-positiv Knochenmarkszellen nach vorangegangener Verabreichung eines Vasodilators intravenös appliziert. Die Tiere wurden vier Stunden, einen Tag und eine Woche nach Zell-Gabe getötet.

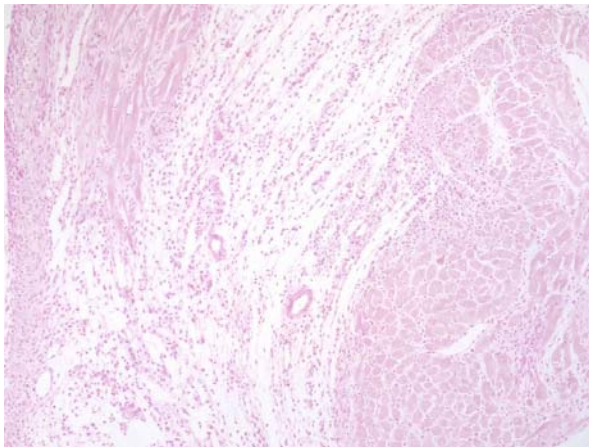


Abb. 30: Infarktgebiet einen Tag nach BMC-Injektion  
Originalvergrößerung 100fach

Es wurde beobachtet, dass infundierte Knochenmarkszellen beim gesunden Tier nicht in das Myokard einwandern (Daten nicht gezeigt). Zudem konnte bei den Infarkt-Tieren demonstriert werden, dass eine vernachlässigbar geringe Anzahl infundierter Zellen zum Ort der Schädigung gelangte. Demnach konnte keine Rekrutierung infundierter Knochenmarkszellen zum Ischämie-Gebiet hin bestätigt werden, weder 1 Woche nach BMC-Infusion noch zu den früheren Zeitpunkten. Abbildung 30 zeigt einen Ausschnitt aus dem Infarktgebiet eines Tieres einen Tag nach Zell-Gabe.

In diesem Bereich konnten keine Marker-positiven infundierten Zellen identifiziert werden. Abbildung 31 demonstriert beispielhaft eine der äußerst selten gesehenen stark hPLAP-positiven Spender-Zellen.

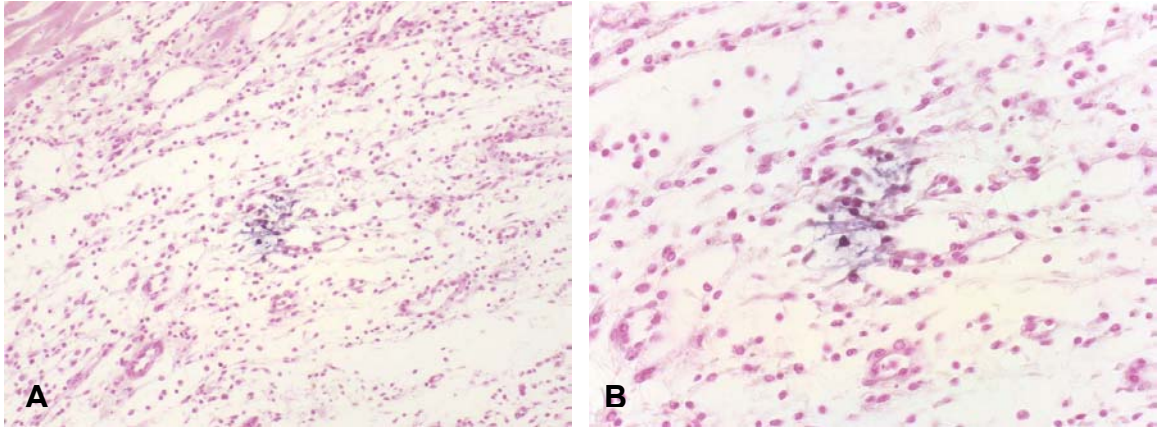


Abb. 31: Vereinzelt hPLAP-positive Spenderzellen im Infarktgebiet 1 Tag nach BMC-Injektion  
Originalvergrößerung 200fach (A) bzw. 400fach (B)

Dieses Experiment zeigt, dass infundierte Knochenmarkszellen nur in geringem Ausmaß an den Ort der Gewebsschädigung gelangen. Eine Differenzierung dieser Zellen zu Kardiomyozyten konnte nicht bestätigt werden.

## 5. Diskussion

### 5.1 Myokardinfarkt-Modell

#### *5.1.1. Diskussion des Versuchsaufbaus*

##### 5.1.1.1 Infarktinduktion

Die Ligation der linken Koronararterie ist generell gut geeignet, großflächige Vorderwandinfarkte im Rattenmodell zu erzielen, die die pathophysiologischen Geschehnisse am humanen Herzen gut widerspiegeln. Nach den gesammelten Erfahrungen an der Fischer 344 Ratte ist es allerdings nicht möglich, eine Standardisierung der Infarktgrößen zu erreichen, da die tatsächliche anatomische Lage der zu ligierenden Arterie individuell sehr unterschiedlich ist. Weitere Untersuchungen, beispielsweise die Echokardiographie, sind nötig, um den funktionellen Nachweis für eine tatsächliche Schädigung des Herzmuskels zu erhalten.

##### 5.1.1.2 Zeitpunkt der Zell-Verabreichung und Art der Applikation

Der Zeitpunkt der Zell-Gabe mit 7 Tagen nach Infarktinduktion wurde nach gründlichem Studium der Literatur gewählt. Arbeiten von LI et al. (2001) zeigten, dass die Entzündungsreaktionen am Herzen in der ersten Woche nach Infarkt am stärksten sind und dass daher während dieser Zeitspanne transplantierte Zellen nicht in der Lage sind, an den Ort ihrer Bestimmung, in diesem Fall der Herzmuskel, zu gelangen, beziehungsweise sich dort anzusiedeln. Auch STRAUER et al. (2002) diskutierte den optimalen Zeitpunkt der Zell-Gabe und kam gleichfalls zu dem Schluss, dass eine Verabreichung zwischen Tag 7 und 14 sowohl am vielversprechendsten als auch für die klinische Therapie umsetzbar erscheint.

Als Methode zur Zell-Transplantation stehen theoretisch die intravenöse, die intraarterielle, die peritoneale, die intrakoronare und die intramyokardiale Verabreichung zur

---

Verfügung. Wir wählten für unseren Versuchsaufbau die Methode der intravenösen Zell-Gabe. Da bekannt ist, dass ein beträchtlicher Anteil der infundierten Zellen in der Lunge zurückgehalten wird (BARBASH et al., 2003), modifizierten wir die Zellinfusion durch die vorherige Gabe eines Vasodilatators. Wie GAO et al. (2001) beschrieben beträgt die durchschnittliche Größe mesenchymaler Stammzellen bei der Ratte zwischen 20 und 24  $\mu\text{m}$ , wohingegen die Lungenkapillaren lediglich einen Durchmesser von 10-15  $\mu\text{m}$  aufweisen. Dazu kommt, dass MSC nicht die Fähigkeit besitzen, wie beispielsweise Erythrozyten, ihre Form zu verändern. Wie von GAO et al. gezeigt kann durch vorherige Gabe eines Vasodilatators die Anzahl der in den gesamten Kreislauf gelangenden infundierten Knochenmarkzellen erhöht werden.

Vorteile der intravenösen Applikation liegen in ihrer geringen Invasivität und ihrer leichten und sicheren Durchführung, sowohl am Tier als auch am Menschen. Man muss allerdings zugeben, dass Studien, die verschiedene Applikationsarten miteinander verglichen, ergaben, dass die intramyokardiale Verabreichung von Knochenmarkszellen der intravenösen generell überlegen ist, da quantitativ mehr transplantierte Zellen im Herzmuskel aufzufinden waren (BARBASH et al., 2003; HAYASHI et al., 2004; HOFMANN et al., 2005). Trotz der Überlegenheit der intramyokardialen gegenüber der intravenösen Zell-Gabe entschieden wir uns für letztere Methode, da sie durch die einfache Durchführung und geringe Invasivität für die klinische Anwendung am Menschen am leichtesten umsetzbar erscheint.

#### 5.1.1.3 Vermeidung von Chimärismus bei den neonatal toleranten F344 Ratten

Wie unter 4.2.3 beschrieben, wurde bei einem der ursprünglich getesteten 6 neonatal toleranten Tiere in der FACS-Analyse ein Background an hPLAP-positiven Zellen im peripheren Blut detektiert. Auf Grund dieser Beobachtungen entschloss man sich in Folge, alle weiteren Versuche zur Toleranz-Induktion ausschließlich mit bestrahltem Vollblut hPLAP-transgener Tiere durchzuführen, um der Chimären-Bildung entgegenzuwirken. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Bestrahlung mit 30 Gy die Zellen derart schädigt, sodass keine Proliferation mehr stattfinden kann, selbst nicht durch Stimulierung mit potenten Mitogenen wie Concavalin A (WEINMANN et al., 2000). Somit wurden alle hPLAP-tg Blutproben vor der Verabreichung mit 30 Gy mittels des Linearbeschleunigers der VU Wien (siehe 3.2.1.2) bestrahlt, um zu gewährleisten, dass sämtliche neonatal toleranten F344 Ratten für die folgenden Versuche

---

Background-frei waren. Trotzdem diente die FACS-Analyse weiterhin zur Bestätigung, dass keine hPLAP-chimären Tiere für die Versuche verwendet wurden.

### 5.1.2 Diskussion der Resultate

#### 5.1.2.1 Myokardiale Differenzierung endogener Knochenmarkszellen

Zum einen konnte anhand der Baseline und der scheinoperierten Tiere gezeigt werden, dass es am Herzmuskel unter physiologischen Umständen in erster Linie zu einer Erneuerung von Endothel und Fibrozyten kommt, und dass diese Zellen aus dem Knochenmark in das jeweilige Gewebe einwandern. In keinem der untersuchten Schnitte konnten hPLAP-positive Kardiomyozyten nachgewiesen werden, weder in Sham- noch in Infarkt-Tieren, unabhängig von der Verabreichung von Knochenmarkszellen.

Diese Ergebnisse stehen in direktem Widerspruch zu Beobachtungen aus der Transplantationsmedizin, wo zu einem geringen Prozentsatz aus dem Knochenmark stammende Herzmuskelzellen beobachtet wurden (BAYES-GENIS et al., 2002; LAFLAMME et al., 2002; MULLER et al., 2002; QUAINI et al., 2002; DEB et al., 2003). Während QUAINI et al. bis zu 30% an kardialen Chimerismus postulierten, kamen andere Arbeitsgruppen (BAYES-GENIS et al., 2002; LAFLAMME et al., 2002; MULLER et al., 2002) auf einen weitaus geringeren Anteil an aus dem Knochenmark stammenden Zellen im Myokard. Der erstaunlich hohe Chimärismus bei QUAINI et al. könnte daher herrühren, dass die Untersuchungen bereits binnen 4 Wochen nach Herztransplantation durchgeführt wurden, nach Versterben der Transplantationsempfänger. Somit könnten die chimären Zellen weniger einen physiologischen Turnover am Herzmuskel widerspiegeln als vielmehr die inflammatorische Infiltration des Herzmuskels durch Zellen aus dem Knochenmark in Folge von Abstoßungsreaktionen (TAYLOR et al., 2002). Im Gegensatz dazu stehen die Daten von GLASER et al. (2002), welche 3 bis 10 Jahre nach Transplantation zwar vom Empfänger stammende Endothel- und glatte Muskelzellen, aber keine Kardiomyozyten nachweisen konnten und somit mit unseren Daten konform gehen.

