

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik I
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

Aufklärung der Rolle von zirkulierenden und ortständigen
CXCR4⁺ Zellen im ischämischen Herzen

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

vorgelegt von
Thi Van Gayer, geborene Pham
aus
Hanoi, Van Thai, Vietnam

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Wolfgang Franz
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Anne Krug Prof. Dr. Arthur Liesz
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Assoz. Prof. PD Dr. Marc-Michael Zaruba
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	09.11.2023

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Thi Van Gayer, geboren am 19.11.1987, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema:

„Aufklärung der Rolle von zirkulierenden und ortständigen CXCR4⁺ Zellen im ischämischen Herzen“

eigenständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Textpassagen, die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Aschaffenburg, den 15.06.2023

Thi Van Gayer

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	13
1.1	Epidemiologie	13
1.2	Pathophysiologie	15
1.3	Therapieoptionen	16
II.	LITERATURÜBERSICHT	17
2.1	Regenerative Medizin	17
2.1.1	Regeneration des Herzens	17
2.1.2	Therapeutische Ansätze in der regenerativen kardialen Forschung	18
2.2	Verwendete Zellarten in der Herzforschung	19
2.2.1	Embryonale Stammzellen	20
2.2.2	Induzierte pluripotente Stammzellen - iPS	21
2.2.3	Adulte Stammzellen	22
2.2.3.1	Satellitenzellen des Skelettmuskels für die kardiale Regeneration	22
2.2.3.2	Progenitorzellen aus dem Knochenmark für die kardiale Regeneration	23
2.2.3.3	Residente kardiale Stammzellen/Progenitorzellen für die kardiale Regeneration	23
2.3	Zelluläre Regulationsmechanismen beim Myokardinfarkt	24
2.3.1	Zellnekrose	25
2.3.2	Apoptose	25
2.3.3	Autophagie	25
2.3.4	Inflamationsreaktion	26
2.4	Direktes vs. indirektes Verfahren in der kardialen Stammzelltherapie	28
2.5	Stammzellmobilisierung	30
2.6	Zellhoming	32
2.6.1	Das Enzym HIF-Prolylhydroxylase und die Prolylhydroxylase-Inhibitoren (PHI)	34
III.	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	36
IV.	VERSUCHSTIERE, MATERIAL UND METHODEN	38
4.1	Versuchstiere	38
4.1.1	Mausstamm und Zucht der verwendeten Tiere	38
4.1.2	Haltungsbedingungen	40
4.1.3	Gesetzliche Bestimmungen	40

4.2	Versuchsdesign	40
4.2.1	Versuchsgruppen	40
4.2.1.1	Kontrollgruppe ohne Ischämie	40
4.2.1.2	Versuchsgruppe mit Ischämieinduktion	40
4.2.1.3	Therapiegruppe nach einer Ischämieinduktion	40
4.3	Versuchsdesign und Zeitverlauf	41
4.4	Analgesie	41
4.5	Genotypisierung durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	41
4.5.1	Verwendete Materialien und Substanzen im Rahmen der PCR	42
4.5.2	Primer	42
4.5.3	DNA Isolierung	42
4.5.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	43
4.5.5	Gelelektrophorese	43
4.5.5.1	Gelherstellung	43
4.5.5.2	Durchführung der Elektrophorese	43
4.6	Infarktmodell – die LAD-Ligation	44
4.6.1	Anästhesie	44
4.6.2	Analgesie	44
4.6.3	Operative Vorgehensweise	44
4.7	Durchflusszytometrie – FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting)	46
4.7.1	Das Prinzip der Durchflusszytometrie	46
4.7.2	Gewebebegewinnung	48
4.7.2.1	Hintergrund zur Probenaufbereitung	48
4.7.2.2	Knochenmarksentnahme	48
4.7.2.3	Herzentnahme	49
4.7.2.4	Aufbereitung von Knochenmark	49
4.7.2.5	Aufbereitung von Herzgewebe	49
4.7.3	Antikörper	49
4.7.3.1	Liste der verwendeten Antikörper	50
4.7.4	Vorbereitung der Antikörper und Durchführung der Messung	51
4.7.5	Durchführung und Auswertung der FACS-Analysen	52
4.8	Hämodynamik	54

4.8.1	Das Prinzip der Conductance Messung	54
4.8.2	Druck-Volumendiagramm	56
4.8.3	Hämodynamische Messung	57
4.8.3.1	Versuchsdurchführung	57
4.8.3.2	Aufzeichnung und Messparameter	58
4.9	Statistische Auswertung	59
V.	ERGEBNISSE	59
5.1	Charakterisierung der CXCR4 ⁺ -Zellpopulation	59
5.1.1	Postischämische Hochregulation von CD45 ⁺ /CXCR4-EGFP ⁺ /CD11b ⁺ Zellen und CXCR4-EGFP ⁺ /CD11b ⁺ Subpopulation	59
5.1.2	Prolylhydroxylase-Inhibition erhöht CXCR4-EGFP ⁺ /CD11b ⁺ Zellen im Knochenmark und Herzen nach einem Herzinfarkt	64
5.1.3	Prolylhydroxylase-Inhibition erhöht CXCR4-EGFP ⁺ /CD11b ⁺ Subpopulation im ischämischen Herzen	65
5.1.3.1	Hemmung des HIF-1 α Abbaus durch selektive Inhibition der Prolyl-Hydroxylase erhöht pro-angiogenetischen Endothelzellen im ischämischen Herzen	66
5.1.3.2	Hemmung des HIF-1 α Abbaus durch selektive Inhibition der Prolyl-Hydroxylase erhöht c- kit ⁺ - und Sca-1 ⁺ CXCR4 ⁺ EGFP ⁺ /CD11b ⁺ Zellen im ischämischen Herzen	67
5.1.3.3	Hemmung des HIF-1 α Abbaus durch selektive Inhibition der Prolyl-Hydroxylase wirkt positiv auf das M2/M1-Verhältnis	67
5.2	Hämodynamische Auswertung	68
5.2.1	Anmerkung zu hämodynamischen Daten in dieser Arbeit	68
5.2.2	Qualität der hämodynamischen Messung	68
5.2.3	Erhobene hämodynamische Parameter nach 30 Tagen mit und ohne Therapie	68
5.3	Postischämische Mortalität	69
VI.	DISKUSSION	71
6.1	Charakterisierung der CXCR4 ⁺ -Population und ihre Rolle im ischämischen Herzen	71
6.2	Die Wirkung des Prolylhydroxylase-Inhibitors auf die CXCR4 ⁺ -Population	74
6.3	Die Wirkung des Prolylhydroxylase-Inhibitors auf die postischämische Herzfunktion	75
6.4	Limitationen der Arbeit	76
VII.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	77
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	80
IX.	DANKSAGUNG	92

I. EINLEITUNG

1.1 Epidemiologie

Im vergangenen Jahrhundert hat die medizinische Forschung enorme Fortschritte erzielt. Aufgrund der Entwicklung in vielen Bereichen der Medizin konnte die Mortalität, welche in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts vor allem auf infektiöse Erkrankungen zurückzuführen war, gesenkt und somit die Lebenserwartung erhöht werden. Ab etwa der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts führten kardiovaskuläre Erkrankungen die Rangliste der häufigsten Todesursachen in den besser entwickelten Ländern an. Die Mortalitätsrate der kardiovaskulären Erkrankung, bzw. der koronaren Herzerkrankungen, erreichte in den Vereinigten Staaten von Amerika ihren Zenit in den 60er-Jahren (1965: 466/100.000) und ist seitdem kontinuierlich gesunken (2013: 274/100.000). Eine Reduktion der Mortalitätsrate um etwa 50-70% wurde in den letzten 30-40 Jahren weltweit beobachtet [1, 2]. In Deutschland kam es, dem statistischen Bundesamt zu Folge, im Jahr 1980 zu 205 Sterbefällen pro 100.000 Einwohner, im Jahre 2016 waren es dagegen nur noch 66,5 pro 100.000. Dieser Trend lässt sich weltweit beobachten. Ursächlich hierfür sind insbesondere die Fortschritte im Bereich der interventionellen Kardiologie und kardiovaskulären Forschung in den letzten 40-50 Jahren. Ein besseres Verständnis über die Pathogenese der kardialen Okklusion und Zellnekrose haben dazu geführt, dass immer wieder neue Therapiemaßnahmen entwickelt werden, die die Überlebensrate nach einem akuten Herzinfarkt erhöhen. Zwar hat sich die Akutsterblichkeit nach Herzinfarkt deutlich reduziert, jedoch kommt es in der Folge bei vielen Patienten zur Ausbildung einer Herzinsuffizienz.

Trotz signifikanter Verbesserungen im Bereich der medikamentösen und interventionellen Therapie stehen kardiovaskuläre Erkrankungen jedoch nach wie vor an der Spitze der häufigsten Todesursache in den westlichen Industrieländern. Statistisch rangführend sind die chronische ischämische Kardiomyopathie, der akute Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz [2, 3].

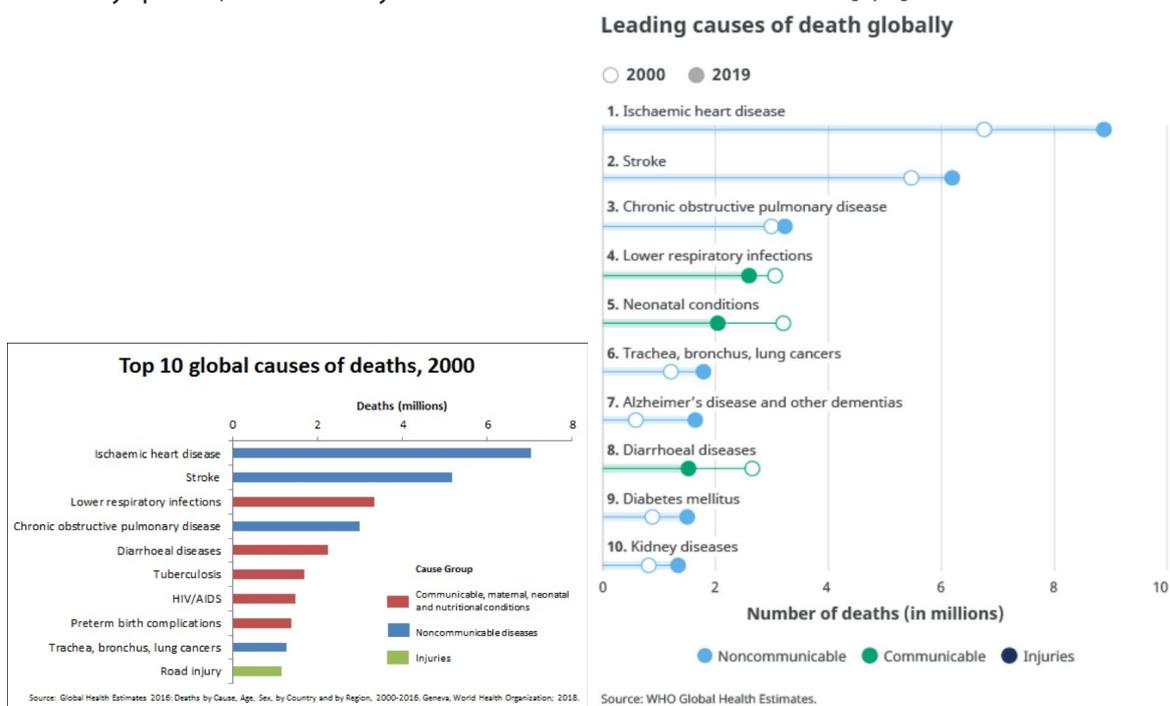


Abbildung 1: Globale Todesursachen nach dem World Health Organization, World health statistics: https://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/en/

Häufige Todesursachen in der Europäischen Union 2015

Anzahl der Sterbefälle



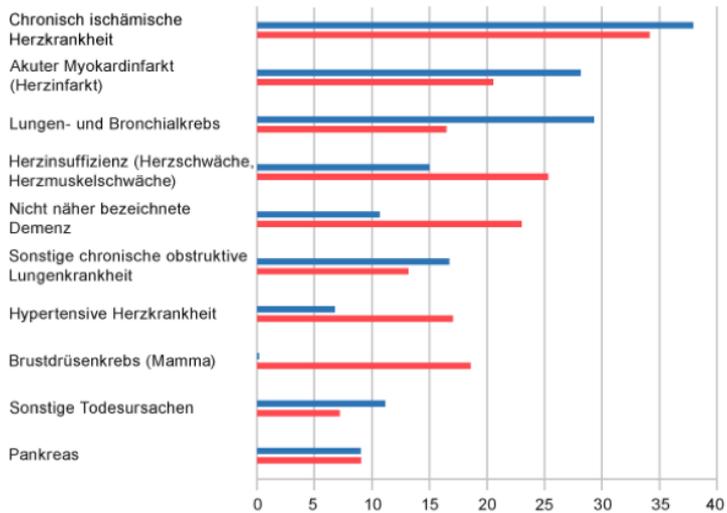
Quelle: Eurostat

© Statistisches Bundesamt (Destatis), 2019

Häufigste Todesursachen 2016

in Tsd.

■ Männlich ■ Weiblich



© Statistisches Bundesamt (Destatis), 2019

Abbildung 2 und 3: Todesursachen in Europa (2015) und in Deutschland (2016) nach dem Statistischen Bundesamt, https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html; jsessionid=6732C08B77E855CFD3B038FF8812170E.internet722

1.2 Pathophysiologie

Das Herz ist ein muskulöses Hohlorgan, das als Druck- und Saugpumpe für den Transport des Blutes durch den Körper dient. Mittels eines dichten Netzwerks von Herzkranzarterien und -venen wird die Sauerstoffversorgung des Herzmuskels (Myokards) sichergestellt.

Ischämische Kardiomyopathien werden durch Durchblutungsstörungen im Herzen verursacht, zum Beispiel in Folge verengter Herzkranzgefäße (koronare Herzerkrankung). Ätiologisch liegt zumeist eine Gefäßverkalkung (Atherosklerose) zugrunde, welche durch die Ausbildung von instabilen Plaques und im Verlauf durch Plaqueruptur gekennzeichnet ist. Letztere kann zum teilweisen oder vollständigen Gefäßverschluss führen. Ein akuter Myokardinfarkt ist häufig die Erstmanifestation einer Koronararterienkrankung und geht zunächst mit einer Minderversorgung des Gewebes einher. Aufgrund intrazellulärem Energie- und Sauerstoffmangel mit simultaner Akkumulation von Stoffwechselendprodukten kommt es zur Myokardnekrose mit konsekutiver Narbenbildung. Durch den Verlust kontraktiler Kardiomyozyten (Herzzellen) und die Veränderung der Struktur des Herzmuskelgewebes nimmt die Leistungsfähigkeit des Herzens in Abhängigkeit zur Größe des Infarktareals ab. Daraus folgen weitere Umbauprozesse im Gewebe sowie fortschreitende funktionale Einschränkungen. Der Prozess des kollagenen myokardialen Gewebeumbaus wird auch als kardiales Remodeling bezeichnet und ist charakterisiert durch Reduktion der Wandstärke, Ausdehnung des kollagenen Bindegewebes sowie Ventrikeldilatation. Progrediente Funktionseinschränkungen des infarzierten Herzens und Leistungseinbußen im Sinne einer sekundären Herzinsuffizienz sind die Folgen [4, 5] (Abbildung 4).

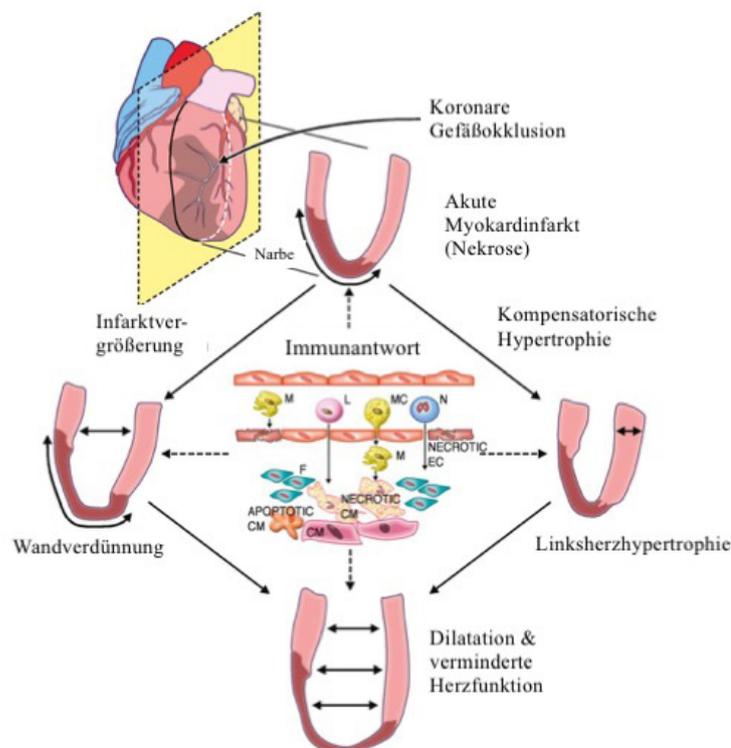


Abbildung 4: Pathophysiologie der ischämischen Kardiomyopathien, modifiziert nach Seropian et al. "Inflammation and Ventricular Remodeling With STEMI" (JACC Vol. 63, No. 16, 2014 April 29, 2014:1593–603)

1.3 Therapieoptionen

Kardiovaskuläre Erkrankungen bedeuten für vielen Patienten eine deutliche Beeinträchtigung der Lebensqualität und stellen für das Gesundheitssystem eine enorme finanzielle Belastung dar.

„Vorbeugen ist besser als heilen“ - so lautet ein Zitat des Arztes Christoph Wilhelm Hufeland (1762-1836) aus dem im Jahre 1797 veröffentlichten Buch „Makrobiotik oder die Kunst, das menschliche Leben zu verlängern“. Ganz nach dieser Maxime werden immer wieder neue Therapiemöglichkeiten gesucht, die auf eine Verhinderung der Entstehung der koronaren Herzerkrankung oder die Minimierung des ischämischen Gewebes oder gar auf den Ersatz des vernarbten Herzgewebes abzielen.

So hat die Framingham Heart Study in den 1960er Jahren das Rauchen, hohen Blutdruck und einen hohen Serumcholesterinspiegel als maßgebende Risikofaktoren für die Entwicklung kardiovaskulärer bzw. koronarer Erkrankungen demaskiert [6-10]. Mittels Lebensstiländerung und medikamentöser Therapie konnten die genannten Risikofaktoren reduziert werden. Dadurch wurde ein wesentlicher Beitrag zur Minimierung der Inzidenz der koronaren Atherosklerose geleistet. Weitere Fortschritte in der koronaren Versorgung, wie zum Beispiel die koronare Bypass-Operation, die perkutane transluminale Angioplastie (PTCA) und die Stentimplantation haben enorm zur Reduktion der Mortalitätsrate beigetragen [2].

Die Therapie der Herzinsuffizienz ist multimodal angelegt. Eine wichtige Säule ist die medikamentöse Therapie, die entweder über eine Nachlastsenkung (Betablocker, ACE-Hemmer/Angiotensin-2-Blocker/ARNI) die kardiale Pumpleistung verbessert, symptomlindernd wirkt (Diuretika bei Ödemen) und/oder über Frequenzkontrolle (Betablocker, Ivabradin, Digitalis) die Herzleistung erhöht. Ein weiterer Grundpfeiler ist die Ausschaltung allgemeiner Risikofaktoren für die Entstehung der Arteriosklerose beispielsweise über eine Lebensstiländerung mit ausreichender körperlicher Belastung, ausgewogener Diät, sowie Vermeidung schädigender Substanzen. Aufgrund der Dilatation und Vernarbungen des Ventrikels können Herzrhythmusstörungen auftreten, die negativ auf das Zusammenspiel zwischen den Herzvorhöfen und Herzkammern wirken oder lebensgefährdend sein können (ventrikuläre Tachykardie), daher ist neben einer medikamentösen rhythmologischen Therapie oft eine invasive Device-Therapie notwendig. Hierzu gehört unter anderem die kardiale Resynchronisationstherapie (CRT) und der Einsatz eines implantierbaren Kardioverter-Defibrillators (ICD). Im fortgeschrittenen Stadium einer chronischen Herzinsuffizienz bleibt häufig die Herztransplantation als einzig sinnvolle Therapiemöglichkeit, welche zum einen durch den Mangel an zur Verfügung stehenden Spenderorganen und zum anderen durch immunologische Komplikationen oft nicht realisierbar ist [11-14].

Neue vielversprechende Therapieoptionen aus dem Gebiet der regenerativen Medizin versuchen die kardiale Funktionalität zu erhalten, indem die Regenerationsfähigkeit des Herzmuskels positiv beeinflusst wird [15, 16]. Die Ansätze der Stammzellforschung sind vielfältig. Einer der Ansätze beruht auf der Interaktion zwischen CXCR4-Rezeptoren mit dem Liganden SDF-1. In Bezug auf die Erforschung reparativer Therapieoptionen hatte sich unser Labor lange mit der SDF1-CXCR4-Achse beschäftigt [17-21]. Diese spielt eine entscheidende Rolle in der embryonalen Entwicklung, als auch in der Rekrutierung und Migration von Vorläuferzellen ins ischämische Herz. Experimentelle Daten belegen, dass nach einem Herzinfarkt SDF-1- und CXCR4-Zellen hoch reguliert werden. In

diesem Zusammenhang wurden erhöhte Gefäßneubildung, sowie ein Rückgang der Narbenbildung im infarzierten Gewebe beobachtet [20, 22]. Arbeiten aus unserem Labor haben gezeigt, dass eine Hemmung des SDF-1 Abbaus durch Dipeptidylpeptidase-Inhibitoren zu einer verbesserten Gefäßversorgung, besseren Herzfunktion und gesteigertem Überleben nach Herzinfarkt führt [18-20]. Nichtsdestotrotz sind die genauen Wirkmechanismen noch unzureichend verstanden [23-26]. Mit unserer Forschungsarbeit möchten wir zum Verständnis der molekularen und zellulären Effekte der kardialen SDF-1/CXCR4 Achse beitragen.

II. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Regenerative Medizin

2.1.1 Regeneration des Herzens

Die Regenerationsfähigkeit des Herzens war lange Zeit umstritten. Im 19. Jahrhundert, in den Anfängen der modernen Medizin, wurde die Regenerationsfähigkeit des Herzens vorausgesetzt, da eine Organhypertrophie (Organvergrößerung) als Zeichen einer Hyperplasie (Zellvermehrung) gewertet wurde. Im Jahre 1925 postulierte Karsner et al. [27], dass eine Organhypertrophie auf eine Zellhypertrophie zurückzuführen sei und dass mitotische Zellen als Zeichen einer Proliferation im untersuchten Herzen unauffindbar seien. Seitdem wurde der Gedanke, dass sich Herzgewebe regenerieren kann, weitgehend von der Wissenschaft verworfen. Zwar existierten Berichte über mitotische Vorgänge im kindlichen Herzen mit Hypertrophie oder Myokarditis [28] sowie im tierischen Herzgewebe nach einer induzierten Herzverletzung [29], die Regenerationsfähigkeit des Herzens wurde jedoch bis in die 1990er Jahre kritisch hinterfragt. Mit dem Nachweis von Metaphasechromosomen und Zytokinese, sowohl in gesunden, als auch erkrankten Herzen [30, 31], wurde die Vorstellung, dass Kardiomyozyten (Herzzellen) durchaus in sehr begrenztem Ausmaß proliferieren können, von der Wissenschaft akzeptiert. Jedoch wurde ihr zunächst keine bedeutende Rolle zugeschrieben, da diese endogene Proliferationsfähigkeit als zu gering eingestuft wurde [32]. Mit dem Beginn des Zeitalters der kardialen Stammzelltherapie und dem Postulat, dass sich knochenmarkstämmige Stammzellen zu Kardiomyozyten differenzieren können [33], schien die endogene kardiale Proliferationsfähigkeit in Vergessenheit zu geraten. Kürzlich, nach diesem Postulat, wurde die Entdeckung von residenten kardialen Stammzellen veröffentlicht [34-36] und legte den Grundstein für die Arbeitshypothese eines parakrinen Reparaturmechanismus. Bergmann et al. haben mit ihrer im Jahre 2009 veröffentlichten Studie den endgültigen wissenschaftlichen Nachweis für die begrenzte kardiale Regenerationsfähigkeit geliefert [37]. Mittels der Integration von C14 in die DNA konnte das genaue Alter der Kardiomyozyten und somit der regenerationsfähige Anteil des Herzgewebes bestimmt werden. Es wurde berichtet, dass sich jährlich etwa 1% der menschlichen Kardiomyozyten bei einem 25-jährigen gesunden Menschen erneuern. Dieser Prozentsatz reduzierte sich jedoch bei einem 75-jährigen Menschen auf 0,45%. Darüber hinaus würde die Zellregeneration über die gesamte Lebensspanne eines Menschen mit etwa 50% der Kardiomyozyten korrelieren. Diese Befunde deuten darauf hin, dass eine kardiale zelluläre Regeneration prinzipiell bis ins hohe

Alter stattfindet und wahrscheinlich, sowohl auf eine Stammzellendifferenzierung, als auch auf eine Proliferation der endogenen Kardiomyozyten zurückzuführen ist [37, 38].

2.1.2 Therapeutische Ansätze in der regenerativen kardialen Forschung

Die Regenerative Medizin umfasst ein breites wissenschaftliches Spektrum. Allgemein formuliert versucht sie durch therapeutische Strategien, wie beispielsweise Reparatur- und Regenerationsmechanismen oder den Zell- bzw. Gewebeersatz, die Funktion eines beschädigten Gewebes oder Organs wiederherzustellen. Hierbei werden unterschiedliche Biomaterialien, Gene, Proteine oder Zellen eingesetzt.

In den letzten Jahrzehnten haben Strategien aus der regenerativen Medizin Einzug in die kardiovaskuläre Forschung gefunden. Mittels zellgestützten Therapien hat die kardiovaskuläre Regeneration die Wiederherstellung des geschädigten Gewebes und damit die Pumpfunktion des Herzens zum Ziel [39]. Die Grundvorstellung ist, Zellen ex vivo zu züchten und zu vermehren, um diese anschließend als Zellen oder gar als funktionierenden Gewebeverband (Tissue Engineering) in das Infarkt-areal zu transplantieren. Um den Transplantationserfolg zu gewährleisten müssen jedoch viele Faktoren beachtet werden. Dazu zählen die Überlebenswahrscheinlichkeit und funktionale Integrität der zu transplantierenden Zellen im infarzierten Herzen. Ein weiteres Problem ist die Abstoßungsgefahr des Transplantats durch das Empfängerorgan.

Ein genauer Blick auf die Physiologie und Zellbiologie zeigt, dass die kardiovaskuläre Regeneration eine große Herausforderung der modernen Medizin darstellt [40, 41].