Auch Studien an diversen Tiermodellen sind sich nicht einig darüber, inwieweit Knochenmarkszellen an der physiologischen Zellerneuerung im Herzmuskel beteiligt

---

sind. Studien von KURAMOCHI et al. (2003) an letal bestrahlten und mit GFP-positivem Knochenmark transplantierten Mäusen zeigten, dass bereits einen Monat nach Infarktinduktion aus dem Knochenmark stammende GFP-positive Kardiomyozyten in der Border-Zone zu finden waren (0,04% aller Kardiomyozyten). Analog dazu konnten ORLIC et al. (2001) nach Mobilisierung von Knochenmarkszellen durch G-CSF und SCF neu differenzierte Myozyten im infarzierten Herzen nachweisen, während weder NYGREN et al. (2004) noch MOUQUET et al. (2005) in einem ähnlichen Modell GFP positive Herzmuskelzellen aus dem Knochenmark finden konnten.

Aufgrund der von uns erhobenen Daten muss allerdings klar gesagt werden, dass selbst 19 Wochen nach KMT keine Differenzierung von Knochenmarkszellen zu Kardiomyozyten zu beobachten war, weder bei scheinoperierten noch bei infarzierten Tieren. Worauf die Diskrepanz der Daten im Einzelnen zurückzuführen ist, lässt sich nur vermuten. Zum einen kann es durch Überlagerung in Gefrierschnitten zu falsch positiven Aussagen kommen, zum anderen wurden zur Verifizierung von Kardiomyozyten zum Teil Marker benutzt, die nicht exklusiv auf Kardiomyozyten exprimiert werden.

Die hier präsentierten Daten können die These der *in vivo*-Differenzierung von Knochenmarkszellen zu Kardiomyozyten nicht bestätigen und decken sich somit mit den Ergebnissen von NYGREN et al. (2004).

#### 5.1.2.2 Rekrutierung von Knochenmarkszellen in das Ischämie-Gebiet

Die vorliegende Arbeit zeigt deutlich, dass das inflammatorische Infiltrat im Infarktgebiet 2 und 5 Wochen nach Infarktinduktion nahezu exklusiv durch hPLAP-positive Zellen aus dem Knochenmark gestellt wird. Auch BALSAM et al. (2004) und NYGREN et al. (2004) kommen zu einem ähnlichen Ergebnis.

17 Wochen nach Ischämie dominieren in der Infarktnarbe allerdings nicht mehr die hPLAP-positiven Zellen, welche in geringer Zahl als Endothelzellen und äußerst selten als Fibrozyten im geschädigten Myokard verbleiben, statt dessen dominieren endogene, und daher hPLAP-negative, Zellen die Narbe. Diese Daten weisen darauf hin, dass zwar für den Ablauf der inflammatorischen Phase nach Ischämie/Reperfusionsschaden Zellen aus dem Knochenmark beziehungsweise der Zirkulation rekrutiert werden, wobei diese Rekrutierung jedoch temporär begrenzt ist

---

und letztendlich nur wenige der angeforderten Zellen im Herzmuskel verbleiben. Das Narbengewebe des Infarkts wird somit in erster Linie aus lokalen kardialen Zellen geschaffen. Diese Beobachtung wurde bereits durch YANO et al. (2005) beschrieben, die zeigten, dass sich insbesondere die Myofibroblasten von endogenen kardialen Zellen ableiten.

#### 5.1.2.3 Schicksal intravenös verabreichter Knochenmarkszellen

Nach intravenöser Verabreichung hPLAP-positiver Knochenmarkszellen in neonatal Marker-tolerante Empfänger eine Woche nach induziertem Myokardinfarkt konnten lediglich wenige Marker-exprimierende Zellen im Infarktgebiet nachgewiesen werden. In den Herzen der scheinoperierten Tiere bzw. im umliegenden gesunden Myokard der Infarkttiere wurden keine Spenderzellen gesehen. Dieses Ergebnis spricht offenkundig dafür, dass intravenös verabreichte Knochenmarkszellen sich lediglich in geringem Ausmaß im geschädigten Herzmuskel einfinden.

Was wir ebenfalls ausschließen konnten, ist eine *in vivo* Differenzierung der injizierten Zellen zu Herzmuskelzellen. Weder im ersten noch im zweiten Infarkt-Experiment kam es nach intravenöser Gabe von Knochenmarkszellen eine Woche nach Infarkt-induktion zu einer myokardialen Differenzierung, weder bei scheinoperierten noch bei infarzierten Tieren. Ebenso konnten wir keine Verstärkung der Neovaskularisierung des Infarkts durch aktive Inkorporation der applizierten Zellen als Endothelzellen beobachten.

Während die Gruppen von JAQUET et al. (2005) und LIMBOURG et al. (2005) zu übereinstimmend negativen Ergebnissen gelangten, zeigten Studien anderer Forschungsgruppen eine *in vivo* Differenzierung zu Kardiomyozyten. Die meisten Studien, in denen eine *in vivo* Differenzierung nachgewiesen werden konnte, basierten auf einer intramyokardialen Zell-Verabreichung (TOMITA et al., 1999; SHAKE et al., 2002; TOMA et al., 2002; KUDO et al., 2003; KAJSTURA et al., 2005; NOISEUX et al., 2006; UEMURA et al., 2006). Die Art der Zell-Applikation könnte einer der Gründe für die unterschiedlichen Resultate sein.

Die vorliegende Arbeit zeigte, dass es mittels der intravenösen Zell-Applikation zu hohen Zellverlusten kommt und dass nur wenige der infundierten Zellen am Bestimmungsort ankommen. Des weiteren könnte die Tatsache, dass die Zellen durch die

---

intramyokardiale Gabe direkt in ein Umgebungsmilieu, welches sich positiv auf eine mögliche Differenzierung zu Kardiomyozyten auswirken könnte, verbracht werden, eine Rolle spielen.

Es liegen jedoch auch Publikationen vor, welche beschrieben, dass es selbst nach intravenöser Gabe von Zellen zu einer Differenzierung zu Herzmuskelzellen kam (BITTIRA et al., 2003; NAGAYA et al., 2004; MISAO et al., 2006). Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen wurden in diesen Studien allerdings kultivierte und angereicherte MSCs zur Therapie eingesetzt, wohingegen in der vorliegenden Arbeit  $1 \times 10^7$  frisch isolierte Knochenmarkszellen intravenös verabreicht worden waren. Geht man davon aus, dass lediglich 0,001 bis 0,01% aller Knochenmarkszellen MSCs darstellen (PITTENGER et al., 2004), so wurden den Tieren maximal 100 bis 1000 relevante Zellen injiziert. Es wäre zu diskutieren, ob eine Erhöhung der Zell-Zahl bzw. vorherige Kultivierung und Anreicherung von MSCs zu einer myokardialen oder endothelialen Differenzierung der Zellen geführt hätte. CIULLA et al. (2003) zeigten, dass nach Verabreichung mononukleärer Knochenmarkszellen eine Woche nach Infarktinduktion diese ausschließlich im Infarktgebiet, nicht aber im umliegenden Myokard, und zu einem geringen Prozentsatz in der Milz nachzuweisen waren. Auch KOTTON et al. (2001) zeigten, dass es zu einem exklusiven Homing intravenös verabreichter Knochenmarkszellen zum Ort der Gewebeschädigung, in diesem Fall der Lunge, kam, in den restlichen Organen aber kaum bis keine infundierten Zellen nachzuweisen waren. Diesen Studien nach kommt es zu einer gezielten Rekrutierung der intravenös verabreichten Zellen zu Orten der Gewebsschädigung. Diese Beobachtung kann durch die vorliegende Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Ebenso wie HOFMANN et al. (2005) beschrieben, konnten nach intravenöser Applikation lediglich wenige einzelne Spender-Zellen im Infarktgebiet nachgewiesen werden. Es muss festgehalten werden, dass weder eine de novo Differenzierung von Spenderzellen zu myokardialen Zellen noch Anzeichen der Zellfusion mit endogenen Myokardzellen beobachtet werden konnte, weder in den Herzen scheinoperierter noch in den Herzen infarzierter Tiere.

#### 5.1.2.4 Effekt der Zell-Therapie auf die kardiale Funktionalität

Die echokardiographischen Untersuchungen ergaben einen signifikanten Unterschied in der Funktionalität, anhand der 4 ausgewählten Parameter Ejection Fraction

---



EF, Fractional Shortening FS, linksventrikuläre Dimension diastolisch LVDD und systolisch LVDs, zwischen den infarzierten und den scheinoperierten Tieren. Wie auch bei LITWIN et al. (1994) zeigten die Infarkttiere vermindertes FS und verminderte EF, wohingegen sich die Dilatation des Ventrikels durch erhöhte Werte von LVDD und LVDs manifestierte. Somit zeigten alle infarzierten Tiere, die in die Auswertung einbezogen worden waren, eine deutliche Beeinträchtigung der kardialen Funktion.

Im Zuge dieser Arbeit konnte keine Verbesserung der kardialen Funktionalität in Folge der Zell-Verabreichung gezeigt werden. Auch hier gibt es eine Vielzahl widersprüchlicher Daten in der Literatur. Während in erster Linie präklinische Studien eine Verbesserung der linksventrikulären Funktionalität sowohl nach intravenöser (LIMBOURG et al., 2005; MA et al., 2005; BOOMSMA et al., 2006; SCHUSTER et al., 2006), intramyokardialer (TANG et al., 2004; ZHANG et al., 2004) als auch nach intrakoronarer (KAMIHATA et al., 2002) Zell-Gabe demonstrieren, weichen aktuelle Studien aus der klinischen Forschung mehr und mehr von diesen Beobachtungen ab (STAMM et al., 2003; TANG et al., 2005; JANSSENS et al., 2006; LUNDE et al., 2006; MEYER et al., 2006; SCHÄCHINGER et al., 2006).

Es muss deutlich gesagt werden, dass die Echokardiographie eine Methode mit hoher Varianz-Anfälligkeit darstellt und einen erfahrenen Untersucher erfordert. Ebenso muss betont werden, dass die finalen Gruppengrößen mit 2 bis 3 Tieren pro Gruppe zu klein sind, um mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten eine definitive Aussage über den Effekt der Zell-Therapie bezüglich der Funktionalität des infarzierten Herzmuskels machen zu können. Dennoch lässt der Trend zu einer verminderten Ventrikel-Dilatation 16 Wochen nach Zell-Gabe die Möglichkeit offen, dass die Zell-Therapie einen positiven Langzeiteffekt auf die Funktionalität des Herzmuskels bewirkt.

#### 5.1.2.5 Einfluss der Zell-Therapie auf die Infarktgröße

Wie den Daten aus der Planimetrie zu entnehmen ist, kam es in dieser Studie wie auch bei anderen (KAMIHATA et al., 2002; XU et al., 2005; MISAO et al., 2006; NOISEUX et al., 2006) durch die intravenöse Gabe von Knochenmarkszellen nach Infarkt zu einer signifikanten Verminderung der Infarktgrößen. Daraus resultierte ein

---

verbesserter Quotient aus Fläche des linken Ventrikels zu gesamter Herzfläche und eine verminderte Ausdünnung des linksventrikulären Myokards. Eine Reduktion der Infarktgröße zieht folgende Konsequenzen nach sich:

- a) Es kommt zu einem verminderten Untergang myokardialer Zellen,
- b) somit bleibt mehr vitales, funktionelles Myokard erhalten,
- c) durch die verminderte Narbenbildung wird einer Fibrosierung des linken Ventrikels vorgebeugt, was zu
- d) einer Verbesserung der Kontraktilität und in Folge zu
- e) einer verbesserten Leistung des Herzmuskels führen sollte.

Warum es durch die Zell-Therapie zu einer derart drastischen Reduktion der Infarktgrößen kommt, ist nicht geklärt und soll im Folgenden diskutiert werden. Ansatzpunkte zur Klärung der stark differierenden Ergebnisse, sowohl in der Echokardiographie als auch in der zum Teil beobachteten *in vivo* myokardialen Differenzierung wären zum einen im Zeitpunkt der Zell-Verabreichung, zum anderen in der Qualität und Quantität der verabreichten Zellen sowie in der Applikationsart zu sehen. Ein weiterer Punkt ist, dass man Ergebnisse aus Maus- bzw. Rattenmodellen nicht universell auf den Menschen übertragen kann.

Die Zeitpunkte der Zell-Gabe in der Literatur variieren von 1 Stunde bis hin zu 14 Tagen nach Induktion der Ischämie. Ebenso wurde zum einen mit unkultivierten Knochenmarkszellen, wie in dieser Studie, als auch mit kultivierten oder vordifferenzierten Zellen bzw. Subpopulationen in variierenden Konzentrationen von  $1 \times 10^6$  bis  $5 \times 10^8$  Zellen gearbeitet.

Es müssten die Daten groß angelegter Studien verschiedener Forschungsgruppen, welche mit abgeglichenen Protokollen bezüglich der Isolierung, Kultivierung und Verabreichung definierter Zellpopulationen und Zellkonzentrationen zu definierten Zeitpunkten arbeiten, verglichen werden, um tatsächlich herausfinden zu können, ob die Zell-Therapie von funktionellem Nutzen ist, welche Zellpopulation dafür geeignet ist, in welcher Konzentration und zu welchem Zeitpunkt diese verabreicht werden müssen, um eine effektive klinische Wirkung entfalten zu können. Dabei muss auch die klinische Durchführbarkeit im Auge behalten werden. Es ist sicherlich interessant, dass eine Zell-Therapie, die eine Stunde nach Induktion des Infarkts durchgeführt

---

wurde, zu einer Verbesserung der kardialen Funktionalität führt (BOOMSMA et al., 2006), jedoch ist eine Umsetzung in die klinische Behandlung von Herzinfarktpatienten nicht möglich, da die Zeitspanne zwischen Stattfinden des Infarkts und Diagnose/Therapie Stunden bis Tage beträgt.

### *5.1.3 Hypothesen zur Wirkweise transplantiertes Knochenmarkszellen*

Während eine Reihe von Arbeitsgruppen positive Effekte der Zell-Therapie in erster Linie der Generierung neuen, funktionellen Myokards (TOMA et al., 2002; BELTRAMI et al., 2003; SHAKE et al., 2002; BITTIRA et al., 2003; NAGAYA et al., 2003) bzw. der aktiven Beteiligung an der Neovaskularisierung des geschädigten Herzmuskels zuschreiben (TAKAHASHI et al., 1999; KAMIHATA et al., 2001; TANG et al., 2004), stellen andere die Hypothese auf, dass die Zell-Therapie durch die Bereitstellung von Wachstumsfaktoren (TANG et al. 2005; UEMURA et al., 2006) die Situation nach Infarkt verbessert.

Die Wirkung der Knochenmarkszellen könnte, wie auch bereits schon andere Arbeitsgruppen vermuteten, auf einem immunmodulatorischen Eingreifen in das Infarktgeschehen oder auf einer generalisierten Immunsuppression basieren. Wir konnten feststellen, dass es nach Verabreichung von Knochenmarkszellen zu einer verminderten zellulären Infiltration des Infarktgebiets kam. Diese Beobachtung könnte bedeuten, dass es durch die Gabe von Knochenmarkszellen nach Myokardinfarkt zu einer Minderung des Entzündungsprozesses kommt, was in Folge zu einer verminderten Rekrutierung von Zellen aus dem Knochenmark zum Ischämie-Gebiet hin führen und letztendlich durch die Dämpfung der Entzündungsreaktion eine Minderung der Infarktgröße bewirken könnte.

MISAO et al. (2006) demonstrierten, dass es nach intravenöser Verabreichung von Knochenmarkszellen zu einer verminderten Freisetzung von TGF- $\beta$  und MMP-1 im infarzierten Herzen kommt, was sich in verminderten Infarktgrößen und verbesserter Funktionalität äußerte. Klinische Studien konnten zeigen, dass durch Infusion von MSCs eine Reduktion von Graft-versus-Host Reaktionen erreicht werden kann (RINGDEN et al., 2006; YANEZ et al., 2006). Und auch die Arbeit von BARTHOLOMEW et al. (2002) zeigte durch einmalige Infusion von MSCs an Primaten die verlängerte Überlebensrate von Hauttransplantaten. Die zuletzt genannten Beispiele lassen vermuten, dass es durch die Verabreichung der MSCs zu einer all-

---

gemeinen Unterdrückung des Immunsystems kam, was wiederum eine Verzögerung bzw. Minderung der Abstoßungsreaktionen nach sich zog. Eine generalisierte Immunsuppression könnte sich positiv auf Entzündungsgeschehnisse auswirken, da so überschießende inflammatorische Reaktionen unterdrückt würden und ein schnelleres Abheilen der Infarktnarbe gewährleistet würde. Daneben käme es beispielsweise durch Unterdrückung der TGF- $\beta$  Freisetzung zu einer verminderten Produktion extrazellulärer Matrix, was sich wiederum in einer Reduktion der Infarktgröße zeigen würde.

Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass das Immunsystem des Empfängers durch die Zell-Transplantation und die dabei stets co-infundierten apoptotischen Zellen überwältigt wird, so dass es infolge dessen zu einer Reduktion der lokalen inflammatorischen Reaktion am Herzen kommt (VOLL et al., 1997; THUM et al. 2005).

## 5.2 Modifiziertes Tiermodell

Die erfolgreiche Etablierung des modifizierten Tiermodells konnte demonstriert werden. Die generierten Tiere zeigten gegenüber Hauttransplantaten hPLAP-positiver Spender keinerlei Abstoßungsreaktionen und wiesen, nach routinemäßiger Bestrahlung des Spenderbluts, welches zur Induktion der Toleranz verwendet wurde, keinen Background an hPLAP-positiven Zellen auf.

Bisher wurden für Transplantations-Studien fast ausschließlich Tiermodelle verwendet, die zumindest eines der folgenden schwerwiegenden Defizite aufwiesen:

Entweder musste man die Empfängertiere einer immunsuppressiven Therapie unterziehen oder aber immundefiziente SCID-Mäuse oder athymische Nacktratten als Empfänger wählen. Hinzu kam, dass die Möglichkeiten für Langzeitstudien begrenzt waren, da mit einer Abschwächung des Marker-Signals oder einer Abstoßungsreaktion zu rechnen war.

Nun ist es möglich, Marker exprimierende Zellen beziehungsweise Organe in immunkompetente, Marker tolerante Empfängertiere zu transplantieren, ohne Abstoßungsreaktionen erwarten oder Immunsuppressiva einsetzen zu müssen. Da man auf die Knochenmarktransplantation als Mittel zur Toleranz-Erzeugung verzichten kann, verfügt man über Tiere, die keinen Background an Marker exprimierenden Zel-

---

len aufweisen und in denen transplantierte Zellen spezifisch verfolgt werden können. Hinzu kommt, dass transplantierte Zellen in einfacher Weise histochemisch nachgewiesen werden können, sowohl nach Paraffin- als auch nach Kunststoffeinbettung, was eine Nutzung für Untersuchungen an Weichgeweben als auch an Hartgeweben wie Knochen/Knorpel ermöglicht. Ferner ist dieses Modell geeignet, Langzeituntersuchungen zu Zelltransplantationen durchzuführen, da keine Abstoßungsreaktionen zu befürchten sind. Ein weiterer Vorzug liegt in der Tatsache, dass das etablierte Modell für komplexe Untersuchungen an pathologischen Vorgängen unter Berücksichtigung der Implikation aller entzündungsbedingten Prozesse genutzt werden kann, wie dies beispielsweise bei verschiedenen Ischämie/Reperfusionenmodellen für ein vollständiges Verstehen der Abläufe notwendig ist. Wollte man diese Modelle bis dato nutzen, müsste man zur Verfolgung transplanteder Zellen auf immundefiziente Tiere zurückgreifen, welche in völlig veränderter Weise auf ein Entzündungsgeschehen reagieren und somit nicht die tatsächlichen Abläufe in einem immunkompetenten Organismus widerspiegeln.

### 5.3 Ausblick

Das Myokardinfarkt-Modell hat sehr aufschlussreiche Ergebnisse geliefert, die zu einem weiteren Verständnis der Wirkung intravenös verabreichter Knochenmarkszellen auf das kardiale Remodeling führen können.

Zunächst konnte demonstriert werden, dass die infundierten Zellen nur in äußerst geringem Maße in das geschädigte Myokard gelangen. Somit liegt der in dieser Studie gezeigte Effekt auf das Ausmaß der Infarktgröße nicht in der Generierung neuen Myokards. Ebenso konnte keine Neovaskularisierung des Infarktgebiets durch die infundierten Zellen beobachtet werden. Es wird die Hypothese aufgestellt, dass es infolge der Übertragung von Knochenmarkszellen entweder zu einer generalisierten Immunsuppression des Organismus und infolgedessen zu einer abgeschwächten Entzündungsreaktion nach Myokardinfarkt kommt oder aber dass die transplantierten Zellen selbst immunmodulatorische Effekte ausüben.

Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Zusammenhänge zwischen der Verabreichung von Knochenmarkszellen und einer Verbesserung der kardialen Situation

---

nach Myokardinfarkt zu beleuchten und um tatsächlich bestätigen zu können, inwieweit die Zell-Therapie über immunmodulatorische Effekte in das kardiale Remodeling eingreift.

Kommt es zu einer Verifizierung der Hypothese, hätte dies Auswirkungen auf eine weitere zukünftige Applikation von Knochenmarkszellen in der Humanmedizin, speziell in der Therapie des akuten Herzinfarkts. Die Gewinnung von Knochenmarkszellen, sei es durch Biopsie oder Diaphorese, und deren Kultivierung ist leicht durchführbar. Auch die Injektion der Zellen 1 Woche nach Infarkt ist für die Klinik eine realistische und umsetzbare Zeitspanne.

Als Konsequenz der Therapie wäre eine Schadensbegrenzung post-ischämischer Abläufe zu sehen: Es käme zu einer Reduktion der Infarkt Narbe, damit zu vermehrtem Erhalt viablen Myokards, zu verbesserter Kontraktilität und Funktionalität des Herzmuskels und infolgedessen zu einer verbesserten Prognose bezüglich Mortalität sowie der Entwicklung einer kongestiven Herzinsuffizienz.

## 6. Zusammenfassung

Die therapeutische Effizienz der Stammzell-Therapie am Herzinfarkt-Patienten wird nach wie vor stark kontrovers diskutiert. Ziel dieser Studie war es, mit Hilfe des Tiermodells der letal bestrahlten und mit Marker-exprimierendem Knochenmark rekonstituierten Fischer 344 Ratte, die Rolle endogener Knochenmarkszellen in den Abläufen nach Myokardinfarkt aufzuzeigen. Als Marker wurde die humane Plazentäre Alkalische Phosphatase (hPLAP) gewählt, welche sich durch ihre Stabilität und das simple histochemische Nachweisverfahren auszeichnet. Die Ergebnisse des Myokardinfarkt-Modells zeigten, dass beinahe sämtliche Zellen des inflammatorischen Infiltrats im Infarktgebiet aus dem Knochenmark stammten, während die letztendlich resultierende Infarktnarbe in erster Linie durch endogene kardiale Zellen gebildet wurde. Wenige aus dem Knochenmark stammende Zellen siedelten sich langfristig im Infarktgebiet als Endothelzellen an. Zur Klärung der Frage, ob die Zell-Therapie einen positiven Effekt auf das Heilungsgeschehen und die Funktionalität des Herzmuskels nach Myokardinfarkt hat, wurden eine Woche nach Infarktinduktion  $1 \times 10^7$  hPLAP-positive Knochenmarkszellen intravenös injiziert. Als Folge war eine signifikante Reduktion der Infarktgrößen im Vergleich zu Tieren ohne Zell-Therapie zu beobachten. Des Weiteren konnte nach Zell-Gabe eine verminderte Infiltration des ischämischen Gebiets mit inflammatorischen Zellen gezeigt werden. Entgegen Beispielen aus der Literatur konnte keine Differenzierung zu Kardiomyozyten, weder aus endogenen noch aus exogen verabreichten Knochenmarkszellen, bestätigt werden. Die Hypothese liegt nahe, dass der positive Effekt der intravenösen Zell-Therapie in einer Immunmodulation der entzündlichen Prozesse nach Ischämie bzw. in einer generellen Immunsuppression begründet ist.