Zusammengefasst setzt sich das Herz-Kreislaufsystem aus dem Herzmuskel, dem Koronarkreislauf, dem Lungenkreislauf, und dem großen Körperkreislauf zusammen. Ein funktionierendes kardiovaskuläres System erfüllt eine Reihe lebenswichtiger Funktionen wie beispielsweise die Versorgung der Gewebe mit Sauerstoff, Wasser und Nährstoffen. Des Weiteren ist es für den Transport von korpuskulären Blutbestandteilen und von Botenstoffen zuständig, die eine wichtige Rolle bei der Wundheilung, Infektion, sowie interzellulärer Kommunikation einnehmen. Das Herz gilt dabei als zentraler Bestandteil des Blutkreislaufs und trägt maßgeblich zur Aufrechterhaltung einer gleichmäßigen Durchblutung unseres Körpers bei. Um die Hämodynamik aufrecht zu erhalten, muss die Funktion des Herzens einerseits und die Funktion des gesamten Kreislaufs andererseits, aufeinander abgestimmt sein. Die myokardiale Pumpfunktion wird im Allgemeinen durch Größen wie Ejektionsfraktion, Schlagvolumen oder Herzminutenvolumen gekennzeichnet. Kriterien wie Schlagkraft (Inotropie), Herzfrequenz (Chronotropie), Reizleitung (Dromotropie), Erregbarkeit (Bathmotropie) und Erschlaffung (Lusitropie) liefern Rückschlüsse über die Herzfunktion. Über das vegetative Nervensystem und den Frank-Starling-Mechanismus kann die myokardiale Pumpfunktion an unterschiedliche körperliche Belastungen angepasst werden.

Neben seiner Funktion als Pumpe wirkt das Herz über Dehnungsrezeptoren in Vorhöfen und Ventrikeln auch als Messorgan und Hormonproduzent (atriale natriuretische Peptide), über welche es Einfluss auf den Salz- und Wasserhaushalt, sowie auf die Blutdruckregulation ausübt.

Auf zellulärer Ebene sind einige Eigenschaften und der Aufbau der Herzmuskelzellen hervorzuheben, die aktuell eine Hürde für die funktionelle Integrität der zu transplantierenden Zellen darstellen. Die Kardiomyozyten zählen zur quergestreiften Muskulatur, sind jedoch ausschließlich vegetativ innerviert und somit nicht willkürlich steuerbar. Dank des Erregungsbildungs- und Reiz-

leitungssystem, welches spontan eine elektrische Erregung generieren kann, schlägt das Herz autonom, steht aber unter dem Einfluss humoraler (z.B. Adrenalin) und autonom-nervöser Steuerung (Sympatikusaktivierung). Die Arbeitsmyokardzellen sind über Gap Junctions miteinander zu einem funktionellen Synzytium verknüpft, so dass elektrische Erregung, die durch die Schrittmacherzellen generiert wird, schneller weitergeleitet werden kann. Anschließend muss das ankommende elektrische Signal in Form eines Aktionspotentials in eine mechanische Kontraktion der Herzmuskelzelle umgewandelt werden. Diese sogenannte elektromechanische Kopplung führt über einen Calcium getriggerten Calciumausstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum zu einer Kontraktion des Herzmuskels. Das korrekte Zusammenspiel zwischen den Schrittmacherzellen und den Arbeitsmyokardzellen ist wichtig für den reibungslosen Ablauf des Herzzyklus und hat einen sehr großen Einfluss auf die Herzfunktion.

Störungen der Herzfunktion betreffen in der Regel alle Arten von Herzgewebe. So führt der myokardiale Durchblutungsmangel bei koronarer Herzkrankheit auch zu Fehlfunktionen innerhalb der Herzmuskulatur und dem Reizleitungssystem. Betroffen ist daher das gesamte kardiovaskuläre System. Therapeutische Strategien müssen diese unterschiedlichen Funktionen und Charakteristika berücksichtigen.

Bei einem typischen Myokardinfarkt kann ein Zellverlust von bis zu 10^9 Kardiomyozyten auftreten [42]. Diese Zahl entspricht etwa fünfundzwanzig Prozent des gesamten myokardialen Zellvolumens. Eine Infarktgröße von mehr als 40% verursacht einen kardiogenen Schock [42, 43]. Da die Regenerationsfähigkeit der Myokardzellen bei höheren Wirbeltieren sehr limitiert ist, werden die geschädigten Myokardzellen in der Regel durch Fibroblasten bzw. Narbengewebe ersetzt und vermindern dadurch die Herzfunktion [44].

Ein Therapieansatz entsteht aus der Überlegung, dass dieser Zellverlust durch neue, funktionsfähige Zellen kompensiert werden kann. Um die Funktionalität des Herzens erhalten zu können müsste allerdings eine enorme Zellanzahl ersetzt werden. Es stellt sich die Frage, welche Zellen geeignet sein könnten und auf welche Weise sie in das Infarktreal appliziert werden sollten.

Eine andere Möglichkeit ist die Injektion von exogenen Zellen in den Infarktbereich. Diese Zellen würden proliferieren und sich im Infarktbereich reorganisieren und die Funktion der verlorenen Zellen einnehmen [45, 46]. Es wird außerdem vermutet, dass sie parakrine Signale an endogene Kardiomyozyten abgeben, die ihrerseits die eigene Proliferation antreiben [47-49].

Eine weitere therapeutische Strategie stützt sich auf die Regenerationsfähigkeit von unbeschädigten Progenitorzellen oder Kardiomyozyten im angrenzenden Bereich des Infarktes. Diese Zellen könnten möglicherweise proliferieren oder gar zu neuen Kardiomyozyten differenzieren [37, 50].

2.2 Verwendete Zellarten in der Herzforschung

Wissenschaftler und Mediziner haben bisher unterschiedliche Stammzellarten zur Erforschung der kardiovaskulären Regeneration verwendet. Stammzellen können vor allem in Embryonen und Föten sowie in vielen Organen des menschlichen Körpers (zum Beispiel im Knochenmark, Blut, Skelettmuskulatur, Fettgewebe) nachgewiesen werden [51]. Grundsätzlich muss zwischen embryonalen und adulten Stammzellen unterschieden werden.

2.2.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen zeichnen sich durch ihre Pluripotenz aus. Diese Möglichkeit, sich unbegrenzt zu vermehren und in jeden Zelltyp des Körpers differenzieren zu können, hat den Vorteil, dass sie beinahe ubiquitär einsetzbar sind und stellt somit eine verlockende und vielversprechende Option dar. Aktuell gibt es drei Möglichkeiten embryonale Stammzellen für die Forschung zu gewinnen.

Die eine Möglichkeit ist die Isolierung aus Embryonen nach einer in vitro Fertilisation. Hierbei werden Ei- und Spermazellen künstlich zusammengeführt und befruchtet. Bis zum Acht-Zell-Stadium sind die Zellen totipotent. Das bedeutet, dass jede Zelle bis zu diesem Stadium die Voraussetzung zur Entwicklung eines eigenständigen Lebewesens erfüllt. Danach entwickelt sich aus diesem Zellverband die Blastozyste, aus deren inneren Zellmasse wiederum pluripotente embryonale Stammzellen für die Forschung entnommen werden. Die ersten embryonalen Stammzellen wurden 1981 aus der inneren Zellmasse einer Maus isoliert [52, 53].

Embryonale Stammzellen der Maus können in Präimplantationsembryonen reimplantiert und am Aufbau aller fötalen Gewebe beteiligt werden. Diese Eigenschaft wird bei der zielgerichteten Ausschaltung bestimmter Gene in Mäusen genutzt, um Knock-out-Mäuse für die Erforschung von Genfunktionen und menschliche Krankheitsmodelle herzustellen.

Aufgrund von Unterschieden zwischen Menschen und Tieren müssen Forschungsergebnisse am menschlichen Modell verifiziert werden. Mit der Isolierung von menschlichen embryonalen Stammzellen durch Thomson et al. 1998, wurde sowohl das wissenschaftliche als auch das öffentliche Interesse für zellgestützte Therapien geweckt [54].

In der Genforschung werden humane embryonale Stammzellen in der Regel aus überzähligen Embryonen gewonnen, die bei einer in vitro Fertilisation entstanden sind und nicht mehr für Fortpflanzungszwecke verwendet werden. Mit Einverständnis des Betroffenen können diese Zellen bis zur Verwendung tiefgefroren gelagert werden.

Eine weitere Möglichkeit ist die Gewinnung der den embryonalen Stammzellen äquivalenten primordialen Keimzellen (Vorläufer der Ei- und Spermazellen) aus abgetriebenen fünf- bis neunwöchigen Föten. Der Einsatz von fetalen Zellen ist ethisch umstritten. Außerdem ist die Zahl der Stammzellen, die aus einem Fetus isoliert werden kann, gering und die Vermehrung schwierig. Es ist fraglich, ob fetale Stammzellen jemals eine bedeutende Rolle in der Medizin spielen werden.

Durch „therapeutisches Klonen“ (Zellkerntransfer) können auch embryonale Stammzellen gewonnen werden [55, 56]. Aus den gewonnenen Stammzellen können Ersatzgewebe wie Herzmuskelzellen oder Nervenzellen hergestellt werden. Bei dieser Methode ist eine gespendete, unbefruchtete Eizelle notwendig. Hierbei wird der Zellkern der Eizelle entfernt und durch den Zellkern einer Körperzelle des Empfängers ersetzt. Durch diese Methode wird der Zellkern der Körperzelle in einer Art Ur-Zustand versetzt und reprogrammiert, so dass eine neue totipotente Zelle entstehen kann.

Mit geeigneten Nährmedien lassen sich aus Stammzellen im Labor bestimmte Zelltypen züchten [57, 58]. Noch gibt es allerdings kein Verfahren, mit dem die Stammzellen in ihrer Entwicklung willkürlich und zielgerichtet gesteuert werden können.

Nachteile bei der Verwendung embryonaler Stammzellen in der Medizin sind vielfältig, wie bei-

spielsweise das Risiko einer Teratombildung und die Erfordernis einer Immunsuppression durch das Einbringen von heterologem Material. Aus moralischen und ethischen Gründen können Forscher einige Versuche, die sie beispielsweise an tierischen Stammzellen durchführen, nicht an menschlichen Stammzellen vornehmen, da bei der Gewinnung von embryonalen Stammzellen frühe menschliche Embryonen zum Teil zerstört werden. Es wird vermutet, dass die Qualität der Stammzellen, welche durch den Zellkerntransfer gewonnen wird, am besten sei, da aufgrund des identischen genetischen Ursprungs einer Transplantatabstoßung vorgebeugt wird [51]. Außerdem wird hierbei eine unbefruchtete Eizelle verwendet, so dass diese Methode ethisch und moralisch besser vertretbar ist.

2.2.2 Induzierte pluripotente Stammzellen - iPS

Embryonale Stammzellen galten sehr lange als die einzige Quelle pluripotenter Zellen. Im Jahre 2006 postulieren Takahashi und Yamanaka et al. eine weitere Form der Stammzelle, die sogenannte induzierte pluripotente Stammzelle - iPS [59]. Demnach wurden vier Gene (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) mittels eines Retrovirus in die DNA der Hautzellen/Fibroblasten der Maus eingebracht (Transduktion), die einen Prozess im Inneren der Zelle in Gang setzten, welcher die Hautzellen/Fibroblasten reprogrammierte und innerhalb von 2-3 Wochen in iPS umwandelte. Mittlerweile kann diese Reprogrammierung auch für humane Zellen erreicht werden [60-62]. Die genauen Prozesse der Reprogrammierung sind noch unzureichend verstanden und bedürfen intensiverer Forschungen. Dennoch lassen sich mit der Verwendung von iPS ethische und moralische Probleme umgehen, mit denen der Einsatz von embryonalen Stammzellen behaftet ist. Außerdem wird keine Immunsuppression benötigt, da es sich bei iPS um autologe Zellen handelt. iPS bieten somit hervorragende Möglichkeiten zur Erschaffung und Untersuchung erkrankter Zellen mit der jeweiligen Genetik der Patienten.

Obwohl die Möglichkeiten der zellgestützten Therapie mit maßgeschneiderten iPS attraktiv klingen, ist und bleibt die Entwicklung von bezahlbaren und wirksamen iPS-Therapien eine sehr große Herausforderung. Eine weitere große Hürde auf dem Weg zur klinischen Anwendung von iPS besteht in der potenziellen Teratogenität, welche einerseits durch die Verwendung von Retroviren zur Veränderung des Genoms der Empfängerzelle und andererseits durch das Protoonkogen c-Myc hervorgerufen werden kann. Yu et al. haben zwar herausgefunden, dass zur Induktion von iPS das Protoonkogen c-Myc nicht benötigt wird [60], dennoch würde c-Myc die Effizienz der Methode deutlich verbessern. Weitere Arbeiten haben gezeigt, dass anstatt Retroviren auch Adenoviren [63], Plasmide [64] oder Transposone [65, 66] verwendet werden können. Durch das aktive Einbringen von rekombinanten Proteinen in die Zelle konnten ebenfalls iPS bzw. piPS (protein-induzierte pluripotente Stammzellen) erzeugt werden [67]. Ein Negativpunkt bei diesen alternativen Methoden ist die deutlich niedrigere Effizienz in der Gewinnung von iPS im Vergleich zum ursprünglichen Ansatz durch Takahashi und Yamanaka.

Prinzipiell bedürfen die bisherigen Ergebnisse aus Arbeiten an humanen embryonalen Stammzellen noch einer intensiveren Grundlagenforschung, damit sie - ähnlich wie die adulten Stammzellen - klinische Anwendung finden werden.

2.2.3 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen sind multipotent. Sie haben ein reduziertes Entwicklungspotenzial und sind sowohl in ihrer Proliferationsfähigkeit als auch Lebensdauer begrenzt. Sie wurden bisher in 20 Organen des Körpers nachgewiesen, sind dort lebenslanglich vorhanden und können die unterschiedlichsten Arten von Ersatzzellen bilden. Mithilfe von Wachstumsfaktoren können sie in vitro in einen spezialisierten Zelltyp differenzieren. Adulte Stammzellen haben den Vorteil, dass sie aus jedem Individuum isoliert werden können, so dass perspektivisch der Ersatz durch autologe (körpereigene) Zellen besteht. Mit der Technik des Tissue Engineering können sogar Gewebe für die Transplantation hergestellt werden. Eine maligne Entartung konnte bei der klinischen Verwendung von adulten Stammzellen bisher nicht beobachtet werden. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung autologer Vorläuferzellen (Progenitorzellen) findet sich in der nicht vorhandenen Immunogenität. Transplantierte autologe Zellen werden vom Immunsystem nicht als fremd erkannt und werden daher nicht abgestoßen.

2.2.3.1 Satellitenzellen des Skelettmuskels für die kardiale Regeneration

Herzmuskelzellen und Skelettmuskelzellen gehören aufgrund der Anordnung Actin- und Myosinfilamenten, der Banden, Zonen und Z-Scheiben zur quergestreiften Muskulatur. Im Gegensatz zur regelmäßigen Anordnung der Skelettmuskelzellen sind Herzmuskelzellen unregelmäßig verzweigt und kommen nur am Herzen vor. Sie sind miteinander über Gap Junctions verbunden und bilden ein funktionelles Synzytium. Ein wichtiger Unterschied besteht vor allem darin, dass Herzmuskelzellen vollkommen autonom und unabhängig von nervalen Impulsen arbeiten. Jede Skelettmuskelzelle wird einzeln über die sogenannte motorische Endplatte eines Motoneurons innerviert, ist von ihren Nachbarzellen vollständig getrennt und arbeitet für sich alleine, wobei ein Motoneuron durch Kollateralen mehrere Muskelfasern gleichzeitig innervieren kann. Skelettmuskelzellen entstehen durch Fusion von Vorläuferzellen, den Myoblasten. In der adulten Muskulatur können die sogenannten Satellitenzellen nachgewiesen werden, die als Stammzellen des quergestreiften Muskelgewebes gelten [68, 69]. Infolge einer muskulären Verletzung werden Satellitenzellen aktiviert und zur Proliferation angeregt. Die von Satellitenzellen abstammenden Myoblasten migrieren zu geschädigten Muskelfasern und fusionieren entweder mit gesunden Muskelfasern oder untereinander. Auf diese Weise werden neue Muskelfasern ausgebildet. Möglicherweise sind Satellitenzellen eine spezielle Klasse von myogenen Zellen, die entweder direkt von embryonalen Myoblasten stammen oder als eigenständiger Zelltyp durch Migration aus den Somiten entstehen [70, 71].

Aufgrund ihrer Eigenschaft wurden Satellitenzellen der Skelettmuskulatur auf ihr Potential untersucht, das verletzte Myokard zu regenerieren. In Tiermodellen konnte nach Myoblastentransfer eine Funktionsverbesserung des infarzierten Herzmuskels beobachtet werden [72, 73]. Obwohl die zugrunde liegenden Mechanismen unzureichend verstanden sind, wurde im Rahmen einer randomisierten, multizentrischen, klinischen Studie Infarktpatienten mit Indikation zur chirurgischen Intervention eine intramyokardiale Myoblasteninjektion verabreicht [74]. Nach 6 Monaten zeigte sich eine höhere Inzidenz von Arrhythmien im Patientenkollektiv mit Myoblastentransfer. Die erhoffte Verbesserung der kardialen Pumpleistung blieb aus [75]. Andere Versuche an Tiermodellen haben gezeigt, dass die verwendeten Myoblasten den Transfer in das infarzierte Herz nur zum Teil überlebten, jedoch nicht zu Kardiomyozyten differenzierten. Die transplantierten Myoblasten diffe-

renzierten sich weiter zu Skelettmuskelzellen, die nicht elektromechanisch mit endogenen Kardiomyozyten verbunden sind und sich auch nicht funktionell an der Herzaktion beteiligten [76, 77].

2.2.3.2 Progenitorzellen aus dem Knochenmark für die kardiale Regeneration

Vorläuferzellen des Knochenmarks haben sich als Quelle für adulte Stammzellen in der Medizin, insbesondere in der hämato-onkologischen Therapie, bereits früh etabliert. Diese Zellen besitzen nicht nur ein breit gefächertes Entwicklungspotenzial, sondern können in vitro vermehrt und, wie die Erfahrungen aus der Hämato-Onkologie zeigen, am Menschen zur zielgerichteten Therapie angewendet werden. Humane hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen können anhand spezifischer Oberflächenantigene bzw. Markermoleküle erkannt werden. Markermoleküle bzw. Oberflächenantigene werden, je nach Art und Funktion der Zellen, auf der Zelloberfläche präsentiert und werden nach dem CD-System (Cluster of Differentiation) nummeriert. Die physiologische Funktion dieser Moleküle ist vielfältig und reicht vom Rezeptor für Botenstoffe zu Erkennungs- oder Adhäsionsmolekülen und bis hin zum Übermittler für Signale an Zielzellen. So hat sich das Oberflächenantigen CD34 als positiver Selektionsmarker für hämatopoetische Stammzellen etabliert, kommt allerdings auch auf Endothelzellen vor. Das Markermolekül CD45 lässt sich beispielsweise auf allen Leukozyten – auch auf hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen – nachweisen und wird daher als Panleukozytenmarker bezeichnet. Progenitorzellen aus dem Knochenmark haben aufgrund ihrer früher vermuteten Fähigkeit sich unter anderem zu Kardiomyozyten zu differenzieren [33, 78], Hoffnungen in eine kardiale, regenerative Therapie geweckt. In den letzten zwei Jahrzehnten gab es aufgrund dieser Überlegungen einige Versuche, die mittels intrakoronarer oder intramyokardialer Applikationen von Stammzellen in das infarzierte Myokard eine Verbesserung der kardialen Pumpfunktion zum Ziel hatten. Während Tierversuche gezeigt haben, dass sich die kardiale Pumpleistung und die Überlebenschancen der Tiere nach einer direkten oder indirekten Stammzelltherapie gebessert haben [33, 79, 80], erbrachten Untersuchungen an Patienten eher ernüchternde Ergebnisse. Es zeigten sich keine [81-84], bzw. nur geringe Effekte [85-88].

2.2.3.3 Residente kardiale Stammzellen/Progenitorzellen für die kardiale Regeneration

Berichte über die kardiale Regenerationsfähigkeit beim Zebrafisch [89] sowie beim Menschen durch Bergmann et al. [37] lassen vermuten, dass das erwachsene menschliche Herz ebenfalls kardiale Stammzellen beherbergt. Tatsächlich wurde eine Reihe von Stammzellen im Herzen beschrieben, wie beispielsweise c-kit positive und Sca-1 positive Zellen [90-93]. Jedoch scheint das Potential dieser Zellen zur kardialen Differenzierung auf das neonatale Stadium reduziert zu sein [91]. Trotz einiger Unklarheiten über die residenten kardialen Stammzellen wurden einige klinische Versuche mit kardialen Stammzellen (SCIPIO = Stem Cell Infusion in Patients with Ischemic Cardiomyopathy, CADUCEUS = CARDiosphere-Derived aUtologous stem Cells to reverse ventricular dysfunction, CONCERT-HF = Combination of Mesenchymal and c-kit⁺ Cardiac Stem Cells As regenerative Therapy for Heart Failure) durchgeführt. Anfängliche Ergebnisse von SCIPIO [94] und CADUCEUS [95, 96] ergaben einen signifikanten Anstieg der ventrikulären Ejektionsfraktion, sowie eine reduzierte Infarktgröße und ventrikuläre Myokardverstärkung im Infarktgebiet. Ergebnisse von CONCERT-HF (Phase II), bei der sowohl kardiale als auch mesenchymale Stammzellen verwendet werden, ergaben zwar ein verbessertes Behandlungsergebnis nach 6 und 12 Monaten, welches jedoch nicht mit

einer signifikanten Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion und Reduktion der Infarktnarbe einhergeht [97, 98]. Weitere klinische Studien haben ähnliche Ergebnisse erbracht. Es wird vermutet, dass das verbesserte Behandlungsergebnis auf systemische oder parakrine Effekte der transplantierten Zellen zurückzuführen sei. Der wissenschaftliche Skandal um manipulierte Daten bezüglich der residenten kardialen c-kit⁺ Stammzellen hat das Vertrauen in die Stammzelltherapie im Allgemeinen - insbesondere in die kardiale Stammzelltherapie - erschüttert. Es braucht viel Zeit und noch mehr fundiertere wissenschaftliche Ergebnisse, um dieses Vertrauen wieder zu gewinnen [99].

2.3 Zelluläre Regulationsmechanismen beim Myokardinfarkt

Das Herz ist ein Hochleistungsorgan und bedarf daher sehr viel Energie in Form von ATP, welches über 95% durch oxidative Phosphorylierung gewonnen werden kann. Wie der Name des Vorgangs impliziert, wird hierbei Sauerstoff benötigt. Kommt es in einem Bereich des Herzens plötzlich zur Minderversorgung mit Sauerstoff, wie es beim Herzinfarkt der Fall ist, werden zelluläre Regulationsmechanismen in Gang gesetzt, die das Schicksal der betroffenen Kardiomyozyten bestimmen. Diese Regulationsmechanismen können übergeordnet in Nekrose, Apoptose, Autophagie und Inflammation eingeteilt werden [100] (siehe Abbildung 5 und 6).

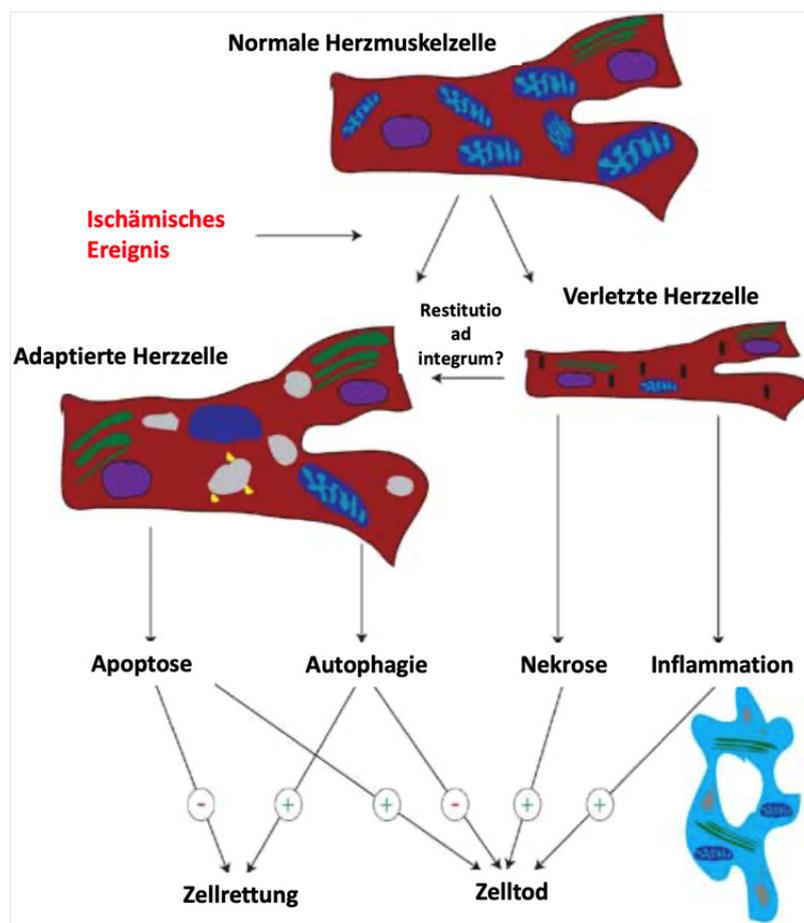


Abbildung 5: Unterschiedliche Regulationsmechanismen infolge einer Ischämie, modifiziert nach O’Neal et al. (2012) “Cellular Pathways of Death and Survival in Acute Myocardial Infarction” (J Clin Exp Cardiol 56:003. doi:10.4172/2155-9880.56-003)

2.3.1 Zellnekrose

Die Nekrose bzw. der irreversible Zelltod wird in den ersten zwei Stunden eingeleitet, erreicht das Maximum nach etwa vierundzwanzig Stunden und wird nach etwa zweiundsiebzig Stunden beendet [101]. Durch Sauerstoffmangel wird der aerobe Stoffwechsel auf einen anaeroben umgestellt, um ausreichend ATP für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion zu gewährleisten. Dabei entstehen intrazellulär viele Protonen (H^+ -Ionen), die zur Denaturierung von Proteinen, wie beispielsweise RNA, führen können und daher zum Teil über Protonenpumpen (Na^+/H^+ -Ionenaustauscher) an der Zellmembran extrazellulär transportiert werden. Dadurch reichern sich intrazellulär wiederum viele Na^+ -Ionen an, die durch membranständige Na^+/Ca^{2+} -Ionenaustauscher entfernt werden. Durch die Anreicherung von Ca^{2+} -Ionen intrazellulär, strömt von extrazellulär Wasser entsprechend des osmotischen Gefälles nach intrazellulär ein. Es kommt zur Zellschwellung und Ruptur der Zellorganellen und Zellmembranen. Durch zelleigene lysosomale Enzyme werden Zellen zusätzlich aufgelöst (Lyse). Einen weiteren Beitrag zum Zelltod leistet der erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen-Anstieg, in dem Ca^{2+} -Ionen über einen Uniporter intramitochondrial transportiert werden. Dadurch öffnen sich die mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Poren (MPTP), die Mitochondrien schwellen an und rupturieren ebenfalls im Verlauf.

2.3.2 Apoptose

Die Apoptose dagegen läuft ohne Entzündungsreaktion ab. Als erstes kommt es zur Schrumpfung und Verformung der Zelle. Der Zellverband wird zerstört und die Zelle zerfällt nach Fragmentation der DNA in Vesikel, die durch Makrophagen phagozytiert werden. Die Apoptose ist ein durch extrinsische (äußere) oder intrinsische (innere) Auslöser hervorgerufener Prozess, der aktiv von der Zelle kontrolliert und daher als programmierter Zelltod bezeichnet wird. Der extrinsische Signalweg wird über die sogenannten Todesliganden (Fas/CD95, TNFR-1) und deren Rezeptoren vermittelt und führt zu einer kaskadenartigen proteolytischen (Protein-spaltenden) Reaktion. Beim intrinsischen Signalweg werden mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Poren (MPTP) gebildet, wodurch das Membranpotenzial der inneren Mitochondrienmembran zusammenbricht und die Freisetzung der mitochondrialen Apoptose-Mediatorproteine wie Cytochrom c, Smac/Diablo und Endonuklease G werden in das Zytoplasma ermöglicht. Diese Proteine entfalten ihre Wirkung zum einen über die Fragmentierung der Zellkern-DNA, zum anderen über die Erhöhung der Effektor-Caspasen, welche zahlreiche zelluläre Proteine zerstören können.

Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass Nekrose und Apoptose unterschiedlich zur Infarktgröße beitragen und dass ein Großteil des Zelluntergangs der Apoptose zuzuschreiben ist [102, 103]. Da die Apoptose ein aktiv kontrollierter Vorgang ist und fast jederzeit beendet werden kann – vorausgesetzt, bestimmte Voraussetzungen werden erfüllt – kann eine Reduktion der Apoptose zur Verkleinerung der Infarktnarbe und somit zur besseren Herzfunktion führen.

2.3.3 Autophagie

Die Autophagie ist ein Prozess gesunder Zellen, bei dem eigene, als überflüssig zu wertende Zellbestandteile und Organellen abgebaut werden. Die abgebauten Bestandteile werden anschließend für andere Prozesse wiederverwertet. Die Autophagie stellt somit ein Gleichgewicht zwischen der Produktion und dem Abbau von Zellbestandteilen her. Insbesondere in Zeiten von zellulärem

Stress und Energiemangel ist sie strategisch wichtig, um Energie einzusparen. Beim Herzinfarkt spielt die Autophagie eine wichtige Rolle, insbesondere in der Periinfarktzone, wo der Energieverbrauch der Zellen soweit herunterreguliert wird, dass deren Überleben ermöglicht werden kann.

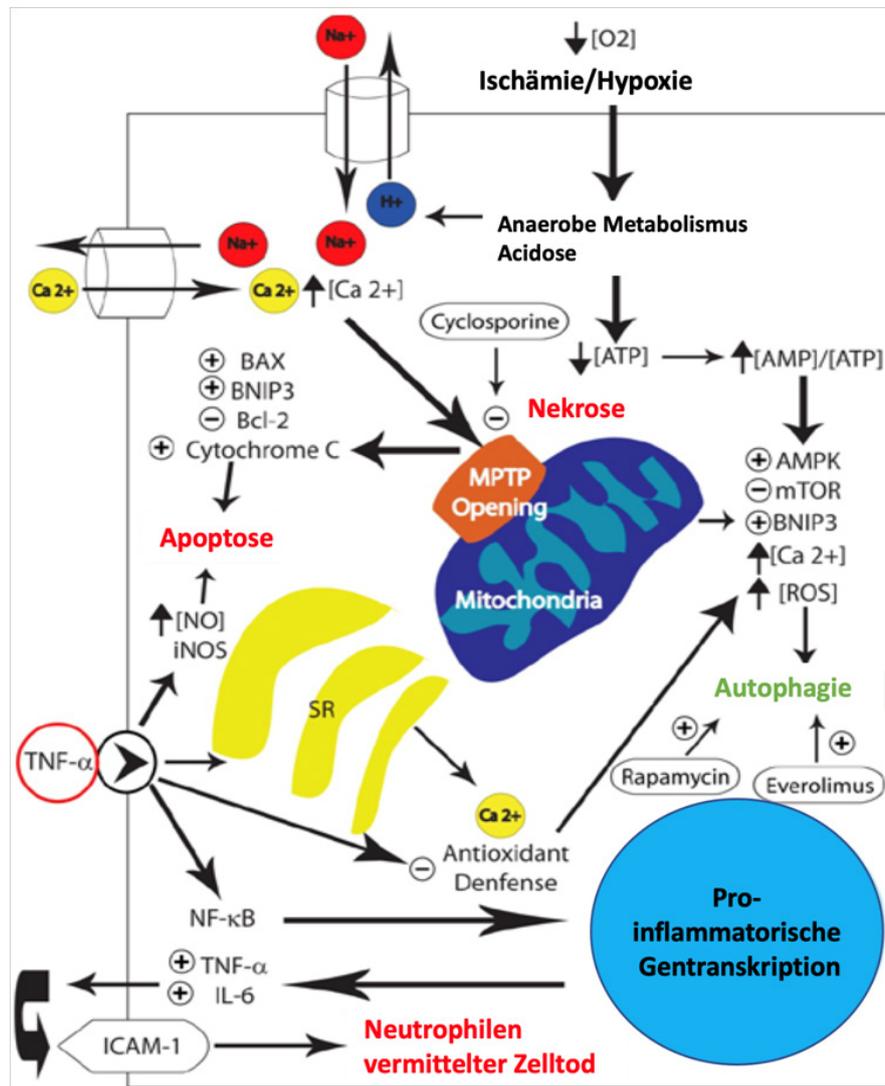


Abbildung 6: Regulationsmechanismen auf zellulärer Ebene infolge einer Ischämie, modifiziert nach O'Neal et al. (2012) „Cellular Pathways of Death and Survival in Acute Myocardial Infarction“ (J Clin Exp Cardiol 56:003. doi:10.4172/2155-9880.56-003)

2.3.4 Inflammationsreaktion

Die Entzündungsreaktion im ischämischen Herzen ist ein sehr wichtiger Prozess für die Heilung und Narbenbildung des infarzierten Gewebes. Abbildung 7 versucht diesen Prozess in einem zeitlichen Zusammenhang zu veranschaulichen. Die Darstellung gilt für Versuche mit Mäusen. Bei größeren Säugetieren und Menschen verläuft dieser Prozess zeitverzögert. Geschädigte bzw. nekrotisierende Zellen senden eine Reihe von Signalen, die sogenannten DAMPs (danger-associated molecular patterns) aus, welche immunmodulierende Zellen aktivieren und die Entzündungsreaktion in Gang setzen. Über Chemokine, Zytokine sowie Adhäsionsmoleküle werden unterschiedliche Zellarten der Entzündungsreaktion in das Infarktareal rekrutiert. Zu den angelockten Zellarten gehören unter anderem Blutplättchen, Neutrophile, Makrophagen, Monozyten, Mastzellen, Fibroblasten und Endothelzellen. Die Aufgabe dieser Zellen ist unter anderem, die nekrotisierenden Zel-

len und Zellbestandteile abzuräumen, neue Gefäße zu bilden (Angiogenese und Vaskularisierung) und ein neues funktionsfähiges Gewebe (Fibrogenese vs. Kardiomyogenese) zu bilden [104]. Eine komplexe interzelluläre Kommunikation ist dabei notwendig, damit die Zellen geregelt ihre Arbeit verrichten können.

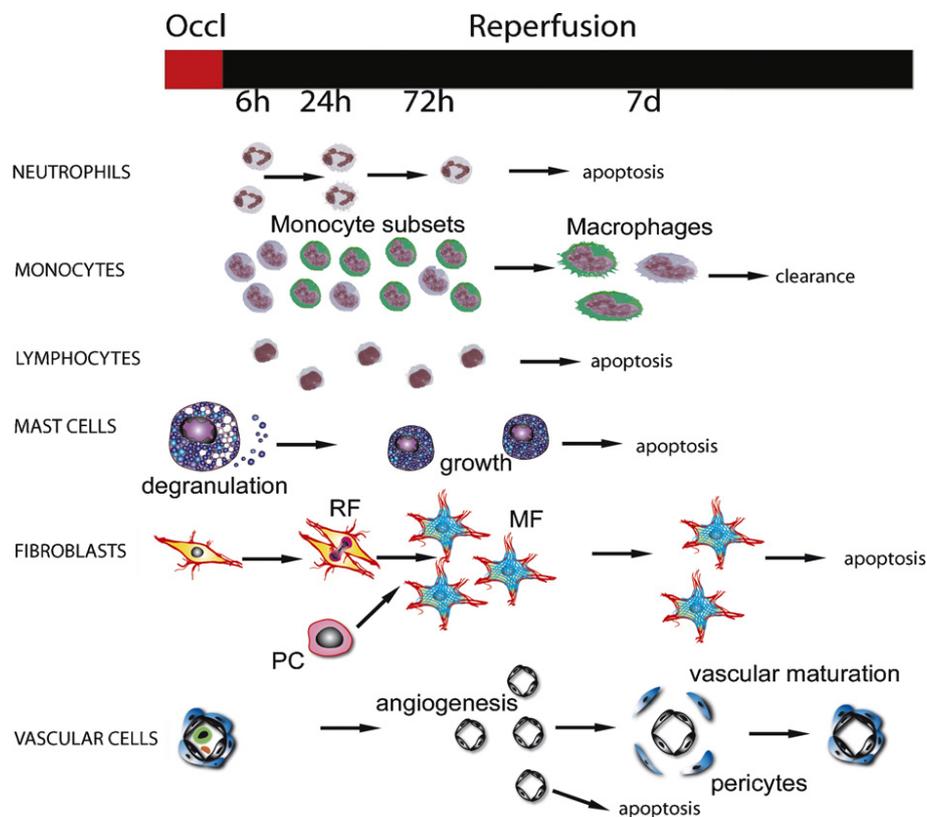


Abbildung 7: Die zelluläre Immunantwort bei Mäusen im Rahmen einer Reperfusionstherapie nach N.G. Frangogiannis, „The immune system and cardiac repair“ (Pharmacological Research 58 (2008) 88-111)

Auch wenn bisherige Forschungsarbeiten sowohl an Tieren als auch an Menschen noch keine endgültigen Rückschlüsse über die kardiale Regeneration erlauben, so liefern sie dennoch wertvolles Wissen über die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen. Laut einem Konsensus von TACTICS (Transnational Alliance for Regenerative Therapies in Cardiovascular Syndroms) können die Hauptmechanismen der kardialen Reparatur und Regeneration vorläufig in sieben Kategorien eingeteilt werden [105]:

- 1) Überlebens- und Schutzmechanismen
- 2) Minimierung der Inflammation
- 3) interzelluläre Kommunikation
- 4) Angiogenese und Vaskularisierung
- 5) Kardiomyogenese
- 6) Molekulare Mechanismen der Proliferation und des Zellzyklus
- 7) kardiale Alterungsprozesse

Diese Mechanismen können sowohl unabhängig als auch kooperativ ablaufen. Kardiale Reparatur- und Regenerationsmechanismen bestehen allgemein formuliert aus einem multifaktoriellen Ineinandergreifen einzelner Prozesse. Visuell kann die kardiale Regeneration als ein riesiger Eisberg beschrieben werden und unser Verständnis darüber stellt die Spitze des Eisberges dar.

2.4 Direktes vs. indirektes Verfahren in der kardialen Stammzelltherapie

Wie bereits erwähnt, müssen therapeutische Strategien im Rahmen der kardialen Stammzelltherapie viele Punkte berücksichtigen. Nicht nur zellbiologische Herausforderungen, wie beispielsweise die besondere myokardiale Struktur und Funktion sowie die geringe Regenerationsfähigkeit der Kardiomyozyten, sondern auch technische Hürden, wie die qualitative und quantitative Bestimmung der zu verwendenden Zellarten sowie deren klinische Anwendungsformen, müssen überwunden werden. Während embryonale Stammzellen noch weitere präklinische Forschungen benötigen, um eine sichere, ethisch vertretbare Anwendung am Patienten zu gewährleisten, werden adulte Stammzellen bereits erfolgreich im klinischen Alltag, insbesondere in der Behandlung von Leukämien und Lymphomen, eingesetzt. Vereinfacht gesagt können therapeutische Strategien in zwei Kategorien eingeteilt werden: direkte und indirekte. So unterschiedlich wie die eingesetzten Zelltypen, deren Anwendungsgebiete und Anwendungsarten auch sind, wird in der Stammzelltherapie in der Regel von einer Stammzelltransplantation gesprochen. Eine Stammzelltransplantation ist jedoch eine invasive Methode. In der Herzforschung werden Stammzellen häufig durch direkte intramyokardiale Injektion oder intrakoronare Infusion während einer Herzoperation oder einer Herzkatheteruntersuchung appliziert. Das heißt, Stammzellen müssen zunächst aus anderen mesenchymalen Geweben (Knochen, Knorpel, Sehnen, Muskel, Bindegewebe, Blutzellen) entnommen, dann möglicherweise zur Transplantationsvorbereitung vermehrt, in ihrer Differenzierung ange-regt, danach gereinigt und sortiert werden, um anschließend an das betroffene Myokard appliziert werden zu können. Präklinisch existieren bereits Überlegungen, die die Zellen als Zellverband im Rahmen von Tissue Engineering [106-108] oder gar als komplett ex vivo gezüchtete Herzen zu transplantieren [109].

Die direkte Therapiemethode stellt unter diesem Blickwinkel aufgrund der Komplexität des technischen Verfahrens und der Invasivität ein gewisses Risiko dar, so dass indirekte Therapieverfahren eine attraktive Alternative darstellen. Wu et al. hat zudem berichtet, dass Stammzellen verschiedener Ursprünge nur innerhalb einiger Wochen nach einer Stammzelltransplantation nachzuweisen sind [110, 111]. Außerdem wurde die ursprüngliche Überlegung, dass sich adulte Stammzellen zu Kardiomyozyten differenzieren können, durch einige andere Forschungsarbeiten widerlegt [34, 35]. Es wird aktuell angenommen, dass applizierte und/oder mobilisierte Zellen im Infarktareal ihre Wirkung möglicherweise über parakrine Reparaturmechanismen entfalten [35, 36, 47-49, 112]. Zum Repertoire dieser Reparaturmechanismen zählen beispielsweise die Verhinderung bzw. Verminderung der Zellapoptose im Infarktareal sowie die Neovaskularisierung, die mit verbesserter Sauerstoffversorgung und verminderter Myokardnekrose einhergehen.

Die zellulären Regulationsmechanismen sind sehr komplex, bieten jedoch ein vielfältiges Potenzial für therapeutische Ansätze. Eine Schlüsselstellung scheint dabei die Inflammationsreaktion einzu-

nehmen. Die aktuelle Wissenschaft ist sich einig, dass eine Entzündungsreaktion für die Heilung und Regeneration des ischämischen Herzes notwendig ist. Eine Hemmung der Inflammation kann unter Umständen eine Ventrikelruptur begünstigen. Eine verstärkte Inflammationsreaktion kann jedoch zur Infarktvergrößerung, Fibrosierung des Myokards und letzten Endes zur Herzinsuffizienz führen. Eine optimale Balance zwischen pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Regulationsmechanismen muss noch gefunden werden [104].

Zusammenfassend deutet die aktuelle Studienlage darauf hin, dass kardiale zelluläre Regeneration sowohl auf eine Stammzellendifferenzierung als auch auf eine Proliferation von endogenen Kardiomyozyten bzw. deren Vorläuferzellen zurückzuführen ist (siehe Abb. 8). Die Stammzelltransplantation ist jedoch eine invasive Methode, die aktuell noch mit hoher Komplikationsrate und technischen Schwierigkeiten verbunden ist [113]. Was passiert also, wenn Stammzellen oder Progenitorzellen nicht an die Infarktstelle transplantiert, sondern endogen und medikamentös angelockt werden? Da die Inflammationsreaktion letztlich aus einem Zusammenspiel unterschiedlicher Zellen besteht, könnten Stammzellen bzw. Progenitorzellen eine wichtige Rolle in der Inflammationskaskade spielen. Die medikamentöse Mobilisierung und das Homing dieser Zellen zum ischämischen Herzen sowie die Identifizierung ihrer Rolle im Inflammationsprozess könnten einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der kardialen Regeneration darstellen und einen möglichen therapeutischen Ansatz bieten.

Angetrieben von diesem Gedanken hat sich unsere Arbeitsgruppe um die Identifizierung der mobilisierten Zellen im postischämischen Herzen bemüht und deren Wirkung auf die kardiale Funktion untersucht.

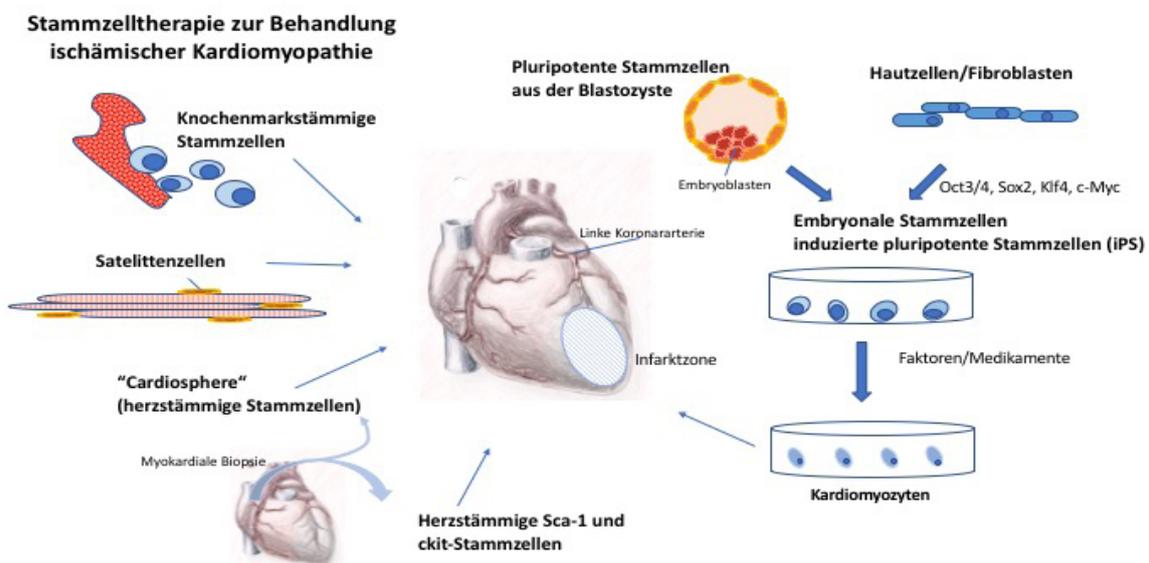


Abbildung 8: Stammzelltherapie zur Behandlung ischämischer Kardiomyopathie, modifiziert nach Santini M. P. and Rosenthal N.: „Myocardial Regenerative Properties of Macrophage Populations and Stem Cells“ (J. of Cardiovasc. Trans. Res. (2012) 5:700–712)

2.5 Stammzellmobilisierung

Wie oben bereits angesprochen können adulte Stammzellen in vielen mesenchymalen Geweben nachgewiesen werden. Die Vorstellung, Stammzellen zur Therapie unterschiedlicher Krankheitsbilder zu verwenden, hat sich insbesondere in der Hämato-Onkologie seit langem etabliert.

Die sogenannten hämatopoetischen Stammzellen bilden den Ursprung der roten und weißen Blutzellen. Aus ihnen differenzieren sich im Verlauf zahlreiche Zellgenerationen der Erythropoese, Leukopoese und Thrombopoese. Die Hauptfunktion reifer Erythrozyten (roter Blutkörperchen) ist der Atemgastransport an die Körperzellen, reife Leukozyten (weiße Blutkörperchen) sind für die Immunabwehr und reife Thrombozyten für die Blutstillung verantwortlich. Die Blutzellbildung beginnt während der Embryonalentwicklung zunächst in den mesenchymalen Blutinseln des Fötus und des Dottersacks. Später verlagert sie sich in die Leber, Milz und allmählich ins Knochenmark. Nach der Geburt können hämatopoetische Stammzellen für gewöhnlich nur noch im roten Knochenmark, in der sogenannten Stammzellnische, einer hoch organisierten dreidimensionalen Struktur, bestehend aus Stromazellen (Stützzellen wie Fibrozyten/Fibroblasten) und einer extrazellulären Matrix, nachgewiesen werden [114]. Alle hämatopoetischen Stammzellen besitzen die Fähigkeit zur Differenzierung und Proliferation und lassen sich nur funktionell identifizieren. Eine wichtige Rolle bei der Differenzierung spielen die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (CSF = colony stimulating factors, je nach Zellreihe auch G-CSF, M-CSF), kleine parakrin wirkende Peptide. G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) und das verwandte Zytokin GM-CSF (granulocyte monocyte-colony stimulating factor) sind Zytokine, die typischerweise zur Mobilisierung CD34⁺ Stammzellen eingesetzt werden.

Die Hämatopoese findet größtenteils im Knochenmark statt, so dass das Knochenmark als Proliferations- und Reifungspool der Blutzellen gilt.

Die Retention der Stammzellen am Knochenmark wird über adhäsive Interaktionen zwischen den Stammzellen und dem Stroma ermöglicht. Die Stammzellmobilisierung aus dem Knochenmark in die Zirkulation ist noch nicht in allen Einzelheiten verstanden. In jedem Fall werden hierfür Progenitorzellen von den Stromazellen des Knochenmarks unter anderem in Abhängigkeit von Zyto- und Chemokinen losgelöst. Zwei Signalwege werden in der Stammzellforschung häufig verwendet: Zum einen das Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) und der dazugehörige Rezeptor Very Late Antigen-4 (VLA 4) auf der Stammzelloberfläche, zum anderen SDF-1 α und der C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4).

SDF-1 (stromal cell derived factor-1/CXCL12) gehört zu den Zytokinen, genauer gesagt den Chemokinen. Es existieren insgesamt sechs humane und drei mausstämmige Isoformen des SDF-1, wobei α und β am besten beschrieben sind [115]. Zytokine sind kleine Proteine, die von Zellen produziert werden. Ihre Wirkung entfaltet sich autokrin durch Bindung an geeignete Rezeptoren auf derselben Zelle oder parakrin auf Nachbarzellen. Die Zytokine ermöglichen durch ihre vielfältigen Wechselwirkungen die interzelluläre Kommunikation und steuern die Aktivität der betroffenen Zellen. So wird sowohl die angeborene und die adaptive Abwehr als auch die Hämatopoese reguliert. Als Chemokine werden alle Zytokine bezeichnet, die chemotaktisch – „zellanziehend“ – wirken. SDF-1 wird in der Knochenmarksnische auf Osteoblasten, Stromazellen und Endothelzellen exprimiert und wirkt als chemotaktischer Lockstoff für alle Zellen, die den G-Protein-assoziierten Rezeptor

CXCR4 präsentieren. Unter normalen physiologischen Bedingungen wird CXCR4 vor allem von hämatopoetischen Progenitorzellen sowie von adulten Stammzellen der neuronalen, muskuloskelettalen, endothelialen und kardialen Gewebe exprimiert [116]. Der SDF-1/CXCR4-Achse wird eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit einer Stammzellmobilisierung und -Homing zugeschrieben. Diese Annahme beruht auf Beobachtungen während der Embryonal- und Organentwicklung.

Während der Gastrulation sind SDF-1- und CXCR4-Zellen an der Zellmigration beteiligt: Während Zellen des Ektoderms (äußeres Keimblatt) SDF-1 exprimieren, enthalten migrierende Zellen des Meso- und Endoderm (mittleres und inneres Keimblatt) den dazugehörigen Liganden CXCR4 auf ihrer Oberfläche. Untersuchungen ergaben eine Wanderung der CXCR4 exprimierenden Zellen in Richtung des SDF-1-Gradienten. Auch während der Organogenese scheinen die SDF-1-CXCR4-Achse in der Neural-, Herz-, Gefäßentwicklung sowie der Hämatopoese eine Schlüsselstellung einzunehmen. SDF1/CXCR4-Knockout-Mäuse zeigen eine sehr hohe Letalität in der späten Embryonal- oder Perinatalphase. Unter anderem konnten schwere Gefäß- und Herzdefekte nachgewiesen werden [117]. Durch die Gabe eines CXCR4-Antagonisten, wie beispielsweise AMD3100 (Plerixafor) oder die systemische Applikation von SDF-1 über rekombinante Adenoviren, wurde eine anhaltende Mobilisierung von CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen ins periphere Blut beobachtet [23, 118]. Dosisabhängig gilt AMD 3100 als ein potenter Stammzellmobilisator, da es als selektiver Antagonist zu SDF-1 α an den CXCR4-Rezeptor von Stammzellen bindet und inhibiert somit die Ankerfunktion der SDF-1/CXCR4-Achse in der Knochenmarksnische. Infolgedessen kann eine Mobilisation erfolgen.

Postnatal befindet sich im Knochenmark eine hohe Konzentration von SDF-1. Hierdurch entsteht ein Gradient zwischen Knochenmark und peripherem Blut, der unter physiologischen Bedingungen die meisten hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in ihrem Knochenmark zurückhält. Im peripheren Blut zirkulieren nur einige der Stammzellen [119]. Wird der Gradient beispielsweise durch traumatisch bedingte Gewebsschädigung oder Ischämie verändert, kommt es zur Mobilisierung der Zellen [23].

Es gibt viele Substanzen die Stammzellen aus dem Knochenmark in die Blutbahn mobilisieren können (siehe Tabelle 1). G-CSF stimuliert zum Beispiel die Expression von Proteasen wie Kathepsin G, Elastase und MMP-9 (Matrixmetalloproteinase-9) in neutrophilen Granulozyten. Durch proteolytische Spaltung wird SDF-1 inaktiviert und unterbricht dadurch die SDF-1/CXCR4-Verankerung im Knochenmarkstroma. Zusätzlich verursacht G-CSF eine verminderte Expression von SDF-1 im Knochenmark und CXCR4 auf den Stammzelloberflächen. Beide Mechanismen bewirken den Adhäsionsverlust der Zelle an die Knochenmarksnische und ermöglicht deren Eintritt in die Blutbahn. Diese Eigenschaft macht die SDF-1/CXCR4-Achse zu einem zentralen Element der Stammzellmobilisierung [23, 114, 120].

Auch Interleukine, Catecholamine, Steroidhormone (Stimulation durch Androgene, Hemmung durch Östrogene), Parathormon, Erythropoetin üben Einfluss auf die Blutzellbildung aus. Eine Mobilisation der endothelialen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark wird bereits unter physiologischen Bedingungen etwa durch physische Anstrengung, Nitritoxid und VEGF-vermittelt ausgelöst. Dieses Phänomen wurde nachgewiesen, in dem sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen nach physischer Anstrengung eine erhöhte Anzahl von endothelialen Vorläuferzellen im peripheren Blut gemessen wurde [121, 122].