Nach Modifizierung des bestehenden Tiermodells, was eine Verfolgung Marker-exprimierender Zellen in Marker-toleranten, Background-freien und zugleich immun-kompetenten Tieren ermöglichte, konnte gezeigt werden, dass nach Infarktinduktion intravenös verabreichte Knochenmarkszellen nur zu einem geringen Prozentsatz in den infarzierten Herzmuskel gelangen, was die These bestärkt, dass positive Effekte der Zell-Therapie weniger der Schaffung neuen Myokards oder der aktiven Beteiligung der transplantierten Zellen an der Neovaskularisierung des Infarkts zuzuschreiben sind, sondern dass diese auf einer Modulation des Entzündungsgeschehens beruhen könnten.

---

## 7. Summary

### **The role of endogenous and intravenously administered bone marrow cells in left ventricular remodeling after myocardial infarction**

The therapeutic potential of systemically or locally injected bone marrow cells (BMC) or mesenchymal stem cells in myocardial infarction (MI) is a very controversial issue. Using human placental alkaline phosphatase (hPLAP) as a genetic marker for cell tracking, we examined the therapeutic efficacy and the homing of intravenously administered, hPLAP labeled cells in marker tolerant, immunocompetent rats after induction of MI. The marker enzyme hPLAP provides superb histological detection quality in paraffin and plastic sections. The influx of bone marrow-derived cells during tissue repair was monitored in wild-type inbred Fischer 344 rats reconstituted with bone marrow from transgenic F344 rats expressing hPLAP under the control of the ubiquitous R26 promoter. Four months post-MI, we found that the mesenchymal cells in the scar tissue were almost exclusively of local origin. Intravenous administration of  $1 \times 10^7$  BMC from hPLAP transgenic donors administered 1 week post-MI profoundly reduced the infiltration of the infarction site by bone marrow-derived cells, and also the infarction area. No differentiation of endogenous nor exogenous BMCs was observed. To examine the homing of intravenous hPLAP labeled BMC in MI we established a background-free syngeneic model for long-term histological cell tracking in the absence of immune-mediated rejection of labeled cells in immunocompetent animals. Skin grafts showed that neonatal exposure of wild-type F344 rats to hPLAP transgenic F344 cells results in lifelong tolerance to hPLAP expressing tissues and cells. Using this model of neonatally tolerized marker tolerant rats, we showed that only very few hPLAP labeled BMC injected intravenously one week post-MI homed to the infarction site. Therefore, we hypothesize that the beneficial effect of intravenous BMC on left ventricular remodeling after MI is caused by systemic immunomodulation.

---



## 8. Literaturverzeichnis

ADAM-KLAGES S, Adam D, Wiegmann K, Struve S, Kolanus W, Schneider-Mergener J, Kronke M (1996)

FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase

Cell **86**:937-947

ADAMS DH and SHAW S (1994)

Leukocyte-endothelial interactions and regulation of leukocyte migration

Lancet **343**:831-836

ADAMS V, Lenk K, Linke A, Lenz D, Erbs S, Sandri M, Tarnok A, Gielen S, Emmrich F, Schuler G, Hambrecht R (2004)

Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia

Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**:684-690

AGNOLETTI L, Curello S, Bachetti T, Malacame F, Gaia G, Comini L, Volterrani M, Bonetti P, Parrinello G, Cadei M, Grigolato PG, Ferrari R (1999)

Serum from patients with severe heart failure downregulates eNOS and is proapoptotic: role of tumor necrosis factor- $\alpha$

Circulation **100**:1983-1991

AHN D, Cheng L, Moon C, Spurgeon H, Lakatta EG, Talan MI (2004)

Induction of myocardial infarcts of a predictable size and location by branch pattern probability-assisted coronary ligation in C57Bl/6 mice

Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**:H1201-1207

AKAR AR, Durdu S, Corapcioglu T, Ozyurda U (2006)

Regenerative medicine for cardiovascular disorders-new milestones: adult stem cells

Artificial Organs **30**:213-232

ALISON M and SARRAF C (1998)

Hepatic stem cells

J Hepatol **29**:676-682

ALPERT JS, Thygesen K, Antmann E, Bassand JP (2000)

---

- Myocardial infarction redefined- a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Re-definition of Myocardial Infarction  
J of Am Coll Cardiol **36**:959-969
- ALVAREZ-DOLADO M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee Ho, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A (2003)  
Fusion of bone-marrow derived cells with purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes  
Nature **425**:968-973
- ASAHARA T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, Van Der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM (1997)  
Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis  
Science **275**:964-867
- ASAHARA T and KAWAMOTO A (2004)  
Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis  
Am J Physiol Cell Physiol **287**:C572-C579
- ASKARI AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, Rovner A, Ellis SG, Thomas JD, Dicorleto PE, Topol EJ, Penn MS (2003)  
Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy  
Lancet **362**:697-703
- ASSMUS B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grundwald F, Aicher A, Urbich C, Marin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM (2002)  
Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI)  
Circulation **106**:3009-3017
- BALSAM LB, Wagers AJ, Christensen JI, Kofidis T, Weissman I, Robbins RC (2004)  
Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium  
Nature **428**:668-673
- BARTHOLOMEW A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffmann R (2002)  
Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo
-

Exp Hematol **30**:42-48

BASSOLS A AND MASSAGUE J (1988)

Transforming growth factor beta regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans

J Biol Chem **263**:3039-3045

BAYES-GENIS A, Salido M, Ristol Fs, Puig M, Brossa V, Campreciós M, Corominas JM, Mariñoso MI, Baró T, Vela Mc, Serrano S, Padró JM, Bayes De Luna A, Cinca J (2002)

Host cell-derived cardiomyocytes in sex-mismatch cardiac allografts Cardio-vasc Res **56**:404-410

BELTRAMI AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P (2001)

Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction

N Engl J Med **344**:1750-1757

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

Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration

Cell **114**:763-776

BENHAM FJ, Fogh J, Harris H (1981)

Alkaline phosphatase expression in human cell lines derived from various malignancies

Int J Cancer **27**:637-644

BIANCO P and ROBEY PG (2001)

Stem cells in tissue engineering

Nature **414**:118-121

BIRDSALL HH, Green DM, Trial J, Youker KA, Burns AR, Mackay CR, Larosa GJ, Hawkins HK, Smith CW, Michael LH, Entman MI, Rossen RD (1997)

Complement C5a, TGF-beta 1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first hours after reperfusion

Circulation **3**:684-692

BITTIRA B, Shum-Tim D, Al-Khaldi A, Chiu RC-J (2003)

Mobilization and homing of bone marrow stromal cells in myocardial infarction

European Journal of Cardio-thoracic Surgery **24**:393-398

---

BITTNER RE, Schofer C, Weipoltshammer K, Ivanova S, Streubel B, Hauser E, Freilinger M, Hoger H, Elbe-Burger A, Wachtler F (1999)

Recruitment of bone-marrow derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice

Anat Embryol **199**:391-396

BJORNSON CR, Ritze RI, Reynolds BA, Magli MA, Vescovi AL (1999)

Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo

Science **283**:534-537

BLAU HM, Brazelton TR, Weimann JM (2001)

The evolving concept of a stem cell: entity or function?

Cell **105**:829-841

BOESIGER J, Tsai M, Maurer M, Yamaguchi M, Brown LF, Claffey KP, Dvorak HF, Galli SJ (1998)

Mast cells can secrete vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and exhibit enhanced release after immunoglobulin E-dependent up-regulation of Fc epsilon receptor 1 expression

J Exp Med **188**:1135-1145

BOOMSMA RA, Swaminathan PD, Geenen DL (2006)

Intravenously injected mesenchymal stem cells home to viable myocardium after coronary occlusion and preserve systolic function without altering infarct size

Int J Cardiol

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list\\_uids=17187879&query\\_hl=19&itool=pubmed\\_docsum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=17187879&query_hl=19&itool=pubmed_docsum)

(Datum des Zugriffs: 19.03.2007)

BOSSE R, Vestweber D (1994)

Only simultaneous blocking of the L- and P-selectin completely inhibits neutrophil migration into mouse peritoneum

Eur J Immunol **12**:3019-3024

BOSSI M, Hoylaerts MF, Millán JL (1993)

Modifications in a flexible surface loop modulate the isozyme-specific properties of mammalian alkaline phosphatases

J Biol Chem **268**:25409-25416

---

BOZKURT B, Kribbs S, Clubb FJ Jr, Michael LH, Didenko VV, Hornsby PJ, Seta Y, Oral H, Spinale FG, Mann DL (1998)

Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor- $\alpha$  promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats

Circulation **97**:1382-1391

BRAZELTON TR, Rossi FMV, Keshet GI, Blau HM (2000)

From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice

Science **290**:1775-1779

BRUDER SP, Jaiswal N, Haynesworth SE (1997)

Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation

J Cell Biochem **64**:278-294

BUTLER PE, Lee WP, Van De Water AP, Randolph MA (2000)

Neonatal induction of tolerance to skeletal tissue allografts without immunosuppression

Plast Reconstr Surg **105**:2424-2430

CAMARGO FD, Finegold M, Goodell MA (2004)

Hematopoietic myelo-monocytic cells are the major source of hepatocyte fusion partners

J Clin Invest **113**:1266-1270

CHANDRASEKAR B, Freeman GL (1997)

Induction of nuclear factor kappaB and activation protein 1 in postischemic myocardium

FEBS Lett **1**:30-34

CIULLA MM, Lazzari L, Pacchiana R, Esposito A, Bosari S, Ferrero S, Gianelli U, Paliotti R, Busca G, Giorgetti A, Magrini F, Rebullia P (2003)

Homing of peripherally injected bone marrow cells in the rat after experimental myocardial injury

Haematologica **88**:614-621

COBER ST, Randolph MA, Lee WP (1999)

Skin allograft survival following intrathymic injection of donor bone marrow

J Surg Res **85**:204-208

COHNHEIM J (1867)

---

- Ueber Entzündung und Eiterung  
Pathol Anat Physiol Klin Med **40**:1-79
- CONDORELLI G, Borello U, De Angelis L, Latronico M, Sirabella D, Coletta M, Galli R, Balconi G, Follenzi A, Frati G, De Angelis MGC, Gioglio L, Amuchastegui S, Adorini L, Naldini L, Vescovi A, Dajana E, Cossu G (2001)  
Cardiomyocytes induce endothelial cells to transdifferentiate into cardiac muscle: Implications for myocardium regeneration  
Proc Natl Acad Sci **98**:10733-10738
- CONWAY EM, Collen D, Carmeliet P (2001)  
Molecular mechanisms of blood vessel growth  
Cardiovasc Res **49**:507-521
- D'IPPOLITO G, Diabira S, Howard GA, Menei P, Roos BA, Schiller PC (2004)  
Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential  
J of Cell Sci **117**:2971-2981
- DAVANI S, Deschaseaux F, Chalmers D, Tiberghien P, Kantelip J-P (2005)  
Can stem cells mend a broken heart?  
Cardiovasc Res **65**:305-316
- DAWN B, Guo Y, Rezazadeh A, Huang Y, Stein AB, Hunt G, Tiwari S, Varma J, Gu Y, Prabhu SD, Kajstura J, Anversa P, Ildstad ST, Bolli R (2006)  
Postinfarct cytokine therapy regenerates cardiac tissue and improves left ventricular function  
Circ Res **98**:1098-1105
- DEAN RG, Balding LC, Candido R, Burns WC, Cao Z, Twigg SM, Burell LM (2005)  
Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis after myocardial infarction  
J Histochem Cytochem **53**:1245-1256
- DEB A, Wang S, Skelding KA, Miller D, SIMPeR D, Caplice NM (2003)  
Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart  
Circulation **107**:1247-1249
- DESMOULIERE A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G (1993)  
Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts
-