Wirkstoffklasse	Substanzen	Mechanismen
Wachstumsfaktor	G-CSF, GM-CSF, IL-3, VEGF, SCF, EPO	Aktivierung und Vermehrung von hämatopoetischen Stammzellen, Regulierung von MMP-9/SDF-1
Chemokine	SDF-1, CXCL8, IL-8	Granulozytenaktivierung
Hormone	Östrogene, Parathormon	eNOS abhängig, G-CSF
Medikamente	CXCR4-Antagonisten wie AMD3100	Unterbrechung der SDF-1/CXCR4-Achse im Knochenmark
Toxine	Pertussistoxin	Regulierung der SDF-1/CXCR4-Achse
Stress	Physische Aktivierung	eNOS abhängig
Immunsuppressiva	Cyclophosphamid, 5-FU	Stammzellmobilisierung

Tabelle 1: Möglichkeiten zur Stammzellmobilisierung

G-CSF = granulocyte-colony stimulating factor; GM-CSF = granulocyte monocyte-colony stimulating factor; IL-3 = Interleukin 3; VEGF = vascular endothelial growth factor = Gefäßwachstumsfaktor; SCF = stem cell factor/Kit-Ligand; EPO = Erythropoetin; SDF-1 = stromal cell derived factor 1, CXCL-8 = IL-8 = Interleukin 8; eNOS = endothelial nitric oxide synthase = endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase; 5-FU = 5-Flourouracil

2.6 Zellhoming

Nachdem Progenitorzellen in die Blutbahn eintreten, müssen sie noch an das Zielgewebe ange lockt werden. Dieser Prozess wird als „Homing“ bezeichnet. Hierbei nehmen CXCR4-Rezeptor und SDF-1 α eine zentrale Rolle ein.

Wie bereits oben erwähnt, wird SDF-1 unter anderem von Stromazellen und Endothelzellen des Knochenmarks, des Herzmuskels, der Leber und des Gehirns exprimiert. Im Herzen wurde auch über eine Expression von SDF-1 auf Kardiomyozyten berichtet [123].

Aufgrund hypoxischer oder traumatischer Schädigung, wie es beispielsweise beim Herzinfarkt oder bei der Extremitätenischämie und Leberschädigung der Fall ist, wird die Isoform SDF-1 α vermehrt exprimiert. Dieser Vorgang wird durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) ermöglicht, der zwei Untereinheiten HIF-1 α und β in sich vereint und nur als Heterodimer funktionstüchtig ist. Es gibt über 70 Gene, die durch HIF-1 α induziert werden, mitunter SDF-1, CXCR4, Erythropoetin, Lactat-Dehydrogenase-A, Endothelin-1, VEGF, PDGF und NOS = Nitric Oxide Synthase (Angiogenese) [23, 124-126]. Die Hypoxie gilt als Hauptstimulus für die HIF-1 α Aktivierung, dennoch gibt es mittlerweile eine Reihe von Berichten über weitere nicht-hypoxischer Stimuli. Die Aktivierung des HIF-1 α unter hypoxischen unterscheidet sich grundlegend von der Aktivierung unter nicht-hypoxischen Bedingungen [127, 128]:

Unter physiologischen, normoxischen Voraussetzungen wird die HIF-1 β Untereinheit aktiviert und exprimiert. Die HIF-1 α -Untereinheit wird jedoch durch die HIF-Prolylhydroxylase an zwei Prolylres-ten hydroxyliert und durch das Ubiquitin-Proteasom- System (UPS) inaktiviert. Bei Hypoxie findet die Hydroxylierung nicht mehr statt, so dass das stabilisierte HIF-1 α daraufhin an HIF-1 β binden kann. Gemeinsam bilden sie als Heterodimer den aktiven HIF-1-Transkriptionsfaktor.

Unter nicht-hypoxischen Bedingungen steigt die HIF-1 α Transkriptionsrate und somit die HIF-1 α Translation an. Durch die Akkumulation von HIF-1 α wird die Bildung des aktiven HIF-1-Transkriptionsfaktors begünstigt. Der Anstieg der HIF-1 α Transkriptionsrate werden unter anderem durch vasoaktive Hormone, Angiotensin II, Thrombin und Endothelin, aber auch Lipopolysaccharide (LPS), platelet-derived growth factor (PDGF) und TNF- α verursacht.

Durch Bindung des aktivierten Transkriptionsfaktors HIF-1 α beispielsweise am SDF-1-Promotor wird die Bildung von dazugehörigen SDF-1 mRNA und nachfolgend die SDF-1 Expression induziert.

Der Anstieg der SDF-1-Expression im ischämischen Herzen wirkt chemotaktisch auf CXCR4-exprimierende Zellen. SDF-1 wird bis zu 72 Stunden hochreguliert und fällt anschließend allmählich wieder ab [23, 129]. Dementsprechend können CXCR4⁺-Zellen nur limitiert zum Herzen rekrutiert werden. Strategien, die eine SDF-1-Erhöhung zum Ziel haben, würden indirekt die Mobilisierung von CXCR4⁺-Zellen in der wichtigen Postinfarktphase positiv beeinflussen. Arbeiten aus unserem Labor haben gezeigt, dass über die Hemmung des SDF-1-Abbaus mittels Dpp4-Inhibitoren (Gliptine) eine verbesserte Herzfunktion erzielt werden kann[18]. Aufgrund der Bedeutung der Prolylhydroxylase bei der Aktivierung des Transkriptionsfaktor HIF-1 haben wir in der Inhibition der Prolylhydroxylase einen neuen therapeutischen Ansatz zur Feinregulation der kardialen SDF-1/CXCR4 Achse nach Ischämie vermutet.

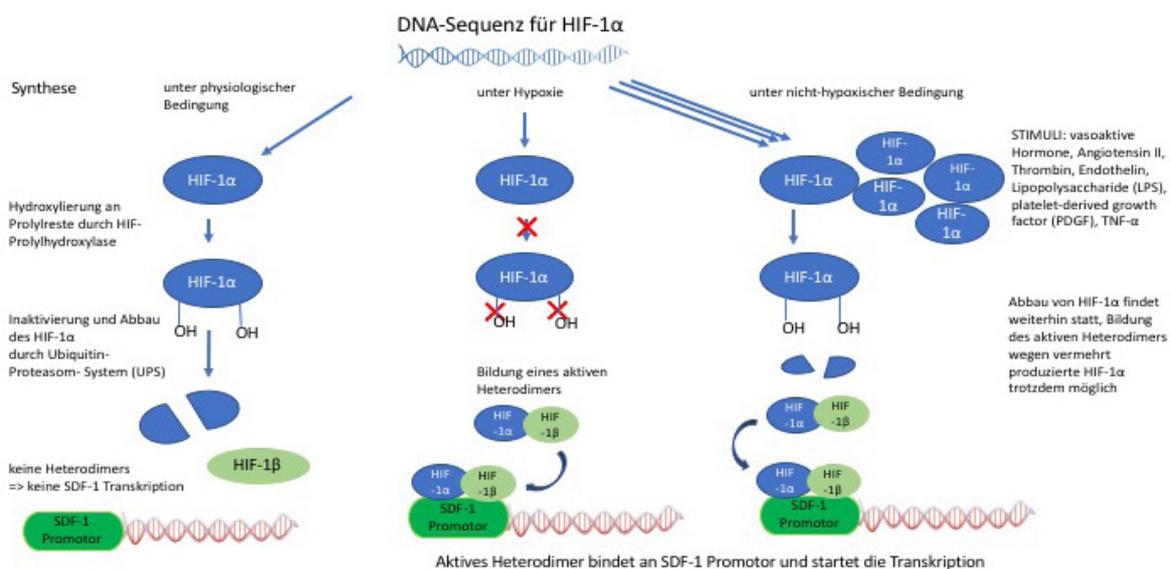


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Stammzellhomings mittels HIF-Pathway, modifiziert nach Dery et al. und Page et al. [122, 123]

Unter physiologischen Bedingungen wird die HIF-1 α -Untereinheit durch das UPS abgebaut, eine Bildung des aktiven HIF-1 ist nicht möglich (links). Unter Hypoxie stabilisiert sich HIF-1 α , aufgrund einer fehlenden Hydroxylierung und eines infolgedessen ausfallenden Abbaus; HIF-1 α bildet mit der HIF-1 β -Untereinheit den aktiven Transkriptionsfaktor HIF-1, welcher schließlich an den Promotor des SDF-1-Gens bindet und die Transkription startet. Auch nicht-hypoxische Stimuli können einen Anstieg der SDF-1 Expression verursachen, in dem vermehrt HIF-1 α -Untereinheiten synthetisiert werden (rechts).

2.6.1 Das Enzym HIF-Prolylhydroxylase und die Prolylhydroxylase-Inhibitoren (PHI)

Das Enzym Prolyl-4-Hydroxylase (4-PH) ist ein Enzymkomplex aus vier Untereinheiten, 2x α , 2x β , wobei erstere noch zusätzliche Isoformen (PH 1-3) aufweisen. Prolylhydroxylasen (PH) sind vor allem bei der Biosynthese von Kollagen erforderlich und spielen eine wichtige Rolle in der Sauerstoffhomöostase, da sie sauerstoffabhängig an der Stabilisierung von HIF- α beteiligt sind. In Abhängigkeit des Wirkungsorts bzw. des Substrats (Kollagen oder HIF- α) wird unterschieden zwischen Kollagen-4-PH oder HIF-4-PH [130]. Gemeinsam ist, dass sich reduziertes Eisen (Fe^{2+}) in ihrem aktiven Zentrum befindet und dass sie zur Aktivität α -Ketoglutarat, zur Regeneration Ascorbat benötigen. Während die Inhibition von Kollagen-4-PHI ein interessanter Angriffspunkt in der Therapie von fibrotischen Krankheitsbildern ist, gelten HIF-PHI als potentielles Therapeutikum anämischer bzw. ischämischer Erkrankungen. Es existieren seit 2018 bereits vier HIF-PHI, die zur Behandlung der renalen Anämie bei chronischer Niereninsuffizienz zugelassen wurden [131-135]: Roxadustat (Zulassung 2018 in China, seit 2021 in Dtl.), Daprodustat (seit 06/2020 in Japan und seit 02/2023 in den USA), Molidustat seit 01/2021 in Japan und seit 05/2023 in den USA), Vadadustat (seit 06/2020 in Japan und 04/2023 in der EU). Wie oben bereits erwähnt, gibt es eine Reihe von Genen, die durch HIF-1 aktiviert werden, daher haben die ersten positiven Ergebnisse in der Behandlung mit HIF-PHI zu weiteren intensiveren Forschungen in anderen ischämischen Formkreisen geführt [136]. In der ischämischen Herzforschung wurde die kardioprotektive Wirkung von HIF-1 durch die Inhibition von HIF-PHI von mehreren Arbeitsgruppen untersucht. So wurde beispielsweise die pharmakologische Präkonditionierung durch eine einmalige intraperitoneale Injektion des HIF-PHI Dimethyloxalylglycine (DMOG) vor einem Myokardinfarkt mit der klassischen ischämischen Präkonditionierung verglichen. Dabei wurde eine verbesserte Myokardfunktion festgestellt [137]. DMOG ist ein zellpermeabler Pan-PHI, der an die Bindestelle der PH kompetitiv bindet und das Enzym dadurch inaktiviert. Als (Prä-/Post-) Konditionierung wird in der Medizin ein Mechanismus bezeichnet, bei dem durch kurze ischämische Reize körpereigene reparative Prozesse angestoßen werden. Das Prinzip der ischämischen Konditionierung wurde erstmals durch Murry et al. im Jahre 1986 beschrieben [138].

In der nachfolgenden Tabelle wurden Studien aufgeführt, die die Wirkung einer PHI auf die kardiale Funktionalität untersucht haben. Dabei fällt auf, dass eine PH-Inhibition mit einer verminderten Inflammationsreaktion, einer reduzierten Infarktgröße, einem verbesserten Remodeling sowie einer verbesserten kardialen Pumpfunktion einhergeht. Jedoch hat keine dieser Studien die Mobilisierung und Rekrutierung von CXCR4⁺-Zellen aus dem Knochenmark zum Herzen näher betrachtet. Unsere Arbeitshypothese war, dass die Hemmung des HIF-1 α Abbaus, durch selektive Inhibition der Prolyl-Hydroxylase, die Expression von SDF-1 bzw. CXCR4 in vivo stimulieren und dadurch die Mobilisierung von CXCR4⁺-Zellen in das ischämische Herz steigern würde. Aufgrund des positiven Effektes der SDF-1/CXCR4-Achse hinsichtlich Angiogenese, Stammzellhoming und Stammzellretention könnte eine verbesserte postischämische kardiale Reparatur erreicht werden.

Einge- setztes Mittel	Tier- modell	Mechanis- mus	Interakti- ve Mole- küle	Berichtete Ergebnisse	Referenz
DMOG	Murine IR in vivo	PHD Inhibi- tion (PHDI)	HIF-1 α , A2BR	Reduzierte Infarktgröße, ver- gleichbare Kardioprotektion wie bei ischämischer Präkonditionie- rung	Eckle et al. [130]
DMOG	Rabbit IR in vivo	PHD Inhibi- tion (PHDI)	IL-8, HO-1	Reduzierte Infarktgröße	Ockaili et al. [132]
FG-2216	Rat MI in vivo	PHD Inhibi- tion (PHDI)	HIF-1 α , HIF- 2 α	Verbessertes Remodelling, ver- besserte Herzfunktion	Philipp et al. [133]
GSK360A	Rat MI in vivo	PHD Inhibi- tion (PHDI)	EPO, HO-1, Hb	Erhöhte Angiogenese und Eryth- ropoese, verbesserte Herzfunk- tion	Bao et al. [134]
siRNA	Murine IR in vivo	PHD2 Inhibi- tion (PHDI)	HIF-1 α	Reduzierte Infarktgröße	Eckle et al. [130]
siRNA	Murine IR in vivo	PHD2 Inhibi- tion (PHDI)	HIF-1 α , HO- 1, iNOS	Reduzierte Infarktgröße, verbes- serte Angiogenese und Herz- funktion	Natarajan et al. ([135]w
shRNA	Murine IR in vivo	PHD2 inhibi- tion (PHDI)	HIF-1 α , VEGF	verbesserte Angiogenese und Herzfunktion	Huang et al. [136]
DMOG	Murine IR in vivo	PHD2 Inhibi- tion (PHDI)	TNF, MIP	Verminderte Inflammation, Nek- rose und Apoptose, verbesserte Funktion	Natarajan et al. [137]
siRNA	Murine IR in vivo	PHD2 Inhibi- tion (PHDI)	TNF, MIP	Verminderte Inflammation, Nek- rose und Apoptose, verbesserte Funktion	Natarajan et al. [137]
PHD2 hy- pomorph mice	Murine IR in vivo	PHD2 Inhibi- tion (PHDI)	HIF-1 α & - 2 α , EPO, GLUT-1 & - 4, PFK, TPI, PGI, eno- lase	Erhöhte Glycolyse, reduzierte Infarktgröße und verbesserte Funktion	Hyvarinen et al.[138]

Tabelle 2 : Prolylhydroxylase-Inhibition in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen, modifiziert nach „Molecular Mechanisms of Action and Therapeutic Uses of Pharmacological Inhibitors of HIF-Prolyl 4-Hydroxylases for Treatment of Ischemic Diseases“ von Selvaraju et al. (Antioxid Redox Signal. 2014 Jun 1; 20(16): 2631–2665)

DMOG = Dimethyloxallylglycine; EPO =Erythropoetin; GLUT = Glucosetransporter; Hb = Hämoglobin; HIF = Hypoxia inducible factor; HO-1 = Hämoxygenase-1; IR= ischämische Reperfusion; MI = Myokardinfarkt; MIP = Macrophage inflammatory factor; PFK = Phosphofruktokinase; PHDI = Prolylhydroxylase-Inhibitor/inhibition; RNA = Ribonukleinsäure; shRNA= small hairpin RNA; siRNA= small interfering ribonucleic acid; VEGF = Vascular endothelial growth factor = Gefäßwachstumsfaktor; TNF = Tumornekrosefaktor.

III. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die Interaktion von SDF-1 mit CXCR4 löst eine Reihe intrazellulärer Vorgänge aus, die unter anderem über die Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) oder Phosphatidylinositol-1-kinase (PI3K)/Akt-Kinase/Proteinkinase B indirekt zur Genexpression, Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Reduktion der Apoptoserate beitragen [23]. Darüber hinaus kann die SDF-1/CXCR4-Achse möglicherweise die Zellmigration und Proliferation von c-kit⁺ kardiovaskuläre Progenitorzellen stimulieren, die entweder zu Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Kardiomyozyten differenzieren [146] oder parakrin zur kardialen Regeneration und Reparatur beitragen können [49]. Es gibt Arbeiten, die darauf hindeuten, dass sich knochenmarkstämmige endotheliale Vorläuferzellen, darunter CD34⁺Flk1⁺CXCR4⁺, in verletzte Gefäßwände integrieren, in adulte Endothelzellen differenzieren und somit an der Reendothelialisierung und Neovaskularisierung teilnehmen [147-149]. Auch CXCR4⁺VEGFR1⁺ Progenitorzellen (sog. Hämangiozyten) [150] oder CXCR4⁺CD11b⁺ knochenmarkstämmige Zellen [151] können mittels Sekretion von angiogenetischen Wachstumsfaktoren (VEGF = vascular endothelial growth factor) zu den genannten Prozessen beitragen. Aufgrund des positiven Effektes der SDF-1/CXCR4-Achse hinsichtlich Angiogenese, Zellhoming und Zellretention gab es bereits einige Versuche den Gehalt an SDF-1 zu erhöhen [18, 152-154], die insgesamt eine verbesserte Herzfunktion und Mortalitätsrate zeigten, aber meist von einem invasiven/operativen Zugangsweg Gebrauch machten. Bergman et al. hat zwar prinzipiell den Nachweis für eine kardiale Regeneration erbracht, die Experimente konnten jedoch nicht klären, ob diese Regeneration auf einer Replikation von Kardiomyozyten oder eine de novo Bildung aus einem Progenitorpool zurückzuführen ist [37]. Hsieh et al. konnte mit ihrem Versuch indirekt zeigen, dass die kardiale Regeneration postischämisch durch eine de novo Differenzierung der Vorläuferzellen ermöglicht wird [50]. In 2008 postulierte Nelson et al., dass sich CXCR4⁺/Flk1⁺ Vorläuferzellen während ihrer Entwicklung/Differenzierung eine kardiovaskuläre Richtung einschlagen. Senyo et al. postulierten in 2013 jedoch, dass Progenitorzellen kaum zur kardialen Regeneration nach einem Herzinfarkt beitragen würden, da neue Kardiomyozyten sich vor allem durch Teilung vorbestehender Kardiomyozyten (ca. 0,76%/Jahr) entstehen [155]. Es gibt jedoch weitere Veröffentlichungen, die zeigen, dass Progenitorzellen sich durchaus zu Kardiomyozyten differenzieren können [156]. Die Frage nach der Herkunft der neuen Kardiomyozyten bleibt weiterhin offen. Es ist auch nicht eindeutig, welche Rolle die CXCR4-positiven Vorläuferzellen im Regenerations-/Reparaturprozess einnehmen und um welche Zelltypen (Endothelzellen, Monozyten/Makrophagen, Neutrophile etc.) es sich dabei handelt. In diesem komplexen kardialen Regenerationsvorgang scheint die Inflammationsreaktion eine Schlüsselposition einzunehmen [157]. Postischämisch führt eine starke Inflammationsreaktion möglicherweise zur Herzruptur durch zusätzlichen Verlust der Kardiomyozyten. Eine prolongierte Inflammation kann ein verstärktes Remodeling nach sich ziehen, welches eine größere Herzdilatation zur Folge hat. Aus diesem Grund ist eine balancierte und transiente inflammatorische Antwort bedeutend für eine gute kardiale Heilung [104]. Da Makrophagen bei der Inflammationsreaktion eine weitreichende Rolle einnehmen, könnte die Identifikation der unterschiedlichen Makrophagenphänotypen sowie deren Funktion zum besseren Verständnis der postischämischen Inflammationsreaktion beitragen [158]. Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe von transgenen CXCR4-EGFP Mäusen die Rolle von CXCR4⁺-Zellen

im ischämischen Herzen aufzuklären und einen neuen therapeutischen Ansatz mit einem PHI zur Verbesserung der Herzfunktion zu untersuchen.

Folgende Fragen wurden dabei von uns formuliert:

- 1) Um welchen Zelltyp kann es sich bei der CXCR4⁺-Population handeln (Endothelzellen, Monozyten/Makrophagen, Neutrophile etc.)?
- 2) Welche Rolle nehmen CXCR4⁺-Zellen bei kardialen Reparaturprozessen ein?
- 3) Inwiefern lassen sich durch die Inhibition von PH die CXCR4⁺-Zellen mobilisieren und zum infarzierten Herzen rekrutieren? Wie wirkt sich die Therapie mit einem PHI auf die Herzfunktion aus? (siehe Abb. 10)

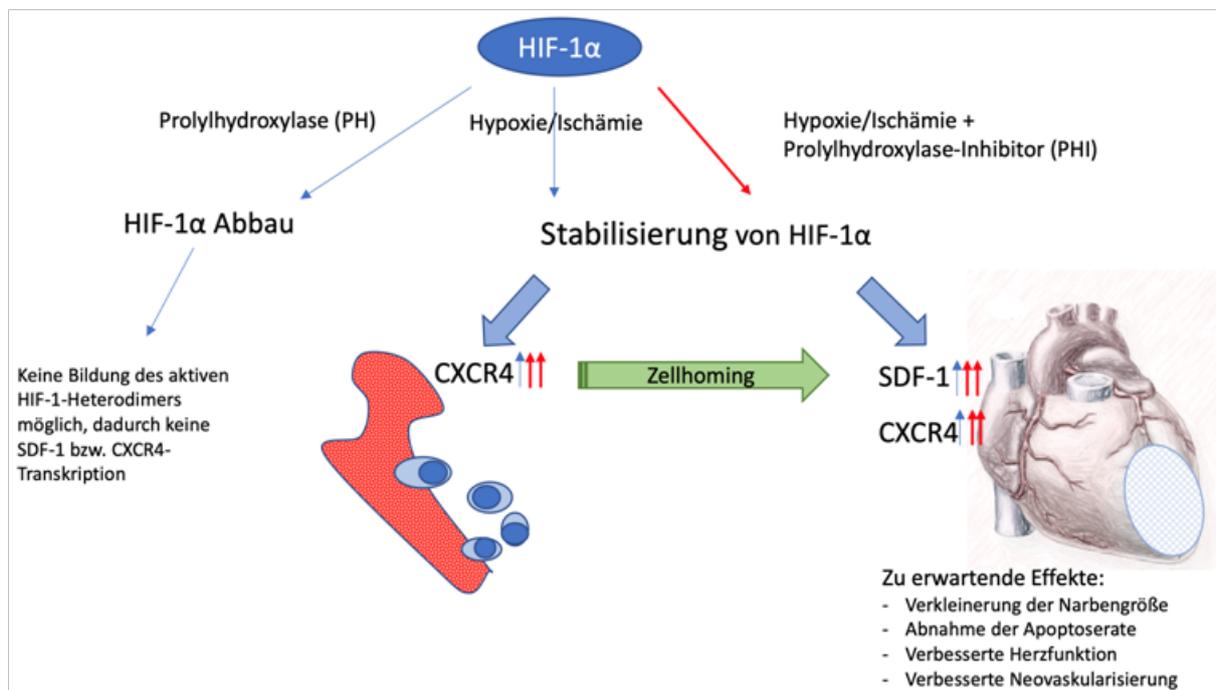


Abbildung 10: Therapeutischer Ansatz zur Verbesserung der Mobilisierung und Homing von CXCR4⁺-Zellen, modifiziert nach Ghadge et al., „Prolyhydroxylase inhibition induces SDF-1 associated with increased CXCR4⁺/CD11b⁺ subpopulations and cardiac repair“ (J Mol Med (Berl) 2017; 95(8): 825–837)

Unter physiologischer Bedingung wird HIF-1α durch das Enzym Prolyhydroxylase inaktiviert und über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut. Unter Hypoxie wird HIF-1α stabilisiert und bildet mit dem HIF-1β ein aktives Heterodimer, welches in den Zellkern transloziert, um sich dort an die Promotorregion des SDF-1 bzw. CXCR4-Gens zu binden, und dadurch die Transkription initiiert. Unserer Hypothese nach müsste eine Behandlung mit PHI die SDF-1 Expression im ischämischen Herzen und Proliferation von CXCR4-Zellen im Knochenmark verstärken und dadurch das Homing zum ischämischen Herzen begünstigen.

IV. VERSUCHSTIERE, MATERIAL UND METHODEN

4.1 Versuchstiere

4.1.1 Mausstamm und Zucht der verwendeten Tiere

Für die verschiedenen Versuchsgruppen wurden Mäuse im Alter von 8-12 Wochen herangezogen.

Um die CXCR4⁺-Zellen im Knochenmark und im Herzen zu identifizieren wurden transgene CXCR4-EGFP BAC Reporter-mäuse verwendet.

Reporter-mäuse tragen ein sogenanntes Reporter-gen, dessen Anwesenheit sich nach Überführung in einen Zielorganismus – hier: eine Maus – leicht nachweisen lässt. Mit Hilfe von Reporter-gen-Konstruktionen kann verfolgt werden, ob und in welchem Ausmaß, fremde DNA in Zielzellen eingebracht werden konnte. Das Reporter-gen kann erst dann wieder aktiv und exprimiert werden, wenn entsprechende DNA-Abschnitte vorhanden sind.

Die verwendeten Versuchsmäuse tragen zusätzlich zu den regulatorischen Sequenzen des CXCR4-Promotors ein grün fluoreszierendes Reporter-gen (EGFP – enhanced green fluorescent protein) am 3'-Ende eines korrespondierenden ca. 150-200kb langen, artifiziellen, bakteriellen Chromosoms (BAC). Das erste BAC Klon mit dem kompletten CXCR4 Genom (clone# RP23-9A20) wurde durch computergestützte Simulation („in silicio“) identifiziert und erstmals durch BACPAC Resource Center (BPRC) at Children's Hospital Oakland Research Institute in Oakland, California, USA generiert und mittels des Vektors pLD53.SC-AB modifiziert (The Gene Expression Nervous System Atlas (GENSAT) Project, The Rockefeller University (New York)). Die erste Generation der transgenen CXCR4-EGFP BAC Mäuse wurde uns durch R. Miller, Department of Molecular Pharmacology and Biological Chemistry, Northwestern University Medical School, Chicago, zur Verfügung gestellt. Abbildung 12 zeigt exemplarisch den Nachweis einer CXCR4⁺-EGFP⁺-Expression im Knochenmark.

Um die Zucht der CXCR4-EGFP BAC Mäuse aufzubauen wurden die Foundertiere mit C57BL/6N Mäusen verpaart, um Nachkommen mit möglichst gleichem genetischem Hintergrund zu generieren (siehe Abbildung 11). Sowohl Männchen als auch Weibchen befanden sich im Alter von 8 bis 10 Wochen, mit einem Körpergewicht von 20-25 g. Die C57BL/6N-Tiere stammten aus den Zuchtlaboratorien von Charles River in Sulzfeld und sind auf C.C. Little zurückzuführen. Dieser erhielt die Mäuse ursprünglich von Abbie Lathrop und schuf ausgehend von dem C57BL-Stamm 10 Teillinien. Die sechste wurde 1937 separiert und 1974 Charles River zur Verfügung gestellt [159]. Transgene Tiere sind einmalige Mutanten, die ständig weitergezüchtet werden müssen, um den Stamm vor dem Aussterben zu bewahren. Um den Anteil der transgenen Tiere zu erhöhen wurde zusätzlich Inzucht durchgeführt. Während der Züchtung wurden nicht nur die Fortpflanzungsleistung und Koloniegröße regelmäßig beurteilt, sondern besonders auf potenzielle genetische Drifts geachtet, da bei transgenen Mausstämmen mit Inzuchthintergrund immer wieder Spontanmutationen auftreten können, welche den Phänotyp des Stamms verändern und erheblich die Forschungsergebnisse beeinflussen. Um die Auswirkungen von genetischer Drift bei transgenen CXCR4-EGFP-Mäusen zu mindern, wurden alle 4 bis 5 Generationen Rückkreuzungen durchgeführt [159]. Hierdurch wird der genetische Hintergrund regelmäßig aufgefrischt, so dass sich die Versuchstiere genetisch so ähnlich wie möglich sind, um die Reproduzierbarkeit und Validität der Versuchsergebnisse zu gewährleisten.

Da es keine sicher homozygot transgenen Tiere gab, musste jeder Wurf auch auf Transgenität getestet werden. Die Genotypisierung der Tiere erfolgte mittels PCR.

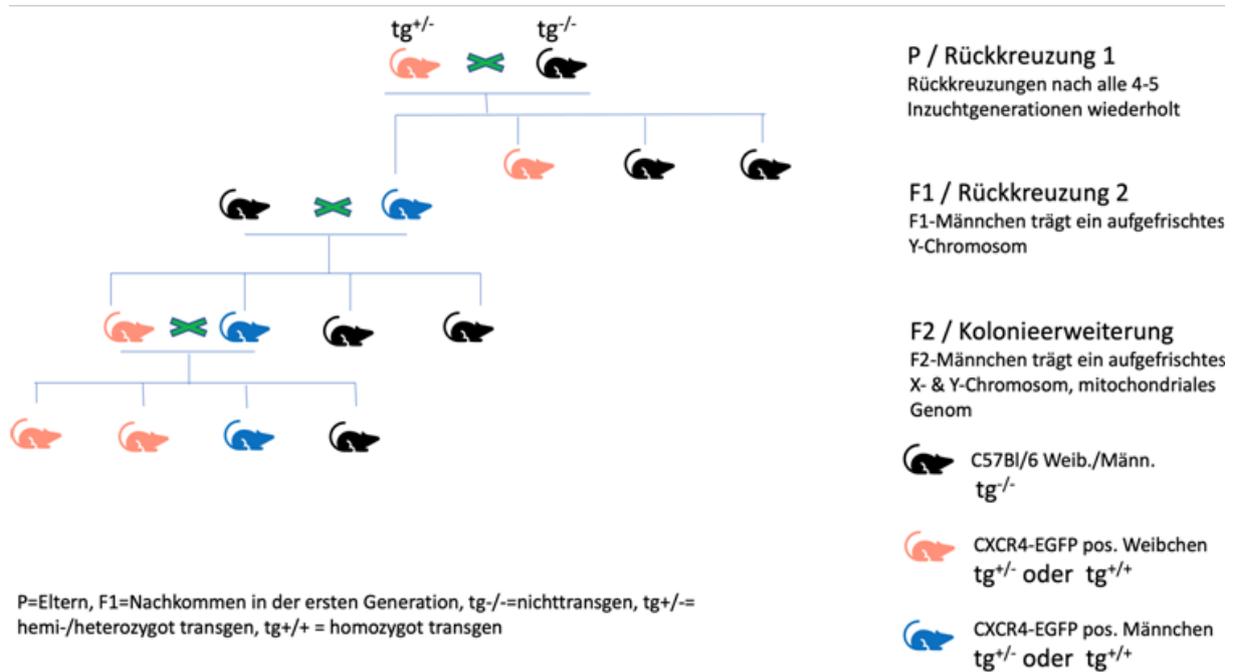


Abbildung 11: Zucht-/Verpaarungsschema, modifiziert nach Fontaine, D.A. and D.B. Davis, "Attention to Background Strain Is Essential for Metabolic Research: C57BL/6 and the International Knockout Mouse Consortium." (Diabetes, 2016. 65(1): p. 25-33.)

Zur Auffrischung des genetischen Hintergrunds werden nach 4-5 Generationen Inzucht zwei Rückkreuzungen durchgeführt.

Rückkreuzung 1: CXCR4-EGFP BAC Weibchen wurde mit C57BL/6 Mäusen verpaart. Die männlichen Nachkommen aus dieser Kreuzung tragen dann ein „aufgefrischtes“ Y Chromosom.

Rückkreuzung 2: CXCR4-EGFP positive Männchen mit dem aufgefrischten Y-Chromosom wurden mit einem C57BL/6 Weibchen verpaart. Die männlichen Nachkommen aus der zweiten Rückkreuzung tragen ein „aufgefrischtes“ X Chromosom, Y Chromosom und mitochondriales Genom (Mitochondriales Genom wird maternal vererbt).

Kolonieerhaltung und Erweiterung: Durch erneute Inzucht kann die nun aufgefrischte Kolonie erhalten und erweitert werden.

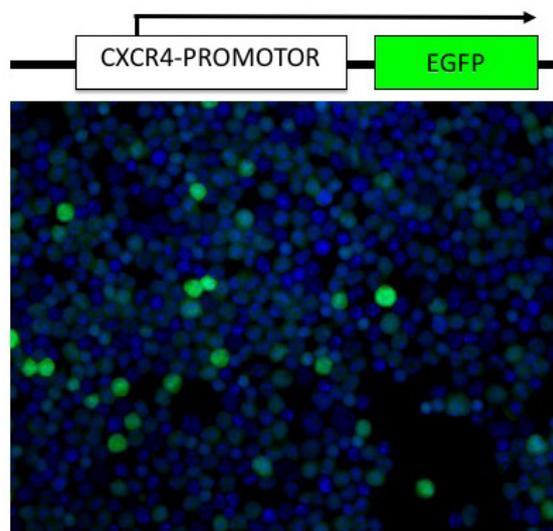


Abbildung 12:

Grün fluoreszierende CXCR4⁺-EGFP⁺-Zellen im Knochenmark nach Immunofluoreszenzfixation (zur Verfügung gestellt durch Maximilian Doppelhammer (Klinikum Großhadern, Medizinische Poliklinik und Klinik I, Ludwig-Maximilians-Universität, München))

4.1.2 Haltungsbedingungen

Die Zucht und Haltung der Versuchstiere erfolgten in einem offenen Haltungssystem am Standort Großhadern, der Medizinischen Klinik und Poliklinik I, Marchioninstraße 15, 81377 München. Die Mäuse in klimatisierten Räumen mit einem 12 Stunden Tag/Nacht-Lichtzyklus in Standardkäfigen vom Typ II long gehalten. Die Raumtemperatur betrug konstant zwischen 19°C und 21°C bei einer Luftfeuchtigkeit von ca. 50 %. Als Nestbaumaterial wurden Plastikhäuschen und Zellstofftücher verwendet. Die Käfige wurden mit JRS Lignocel Hygienestreu eingestreut und regelmäßig gewechselt. Die Tiere erhielten Wasser und eine Standarddiät ad libitum. Ein Käfig enthielt maximal 4 Tiere, wobei operierte, narkotisierte Tiere bis zum vollständigen Erwachen einzeln gehalten wurden.

Der Tierbestand wurde in regelmäßigen Abständen, gemäß FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) Empfehlungen, mikrobiologisch auf speziesrelevante Pathogene untersucht.

4.1.3 Gesetzliche Bestimmungen

Gemäß §8 Tierschutzgesetz wurde die experimentelle Durchführung durch die Regierung von Oberbayern unter den GZ: 55.2-1-54-2531-139-10 genehmigt. Die chirurgischen Eingriffe wurden in einem dafür vorgesehenen Operationsraum der Medizinischen Klinik und Poliklinik I im Klinikum Großhadern durchgeführt (Forschungslabor B, Raum U1 312).

4.2 Versuchsdesign

4.2.1 Versuchsgruppen

4.2.1.1 Kontrollgruppe ohne Ischämie

Tiere aus der Kontrollgruppe erhielten einmal täglich, über zwei bzw. sieben Tage, eine Injektion mit 50 µl einer physiologischen Kochsalzlösung intraperitoneal. Die Tiere wurden mit einer Standarddiät (ssniff) gefüttert.

4.2.1.2 Versuchsgruppe mit Ischämieinduktion

Tiere aus dieser Versuchsgruppe wurden am Tag 0 einem chirurgischen Eingriff unterzogen. Hierbei wurde die linke Koronararterie (engl. LAD = left anterior descending) über eine offene Thorakotomie mit einer Naht permanent unterbunden. Hierdurch wird ein linksventrikulärer Infarkt herbeigeführt. Nach 48-72h und nach 7 Tagen wurden überlebende Mäuse zu einer FACS-Messung herangezogen. Während dieser Zeit erhielten die Tiere neben der Analgesie täglich 50 µl einer physiologischen Kochsalzlösung intraperitoneal. Einige Tiere aus dieser Versuchsgruppe wurden 30 Tage postoperativ zur Bestimmung der Hämodynamik herangezogen.

4.2.1.3 Therapiegruppe nach einer Ischämieinduktion

Um unsere Arbeitshypothese bezüglich eines neuen therapeutischen Ansatzes zu untersuchen erhielten Tiere aus der Therapiegruppe postischämisch, einmal täglich, über zwei bzw. sieben Tage,

zusätzlich den PHI DMOG in der Dosierung von 80 mg/kg intraperitoneal appliziert. Nach Ablauf der Zeit – 7 bzw. 30 Tage postoperativ – traten überlebende Tiere in eine weitere Versuchsphase über.

4.3 Versuchsdesign und Zeitverlauf

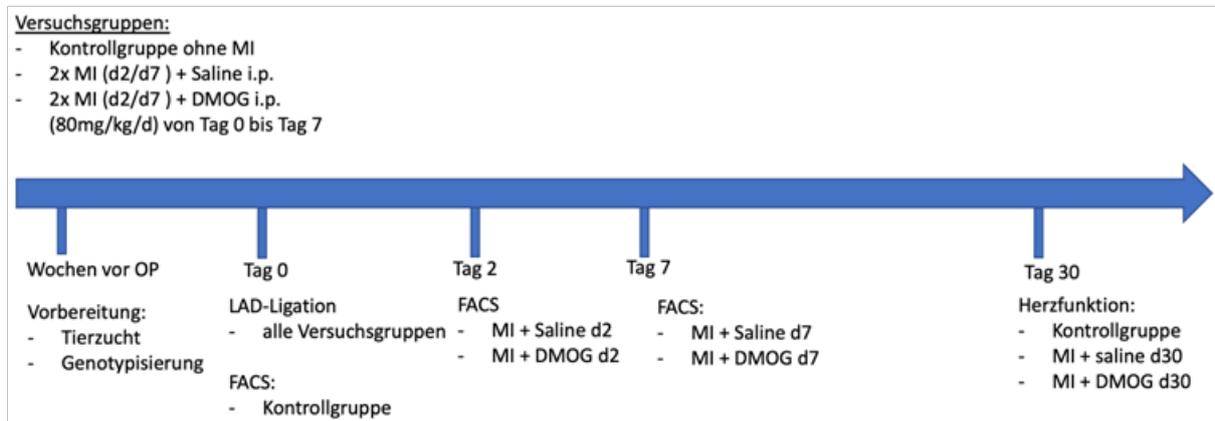


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Versuchsdesigns und zeitlicher Verlauf

4.4 Analgesie

Um eine adäquate peri- und postoperative Analgesie zu gewährleisten erhielten alle Tiere, unabhängig von ihrer Gruppenzugehörigkeit, unmittelbar vor Operationsbeginn, Buprenorphin in der Dosierung 0,1 mg/kg Körpergewicht. Die Analgesie wurde postoperativ über zwei bzw. sieben Tage mit intraperitonealen Buprenorphininjektionen aller acht Stunden fortgeführt.

Buprenorphin (Temgesic)	Essex Pharma, München
Eppendorf-Cups	Eppendorf, Hamburg
Dimethyloxallylglycin (DMOG)	Frontier Scientific, Inc
NaCl 0,9%	Braun, Melsungen
Standarddiät	ssniff
1ml Spritzen BD Micro-Fine	Becton Dickinson, Heidelberg

Tabelle 3: Verwendete Materialien peri- und postoperativ

4.5 Genotypisierung durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Genotypisierung wurde genomische DNA aus Schwanzspitzen und Ohrstanzen gewonnen. Beim Absetzen werden die Tiere gekennzeichnet und hierdurch fiel das Material an, welches bis zur Anwendung bei –20°C konserviert werden musste. Die Expression des CXCR4-BAC-Gens wurde mittels einer Polymerase-Ketten-Reaktion verifiziert.

Das PCR-Protokoll wurde 2007 von Rhonda Wideman etabliert und stand seitdem der Arbeitsgruppe zur Verfügung.

4.5.1 Verwendete Materialien und Substanzen im Rahmen der PCR

Agarose	Roth, Karlsruhe
Aqua dest	Braun, Melsungen
DTT	ICN Biomedicals, Ohio, USA
Eppendorf-Cups	Eppendorf, Hamburg
Ethidiumbromid	Sigmal-Aldrich, St. Lous, USA
Gelatine	Sigmal-Aldrich, St. Lous, USA
CXCR4	wEurofins MWG Operon, Ebersberg
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
KCl	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTP's	Fermentas, St. Leon-Rot
Proteinase K 10mg/ml	Sigmal-Aldrich, St. Lous, USA
SDS	Roth, Karlsruhe
TAE-Puffer	Sigmal-Aldrich, St. Lous, USA
Taq DNA Polymerase (rekombinant)	Fermentas, St. Leon-Rot

Tabelle 4: Materialienliste im Rahmen der PCR

4.5.2 Primer

Die Produktlänge für das CXCR4-EGFP-Gen beträgt 300 bp. Für die Polymerase-Ketten-Reaktion wurden folgende Primer-Sequenzen verwendet:

Gene	Primer (sense)	Reverse Primer (antisense)
CXCR4	5' ACCACGGCTGTAGAGCGAGT 3' BAC	5'TAGCGGCTGAAGCACTGCA 3' GFP

Abbildung 14: Primersequenzen für die Genotypisierung

4.5.3 DNA Isolierung

Für die DNA-Isolierung wurden die Ohrstanzen bzw. Schwanzspitzen über Nacht mit jeweils 150 µl des Prämix in einem Heizblock (HLC, Bovenden) bei 56°C inkubiert. Am Folgetag wurden die Proben mit einem Vortexmischer geschüttelt (Scientific Industries, NY, USA), zentrifugiert (Hettich, Tuttlingen). Nach Überführung des Überstands in ein neues Eppendorf-Cup wurden die Proben bei 90°C über 30 Minuten inkubiert, um die Proteinase K zu inaktivieren.

Verdaupuffer (10x)	500 mM KCl
	100 mM Tris-HCl, pH 8,3
	25 mM MgCl ₂
	0,1 mg/ml Gelatine
Prämix (n=10)	Verdaupuffer (10x) 150 µl
	SDS 10 % 0,75 µl
	0,2 m DTT 175 µl
	10 mg/ml Proteinase K 30 µl
	Aqua dest. 1170 µl

Tabelle 5: Pipettierschema zur Herstellung des Prämix für die DNA-Isolierung

4.5.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die PCR wurden 2 µl der isolierten DNA zu 48 µl Mastermix in PCR-Analyse Cups pipettiert. H₂O diente als Qualitätskontrolle.

DNA	PCR-Puffer (10x)	MgCl ₂ (25mM)	d NTP (2mM)	CXCR4 se	CXCR4 as	Aqua dest.	Taq
2,0 µl	5,0 µl	3 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	32,3 µl	0,2 µl

Tabelle 6: Pipettierschema zur Herstellung des Mastermix für die PCR-Analyse

Die PCR erfolgte in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen) mit folgendem Programm: jeweils für 1 min 94°C, 59°C und 72°C in je 40 Zyklen.

4.5.5 Gelelektrophorese

4.5.5.1 Gelherstellung

Um DNA-Fragmente zu trennen wurde Agarosegel verwendet. Für die Gelherstellung wurden 4 g Agarose in einem Erlenmeyerkolben mit 200 ml TAE Puffer, welcher als Stromleiter diente, vermischt. Die Lösung wurde in einer Mikrowelle bei 530 W für 5 min erwärmt. Das Gemisch wurde anschließend auf einem Rühr Tisch (Heidolph, Schwabach) bei 700 rpm für ca. 30 min gerührt. Sobald eine Temperatur von 60°C erreicht wurde, wurden 20 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und das Gel in eine Gelkammer (Consort, Turnhout, Belgien) gegossen.

4.5.5.2 Durchführung der Elektrophorese

Mit Hilfe der Elektrophorese, welche bei 140 V für 45 min lief, konnten die DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die negativ geladene DNA wurde dabei auf der Kathodenseite des Gels aufgetragen. Nach Anlage der Spannung wanderte die DNA-Fragmente zur Anode. Anhand der Anzahl von Basenpaaren konnten die CXCR4⁺-BAC Mäusen bestimmt werden. Bei CXCR4-EGFP BAC Reporterermäusen würde sich ein PCR-Produkt des veränderten Rezeptors bei 300 bp wie abgebildet zeigen.

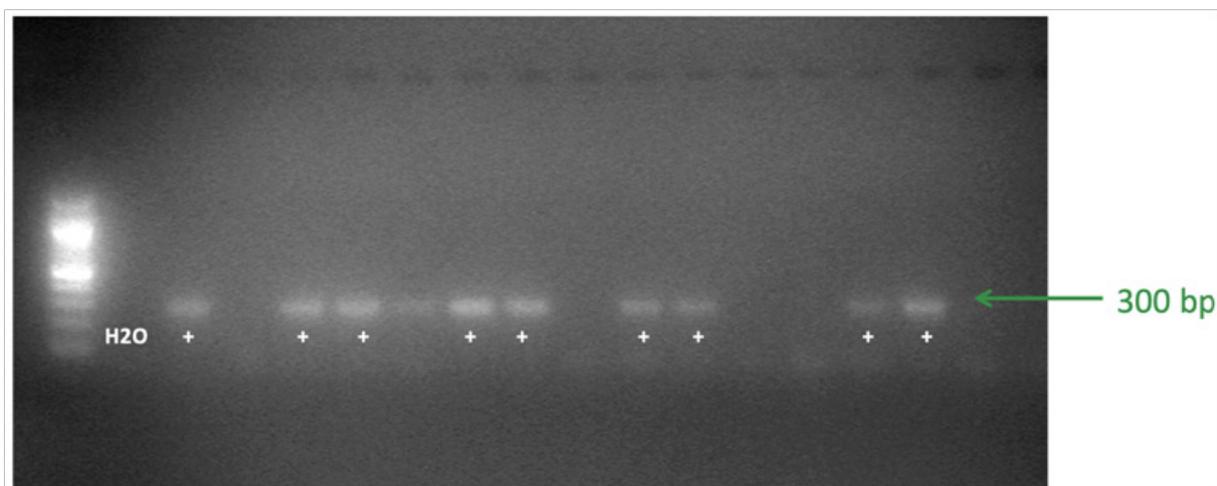


Abbildung 15: Beispiel einer durchgeführten Gelelektrophorese zur Genotypisierung der CXCR4-EGFP positiven Mäuse. CXCR4⁺EGFP⁺-Mäuse weisen Banden bei etwa 300bp auf. Ganz links: Molekulargewichtsmarker in 100 bp Schritten.

4.6 Infarktmodell – die LAD-Ligation

4.6.1 Anästhesie

Für die Dosisbestimmung der Anästhetika wurden die Tiere präoperativ gewogen (ScoutPro, Ohaus, Pine Brook, USA). Die Applikation der Anästhetika erfolgte intraperitoneal mit einer Kombination aus 13 mg/kg Xylazin und 65 mg/kg Ketamin. Die geeignete Narkosetiefe und somit das Erreichen der chirurgischen Toleranz wurde durch einen nicht mehr auslösbaren Zwischenzehenreflex überprüft.

4.6.2 Analgesie

Als Analgetikum wurde Buprenorphin intraperitoneal in der Dosierung 0,1 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Unmittelbar präoperativ wurde erstmalig das Schmerzmittel injiziert, um eine vollständige perioperative Analgesie zu gewährleisten. Die postoperative Analgesie erfolgte durch dreimal tägliche intraperitoneale Buprenorphinjektionen über sieben Tage.

4.6.3 Operative Vorgehensweise

Acepromacin, Vetranquil 1%	Ceva, Düsseldorf
Buprenorphin (Temgesic)	Essex Pharma, München
Dexpanthenol-Augensalbe (Bepanthen)	Bayer, Leverkusen
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Enthaarungscreme, Veet	Reckitt Benckiser, Mannheim
Heparin-Natrium 25.000 I.E./5ml	Braun, Melsungen
Ketaminhydrochlorid, Ketamin-Inresa 5%	Inresa, Freiburg
Braun 0,9%	Braun, Melsungen
Kanülen, Sterican	Braun, Melsungen
Klebestreifen, Durapore	3 M Healthcare, Neuss
Mikrochirurgische Instrumente	FST, Heidelberg
Nahtmaterial, Prolene 5-0, 8-0	Ethicon, Norderstedt
Povidon-Iod, Braunol	Braun, Melsungen
Spritzen 1ml, 2 ml, 10 ml BD Plastipak	Beckton Dickinson, Heidelberg
Xylazinhydrochlorid, Rompun 2%	Bayer, Leverkusen

Tabelle 7: Verwendete Materialien und Medikamente im Rahmen der LAD-Ligation

Mit dem Erlöschen des Zwischenzehenreflex konnte der chirurgische Eingriff gestartet werden. Dexpanthenol-Augensalbe verhinderte das Austrocknen der Kornea während des Eingriffs. Die Tiere wurden auf einer Wärmeplatte mittels Klebestreifen über den Gliedmaßen in die stabile dorsale Lage gebracht. Die Wärmeplatte gewährleistete eine konstante Körpertemperatur von ca. 37,5°C. Eine rektale Messsonde eines Mess-Wärmesystem (FMI, Seeheim) ermöglichte die kontinuierliche Temperaturkontrolle.

Initial wurde das OP-Areal vorbereitet. Hierfür wurde das Areal mit 70 %igem Ethanol entfettet, die OP-Stelle mit einer Enthaarungscreme enthaart und mit Jod desinfiziert. Anschließend wurde der Oberkiefer mittels eines dünnen Gummibands an der Wärmeplatte fixiert. Vorbereitend für die Intubation unter Sicht wurde über den Glandulae mandibularis ein ca. 0,7 mm langer Hautschnitt

angelegt und die Speicheldrüsen stumpf frei präpariert. Nach Freilegung der Trachea wurden die Tiere intubiert. Der Beatmungsschlauch wurde mit Klebeband fixiert. Der Hautschnitt wurde mit einem 5-0 Faden fortlaufend vernäht. Die Beatmung erfolgte über ein Minivent-Beatmungssystem (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) mit einem Atemzugvolumen von 200 μ l und einer Frequenz von 150 Zügen/min. Vor Beginn der Thorakotomie erhielten die Tiere 0,1 mg/kg KM Buprenorphin zur Analgesie. Die Operation erfolgte unter Sicht mit Hilfe eines Mikroskops (Leica A60, Wetzlar). Als OP-Zugang diente ein ca. 1 cm Hautschnitt im zweiten Interkostalraum, linksseitig zwischen Sternum und der linken Axilla. Nach Anlage des Hautschnitts wurden der Musculus pectoralis und der Musculus intercostalis durchtrennt. Der OP-Zugang wurde anschließend durch Aufspreizen des Interkostalraums ermöglicht. Hierfür wurden jeweils die zweite und dritte Rippe mit einem 5-0 Faden umstochen und mithilfe von Haltefäden gegenläufig zum Aufspreizen gezogen. Die Fixierung der Haltefäden mit einem definierten Zug erfolgte mit Klebestreifen an der Unterlage. Nachdem das Perikard stumpf abpräpariert wurde, konnten die koronaren Blutgefäße dargestellt werden. Die LAD wurde etwa 1-2 mm unterhalb der Spitze des linken Herzhohes mit einem 8-0 Faden ligiert. Eine erfolgreiche Ligatur konnte am Auftreten einer Ischämie des Myokards bzw. erblasstes Herzareal festgestellt werden. Der OP-Situs wurde durch drei Einzelknopfnähte über die zweite und dritte Rippe verschlossen. Um einen guten Verschluss und somit gutem OP-Ergebnis zu gewährleisten, ist zu beachten, dass die Muskelschichten und die Haut mit jeweils einem 5-0 Faden getrennt vernäht werden müssen. Abschließend wurde das Operationsfeld mit Braunol desinfiziert. Postoperativ wurden die Tiere nach Wiedereinsetzen der Reflexe extubiert und bis zum vollständigen Abklingen der Narkosewirkung unter einer Rotlichtlampe beobachtet.

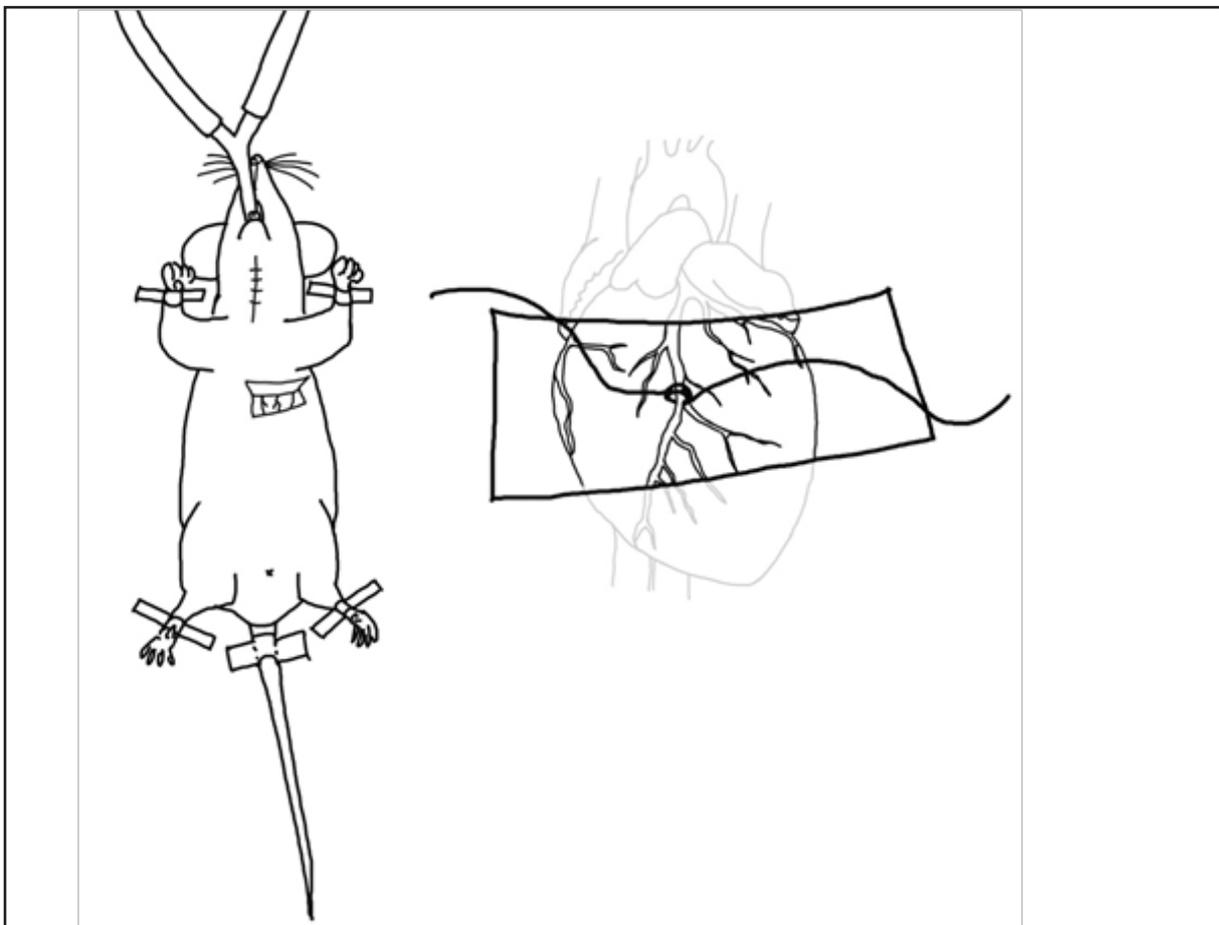


Abbildung 16: Schematische Darstellung des LAD-Ligationsmodells.