- J Cell Biol **122**:103-111
- DETEN A, Holzl A, Leicht M, Barth W, Zimmer HG (2001)  
Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats  
J Mol Cell Cardiol **33**:1191-1207
- DETEN A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG (2002)  
Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction: Experimental studies in rats  
Cardiovasc Res **55**:329-340
- DEXTER TM, Allen TD, Lajtha LG (1977)  
Conditions controlling the proliferation of hemopoietic stem cells in vitro  
J Cell Physiol **91**:335-344
- DHALLA NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N (2000)  
Status of myocardial antioxidant in ischemia-reperfusion injury  
Cardiovasc Res **3**:446-456
- DI NICOLA M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM (2002)  
Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or non-specific mitogenic stimuli  
Blood **99**:3838-3843
- DIGIROLAMO CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ (1999)  
Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate  
Br J Haematol **107**:275-281
- DREYFUS PA, Chretien F, Chazaud B, Kirova Y, Caramelle P, Garcia L, Butler-Browne G, Gherardi RK (2004)  
Adult bone marrow-derived stem cells in muscle connective tissue and satellite cell niches  
Am J of Pathol **164**:773-779
- EBNET K and VESTWEBER D (1999)  
Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines  
Histochem Cell Biol **1**:1-23
-

ENTMANN ML and SMITH CW (1994)

Postreperfusion inflammation: a model for reaction to injury in cardiovascular disease

Cardiovasc Res **9**:1301-1311y

ERDO F, Buhrie C, Blunk J, Hoehn M, Xia Y, Fleischmann B, Focking M, Kuster-mann E, Kolossov E, Hescheler J, Hossmann KA, Trapp T (2003)

Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke

J Cereb Blood Flow Metab **23**:780-785

FERNANDEZ-AVILES F, San Roman JA, Garcia-Frade J, Fernandez ME, Penar-rubia MJ, De La Fuente L, Gomez-Buono M, Cantalapiedra A, Fernandez J, Gutierrez OK, Sanchez PL, Hernandez C, Sanz R, Garcia-Sancho J, Sanchez A (2004)

Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction

Circ Res **95**:742-748

FERRARI G, Cusella-Deangelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F (1998)

Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors

Science **227**:1528-1530

FISCHBEIN MC, Maclean D, Maroko PR (1978)

Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution

Am J of Pathol **90**:57-70

FRANGOIANNIS NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, PhD; Bressler RB, Mendoza LH, Spengler RN, Smith CW, Entman ML (1998)

Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion

Circulation **7**:699-710

FRANGOIANNIS NG, Mendoza LH, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael CH, Smith CW, Entman ML (2000)

IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury



- J Immunol **5**:2798-2808
- FRANGOIANNIS NG, Smith CW, Entman ML (2002)  
The inflammatory response in myocardial infarction  
Cardiovasc Res **53**:31-47
- FRANGOIANNIS NG (2006)  
The mechanistic basis of infarct healing  
Antioxid Redox Signal **8**:1907-1939
- FRANKE TF, Kaplan DR, Cantley LC (1997)  
PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis  
Cell **88**:434-437
- FRIEDENSTEIN AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN (1976)  
Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs  
Exp Hematol **4**:267-274
- FRIEDENSTEIN AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV (1987)  
Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers  
Cell Tissue Kinet **20**:263-272
- FUCHS S, Satler LF, Kornowski R, Okubagzi P, Weisz G, Baffour R, Waksman R, Weissman NJ, Cerqueira M, Leon MB, Epstein SE (2003)  
Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study  
J Am Coll Cardiol **41**:1721-1724
- FUJIO Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN, Walsh K (2000)  
Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart  
Circulation **101**:660-667
- FUKUDA S, Kaga S, Sasaki H, Zhan L, Zhu L, Otani H, Kalfin R, Das DK, Maulik N (2004)  
Angiogenic signal triggered by ischemic stress induces myocardial repair in rat during chronic infarction  
J Mol Cell Cardiol **36**:547-559
- GAGE FH, Ray J, Fisher LJ (1995)  
Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS  
Annu Rev Neurosci **18**:159-192
-

- GAGE FH (2000)  
Mammalian neural stem cells  
*Science* **287**:1433-1438
- GAO J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI (2001)  
The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion  
*Cells Tissues Organs* **169**:12-20
- GEHLING UM, Ergün S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W (2000)  
In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells  
*Blood* **95**:3106-3112
- GLASER R, Lu MM, Narula N, Epstein JA (2002)  
Smooth muscle cells, but not myocytes, of host origin in transplanted human hearts  
*Circulation* **106**:17-19
- GOLDMAN S, Raya TE (1995)  
Rat infarct model of myocardial infarction and heart failure  
*J of Cardiac Failure* **1**:169-178
- GOODELL MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M, Paradis G, Grupp SA, Sieff CA, Mulligan RC, Johnson RP (1997)  
Dye efflux studies suggest the existence of CD34-negative/low hematopoietic stem cells in multiple species  
*Nat Med* **3**:1337-1345
- GORDON MY, Clarke D, Atkinson J, Greaves MF (1990)  
Hemopoietic progenitor cell binding to the stromal microenvironment in vitro  
*Exp Hematol* **18**:837-842
- GRUBER BL, Kew RR, Jelaska A, Marchese MJ, Garlick J, Ren S, Schwartz LB, Korn JH (1997)  
Human mast cells activate fibroblasts: tryptase is a fibrogenic factor stimulating collagen messenger ribonucleic acid synthesis and fibroblast chemotaxis  
*J Immunol* **158**:2310-2317
- GURANTZ D, Cowling RT, Varki N, Frikovsky E, Moore CD, Greenberg BH (2005)
-

- IL-1beta and TNF-alpha upregulate angiotensin II type 1 (AT1) receptors on cardiac fibroblasts and are associated with increased AT1 density in the post-MI heart  
J Mol Cell Cardiol **38**:505-515
- GUSSONI E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC (1999)  
Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation  
Nature **401**:390-394
- HARRISON DE, Stone M, Astle CM (1990)  
Effects of transplantation on the primitive immunohematopoietic stem cell  
J Exp Med **172**:431-437
- HASLETT C (1999)  
Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation  
Am J Respir Crit Care Med **160**:S5-S11
- HAWKE TJ, Garry DJ (2001)  
Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology  
J Appl Physiol **91**:534-551
- HAYASHI M, Li TS, Ito H, Mikamo A, Hamano K (2004)  
Comparison of intramyocardial and intravenous routes of delivering bone marrow cells for the treatment of ischemic heart disease: an experimental study  
Cell Transplant **13**:639-647
- HAYNESWORTH SE, Baber MA, Caplan AI (1996)  
Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha  
J Cell Physiol **166**:585-592
- HEIM DA, Hanazono Y, Giri N, Wu T, Childs R, Sellers SE, Muul L, Agricola BA, Metzger ME, Donahue RE (2000)  
Introduction of a xenogeneic gene via hematopoietic stem cells leads to specific tolerance in a rhesus monkey model  
Mol Ther **1**:533-544
- HIRAYAMA A, Adachi T, Asada S, Mishima M, Nanto S, Kusuoka H, Yamamoto K, Matsumura Y, Hori M, Inoue M (1993)
-

- Late reperfusion for acute myocardial infarction limits the dilatation of left ventricle without the reduction of infarct size  
Circulation **88**:2565-2574
- HOCHEDLINGER K, Jaenisch R (2003)  
Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy  
N Engl J Med **349**:275-286
- HOFMANN M, Wollert KC, Meyer GP, Menke A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Knapp WH, Drexler H (2005)  
Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium  
Circulation **111**:2198-2202
- HRISTOV M, Erl W, Weber PC (2003)  
Endothelial Progenitor Cells: Mobilization, Differentiation, and Homing  
Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**:1185-1189
- HUSS R (2000)  
Isolation of primary and immortalized CD34- hematopoietic and mesenchymal stem cells from various sources  
Stem Cells **20**:249-258
- IKEUCHI M, Tsutsui H, Shiomi T, Matsusaka H, Matsushima S, Wen J, Kubota T, Takeshita A (2004)  
Inhibition of TGF-beta signalling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction  
Cardiovasc Res **64**:526-535
- IRWIN M, Mak S, Mann D, Qu R, Dawood F, Wen WH, Penninger J, Liu P (1999)  
Tissue expression and immunolocalization of tumour necrosis factor-alpha in post infarction-dysfunctional myocardium  
Circulation **99**:1492-1498
- ISNER JM, Kalka C, Kawamoto A, Asahara T (2001)  
Bone marrow as a source of endothelial cells for natural and iatrogenic vascular repair  
Ann N Y Acad Sci **953**:75-84
- ITESCU S, Kocher AA, Schuster MD (2003)  
Myocardial neovascularization by adult bone marrow-derived angioblasts: strategies for improvement of cardiomyocyte function
-

- Heart Failure Reviews **8**:253-258
- JACKSON KA, Mi T, Goodell MA (1999)  
Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle  
Proc Natl Acad Sci USA **96**:14482-14486
- JACKSON KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA (2001)  
Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells  
J Clin Invest **107**:1395-1402
- JAESCHKE H, Smith CW (1997)  
Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury  
J Leukoc Biol **61**:647-653
- JANSSENS S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, Van de Werf F (2006)  
Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial  
Lancet **367**:113-121
- JAQUET K, Krause KT, Denschel J, Faessler P, Nauertz M, Geidel S, Boczor S, Lange C, Stute N, Zander A, Kuck KH (2005)  
Reduction of myocardial scar size after implantation of mesenchymal stem cells in rat: What is the mechanism?  
Stem Cells Dev **14**:299-309
- JARVIS WD, Kolesnick RN, Fornari FA, Traylor RS, Gewirtz DA, Grant S (1994)  
Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway  
Proc Natl Acad Sci USA **91**:73-77
- JIANG Y, Balkrishna N, Jahagirdar R, Reinhardt RL, Schwartz RE, Deene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002)  
Pluripotency of mesenchymal stem cell derived from adult marrow  
Nature **418**:41-49
-

- JIANG Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM (2002)  
Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle and brain  
Exp Hematol **30**:896-904
- JOLLY SR, Kane WJ, Hook BG (1986)  
Reduction of myocardial infarct size by neutrophil depletion: effect of duration of occlusion  
Am J Heart **4**:682-690
- JUGDUTT BI (1997)  
Effect of reperfusion on ventricular mass, topography, and function during healing of anterior infarction  
Am J Physiol **3**:H1205-H1211
- KAJSTURA J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P (1998)  
Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans  
Proc Natl Acad Sci USA **95**:8801-8805
- KAJSTURA J, Rota M, Whang B, Cascapera S, Hosoda T, Bearzi C, Nurzynska D, Kasahara H, Zias E, Bonafé M, Nadal-Ginard B, Torella D, Nascimbene A, Quaini F, Urbanek K, Leri A, Anversa P (2005)  
Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion  
Circ Res **96**:127-137
- KAMIHATA H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, Masaki H, Mori Y, Iba O, Tateishi E, Kosaki A, Shintani S, Murohara T, Imaizumi T, Iwasaka T (2001)  
Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines  
Circulation **104**:1046-1052
- KAMIHATA H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Amano K, Iba O, Imada T, Iwasaka T (2002)  
Improvement of collateral perfusion and regional function by implantation of peripheral blood mononuclear cells into ischemic hibernating myocardium  
Thromb Vasc Biol **22**:1804-1810
- KARIN M and Lin A (2002)
-