4.7 Durchflusszytometrie – FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting)

Die Analyse der CXCR4-Populationen im Knochenmark und im ischämischen Herzen wurde mit Hilfe eines Durchflusszytometers durchgeführt.

4.7.1 Das Prinzip der Durchflusszytometrie

Mittels einer Durchflusszytometrie können Zellsuspensionen aufgetrennt und analysiert werden, die in hoher Geschwindigkeit einzeln an einer elektrischen Spannung oder einem Lichtstrahl vorbeifließen. Dieses Prinzip beruht auf der Tatsache, dass Zellen optische Signale abgeben, wenn sie einen Laserstrahl passieren. Das dabei entstehende Streulicht wird über ein optisches System mittels verschiedener Spiegel und Filter in einzelne Wellenlängenpakete unterteilt und von unterschiedlichen Detektoren gemessen und analysiert. In Abhängigkeit ihrer Form, Struktur oder Färbung können daraus die Eigenschaften der Zellen abgeleitet werden.

Bei einem FACS-Gerät werden die Oberflächenmoleküle einer Zelle mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers erkannt, der wiederum mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert ist. Die Zellsuspension wird zunächst durch eine Mikrokanalküvette geführt und in einen Flüssigkeitsstrom („sheath fluid“) injiziert („stream in stream“ Methode). Der Druck der Zellsuspension ist hierbei größer als der Druck der Hüllflüssigkeit und die Geschwindigkeit des Hüllstroms höher als die der Zellsuspension. Auf dieser Weise sind die Zellsuspension zu einem feinen Strahl fokussiert und die Zellen einzeln durch den Laserstrahl geführt (hydrodynamische Fokussierung). Ändert sich der Druck der Zellsuspension, wird auch die Geschwindigkeit, mit der in den Hüllstrom injiziert wird, beeinflusst und dadurch verändert sich auch die Anzahl der Zellen/Sekunde, die durch die Messzelle wandern. Die Geschwindigkeit der einzelnen Zellen bleibt dabei konstant und wird nur durch die Geschwindigkeit des Hüllstroms bestimmt.

Beim Passieren des Laserstrahls entsteht einerseits Streulicht und andererseits Fluoreszenzlicht. Das Streulicht wird von zwei Streulichtdetektoren („scatter“) gemessen. Der Forward Scatter Detektor (FSC) liegt in derselben Ebene wie der Laserstrahl, der Side Scatter Detektor (SSC) misst das Streulicht, das im 90° Winkel von der Zelle gestreut wird. FSC misst die Beugung des Lichts an der Zelloberfläche und entspricht proportional der Größe der gemessenen Zelle. SSC hingegen entsteht durch Brechung des Lichts an Membranen und Vesikeln im Zellinneren und liefert eine Aussage über die Granularität der Zelle. Das Fluoreszenzlicht in Form von Wellenlängen wird von Fluoreszenzdetektoren aufgefangen. Jedes Fluorochrom besitzt ein Absorptions- und ein Emissionsspektrum und kann dadurch voneinander unterschieden werden. In den Fluoreszenzdetektoren werden die aufgefangenen Wellenlängen zunächst in elektrischen Strom und anschließend in Spannungsimpulse umgewandelt und gegebenenfalls verstärkt. Das Signal ist dabei abhängig von der Größe, der Granularität und den gebundenen Fluoreszenzen (Abb. 17). Durch das Auftragen von Spannungsimpuls gegen die Zeit können drei Parameter erhoben werden: Höhe, Weite und Fläche. Anhand dieser Parameter können beispielsweise Einzelzellen von Doubletten auseinander gehalten werden, da die Höhe in der Regel gleich ist, die Weite und Fläche sich jedoch ändern.

Figure 3.7 Integral and Peak Pulses

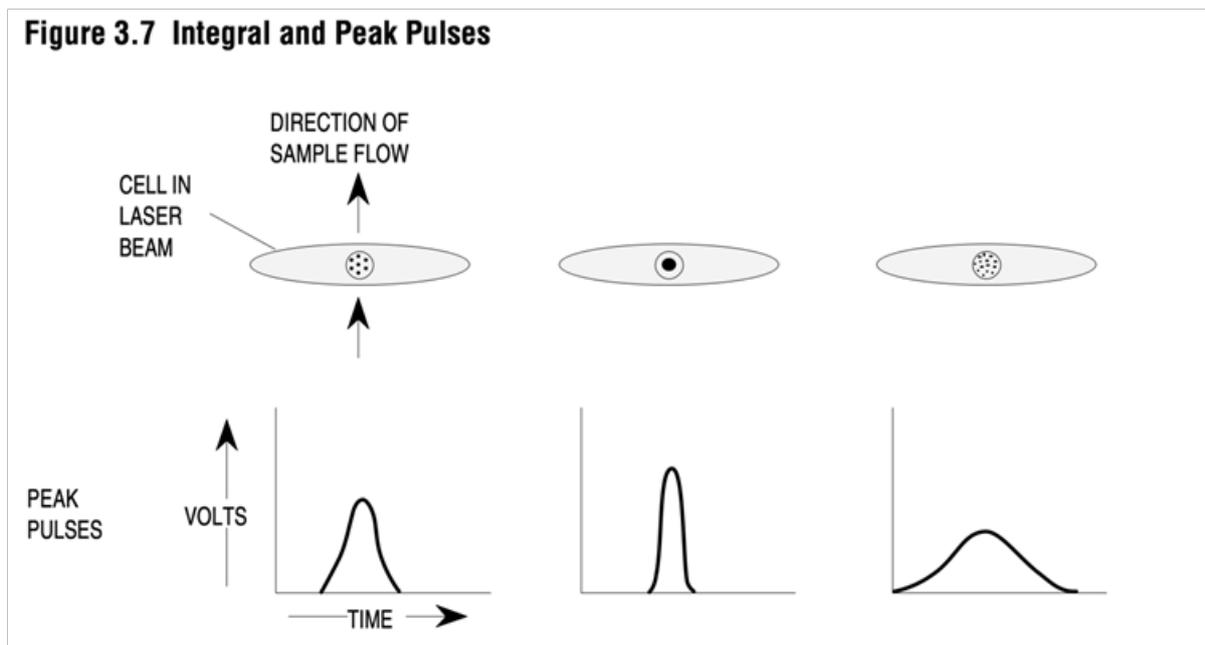


Abbildung 17: Die Abbildung zeigt den Spannungsimpuls unterschiedlicher Zellen. Die Intensität des Streulichts definiert die Höhe des Spannungsimpulses. Die Verteilung des Lichts gibt die Weite/Breite an. Beides zusammen ergeben die Fläche des Spannungsimpulses. Die Abbildung wurde dem Handbuch des Coulter Epics MCLTM, Seite 33, entnommen.

Nach Konvertierung der Messdaten in digitale Werte können diese Messdaten mithilfe eines Analyseprogramms ausgewertet werden. Die Daten lassen sich üblicherweise im Histogramm, Punktdiagramm (dot plot) oder Höhenliniendarstellung (contour plot) darstellen. Histogramme geben die Messwerte eindimensional wieder und stellen die Häufigkeit einzelner Fluoreszenzintensitäten dar. Im Punktdiagramm können Zusammenhänge von Fluoreszenzsignalen hergestellt werden. Es handelt sich hierbei um eine quantitative Messung, da jede gemessene Zelle als Punkt („dot“) aufgetragen wird.

Am Ende des Flüssigkeitsstrahls wird der Strahl durch Vibration in kleine Tröpfchen aufgelöst. Die Tropfengröße ist in der Regel nur so groß, dass eine Zelle hineinpasst. Erfüllt der Tropfen bestimmte Kriterien wird er polarisiert, abschließend beim Passieren eines elektrischen Feldes sortiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben mit dem Coulter Epics XL-MCLTM Durchflusszytometer (Beckmann Coulter) und dem Expo32 ADX Xa Software (Beckmann Coulter) analysiert. Jede Analyse enthält 50000 Ereignisse. Dieses Gerätmodell wurde ab 1993 produziert und erlaubt die Analyse mit FSC, SSC sowie 3 bzw. 4 weiteren Farbstoffen [160]. Die Produktion wurde nach firmeneigenen Angaben 2011 eingestellt, wobei die Gerätwartung noch bis 2018 gewährleistet wurde.

BSA (Albumine bovine serum) 1%	Roth, Karlsruhe
FACS-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Ficoll	GE HealthCare, USA
Heparin-Natrium, 25.000 I.E./5ml	Braun, Melsungen
Iso Flow Sheath Fluid	Beckmann Coulter, München
Kanülen, Sterican 20 G	Braun, Melsungen
Kollagenase	Life Technologies, Darmstadt
PBS	Invitrogen, Darmstadt

Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Skalpell	Pfm medical, Köln
Spritzen 2 ml, 10 ml	Beckton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturschale	Roth, Karlsruhe
Zellsieb 40µm, 70µm	Beckton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugationsröhrchen 15 ml, 50 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz

Tabelle 8: Verwendete Materialien und Substanzen im Rahmen der Durchflusszytometrie

4.7.2 Gewebegewinnung

Die Gewebeentnahme erfolgte unter der bereits beschriebenen Anästhesie. Der Endpunkt wurde in tiefer Narkose durch zervikale Dislokation erreicht.

4.7.2.1 Hintergrund zur Probenaufbereitung

Bei der Analyse der CXCR4-Populationen handelt es sich um mononukleäre Zellen. Da die entnommenen Gewebeproben Zellen enthalten, die bei der Analyse hinderlich sein können, sollten sie aus der Probe entfernt werden. Adhärente oder in Gewebeverbänden befindliche Zellen müssen im Rahmen der Aufarbeitung in eine Einzelzellsuspension überführt werden. Es werden mechanische oder physikalische Trennmethoden angewandt wie beispielsweise das Zerschneiden von Zellverbänden, die Vereinzelnung durch wiederholte Aspiration durch englumige Kanülen, die Anwendung von Kälte zur Dissoziation von adhärenen Zellen sowie die Zentrifugation durch Dichtegradienten. Da verbleibende Zellaggregate nicht ausgeschlossen werden können, muss zusätzlich eine Filtration der Gewebeprobe durch beispielsweise ein Nylongewebe bzw. ein Zellsieb durchgeführt werden, um eine Verstopfung des Durchflusszytometers zu vermeiden.

Da Zelltod mit selektiven Zellverlusten und unspezifischer Antikörperbindung assoziiert ist, werden zum Waschen der Proben spezielle Lösungen (PBS und BSA) verwendet, die sowohl die Zellmembran stabilisieren als auch unspezifische Antikörperbildungen verhindern. Ein zusätzlicher FcR-Block Reagenz wurde nicht verwendet. Neben den Waschungen mit PBS und BSA wurden Isotyp-Kontrollen zur Differenzierung von unspezifischen und spezifischen Antikörperbindungen durchgeführt.

Die verwendeten Lösungen wurden wie nachfolgend beschrieben hergestellt:

PBS (1%):	1l H ₂ O _{deion}	→	9,6 g PBS
Probenpuffer PBS+ BSA (2%):	100 ml PBS	→	1 g BSA (Albumine bovine serum) (1%)
Collagenase-Lösung:	50 ml PBS	→	0,05 g Collagenase

4.7.2.2 Knochenmarksentnahme

Die Haut und das Fell an den unteren Extremitäten der Maus wurden mit einer Schere aufgeschnitten, anschließend das Ligamentum patellae durchtrennt und die Muskulatur entfernt, um den Femur und die Tibia freizulegen. Die Knochenstücke wurden mit Papiertüchern gesäubert, die Kondylen anschließend vorsichtig abgeschnitten. Die entnommenen Knochen wurden mit etwas PBS+BSA im Mörser zerrieben und die dabei entstandene Lösung durch ein 40µm Sieb (blau) gefiltert. Der Vorgang wurde mehrmals wiederholt bis ca. 20 ml Lösung gewonnen wurden.

4.7.2.3 Herzentnahme

Das Herz wurde an der Einmündung der großen Gefäße abgeschnitten, so dass ein Großteil der Arteria ascendens stehen blieb. In einer Petrischale wurden beide Ventrikel über die A. ascendens retrograd mit 10 ml physiologischer Kochsalzlösung gespült, um eine Verunreinigung der Herzproben durch Blutzellen zu minimieren. Anschließend wurde überschüssiges Gewebe wie Herzohren und Gefäßstümpfe sorgfältig entfernt. Das Herz wurde in einer kleinen Zellkulturschale in kleine Stücke geschnitten und mit 6 ml Collagenase-Lösung für 40 Minuten im Brutschrank (Binder CB150, Tuttlingen) inkubiert.

4.7.2.4 Aufbereitung von Knochenmark

Die Isolation von unselektierten mononukleären Knochenmarkszellen aus transgenen CXCR4-EGFP⁺ Mäusen wurde mittels Ficollgradienten ($d=1,077$ g/ml) durchgeführt. Basierend auf der unterschiedlichen Dichte der Blutzellen (Monozyten, Lymphozyten und Basophile $< 1,077$ g/ml und Erythrozyten, Neutrophile, Eosinophile $> 1,077$ g/ml) lässt sich nach einer Zentrifugation die entsprechende Schicht leicht abgrenzen.

Zunächst wurde 25 ml Ficoll in 50 ml Röhrchen vorgelegt, dann mit der Knochenmarksuspension überschichtet und anschließend bei 1200 rpm für 30 min zentrifugiert. Die mittlere trübe Phase mit den Monozyten- und Leukozytenpopulationen wurde in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und auf 45 ml mit PBS aufgefüllt, bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, in ein 15 ml Röhrchen überführt. Eine weitere Waschung erfolgte mit PBS+BSA und Zentrifugation bei 1200 rpm für 10 min. Im vorletzten Schritt wird der Überstand ebenfalls abpipettiert und die übrig gebliebene Zellsuspension auf 6 ml mit PBS aufgefüllt und bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand bis auf 500 μ l abpipettiert, die Zellsuspension resuspendiert und jeweils 50 μ l der Probe in einen Eppendorf-Cup gegeben.

4.7.2.5 Aufbereitung von Herzgewebe

Die Herz-Collagenase-Suspension wurde nach 40-minütiger Inkubation resuspendiert, durch ein 70 μ m Zellsieb (weiß) auf ein 50 ml Röhrchen gefiltert, anschließend in ein 15 ml Röhrchen überführt. Um überschüssige Materialien zu entfernen wurden dreifache Waschungen durchgeführt, zunächst mit 10 ml PBS, dann mit 8 ml PBA+BSA und abschließend mit 6 ml PBS. Zwischen den einzelnen Waschvorgängen wurde die Probe bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Im letzten Schritt wurde nach der Entfernung des Überstandes 500 μ l Zellsuspension behalten und davon jeweils 50 μ l der Probe in einen Eppendorf-Cup gegeben.

4.7.3 Antikörper

Um die CXCR4-Populationen zu analysieren wird die Tatsache genutzt, dass jede Zelle bestimmte Oberflächenantigene exprimiert. Aufgrund der ständig wachsenden Anzahl an Oberflächenantigenen wurde erstmals 1982 auf dem „1st International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA)“ CD Nomenklatur zur Klassifikation von monoklonalen Antikörpern gegen Epitope auf der Oberfläche von Leukozyten eingeführt. CD steht hierbei für „Cluster of Differentiation“ oder „Antigen Cluster Designation“. Seitdem wächst die CD Nomenklatur kontinuierlich und wurde um weitere Zelltypen erweitert. Es gibt jedoch eine Reihe von Antigenen,

die noch nicht in die CD Nomenklatur aufgenommen worden sind. Um Zellen mit bestimmten Oberflächenantigenen im Durchflusszytometer nachweisen zu können, werden monoklonale Antikörper verwendet, die wiederum durch einen fluoreszierenden Farbstoff (PE - rot, PerCP - blau, FITC - grün) markiert sind.

Für die Charakterisierung der CXCR4-Populationen wurden in erster Linie die mononukleären CXCR4⁺ Zellen aus dem Knochenmark und dem Herzen auf die Koexpression mit dem Oberflächenmarker CD45 sowie deren Subpopulationen untersucht. CD45 ist ein Oberflächenprotein vom Rezeptor-Typ Tyrosin-Proteinphosphatase C. Er ist vor allem als Panleukozytenmarker bekannt, da er auf allen Leukozyten – inklusive hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen – exprimiert wird. In Abschnitt 2.3.4 wurde die Inflammationsreaktion als ein wichtiger Bestandteil des postischämischen myokardialen Reparaturmechanismus beschrieben. Daher hatten wir die CXCR4⁺-Population zunächst auf eine Koexpression mit dem Oberflächenmarker CD45 sowie mit weiteren spezifischen Oberflächenmarkern untersucht, die bei der Entzündungsreaktion mitwirken. Abbildung 18 zeigt einen Auszug aus dem CD Chart von Beckman Coulter, auf dem die Zuordnung der Markermoleküle entnommen werden kann.

4.7.3.1 Liste der verwendeten Antikörper

Alle verwendeten Antikörper im Rahmen der Durchflusszytometrie stammten von BD Pharmingen (Beckton Dickinson, Heidelberg) und Biolegend (San Diego, CA).

CD45-PerCP, CD31-PE, c-kit-PE, Sca-1-PE (Ly6-A/E), CD34-PE, Flk-1-PE, CD11b-PerCP, CD11b-Biotin, CD86-PE, CD206-PE, F4/80-PE, Iso A-PE, Iso-A-PerCP, Iso A.

CD N°	Alternative Name											Beckman Coulter Clone				
		T Cells	B Cells	Granulocytes	NK Cells	Macrophages/Monocytes	Platelets	Erythrocytes	Stem Cells	Dendritic Cells	Endothelial Cells		Epithelial Cells			
CD45	LCA, T200, B220, EC 3.1.3.4															●
CD4	T4	S														●
CD11b	αM integrin chain, Mac-1, Mo1, CR3, α-chain of C3bIR	S	S							FcR1						●
CD20	B1, Bgp35	Low								FcR1						●
CD31	PECAM-1, platelet GPIIb/IIIa, endocam	S	S													●
CD34	gp105-120, My10															●
CD117	c-kit, stem cell factor receptor (SCFR)															●
CD309	VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2), KDR															●
CD86	B7.2, B70		S													●
CD206	MMR (macrophage mannose receptor)									S						●

	: negative		: positive on a subset		: positive
	: positive upon activation		: low expression on a subset		: no data
	: low expression		: subset of activated cells		: clone available at Beckman Coulter

Abbildung 18: Auszug aus dem CD-Chart von Beckman Coulter (<https://media.beckman.com/-/media/pdf-assets/posters/flow-reagents-single-color-antibodies-cd-chart.pdf?country=DE>)

4.7.4 Vorbereitung der Antikörper und Durchführung der Messung

Die Antikörper wurden entweder mit Phycoerythrin (PE-rot) oder Peridininchlorophyll-Protein (PerCP-blau) konjugiert. Da die zu untersuchenden Zellen EGFP markiert waren, war eine Konjugation mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC-grün) nicht notwendig. Alle Antikörper mit Ausnahme von CD34 und CD206 wurden 1:100 verdünnt, bevor sie zu den vorbereiteten Zellsuspensionen gegeben wurden. CD34 und CD206 wurden als 1:1 Lösung angesetzt. Die Proben für die Durchflusszytometrie wurden beispielsweise nach folgendem Pipettierprotokoll vorbereitet:

Isotype	Iso A	CD31 rat IgG2a	CD34 rat Ig- G2a	c-kit rat IgG2a	Flk1 rat Ig- G2a	Sca-1 rat Ig- G2a	CD86 rat IgG2a	CD206 rat IgG2a	F4/80 rat IgG2a
PBS+BSA (2%)	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Iso A-PE IgG2a	10								
Iso A PerCP IgG2b	10								
CD11b oder CD45 PerCP IgG2b		10	10	10	10	10	10	10	10
CD31		10							
CD34			10						
c-kit				10					
Flk-1					10				
Sca-1						10			
CD86							10		
CD206								10	
F4/80									10
Probe (µl)	50	50	50	50	50	50	50	50	50

Tabelle 9: Pipettierprotokoll

Die Proben wurden bei 4°C für 45-90 min inkubiert, danach zweimal mit je 400 µl PBS+BSA 2% gewaschen und zentrifugiert (5 min bei 2000rpm), wobei der Überstand (ca. 500 µl) nach Zentrifugation vorsichtig abpipettiert wurde. Mit dem Waschen der mit Antikörpern gefärbten Proben wurden Hintergrundsignale durch Entfernen der nicht gebundenen Antikörper reduziert. Abschließend wurde die Zellsuspension mit 100 µl PBS resuspendiert und gleich zur Messung herangezogen. Lebend- und Totfarbstoffe wurden nicht verwendet. Die Entscheidung basierte unter anderem auf der Überlegung, dass lebende CXCR4-Zellpopulation das Signal eGFP emittieren. Steff et. al. hat gezeigt, dass eGFP vergleichbare Kinetik und Sensitivität wie herkömmliche Apoptosemarker Annexin-V, Propidium Iodid und ROS aufweisen[161]. Die Verwendung von 7AAD war zum Versuchszeitraum in kardialen FACS-Analysen noch nicht etabliert. Für unsere Arbeit verwendeten wir ein Protokoll in Anlehnung an die zeitgleich veröffentlichte wichtige Referenzarbeit von Ben-Mordechai et. al, der ebenfalls keine 7AAD-Färbung verwendete [162].

4.7.5 Durchführung und Auswertung der FACS-Analysen

Die Analyse der CXCR4-Zellpopulationen im Knochenmark und im Herzen wurde durch ein Durchflusszytometer (Beckman Coulter Epics XL) mit Streulicht- und Fluoreszenzparametern ermöglicht. Zur Auswertung wurde das Programm Expo 32 ADC verwendet. Die Funktionsweise wurde bereits in 4.7.1 beschrieben. Es gibt jedoch einige Punkte, die die Messung beeinflussen können. Hierzu zählen beispielsweise die Autofluoreszenz der Zellen, Zellaggregation, unspezifische Antikörperbindung oder spektrale Überlappungen, welche zu unerwünscht erhöhten Signalen führen könnten. Daher musste neben der gewissenhaften Probenaufbereitung eine Kalibrierung des Messgerätes vor jeder Anwendung durchgeführt werden. Des Weiteren können Zellaggregationen und Doubletten durch entsprechende Gatingstrategie ausgeschlossen werden. Durch Auftragen von SSC-h gegen SSC-w im Punktdiagramm können Zellaggregationen oder Doubletten hinsichtlich ihrer Breite (SSC-w) von Einzelzellen unterschieden werden. Nach Herstellerangaben können über 90% der Zelldoubletten erkannt werden (Herstellerhandbuch, S.48). Die Differenzierung von unspezifischen und spezifischen Antikörperbindungen gelang durch Isotopen für jeden einzelnen Farbstoff. Bei spektraler Überlappung müsste die Überlappung geschätzt und subtrahiert werden (Kompensation). Zur Reduktion von Kompensationsartefakten haben wir bereits die Fluorochromen unter Berücksichtigung der Detektoren bzw. Filter ausgewählt (siehe Abb. 19). Die Analyse der Zellpopulationen erfolgte im Punktdiagramm durch „Gating“ (siehe Abb. 20). Bei allen Messungen wurden die Zellen zunächst nach ihrer Granularität (SSC) und Größe (FSC) im Punktdiagramm aufgetragen. Es wurde ein anfängliches Analysefenster („parent gate“) festgelegt, bei der die zu analysierende Zellpopulation – hier: mononukleäre Zellen – definiert wurde. Lymphozyten besitzen eine geringe Granularität („SSC low“) und geringere Größe („FSC low“). Monozyten zeichnen sich durch eine große Größe („FSC high“) aus, besitzen aber im Vergleich zu Granulozyten eine geringere Granularität („SSC middle“). Granulozyten weisen sich dagegen durch eine hohe Granularität („SSC high“) und große Größe („FSC high“) aus. Zelltrümmer sind entsprechend im untersten Bereich („FSC very low“ im SSC/FSC-Plot) zu finden. Ausgehend vom „parent gate“, welches als 100% der Messereignisse definiert wurde, konnte der prozentuale Anteil einzelner Subpopulationen mit analysierten Parametern ermittelt werden. Die Subpopulationen können dabei doppelt negativ, doppelt positiv oder jeweils nur für einen Parameter positiv sein.

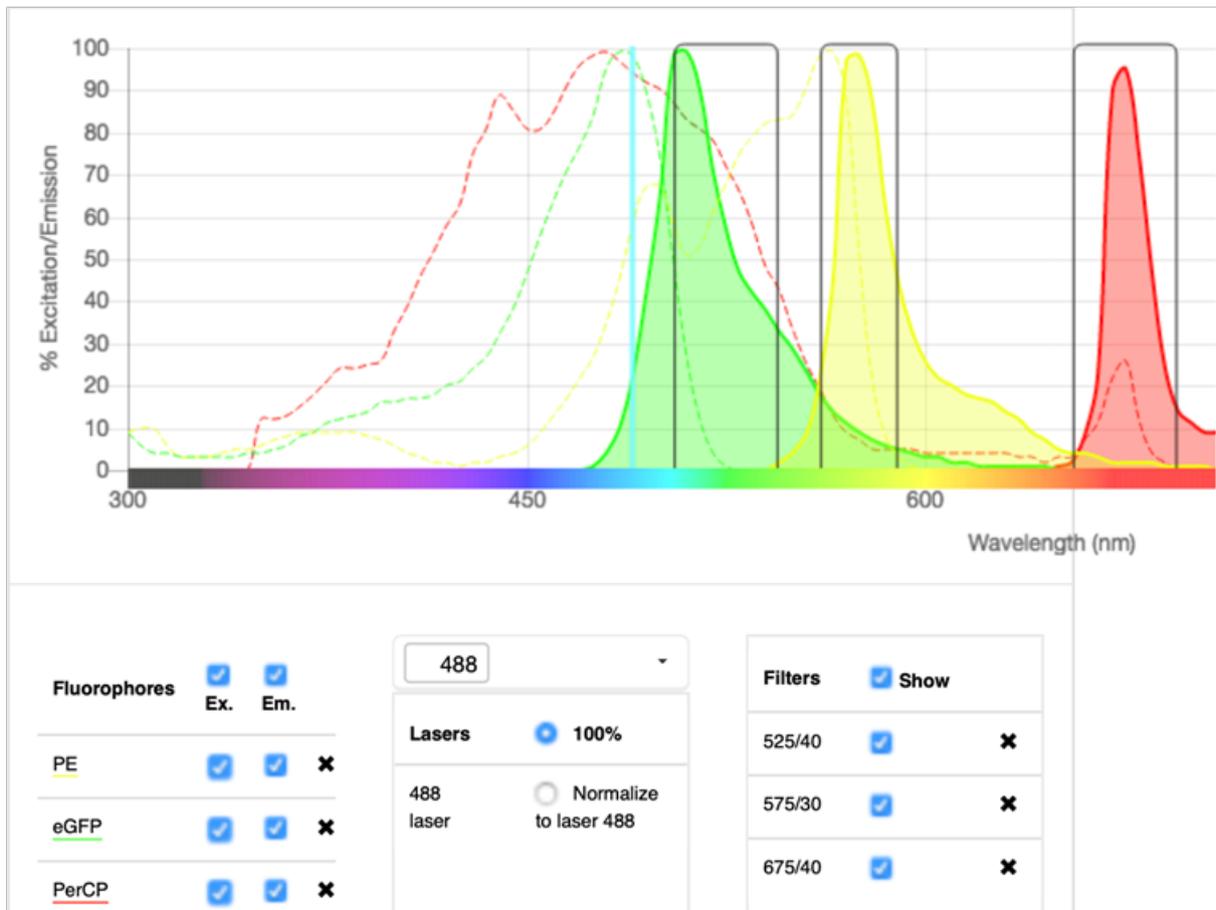


Abbildung 19: Die Abbildung zeigt das Exzitations- und Emissionsspektrum der ausgesuchten Fluorochromen unter der Anregung mit einem 488 nm Argon Laser. Die Überlappung der Spektren lassen sich durch Bandpassfilter reduzieren. Die Abbildung wurde mit Hilfe von Spectralviewer von Beckman Coulter generiert. Die Angabe der Bandpassfilter wurde dem Gerätehandbuch entnommen.