- NF-kappaB at the crossroads of life and death  
Nat Immunol **3**:221-227
- KAWADA H, Ogawa M (2001)  
Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle  
Blood **98**:2008-2013
- KAWAMOTO A, Gwon H-C, Iwaguro H, Yamaguchi J-I, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T (2001)  
Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia  
Circulation **103**:634-637
- KAWAMOTO A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, Nishimura H, Yoon YS, Milliken C, Uchida S, Masuo O, Iwaguro H, Ma H, Hanley A, Silver M, Kearney M, Losordo DW, Isner JM, Asahara T (2003)  
Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia  
Circulation **107**:461-468
- KISSEBERTH WC, Brettingen NT, Lohse JK, Sandgren EP (1999)  
Ubiquitous expression of marker transgenes in mice and rats  
Dev Biol **214**:128-138
- KLONER RA, Fishbein MC, Lew H, Maroko PR, Braunwald E (1978)  
Mummification of the infarcted myocardium by high dose corticosteroids  
Circulation **1**:56-63
- KOBAYASHI T, Hamano K, Li T-S, Katoh T, Kobayashi S, Matsuzaki M, Esato K (2000)  
Enhancement of angiogenesis by the implantation of self bone marrow cells in a rat ischemic heart model  
J of Surg Res **89**:189-195
- KOCHER AA, Schuster MD, Szaboles MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S (2001)  
Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function  
Nat Med **7**:430-436
-

KOTTON DN, Ma BY, Cardoso WV, Sanderson EA, Summer RS, Williams MC, Fine A (2001)

Bone marrow-derived cells as progenitors of alveolar epithelium  
Development **128**:5181-5188

KRAUSE DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ (2001)

Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell  
Cell **105**:369-377

KRIJNEN PA, Nijmeijer R, Meijer CJ, Visser CA, Hack CE, Niessen HW (2002)

Apoptosis in myocardial ischemia and infarction  
J Clin Pathol **55**:801-811

KUBOTA H and Reid LM (2000)

Clonogenic hepatoblasts, common precursors for hepatocytic and biliary lineages, are lacking classical major histocompatibility complex class I antigen  
Proc Natl Acad Sci USA **97**:12132-12137

KUCIA M, Ratajczak J, Reca R, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ (2004a)

Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury  
Blood Cells Mol Dis **32**:52-57

KUCIA M, Dawn B, Hunt G, Guo Y, Wysoczynski M, Majka M, Ratajczak J, Rezzoug F, Ildstad ST, Bolli R, Ratajczak MZ (2004b)

Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood after myocardial infarction  
Circ Res **95**:1191-1199

KUCIA M, Ratajczak J, Ratajczak MZ (2005a)

Bone marrow as a source of circulating CXCR4+ tissue committed stem cells  
Biol Cell **97**:133-146

KUCIA M, Reca R, Jala VR, Dawn B, Ratajczak J, Ratajczak MZ (2005b)

Bone marrow as a home of heterogenous populations of nonhematopoietic stem cells  
Leukemia **19**:1118-1127

---



KUCIA M, Reza R, Campbell FR, Zuba-Surma E, Majka M, Ratajczak J, Ratajczak MZ (2006)

A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4<sup>+</sup> SSEA-1<sup>+</sup> Oct-4<sup>+</sup> stem cells identified in adult bone marrow

Leukemia **20**:857-869

KUDO M, Wang Y, Wani MA, Xu M, Ayub A, Ashraf M (2003)

Implantation of bone marrow stem cells reduces the infarction and fibrosis in ischemic mouse heart

J Mol Cell Cardiol **35**:1113-1119

KURAMOCHI Y, Fukazawa R, Migita M, Hayakawa J, Hayashida M, Uchikoba Y, Fukumi D, Shimada T, Ogawa S (2003)

Cardiomyocyte regeneration from circulating bone marrow cells in mice

Pediatr Res **54**:319-325

KURRELMEYER KM, Michael LH, Baumgarten G et al. (2000)

Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction

Proc Natl Acad Sci USA **10**:5456-5461

LAFLAMME MA, Myerson D, Saffitz JE, Murry CE (2002)

Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts

Circ Res **90**:634-640

LAGASSE E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M (2000)

Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo

Nat Med **6**:1229-1234

LAGASSE E, Shizuru JA, Uchida N, Tsukamoto A, Weissman IL (2001)

Toward regenerative medicine

Immunity **14**:425-436

LAVKER RM and Sun TT (2000)

Epidermal stem cells: properties, markers, and location

Proc Natl Acad Sci USA **97**:13473-13475

LAWRENCE T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA (2001)

Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation

Nat Med **7**:1291-1297

---

- LE BLANC K, Tammik L, Zetterberg E, Rosendahl K, Ringdén O (2003)  
HLA-expression and immunologic properties of undifferentiated and differentiated mesenchymal stem cells  
*Exp Hematol* **31**:890-896
- LE DU MH and Millán JL (2002)  
Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases  
*J Biol Chem* **277**:49808-49814
- LEE MS and Makkar RR (2004)  
Stem-cell transplantation in myocardial infarction: a status report  
*Ann Intern Med* **140**:729-737
- LEE SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thislethwaite PA (2000)  
Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction  
*N Engl J Med* **342**:626-633
- LEFER DJ, Granger DN (2000)  
Oxidative stress and cardiac disease  
*Am J Med* **4**:315-323
- LEHRKE S, Mazhari R, Durand DJ, Zheng M, Bedja D, Zimmet JM, Schuleri KH, Chi AS, Gabrielson KL, Hare JM (2006)  
Aging impairs the beneficial effect of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor on post-myocardial infarction remodelling  
*Circ Res* **99**:553-560
- LEPORE AC, Walczak P, Rao MS, Fischer I, Bulte JWM (2006a)  
MR imaging of lineage-restricted neural precursors following transplantation into the adult spinal cord  
*Exp Neurol* **201**:49-59
- LEPORE AC, Neuhuber B, Connors TM, Han SSW, Liu Y, Daniels MP, Rao MS, Fischer I (2006b)  
Long-term fate of neural precursor cells for following transplantation into developing and adult CNS  
*Neuroscience* **142**:287-304
- LI R-K, Mickle DAG, Weisel RD, Rao V, Jia Z-Q (2001)  
Optimal time for cardiomyocyte transplantation to maximize myocardial function after left ventricular injury
-

Ann Thorac Surg **72**:1957-1963

LIBBY P, Maroko PR, Bloor CM, Sobel BE, Braunwald E (1973)

Reduction of experimental myocardial infarct size by corticosteroid administration

J Clin Invest **3**:599-607

LIMBOURG FP, Ringes-Lichtenberg S, Schaefer A, Jacoby C, Mehraein Y, Jager MD, Limbourg A, Fuchs M, Klein G, Ballmaier M, Schlitt HJ, Schrader J, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H (2005)

Haematopoietic stem cells improve cardiac function after infarction without permanent cardiac engraftment

Eur J Heart Fail **7**:722-729

LITT MR, Jeremy RW, Weismann HF, Winkelstein JA, Becker LC (1989)

Neutrophil depletion limited to reperfusion reduces myocardial infarct size after 90 minutes of ischemia. Evidence for neutrophil-mediated reperfusion injury

Circulation **6**:1816-1827

LITWIN SE, Katz SE, Morgan JP, Douglas PS (1994)

Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat

Circulation **89**:345-354

LUNDE K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebakk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Grøgaard HK, Bjørnerheim R, Brekke M, Müller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang K (2006)

Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction

N Engl J Med **355**:1199-1209

MACEWAN DJ (2002)

TNF ligands and receptors-a matter of life and death

Br J Pharmacol **135**:855-875

MACLELLAN WR, Schneider MD (2000)

Genetic dissection of cardiac growth control pathways

Annu Rev Physiol **62**:289-319

MAJKA SM, Jackson KA, Kienstra KA, Majesky MW, Goodell MA, Hirschi KK (2003)

---

- Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration  
J Clin Invest **111**:71-79
- MAJUMDAR MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL (1998)  
Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC) and stromal cells  
J Cell Physiol **176**:186-192
- MAKINO S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S (1999)  
Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro  
J Clin Invest **103**:697-705
- MATSUI T, Tao J, Monte F, Lee KH, Li L, Picard M, Force TL, Franke TF, Hajjar RJ, Rosenzweig A (2001)  
Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo  
Circulation **104**:330-335
- MAXIMOV A (1906)  
Ueber experimentelle Erzeugung von Knochenmarkgewebe  
Anat Anz **28**:609-612
- MCKINNEY-FREEMAN SL, Jackson KA, Camargo FD, Ferrari G, Mavilio F, Goodell MA (2002)  
Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin  
Proc Natl Acad Sci USA **99**:1341-1346
- MEININGER CJ, Yano H, Rottapel R, Bernstein A, Zsebo KM, Zetter BR (1992)  
The c-kit receptor ligand functions as a mast cell chemoattractant  
Blood **79**:958-963
- METS T, Verdonk G (1981)  
In vitro aging of human bone marrow derived stromal cells  
Mech Ageing Dev **16**:81-89
- MEYER GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, Hecker H, Schaefer A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H (2006)  
Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (Bone marrow transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial
-

- Circulation **113**:1287-1294
- MEZEY E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR (2000)  
Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow  
Science **290**:1779-1782
- MIAO Z, Jin J, Chen L, Zhu J, Huang W, Zhao J, Qian H, Zhang X (2006)  
Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells  
Cell Biology International **30**:681-687
- MICHAEL LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, Hawkins HK, Berens K, Ballantyne CM (1995)  
Myocardial ischemia and reperfusion a murine model  
J Physiol **269**:H2147-H2154
- MICHALOPOULOS GK, DeFrances MC (1997)  
Liver regeneration  
Science **276**:60-66
- MIRAGOLI M, Gaudesius G, Rohr S (2006)  
Electrotonic modulation of cardiac impulse conduction by myofibroblasts  
Circ Res **98**:801-810
- MISAO Y, Takemura G, Arai M, Sato S, Suzuki K, Miyata S, Kosai K, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H (2006)  
Bone marrow-derived myocyte-like cells and regulation of repair related cytokines after bone marrow cell transplantation  
Cardiovasc Res **69**:476-490
- MISRA A, Haudek SB, Knuefermann P, Vallejo JG, Chen ZJ, Michael LH, Sivasubramanian N, Olson EN, Entman ML, Mann DL (2003)  
Nuclear factor-kappaB protects the adult cardiac myocyte against ischemia-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction  
Circulation **108**:3075-3078
- MORISHITA R, Sugimoto T, Aoki M, Kida I, Tomita N, Moriguchi A, Maeda K, Sawa Y, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T (1997)  
In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction  
Nat Med **3**:894-899
-

MOSHER JT, Yeager KJ, Kruger GM, Joseph NM, Hutchin ME, Dlugosz AA, Morrison SJ (2006)

Intrinsic differences among spatially distinct neural crest stem cells in terms of migratory properties, fate determination, and ability to colonize the enteric nervous system

Dev Biol **303**:1-15

MOUQUET F, Pfister O, Jain M, Oikonomopoulos A, Ngoy S, Summer R, Fine A, Liao R (2005)

Restoration of cardiac progenitor cells after myocardial infarction by self-proliferation and selective homing of bone marrow-derived stem cells

Circ Res **97**:1090-1092

MUJTABA T, Han SSW, Fischer I, Sandgren EP, Rao MS (2002)

Stable expression of the alkaline phosphatase marker gene by neural cells in culture and after transplantation into the CNS using cells derived from a transgenic rat

Exp Neurol **174**:48-57

MULLER P, Pfeiffer P, Koglin J, Schafers HJ, Seeland U, Janzen I, Urbschat S, Bohm M (2002)

Cardiomyocytes of noncardiac origin in myocardial biopsies of human transplanted hearts

Circulation **106**:31-35

MURRY CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KBS, Virag JI; Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ (2004)

Hematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts

Nature **428**:664-673

NAGAYA N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, Yamagishi M, Mori H, Kangawa K, Kitamura S (2004)

Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis

Am J Physiol Heart Circ Physiol **287**:H2670-H2676

NAVIAUX RK and Verma IM (1992)

---

- Retroviral vectors for persistent expression in vivo  
Curr Opin Biotechnol **3**:540-547
- NIAN M, Lee P, Khaper N, Liu P (2004)  
Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodelling  
Circ Res **94**:1543-1553
- NOISEUX N, Gneecchi M, Lopez-Illasaca M, Zhang L, Solomon SD, Deb A, Dzau VJ, Pratt RE (2006)  
Mesenchymal stem cells overexpressing akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation  
Molecular Therapy **14**:840-850
- NYGREN JM, Joving S, Breitbach M, Sawen P, Roll W, Hescheler J, Taneera J, Fleischmann BK, Jacobsen SE (2004)  
Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation  
Nat Med **10**:494-501
- ODÖRFER K, Unger NJ, Weber K, Sandgren EP, Erben RG (2007)  
Marker tolerant, immunocompetent animals as a new tool for regenerative medicine and long-term cell tracking  
(submitted)
- OH H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD (2003)  
Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing differentiation, and fusion after infarction  
Proc Natl Acad Sci USA **100**:12313-12318
- ORLIC D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001a)  
Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium  
Nature **410**:701-705
- ORLIC D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001b)  
Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival  
Proc Natl Acad Sci USA **98**:10344-10349
-

PALLANTE BA, Duignan I, Okin D, Chin A, Bressan MC, Mikawa T, Edelberg JM (2007)

Bone marrow Oct3/4<sup>+</sup> cells differentiate into cardiac myocytes via age-dependent paracrine mechanisms

Circ Res **100**:e1-e11

PEICHEV M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S (2000)

Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34<sup>+</sup> cells identifies a population of functional endothelial precursors

Blood **95**:952-958

PENG J, Gurantz D, Tran V, Cowling RT, Greenberg BH (2002)

Tumor necrosis factor-alpha-induced AT1 receptor upregulation enhances angiotensin II-mediated cardiac fibroblast responses that favor fibrosis

Circ Res **91**:1119-1126

PENNINGTON DW, Lopez AR, Thomas PS, Peck C, Gold WM (1992)

Dog mastocytoma cells produce transforming growth factor beta 1

J Clin Invest **90**:35-41

PETERSON BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff IP (1999)

Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells

Science **284**:1168-1170

PETIT F, Minns AB, Nazzari JA, Hettiaratchy SP, Lantieri LA, Randolph MA, Lee WP (2004)

Prolongation of skin allograft survival after neonatal injection of donor bone marrow and epidermal cells

Plas Reconstr Surg **113**:270-276

PFEFFER JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E (1991)

Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction

Am J Physiol **260**:H1406-1414

PITTINGER MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999)

Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells

Science **284**:143-147

PITTINGER MF and MARTIN BJ (2004)

---



- Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics  
Circ Res **95**:9-20
- POSS KD, Wilson LG, Keating MT (2002)  
Heart regeneration in zebrafish  
Science **298**:2188-2190
- QU Z, Liebler JM, Powers MR, Galey T, Ahmadi P, Huang XN, Ansel JC, Butterfield JH, Planck SR, Rosenbaum JT (1995)  
Mast cells are a major source of basic fibroblast growth factor in chronic inflammation and cutaneous hemangioma  
Am J Pathol **147**:564-573
- QUAINI F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P (2002)  
Chimerism of the transplanted heart  
New Engl J Med **346**:5-15
- QUIRICI N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Deliliers GL (2001)  
Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133+ cells  
Br J Haematol **115**:186-194
- REYES M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM (2001)  
Purification and ex vivo expansion of post-natal human marrow mesodermal progenitor cells  
Blood **98**:2615-2625
- REYNOLDS BA and Weiss S (1992)  
Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system  
Science **255**:1707-1710
- RIBATTI D, Vacca A, Nico B, Ria R, Dammacco F (2002)  
Cross-talk between hematopoiesis and angiogenesis signaling pathways  
Curr Mol Med **2**:537-543
- RINGDEN O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnie H, Marschall HU, Dlugosz A, Szakos A, Hassan Z, Omazic B, Aschan J, Barkholt L, Le Blanc K (2006)  
Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease
-

- Transplantation **81**:1390-1397
- ROBERTS R, DeMello V, Sobel BE (1976)  
Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction  
Circulation **53**:1204-206
- ROMEIS B, hrsg. Von Böck P (1989)  
Romeis-Mikroskopische Technik, Urban & Schwarzenberg Verlag, ISBN 3-541-11227-1, S. 498
- ROSENBLATT-VELIN N, Lepore MG, Cartoni C, Beermann F, Pedrazzini T (2005)  
FGF-2 controls the differentiation of resident cardiac precursors into functional cardiomyocytes  
J Clin Invest **115**:1724-1733
- ROSENZWEIG M, Connole M, Glickman R, Yue SP, Noren B, DeMaria M, Johnson RP (2001)  
Induction of cytotoxic T lymphocyte and antibody responses to enhanced green fluorescent protein following transplantation of transduced CD34(+) hematopoietic cells  
Blood **97**:1951-1959
- ROY S, Khanna S, Wallace WA, Lappalainen J, Rink C, Cardounel AJ, Zweier JL, Sen CK (2003)  
Characterization of perceived hyperoxia in isolated primary cardiac fibroblasts and in the reoxygenated heart  
J Biol Chem **278**:47129-47135
- RUBIO D, Garcia-Castro J, Martín MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A (2005)  
Spontaneous human adult stem cell transformation  
Cancer Res **65**:3035-3039
- RUOSS SJ, Hartmann T, Caughey GH (1991)  
Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts  
J Clin Invest **88**:493-499
- SANDHU R, Teichert-Kuliszewska K, Nag S, Proteau G, Robb MJ, Campbell AI, Kuliszewski MA, Kutryk MJ, Stewart DJ (2004)  
Reciprocal regulation of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 following myocardial infarction in the rat  
Cardiovasc Res **64**:115-124
-

SATO Y, Matsui K, Ajiki T, Igarashi Y, Takahashi M, Murakami T, Hakamata Y, Tabata Y, Kobayashi E (2005)

Can a bone marrow cell contribute to organ regeneration? In vivo analysis using transgenic rats with reporter genes

Transplant Proc **37**:273-275

SCHÄCHINGER V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann W-K, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM (2004)

Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction

J Am Coll Cardiol **44**:1690-1699

SCHARENBERG CW, Harkey MA, Torok-Storb B (2002)

The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors

Blood **99**:507-512

SCHLAYER HJ, Laaff H, Peters T, Woort-Menker M, Estler HC, Karck U, Schaefer HE, Decker K (1988)

Involvement of tumor necrosis factor in endotoxin-triggered neutrophil adherence to sinusoidal endothelial cells of mouse liver and its modulation in acute phase

J Hepatol **7**:239-249

SCHULTZ E, McCormick KM (1994)

Skeletal muscle satellite cells

Rev Physiol Biochem Pharmacol **123**:213-257

SCHUSTER MD, Kocher AA, Seki T, Martens TP, Xiang G, Homma S, Itescu S (2004)

Myocardial neovascularization by bone marrow angioblasts results in cardiomyocyte regeneration

Am J Physiol Heart Circ Physiol **287**:H525-H532

SELL S (2001)

Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells

Hepatology **33**:738-750

SERINI G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Geinoz A, Borsi L, Zardi L, Gabbiani G (1998)

---

- The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta 1  
J Cell Biol **142**:873-881
- SHAKE JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ (2002)  
Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects  
Ann Thorac Surg **73**:1919-1925
- SHI Q, Raffi S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A et al. (1998)  
Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells  
Blood **92**:362-367
- SHIMIZU N, Yoshiyama M, Takeuchi K, Hanatani A, Kim S, Omura T, Iwao H, Yoshikawa J (1998)  
Doppler echocardiographic assessment and cardiac gene expression analysis of the left ventricle in myocardial infarcted rats  
Jpn Circ J **62**:436-442
- SHINTANI S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T (2001)  
Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction  
Circulation **103**:2776-2779
- SHIOMI T, Tsutsui H, Hayashidani S, Suematsu N, Ikeuchi M, Wen J, Ishibashi M, Kubota T, Agashira K, Takeshita A (2002)  
Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction  
Circulation **106**:3126-3132
- SHIOTA N, Rysa J, Kovanen PT, Ruskoaho H, Kokkonen JO, Lindstedt KA (2003)  
A role for cardiac mast cells in the pathogenesis of hypertensive heart disease  
J Hypertens **21**:1935-1944
- SIEPE M, Heilmann C, von Samson P, Menasché P, Beyersdorf F (2005)  
Stem cell research and cell transplantation for myocardial regeneration  
Eur J Cardiothorac Surg **28**:318-324
- SIMPSON PJ, Lucchesi BR (1987)
-

- Free radicals and myocardial ischemia and reperfusion injury  
J Lab Clin Med **110**:13-30
- SIWIK DA, Chang DL, Colucci WS (2000)  
Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro  
Circ Res **86**:1259-1265
- SOONPAA MH, Field LJ (1998)  
Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis  
Circ Res **83**:15-26
- SPEES JL, Olson SD, Ylostalo J, Lynch PJ, Smith PJ, Perry A, Peister A, Wang MY, Prockop DJ (2003)  
Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma  
Proc Natl Acad Sci USA **100**:2397-2402
- SQUIRES CE, Escobar GP, Payne JF, Leonardi RA, Goshorn DK, Sheats NJ, Mains IM, Mingoia JT, Flack EC, Lindsey ML (2005)  
Altered fibroblast function following myocardial infarction  
J Mol Cell Cardiol **39**:699-707
- STAMM C, Westphal B, Kleine H-D, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schümichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G (2003)  
Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration  
Lancet **361**:45-46
- STATISTISCHES BUNDESAMT DEUTSCHLAND  
<http://www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab20.php>  
Datum des Zugriffs: 27.03.2007
- STOCUM DL (2004)  
Amphibian regeneration and stem cells  
Curr Top Microbiol Immunol **280**:1-70
- STRAUER BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg RV, Kögler G, Wernet P (2002)  
Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans  
Circulation **106**:1913-1918
-

STRAUER BE, Brehm M, Zeus T, Bartsch T, Schannwell C, Antke C, Sorg RV, Kögler G, Wernet P, Müller H-W, Köstering M (2005)

Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease

J Am Coll Cardiol **46**:1651-1658

TAKAHASHI T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T (1999)

Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization

Nature Med **5**:434-438

TAKUMA S, Ota T, Muro T, Hozumi T, Sciacca R, Di Tullio MR, Blood DK, Yoshikawa J, Homma S (2001)

Assessment of left ventricular function by real-time 3-dimensional echocardiography compared with conventional non-invasive methods

J Am Soc Echocardiogr **14**:275-284

TAN TP, Gao X, Krawczynsyn M, Feng X, Kiriazis H, Dart AM, Du X (2003)

Assessment of cardiac function by echocardiography in conscious and anesthetized mice: Importance of the autonomic nervous system and disease state

J Cardiovasc Pharmacol **42**:182-190

TANG YL, Zhao Q, Zhang YC, Cheng L, Liu M, Shi J, Yang YZ, Pan C, Ge J, Phillips MI (2004)

Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium

Regul Pept **117**:3-10

TANG YL, Zhao Q, Qin X, Shen L, Cheng L, Ge J, Phillips MI (2005)

Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction

Ann Thorac Surg **80**:229-237

TAYLOR DA, Hruban R, Rodriguez ER, Goldschmidt-Clermont PJ (2002)

Cardiac chimerism as a mechanism for self-repair, does it happen and if so what degree?