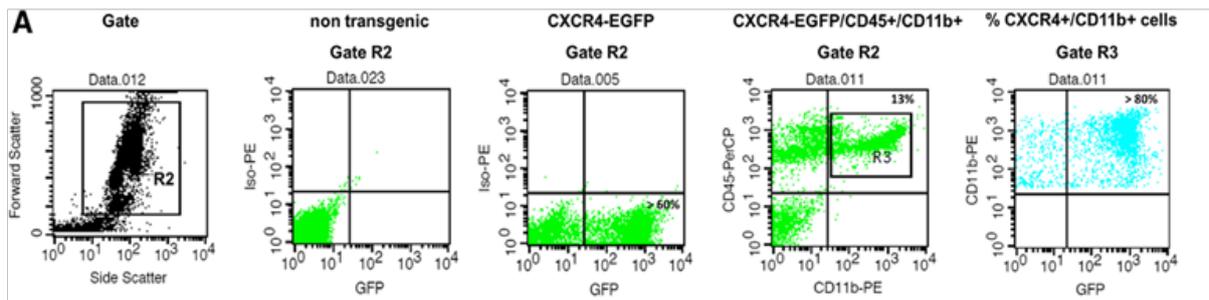


Abbildung 20: Beispielhafte Gatingstrategie. Die FACS-Analyse von mononukleären Knochenmarkzellen sowohl von nicht-transgenen als auch von transgenen CXCR4-EGFP Reporter-mäusen zeigt eine erhöhte Koexpression an CXCR4-EGFP⁺ Zellen auf CD45⁺/CD11b⁺ Zellen (Ghadge et al., „Prolyl-hydroxylase inhibition induces SDF-1 associated with increased CXCR4⁺/CD11b⁺ subpopulations and cardiac repair“ (J Mol Med (Berl) 2017; 95(8): 825–837)

4.8 Hämodynamik

4.8.1 Das Prinzip der Conductance Messung

Zur Bestimmung der Herzmuskelleistung wird seit den 80er Jahren unter anderem eine spezielle Messvorrichtung, die so genannte Conductance Messung oder Strömungsleitwert-Katheter-Technik, verwendet. Durch den so genannten Leitwert-Katheter können Veränderungen eines elektromagnetischen Feldes aufgenommen und gemessen werden. Dabei wird die Tatsache bedient, dass unterschiedliche Stoffe/Substanzen auch unterschiedliche elektrische Leitfähigkeit und unterschiedlichen elektrischen Leitwert aufweisen. Beide Werte sind ein Maß für die Fähigkeit einer Lösung, den elektrischen Strom zu leiten. Zwischen dem Leitwert G (Einheit: Siemens) und dem elektrischen Widerstand R (Einheit: Ohm) besteht ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang:

$G = 1/R$ (hoher elektrischer Leitwert $G =$ niedriger elektrischer, bzw. ohmscher Widerstand R)

Für die Messung des elektrischen Leitwerts wird an Elektrodenpaaren eine Spannung angelegt und der fließende Strom gemessen. Dabei wandern Kationen zur negativen Elektrode, Anionen zur positiven. Das umgebende Medium stellt einen elektrischen Leiter dar. Ein Leiter wird durch die Länge und den Querschnitt charakterisiert. Diese elektrophysikalischen Grundsätze wurden von Baan et al. verwendet [163], um den komplexen Zusammenhang der Veränderung von ventrikulärem Herzinnendruck und ventrikulärem Volumen während des Herzzyklus aufzuzeichnen und daraus die Herzfunktion abzuleiten. Dank des technischen Fortschritts existieren mittlerweile Leitwert-Katheter, die klein genug für den Einsatz in der präklinischen Forschung mit Kleintieren sind.

Für den vorliegenden Versuch wurde ein Katheter (Millar Tip Katheter mit 1,4 French) an die linke Herzkammer geführt und soweit vorgeschoben, bis die distalen Elektroden in der Herzspitze und die proximalen Elektroden direkt unterhalb der Aortenklappe zu liegen kamen. An der Spitze des Katheters befinden sich zwei Elektrodenpaare, die ein elektrisches Wechselfeld mit der Conductance oder dem Leitwert $G(t)$ innerhalb des Ventrikels erzeugen, welches sowohl das darin befindliche Blut als auch das umliegende Gewebe durchdringen kann.

Da Blut eine andere Leitfähigkeit aufweist, als die Wände der Herzkammer, verändert sich das elektromagnetische Feld jeweils in Abhängigkeit von der Verteilung des Blutes und vom leitenden Querschnitt der Herzkammer. Da sich der Leitwert des Blutes proportional zum Ventrikelvolumen verhält, und sich das Blutvolumen innerhalb der Kammer bei jeder Herzaktion ändert, kommt es bei jeder Herzaktion zeitabhängig zur Veränderung des Leitwerts $G(t)$. Die Differenz der gemessenen Leitwerte an den Elektrodenpaaren zu unterschiedlichen Zeitpunkten reflektiert die intraventrikulären Volumenänderungen. Baan et al. hat eine Formel hierfür aufgestellt:

$$G_{i,ii}(t) = \sigma b \times V_{i,ii}(t) / L^2 \quad \text{bzw.} \quad V_{i,ii}(t) = L^2 / \sigma b \times G_{i,ii}(t)$$

$G_{i,ii}(t)$: zeitabhängiger Leitwert der Elektrodenpaare

σb : spezifische Leitfähigkeit des Blutes („sigma b“, $b =$ Blut)

$V_{i,ii}(t)$: zeitabhängiges ventrikuläres Volumen

L : Elektrodendistanz

Die Messelektroden können allerdings die Beschaffenheit der verschiedenen Gewebe nicht unterscheiden. Sie ermitteln lediglich den Leitwert $G(t)$ aller Strukturen. Wie oben bereits erwähnt, verhält sich der Leitwert des Blutes proportional zum Ventrikelvolumen. Um das Ventrikelvolumen zu erhalten, muss folglich der Leitwert des Blutes bestimmt werden. Hierfür wird der Leitwert des umliegenden Gewebes $G(p)$, der als konstant angesehen wird, von dem Gesamtleitwert $G(t)$ subtrahiert. Der Leitwert des umliegenden Gewebes $G(p)$ wird durch Kalibrierung ermittelt. Hierfür wird hypertone NaCl-Lösung injiziert, um dadurch eine Veränderung des Leitwerts des Blutes zu erreichen, ohne dabei Druck oder Volumen im Ventrikel zu beeinflussen. Zur gleichen Zeit werden die sich dadurch verändernden Ventrikelvolumina im Verlauf mehrerer Herzaktionen aufgezeichnet. In einem Volumendiagramm werden endsystolische Volumina (V_{min}) gegen enddiastolische Volumina aufgetragen, die eine Gerade ergeben. Eine weitere Gerade als definierter Zustand einer leeren Herzkammer, also wo enddiastolische Volumina gleich sind wie endsystolische ($V_{ed} = V_{es}$), wird ebenfalls aufgetragen. Der Schnittpunkt dieser beiden Geraden zeigt das Volumen des umliegenden Gewebes an und daraus kann der Leitwert $G(p)$ abgeleitet werden.

Mit folgender Gleichung kann aus dem Leitwert das linksventrikuläre Volumen $V_{i,ii}(t)$ berechnet werden:

$$V_{i,ii}(t) = (1/\alpha) \times (L^2/\sigma_b) \times (G_{i,ii}(t) - G(p))$$

$V(t)$: zeitabhängiges ventrikuläres Volumen

α : dimensionsloser Korrekturfaktor

L : Elektrodendistanz

σ_b : spezifische Leitfähigkeit des Blutes

$G(t)$: Gesamtleitwert

$G(p)$: Leitwert des umliegenden Gewebes

Das gesamte intraventrikuläre Volumen $V_{ges}(t)$ ergibt sich aus der Summe von $V_{i,ii}(t)$.

Über einen integrierten Drucksensor, ein Mikromanometer, kann simultan der Innendruck der Herzkammer gemessen werden. Diese Technik ermöglicht die Aufzeichnung der charakteristischen Herzzyklusdiagramme von Druck und Volumen, sogenannte PV-Loops, in Echtzeit (siehe Abb. 22).

Die Auswertung erfolgt separat über ein Auswertungsprogramm.

4.8.2 Druck-Volumendiagramm

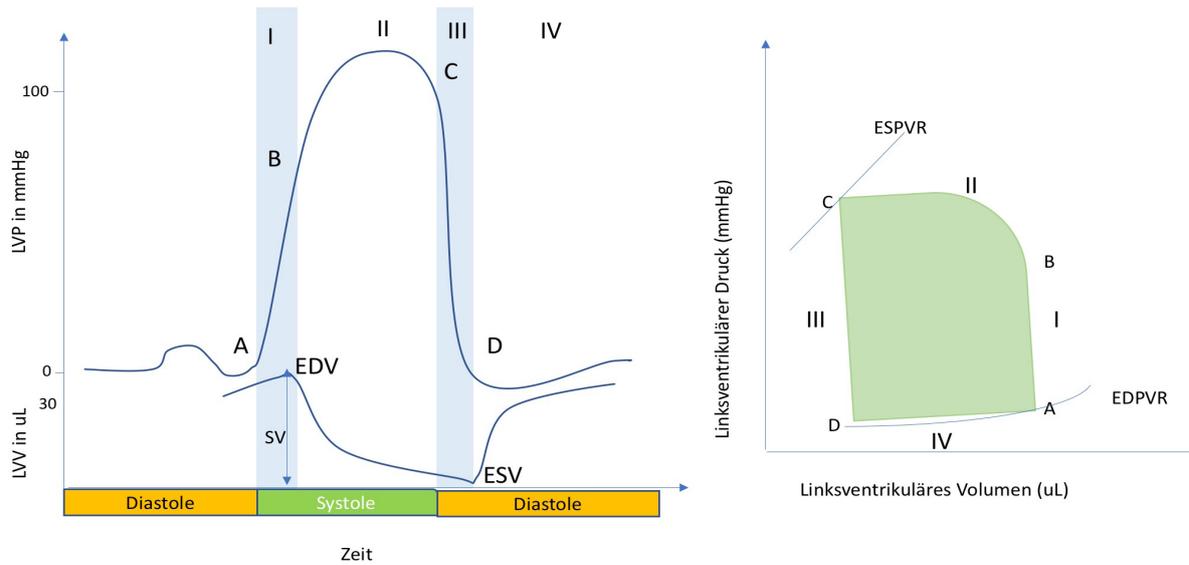


Abbildung 21: Schematische Darstellung des linksventrikulären Druck-/Volumen-Diagramm, modifiziert nach Green et al., „Echocardiographic assessment of pressure volume relations in heart failure and valvular heart disease: using imaging to understand physiology“ (Minerva Cardioangiol. 2011 Aug;59(4):375-89.)

Links: Druck und Volumen gegen Zeit aufgetragen, rechts: Druck-Volumen-Verhältnis.

I = Anspannungsphase/ isovolumetrische Kontraktion, II = Austreibungsphase, III = Entspannungsphase/ isovolumetrische Relaxation, IV = Füllungsphase;

A = AV-Klappen werden geschlossen, B= Aortenklappen werden geöffnet, C = Aortenklappe werden geschlossen, D = AV-Klappen werden geöffnet

Ablauf einer Herzaktion: ...D => IV => A => I => B => II => C => III => D => IV => A.....

ESPVR = Endsystolische Druck-Volumen-Relation (pressure volume relationship)

EDPVR = Enddiastolische Druck-Volumen-Relation (End-diastolic pressure volume relationship)

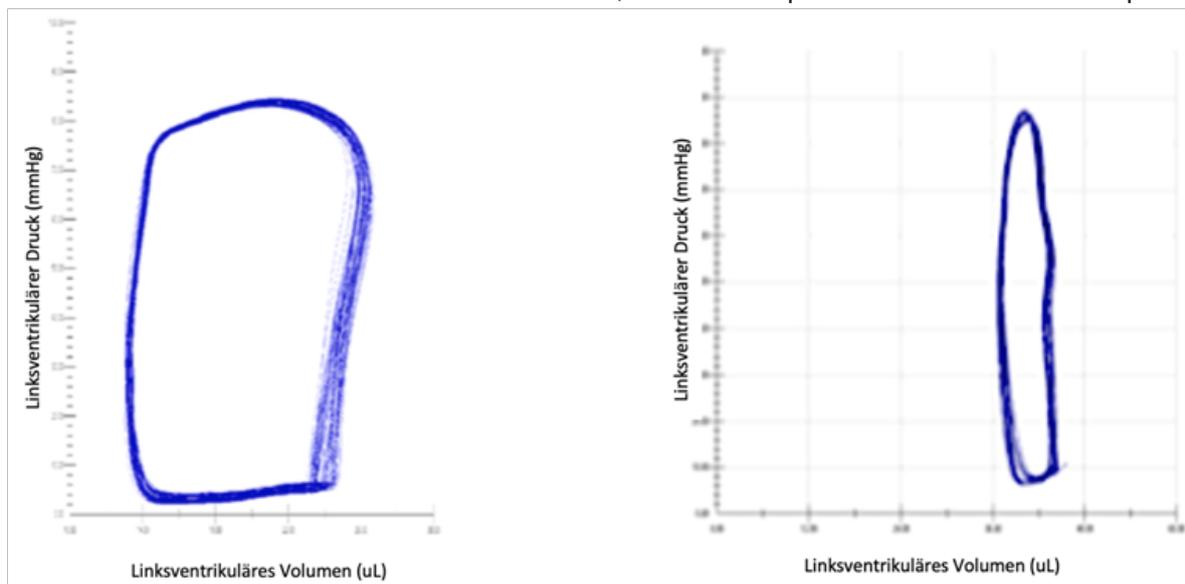


Abbildung 22: Druck-Volumenschleife einer gesunden Kontrollmaus (links) und einer infarzierten Maus (rechts) im Softwareprogramm HSE Isoheart (Hugo Sachs, March-Hugstetten)

4.8.3 Häodynamische Messung

Enthaarungscreme, Veet	Reckitt Benckiser, Mannheim
Ethanol 70%	Roth, Karlsruhe
Büroklammer 32 mm	Herlitz, Berlin
Nähgarn	Gütermann, Gutach-Breisgau
Leukoplast	BSN medical, Hamburg
Wärmeplatte mit Rektalkatheter TKM-0902	Föhr Medical Instruments, Seeheim/Ober-Beerbach
Operationsmikroskop	Carl Zeiss, Jena
MiniVent	Hugo Sachs, Freiburg
HSE Isoheart	Hugo Sachs, March-Hugstetten
PVAN 2.9 Analyse Software	Hugo Sachs, March-Hugstetten
MPCU2PV.exe	Hugo Sachs, March-Hugstetten
Millar Mikro-Tip Katheter	Föhr Medical Instruments, Seeheim/Ober-Beerbach
Mikrochirurgische Instrumente	FST, Heidelberg
NaCl 0,9 %	Braun, Melsungen
NaCl, 4,5 %	Roth, Karlsruhe
Povidon-Iod, Braunol	Braun, Melsungen
Saugtupfer, (SUGI®)	Kettenbach, Eschenburg
Sterican, 30 G	Braun, Melsungen
Spritzen 1 ml BD Plastipak	Becton Dickinson, Heidelberg

Tabelle 10: Liste der Materialien im Rahmen der häodynamischen Messung und Auswertung

4.8.3.1 Versuchsdurchführung

Für die Versuche wurden die Tiere analog zu 4.6.1 und 4.6.2 anästhesiert. Nach Erreichen der chirurgischen Toleranz wurden die Mäuse mit Klebestreifen dorsal auf der Wärmeplatte fixiert. Eine rektale Messsonde ermöglichte perioperativ eine konstante Körpertemperatur von 37,5 °C. Zur Operationsvorbereitung wurde beidseits der Trachea mit 70 %igem Ethanol entfettet, mit einer Enthaarungscreme enthaart und mit Jod desinfiziert. Die Fixierung des Oberkiefers für die Intubation wurde über ein dünnes Gummiband erreicht. Anschließend wurde ein Hautschnitt am Kinnwinkel beginnend bis zum Brusteingang gesetzt, die Speicheldrüsen stumpf freipräpariert, um eine freie Sicht auf die Trachea für die Intubation zu erhalten. Die Beatmung erfolgte über ein Minivent-System (HUGO SACHS, Freiburg) mit einem Atemzugvolumen von 200 µL und einer Frequenz von 150 Zügen/min.

Für die häodynamische Messung wurde die sogenannte „close-chest Methode“ verwendet. Das bedeutet, dass der Katheter über die Arteria carotis interna in den linken Ventrikel geführt wurde. Hierfür musste die A. carotis interna unter dem Operationsmikroskop (Leica A60 Wetzlar) aus der Vagusscheide freipräpariert werden. Hierbei ist eine Verletzung des Nervus vagus zu vermeiden, da die Häodynamik verändert werden kann.

Zur besseren Darstellung der A. carotis wurde das Gefäß am kranialen Ende mit einem handelsüblichen Bindfaden verknotet und dieser mit Zug auf der Wärmeplatte gespannt. Hierdurch wurde

eine Vergrößerung des Gefäßdurchmessers durch Rückstau des Blutes erreicht. Ein zweiter Faden wurde unter dem kaudalen Gefäßende vorgelegt, um mögliche Blutungen durch Zuziehen schnell zu unterbinden. Eine bessere Stabilität beim Einführen des Katheters wurde durch eine Metallklammer unter dem Gefäß erreicht. Mit einer 30 G Kanüle wurde das Gefäß punktiert und der Millar Tip Katheter vorsichtig mit einer Pinzette über die Öffnung in das Gefäß eingeführt. Unter ständiger Kontrolle der Druck-Volumen-Kurve am Monitor wurde der Katheter durch die Arteria carotis interna und die Aorta ascendens und über die Aortenklappe hinweg in den linken Ventrikel vorgeschoben. Über kleine Lageveränderungen des Katheters konnten die Kurven optimiert dargestellt werden. Die Grundwerte (Basalwerte) der Herzleistung wurden aufgezeichnet, sobald die Hämodynamik stabilisiert wurde. Zur späteren Bestimmung des tatsächlichen Blutvolumens wurde jeweils am Ende der Messung noch eine Kalibrierung durch hypertone Kochsalzinjektionen vorgenommen. Zu diesem Zweck wurde die linke Vena jugularis interna freigelegt und über einen Katheter mehrfach ein kleiner Bolus (15µl) hypersaliner Kochsalzlösung (4,5% NaCl) verabreicht und Volumenänderungen aufgezeichnet.

Während der Versuchsdauer wurde der OP-Situs wiederholt mit NaCl feucht gehalten, um Gefäßläsionen durch Austrocknen zu vermindern. Am Ende der Aufzeichnung wurde die Maus durch zervikale Dislokation getötet.

4.8.3.2 Aufzeichnung und Messparameter

Die Kathetermessung erfolgte über das Druckaufnehmersystem Millar Aria, dessen Signale über einen Zwei-Kanal-Brückenverstärker (HSE) in die Computermessapparatur (Dell) eingespeist und mit Hilfe der Software HSE Isoheart aufgezeichnet wurde. Die Auswertung wurde mit der Software Millar PVAN 2.9. (HUGO SACHS, March, Deutschland) durchgeführt.

Parameter	Beschreibung	Einheit
Pmax/min	maximaler/minimaler gemessener Druck	mmHg
Pes/ed bzw.	Endsystolischer/-diastolischer Druck	mmHg
dP/dtmax	Schnellster Druckanstieg	mmHg/s
Vmax/min	maximales/minimales Volumen	µl
Ves/ed	Endsystolisches/-diastolisches Volumen	µl
HF	Herzfrequenz	bpm
SV	Schlagvolumen $SV = EDV - ESV$	µl
CO bzw. HZV	Herzminutenvolumen $HZV [l/min] = HF \times SV$	ml/min
EF	Auswurffraktion $EF [\%] = (EDV - ESV) / EDV \times 100$	%
SW	Herzleistung, Inotropie, Schlagkraft	mmHg*µl
Ea	Arterielle Elastizität $Ea = ESV/SV$	mmHg/µl
Tauweis (τ)	Zeitkonstante der aktiven Relaxation	ms

Tabelle 11: Parameter zur Beurteilung des linken Ventrikels

4.9 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) angegeben. Hinsichtlich der Signifikanzen wurden entsprechend den Anforderungen mit dem ungepaarten Student's t-Test bzw. unifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) überprüft, gefolgt vom Bonferroni Test. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen. Wenn nicht anders angegeben gilt in den Abbildungen * = $p < 0.05$. Für die FACS-Analyse wurden für jede Versuchsgruppe 6 Tiere einbezogen. Für die Hämodynamik wurden Daten von je 5 Tieren in der Kontrollgruppe sowie MI + DMOG, und 7 Tiere in der MI-Gruppe verwendet.

V. ERGEBNISSE

5.1 Charakterisierung der CXCR4⁺-Zellpopulation

5.1.1 Postischämische Hochregulation von CD45⁺/CXCR4-EGFP⁺/CD11b⁺ Zellen und CXCR4-EGFP⁺/CD11b⁺ Subpopulation

Die Analyse der CXCR4⁺-Zellen im prä- und postischämischen Knochenmark sowie im Herzen wurde wie oben beschrieben mithilfe einer Durchflusszytometrie durchgeführt. Für die Versuche wurden transgene CXCR4⁺EGFP⁺-Mäuse herangezogen, die im Vorfeld durch Genotypisierung bestimmt wurden. Die CXCR4⁺EGFP⁺-Expression wurde durch Vergleiche mit nicht-transgenen Mäusen mittels FACS-Analyse verifiziert (siehe Abb. 19). In Vorarbeiten aus unserem Labor wurden in erster Linie mononukleäre CXCR4⁺-Zellen aus dem Knochenmark auf die Koexpression mit dem Oberflächenmarker CD45 sowie deren Subpopulationen untersucht (durch Maximilian Doppelhammer). Postischämisch spielen Entzündungsreaktionen wie bereits in 2.3.4 beschrieben eine wichtige Rolle bei der myokardialen Reparatur. Neben potentiellen Stammzellmarkern wie c-kit, Sca-1, c-kit⁺Sca⁺Lin⁻ wurde eine Koexpression mit Oberflächenmarkern einiger Zelltypen der Inflammationsreaktion untersucht. Die ersten FACS-Analysen zeigten eine hohe Koexpression von CD11b-Monozyten in der CD45⁺CXCR4⁺EGFP⁺-Population im Knochenmark, die postischämisch signifikant angestiegen war [164] (siehe Abb. 23). Ein Anstieg der CD45⁺/CXCR4⁺EGFP⁺/CD11b⁺ - Zellen ließ sich auch im ischämischen Herzen beobachten. Außerdem zeigte sich in der kardialen CD45⁺CXCR4⁺EGFP⁺-Population zusätzlich eine postischämische Hochregulierung der koexprimierten CD4⁺-T-Zellen, CD20⁺-B-Zellen und der pro-angiogenetisch wirkenden CD31, CD34, Flk-1-Endothelzellen sowie der Sca-1⁺, c-kit⁺- und c-kit⁺Sca⁺Lin⁻ - Zellen, welche unter Normoxie nur in geringem Prozentsatz nachgewiesen wurden. Der Anteil von CD45⁺CXCR4⁺-Population war ebenfalls nur zu einem geringem Prozentsatz nachweisbar. Bei genauer Betrachtung fiel jedoch auf, dass sich in der knochenmarkstämmigen CD45⁺ Population auch eine Erhöhung der CD11b⁺, CD31⁺, Flk-1, c-kit⁺, Sca⁺ exprimierenden Zellen zeigte (Abb. 23: obere Diagramme). Die CD45⁺c-kit⁺Sca⁺Lin⁻ Population im Knochenmark nahm am 7. Tag postischämisch ab, während die CD45⁺c-kit⁺Sca⁺Lin⁻ Zellen minimal erhöht waren.