Circulation **106**:2-4

TAYLOR G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM (2000)

---

- Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis  
Cell **102**:451-461
- TERADA N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW (2002)  
Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion  
Nature **416**:542-545
- THEISE ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS (2000)  
Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation  
Hepatology **31**:235-40
- THUM T, Bauersachs J, Poole-Wilson PA, Volk H-D, Anker SD (2005)  
The dying stem cell hypothesis: immune modulation as a novel mechanism for progenitor cell therapy in cardiac muscle  
J Am Coll Cardiol **46**:1799-1802
- TIYYAGURA SR, Pinney SP (2006)  
Left ventricular remodelling after myocardial infarction: past, present, and future  
The Mount Sinai Journal of Medicine **73**:840-851
- TOMA C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD (2002)  
Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart  
Circulation **105**:93-98
- TOMASEK JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA (2002)  
Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling  
Nat Rev Mol Cell Biol **3**:349-363
- TOMITA S, Li R-K, Weisel RD, Mickle DAG, Kim E-J, Sakai T, Jia Z-Q (1999)  
Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function  
Circulation **100**:II247-256
- TOPOL EJ, Califf FM, Vandormael M, Grines CL, George BS, Sanz ML, Wall T, O'Brien M, Schwaiger M, Aquirre FV (1992)
-

- A randomised trial of late reperfusion therapy for acute myocardial infarction.  
Thrombolysis and Angioplasty in Myocardial Infarction-6 Study Group  
*Circulation* **85**:2090-2099
- TORELLA D, Ellison GM, Méndez-Ferrer S, Ibanez B, Nadal-Ginard B (2006)  
Resident human cardiac stem cells: role in cardiac cellular homeostasis and  
potential for myocardial regeneration  
*Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **3**:S8-S13
- TOURBAH A, Gansmuller A, Gumpel M (1991)  
A nuclear marker for mammalian cells and its use with intracerebral trans-  
plants  
*Biotech Histochem* **1**:29-34
- TOUSOULIS D, Antoniadou C, Koumallos N, Stefanadis C (2006)  
Pro-inflammatory cytokines in acute coronary syndromes: from bench to bed-  
side  
*Cytokine & Growth Factor Reviews* **17**:225-233
- TSE WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC (2003)  
Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells:  
Implications in transplantation  
*Transplantation* **75**:389-397
- UEMURA R, Xu M, Ahmad N, Ashraf M (2006)  
Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodelling of ischemic heart  
through paracrine signalling  
*Circ Res* **98**:1414-1421
- UNGER N, Odörfer KI, Weber K, Sandgren EP, Erben RG  
Utility of human placental alkaline phosphatase as a genetic marker for cell  
tracking in bone and cartilage  
*Bone* (submitted)
- VAKEVA AP, Agah A, Rollins SA et al. (1998)  
Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion:  
a role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 ther-  
apy  
*Circulation* **22**:2259-2267
- VASA M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimme-  
ler S (2001)
-



- Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease  
Circ Res **89**:e1-e7
- VERFAILLIE CM (2002)  
Adult stem cells: assessing the case for pluripotency  
Trends Cell Biol **12**:502-508
- VERFAILLIE CM, Schwartz R, Reyes M, Jiang Y (2003)  
Unexpected potential of adult stem cells  
Ann NY Acad Sci **996**:231-234
- VIRAG JI, Murry CE (2003)  
Myofibroblast and endothelial cell proliferation during murine myocardial infarct repair  
Am J Pathol **163**:2433-2440
- VOLL RE, Hermmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I (1997)  
Immunosuppressive effects of apoptotic cells  
Nature **390**:350-351
- WAKITANI S, Saito T, Caplan AI (1995)  
Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal cells exposed to 5-azacytidine  
Muscle Nerve **18**:1417-1426
- WATT FM (1998)  
Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate  
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **353**:831-837
- WEIHRAUCH D, Arras M, Zimmermann R, Schaper J (1995)  
Importance of monocytes/macrophages and fibroblasts for healing of microcroses in porcine myocardium  
Mol Cell Biochem **147**:13-19
- WEIMAR IS, Miranda N, Muller EJ, Hekman A, Kerst JM, de Gast GC, Gerritsen WR (1998)  
Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is produced by human bone marrow stromal cells and promotes proliferation, adhesion and survival of human hematopoietic progenitor cells (CD34+)  
Exp Hematol **26**:885-894
- WEINMANN M, Hoffmann W, Rodegerdts E, Bamberg M (2000)
-

- Biological effects of ionising radiation on human blood compounds ex vivo  
J Cancer Res Oncol **126**:584-588
- WEISMAN HF, Bush DE, Mannisi JA, Weisfeldt ML, Healy B (1988)  
Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion  
Circulation **78**:186-201
- WELM BE, Tepera SB, Venezia T, Graubert TA, Rosen JM, Goodell MA (2002)  
Sca-1(pos) cells in the mouse mammary gland represent an enriched progeni-  
tor cell population  
Dev Biol **245**:42-56
- WILLEMS IE, Havenith MG, De Mey JG, Daemen MJ (1994)  
The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial  
scars  
Am J Pathol **145**:868-875
- WOJAKOWSKI W, Tendera M, Michalowska A, Majka M, Kucia M, Maslankiewicz K,  
Wyderka R, Ochala A, Ratajczak MZ (2004)  
Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mono-  
nuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into  
peripheral blood in patients with acute myocardial infarction  
Circulation **110**:3213-3220
- WOLLERT KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C,  
Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A,  
Drexler H (2004)  
Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction:  
the BOOST randomised controlled clinical trial  
Lancet **364**:141-148
- WOODBURY D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB (2000)  
Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons  
J Neurosci Res **61**:364-370
- XU X, Xu Z, Xu Y, Cui G (2005)  
Selective down-regulation of extracellular matrix gene expression by bone  
marrow derived stem cell transplantation into infarcted myocardium  
Circ J **69**:1275-1283
- YANEZ R, Lamana ML, Garcia-Castro J, Colmenero I, Ramirez M, Bueren JA (2006)
-

- Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of graft-versus-host disease  
*Stem Cells* **24**:2582-2591
- YANG XP, Liu YH, Rhaleb NE, Kurihara N, Kim HE, Carretero OA (1999)  
Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice  
*Am J Physiol* **277**:H1967-H1974
- YANG Z, Zingarelli B, Szabo C (2000)  
Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischemia/reperfusion injury  
*Circulation* **101**:1019-1026
- YANO T, Miura T, Ikeda Y, Matsuda E, Saito K, Miki T, Kobayashi H, Nishino Y, Ohtani S, Shimamoto K (2005)  
Intracardiac fibroblasts, but not bone marrow derived cells, are the origin of myofibroblasts in myocardial infarct repair  
*Cardiovasc Pathol* **14**:241-246
- YASOJIMA K, Kilgore KS, Washington RA, Lucchesi BR, McGeer PL (1998)  
Complement gene expression by rabbit heart: upregulation by ischemia and reperfusion  
*Circ Res* **11**:1224-1230
- YING QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG (2002)  
Changing potency by spontaneous fusion  
*Nature* **416**:545-548
- YOSHIOKA R, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Misawa Y, Takeuchi K, Matsui K, Yamamoto K, Terao K, Shimada K, Ikeda U, Ozawa K, Hanazono Y (2005)  
Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34<sup>+</sup> stem cells in a nonhuman primate model  
*Stem Cells* **23**:355-364
- YUE TI, Chen J, Bao W, Narayanan PK, Brill A, Jiang W, Lysko PG, Gu JL, Boyce R, Zimmerman DM, Hart TK, Buckingham RE, Ohlstein EH (2001)  
In vivo myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone  
*Circulation* **104**:2588-2594
-

ZAMBROWICZ BP, Imamoto A, Fiering S, Herzenberg LA, Kerr WG, Soriano P (1997)

Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells

Proc Natl Acad Sci USA **94**:3789-3794

ZANDER AR, Stute N (2002)

Stammzellforschung: Diesseits des Rubikon

Deutsches Ärzteblatt **99**:341-343

ZHAO LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC (2002)

Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain

Exp Neurol **174**:11-20

ZHAO Y, Glesne D, Huberman E (2003)

A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells

Proc Natl Acad Sci **100**:2426-2431

ZVAIFLER NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edward CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN (2000)

Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals

Arthritis Res **2**:477-488

---

## 9. Danksagung

Ich möchte hiermit all jenen danken, die für mich da waren, nicht nur in der Endzeit meiner Dissertation, sondern auch vorher schon, die mich lieben, die mir zuhören, die mich trösten, die für mich da sind, wenn ich sie brauche...

Ich danke meiner Mama Renate, meinem Papa Dieter und meinem Bruder Marc-Philipp dafür, dass sie immer für mich da waren, dass sie mein Studium unterstützt haben und ich immer auf sie und ihre Liebe zählen kann!

Ich danke meinen liebsten Freundinnen und Freunden, Sumsi alias Simone Haider, Bernadette Achatz, Krümel alias Katrin Krug, Kathi Bauer, Yvonne Nubling, Peter Landgraf, Flo Stengele, Christine Vetter und Flo Saller, die mich immer getröstet, abgelenkt, mir zugehört und mit mir Party gemacht haben!

Ich danke meinen Kollegen, die zugleich gute Freunde geworden sind: Claudia Bergow, Katharina Mildner-Müller, Susanna Harabasz, Tine Lehnert, Verena Pröll, Idi Wüstmann, Bernhard Ludwig, Sonja Rohleder, Christiane Schüler, Ute Zeitz, und Leo Fröhlich!

Bei Frau Dr. Monika Skalicky möchte ich mich ganz herzlich für die statistische Unterstützung bedanken!

Der in München verbliebenen Crew der AG Erben, Karin Weber, Sieglinde Hirmer und Karin Begsteiger sage ich Dank für die schöne Zeit im Labor 105!

Dank sagen möchte ich für die Nutzung des Linearbeschleunigers, welcher als Gemeinschaftsprojekt des Klinischen Departments für diagnostische Verfahren und des Klinischen Departments für Kleintiere und Pferde der VU Wien geführt wird. Namentlich nennen möchte ich Ass.Prof Dr. Miriam Kleiter, Dipl. ACVR-RO, und Dipl. Ing. Thomas Fahrner. Besonderer Dank gilt Dr. Mato Markovic, der alle echokardiographischen Untersuchungen durchführte. Ein Dankeschön auch an Dr. Wilhelm Gerner und Tobias Käser vom Institut für Klinische Immunologie!

---

Und last but not least möchte ich ganz herzlich meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Reinhold Erben danken, der mir dieses interessante Thema überlassen, mich stets unterstützt hat und der mir Onkel Gottfrieds Lebensweisheiten mit auf den Weg gibt.

Vielen Dank!

---

---

## 10. Lebenslauf

### Angaben zur Person

Geburtsdatum: 23. September 1978  
Geburtsort: Deggendorf  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulausbildung

1986 bis 1989 Grundschole Metten  
1989 bis 1998 St.-Michaels-Gymnasium Metten  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Hochschule

November 1998 bis April 2004 Studium der Tiermedizin an der Tiermedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians Universität München  
1. Staatsexamen am 18.03.2002  
2. Staatsexamen am 14.10.2003  
3. Staatsexamen am 20.04.2004

### Dissertationsstudium

September 2004 bis Februar 2005 Beginn der Dissertation unter der Leitung von Privat-Dozent Dr. Dr. R.G. Erben am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

März 2005 bis April 2007 Fortführung der Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. R.G. Erben am Institut für Pathophysiologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien im Rahmen des Umbrella-Projekts „Marker-tolerant animals as models of cell therapy and cell-based gene therapy“

---