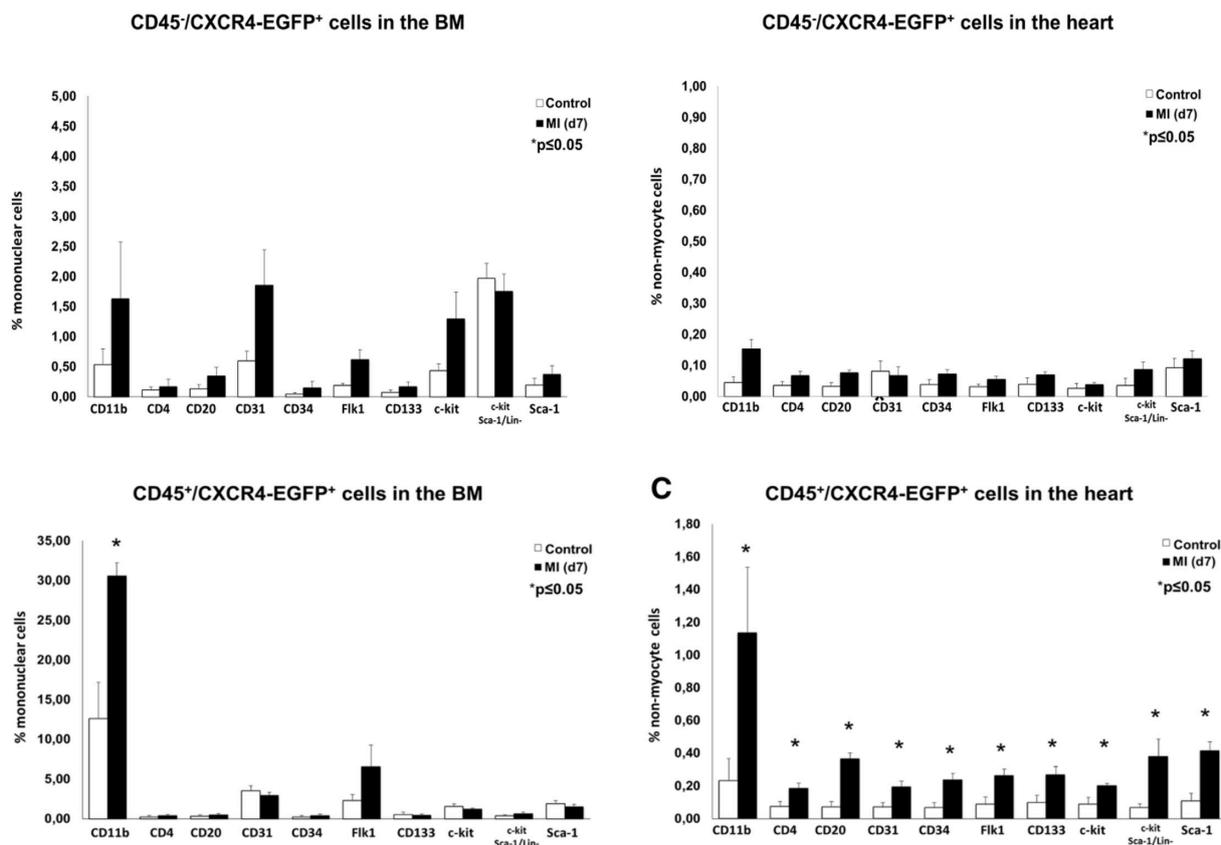


Abbildung 23: Postischämische FACS-Analysen am 7. Tag zeigten einen signifikanten Anstieg der CD45⁺/CXCR4⁺-EGFP⁺/CD11b⁺ Population sowie der potentiell pro-angiogenetischen CD31⁻, CD34⁻, Flk-1-Endothelzellen sowie c-kit⁻ und Sca-1⁺ Zellen im ischämischen Herzen (untere Diagramme). Prozentual waren CD45⁺ Zellen wenig vertreten (obere Diagramme). Die Ergebnisse präsentieren den Mittelwert ± SD (n = 4), *p < 0.05 Kontrolle vs. MI. (Ghadge et al. „Prolyl-hydroxylase inhibition induces SDF-1 associated with increased CXCR4⁺/CD11b⁺ subpopulations and cardiac repair“ (J Mol Med (Berl) 2017; 95(8): 825–837))

Vor allem ließ die starke Erhöhung der CD45⁺/CXCR4⁺EGFP⁺/CD11b⁺ -Zellen im infarzierten Herzen eine essentielle Beteiligung von CD11b⁺ -Zellen an kardialen SDF-1/CXCR4 assoziierten Reparaturmechanismen vermuten, da CD11b markierten Zellen eine positive Wirkung auf die Angiogenese [151] zugeschrieben wurde, und weil sie eine wichtige Rolle bei der postischämischen Inflammationsreaktion einnehmen würden [157]. Nach aktuellem Stand der Forschung werden Monozyten an den Ort der Entzündung angezogen, dort verwandeln sie sich unter anderem in Makrophagen. Die Identifikation unterschiedlicher Makrophagenphänotypen sowie deren Funktion könnte zum besseren Verständnis der postischämischen Inflammationsreaktion beitragen [158]. Bei den Makrophagen wird im Allgemeinen zwischen pro-inflammatorischen M1 und reparativen, anti-inflammatorischen M2-Makrophagen unterschieden. Basierend auf diesen Daten wurde in nachfolgenden FACS-Analysen CXCR4⁺/CD11b⁺ Subpopulationen durch spezielle Monozyten bzw. Makrophagen-Marker CD86-PE (M1), CD206-PE (M2a), F4/80-PE näher spezifiziert. Abbildung 24 zeigt beispielhaft die durchgeführte Gatingstrategie.

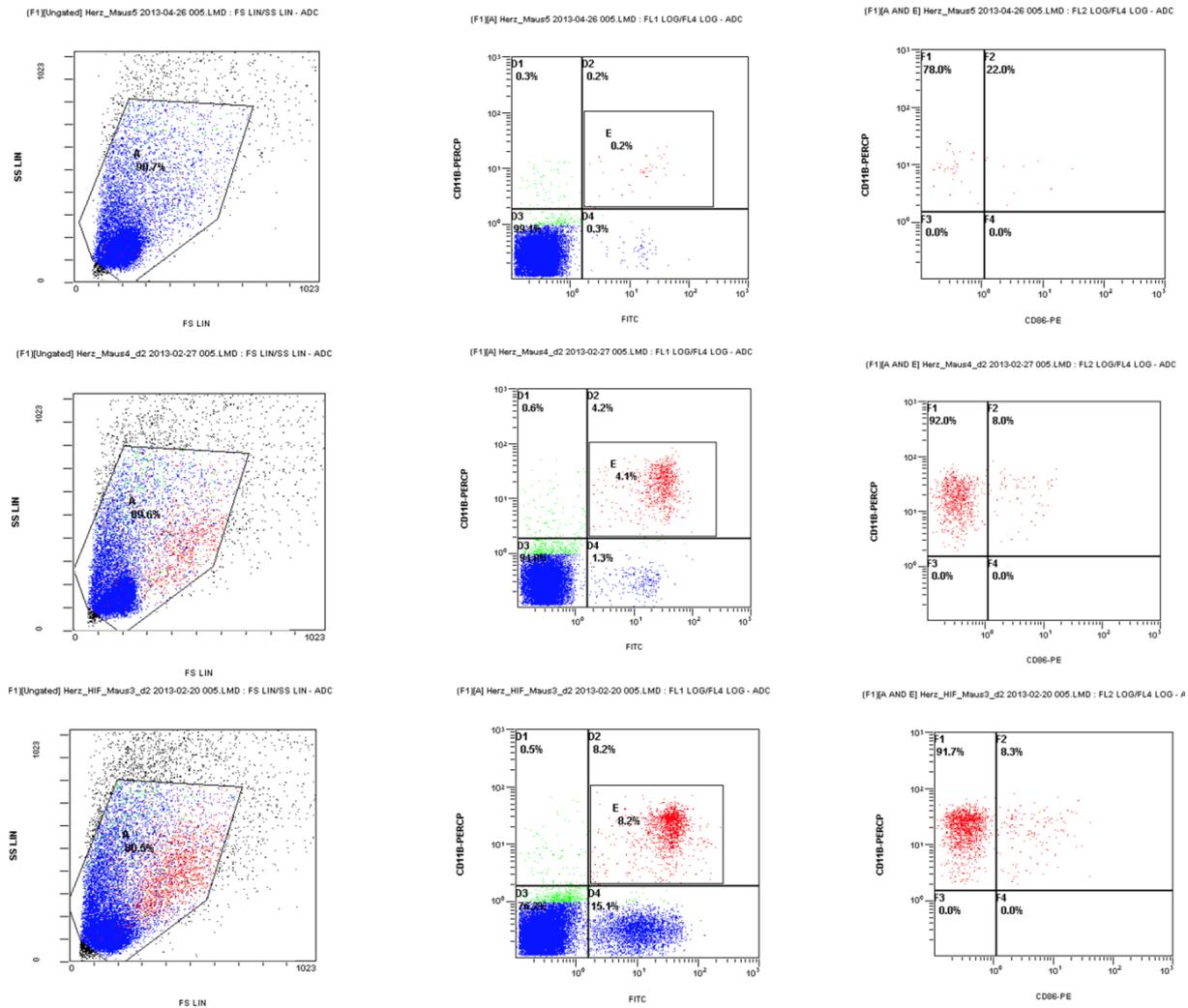


Abbildung 24: Beispielhafte Gating-Strategie. Obere Diagrammreihe: Kontrollgruppe; Mittlere Reihe: Tag 2 post MI; Untere Reihe: Tag 2, post MI + DMOG;

Links: SSC/FSC-Plot mit Analysefenster (Gate) A

Mitte: Gating nach CXCR4/CD11b zeigte sowohl eine Erhöhung der CXCR4⁺-Zellen (jeweils D4) als auch eine erhöhte CXCR4⁺/CD11b⁺-Population (jeweils D2) post MI, insbesondere nach der Behandlung mit DMOG

Rechts: Aus dem Gate E mit der CXCR4⁺/CD11b⁺-Population wurde eine Koexpression mit CD86 untersucht. Hierbei zeigte sich zur Gesamtpopulation (Gate A) eine prozentuale postschämische Erhöhung der CXCR4/CD11b⁺/CD86⁺-Population (F2xD2), welche unter der Therapie mit DMOG weiter anstieg.

Insgesamt konnte die FACS-Analyse eine postschämische Erhöhung der CXCR4⁺-Zellen bestätigen und eine erhöhte CXCR4⁺/CD11b⁺-Population nachweisen. Auch wenn alle untersuchten Zelltypen im ischämischen Herzen hochreguliert waren, zeigte sich vor allem bei der Makrophagensubpopulation ein signifikanter Anstieg (Abb. 25). Während der Anteil der reparativen CD206-Makrophagen im ischämischen Herzen am Tag 7 im Vergleich zu Tag 2 signifikant abnahm, blieben pro-inflammatorische CD86-Makrophagen und F4/80-Makrophagen weiterhin hoch exprimiert. Analog dazu

zeigten sich im Knochenmark eine bestehende Hochregulierung der CD86- und F4/80-Makrophagen am Tag 7 postischämisch. Diese Beobachtung verdeutlicht die zuvor beschriebene Rolle von Makrophagen im ischämischen Herzen.

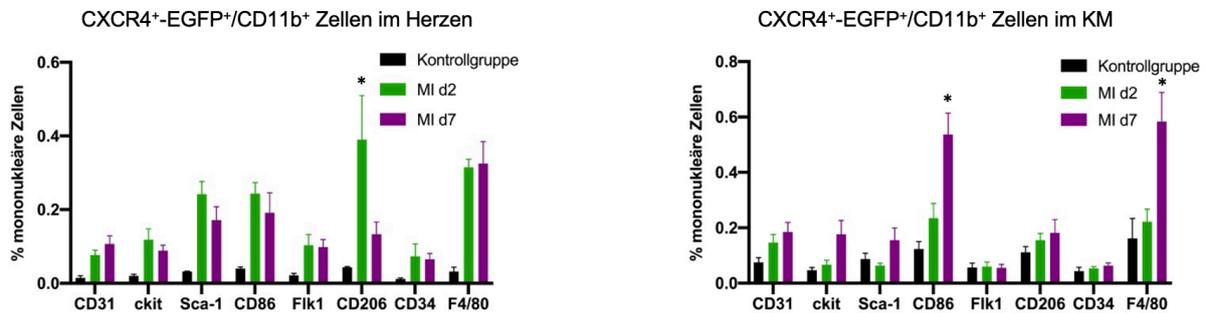


Abbildung 25: Die Analyse von CXCR4⁺-EGFP⁺/CD11b⁺ Zellen ergab eine Hochregulierung der untersuchten Makrophagensubpopulation CD86, CD206 und F4/80 im ischämischen Herzen. Im Knochenmark waren vor allem die CD86- und F4/80-Population am Tag 7 erhöht. Koexprimierte pro-angiogenetische CD31-, CD34-, Flk-1 Endothelzellen sowie Sca-1- und c-kit-Zellen waren im postischämischen Herzen ebenfalls hochreguliert, insbesondere Sca-1. Die Ergebnisse präsentieren den Mittelwert \pm SD (n = 6), *p < 0.05 MI d2 vs. MI d7.

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung des Herzens, bei der die Koexpression von CXCR4-EGFP⁺ Zellen mit CD31 bzw. CD11b⁺ überprüft wurden, konnte unsere Arbeitsgruppe eine post-ischämische Rekrutierung von CXCR4-EGFP⁺-Zellen bestätigen. Die deutliche Koexpression von CD11b auf CXCR4-EGFP⁺ Zellen in der Immunfluoreszenzfärbung zeigte eindrücklich, dass die erhobene FACS-Daten mittels einer zweiten Methode repliziert werden können (siehe Abb. 26). Der Versuch wurde von M. Messner, Medizinische Klinik III, Medizinische Universität Innsbruck, durchgeführt.

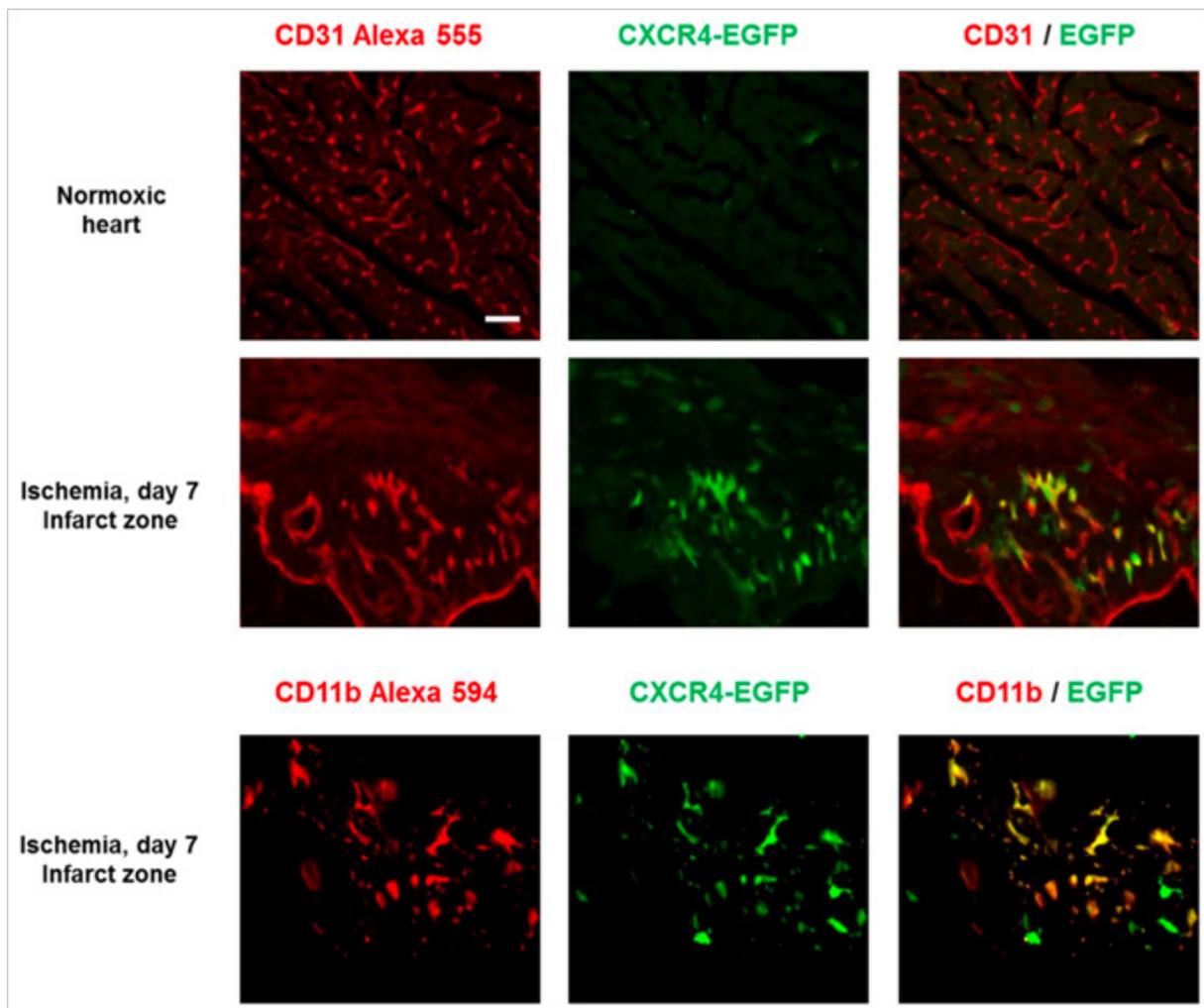


Abbildung 26: Immunofluoreszenzfärbung des Herzens oben: Unter Normoxie gab es keine relevante Expression von CXCR4-EGFP⁺ Zellen; mittlere Reihe: Deutliche Koexpression von CD31 und CXCR4-EGFP⁺ in der Infarktzone 7 Tage post-ischämisch; unten: Koexpression von CD11b und CXCR4-EGFP⁺ Zellen 7 Tage post-ischämisch (Ghadge et al., „Prolyl-hydroxylase inhibition induces SDF-1 associated with increased CXCR4⁺/CD11b⁺ subpopulations and cardiac repair“ (J Mol Med (Berl) 2017; 95(8): 825–837))

5.1.2 Prolylhydroxylase-Inhibition erhöht CXCR4-EGFP⁺/CD11b⁺ Zellen im Knochenmark und Herzen nach einem Herzinfarkt

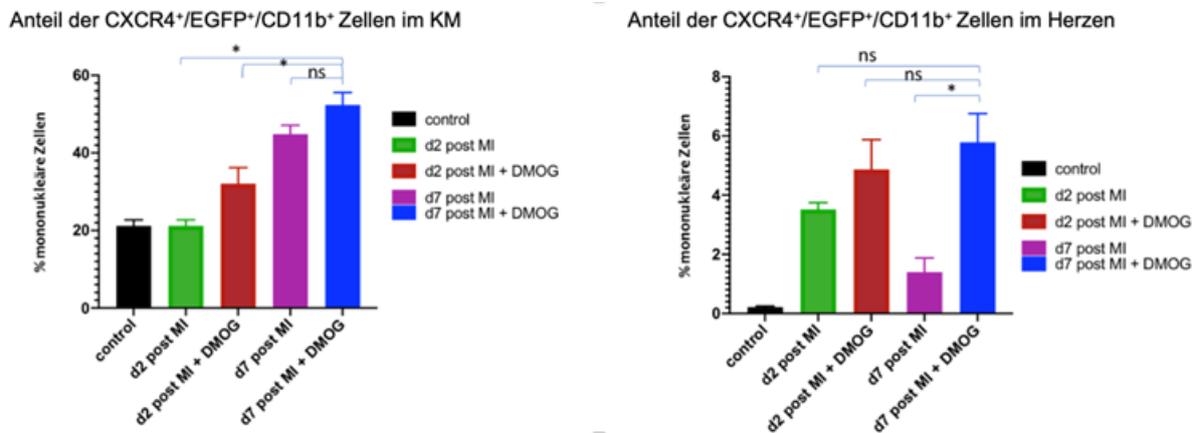


Abbildung 27: Unter der Behandlung mit DMOG kommt es postischämisch zu einer Erhöhung der CXCR4-EGFP⁺/CD11b⁺ Zellen im Knochenmark und Herzen. Die Ergebnisse präsentieren den Mittelwert ± SD (n = 6), *p < 0.05.

Um unsere Arbeitshypothese bezüglich des positiven Effektes von PHI auf die CXCR4⁺-Population zu untersuchen wurden DMOG-behandelte Tiere nach zwei bzw. sieben Tage einer FACS-Analyse unterzogen. Nach systemischer Applikation von DMOG konnte im Knochenmark und im Herzen eine Erhöhung der CXCR4⁺/EGFP⁺/CD11b⁺-Population an beiden Zeitpunkten nachgewiesen werden (siehe Abb.27). Insbesondere im Knochenmark betrug der Anteil der CXCR4⁺/EGFP⁺/CD11b⁺-Zellen am Tag 7 post MI knapp 50% der mononukleären Zellen. Im ischämischen Herzen nahm die CXCR4⁺/EGFP⁺/CD11b⁺ Population in der nicht-therapierten Gruppe von Tag 2 auf Tag 7 ab, in der Therapiegruppe stieg sie dagegen an. Vor allem ist der Anteil kardialer CXCR4⁺/EGFP⁺/CD11b⁺Zellen am Tag 7 in der Therapiegruppe im Vergleich mit der nicht-therapierten Gruppe signifikant erhöht. Ein Vergleich der CXCR4⁺/EGFP⁺/CD11b⁺Zellen dieser beiden Gruppen im Knochenmark ergab dagegen keinen signifikanten Unterschied, wobei die CXCR4⁺/EGFP⁺/CD11b⁺ Population in der Therapiegruppe prozentual höher ist. Das Verhältnis der CXCR4⁺/EGFP⁺/CD11b⁺ Population im Knochenmark (d7 vs. d2) betrug 1,3 in der MI-Gruppe und 1,6 in der Therapiegruppe. Im Herzen betrug dieses Verhältnis 0,4 in der MI-Gruppe (d2>d7) und 1,2 (d2<d7) in der Therapiegruppe. Die anhaltend erhöhte CXCR4⁺/EGFP⁺/CD11b⁺ Zellpopulation am Tag 7 in der Therapiegruppe deutete auf eine PHI-vermittelte verstärkte Mobilisierung und Homing zum ischämischen Herzen hin.

5.1.3 Prolyhydroxylase-Inhibition erhöht CXCR4⁺EGFP⁺/CD11b⁺ Subpopulationen im ischämischen Herzen

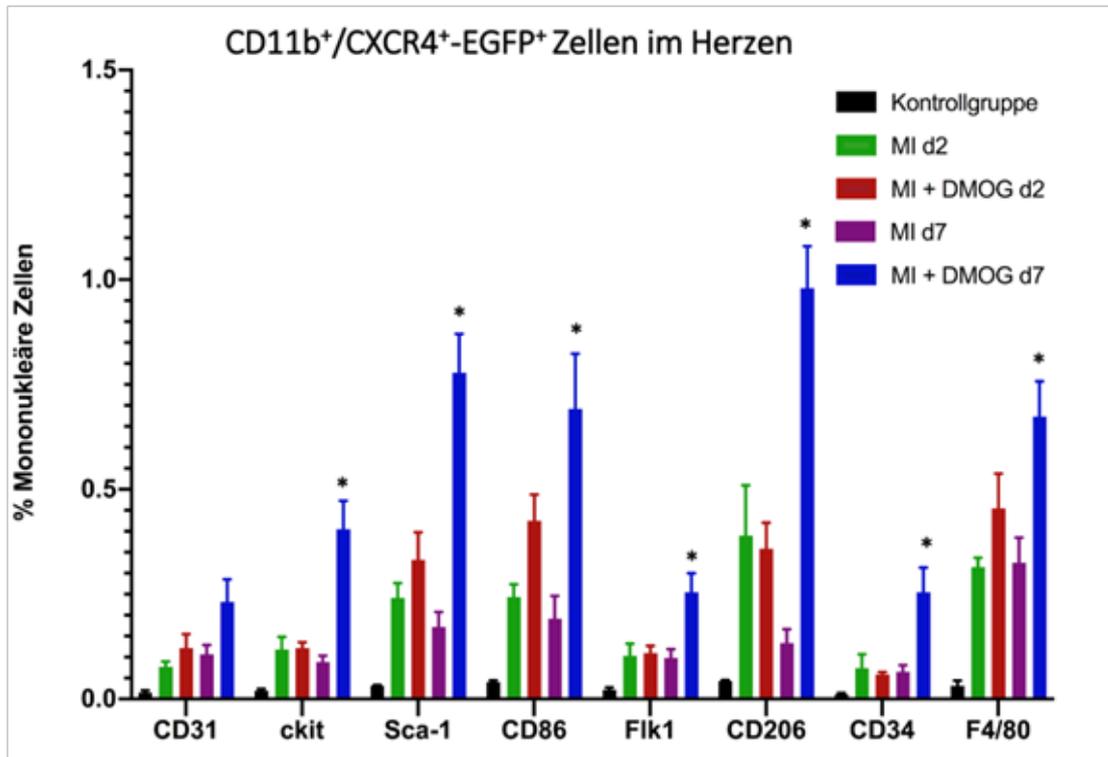


Abbildung 28: Signifikanter Anstieg der c-kit-, Sca1-, Flk1-, CD86-, CD206- und F4/80- CD11b⁺/CXCR4⁺-EGFP⁺ Populationen am Tag 7 in der Infarkt-Gruppe unter PHI-Therapie. Die Ergebnisse präsentieren den Mittelwert \pm SD (n = 6), *p < 0.05 MI d7 vs. MI + DMOG d7.

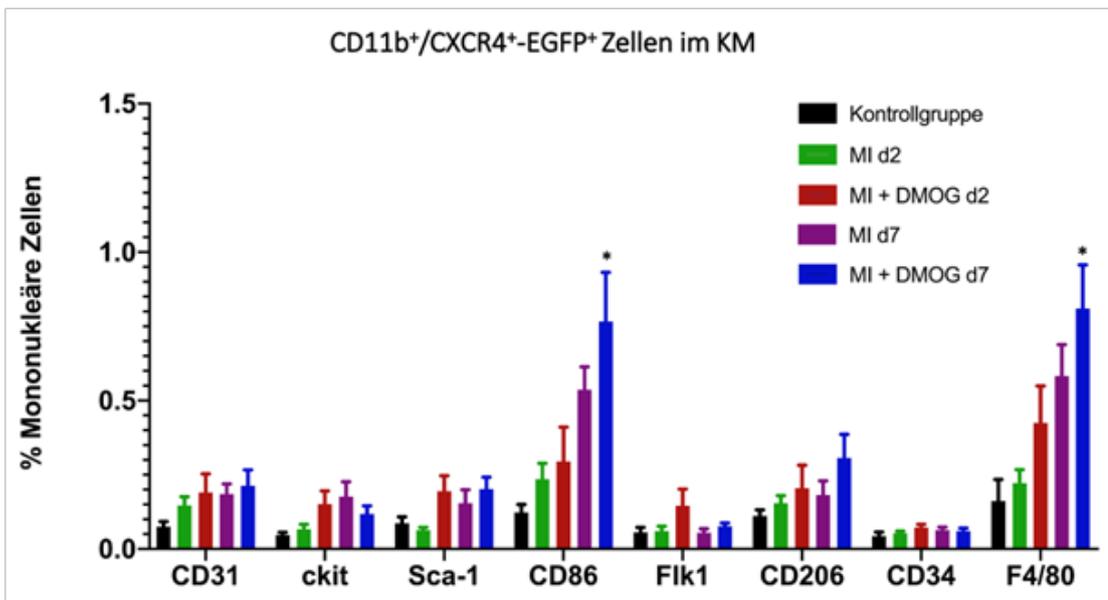


Abbildung 29: In der Infarkt-Gruppe mit und ohne Therapie (KM) kommt es zum Anstieg von Sca1-, CD86-, CD206- und F4/80- Populationen. Im Knochenmark ist die CD86-Population stärker vertreten als die CD206-Population. Mögliche Erklärung: Sowohl CD86 als auch CD206 werden gleich stark hochreguliert. Es werden jedoch mehr CD206-Zellen mobilisiert. Die Ergebnisse präsentieren den Mittelwert \pm SD (n = 6), *p < 0.05 MI + DMOG d2 vs. MI + DMOG d7.

Die weiterführende Untersuchung der CXCR4⁺-EGFP⁺/CD11b⁺ auf eine Koexpression mit den Oberflächenmarkern CD31, CD34 und Flk-1, c-kit und Sca-1 sowie den Makrophagenmarkern F4/80, M1-Marker CD86 und M2-Marker CD206 ergab eine signifikante Erhöhung der untersuchten Subpopulationen im ischämischen Herzen, insbesondere in der Therapiegruppe am Tag 7 (Abb. 28). Im Knochenmark wurde nur bei der CD86⁺ und F4/80⁺-Population ein signifikanter Anstieg festgestellt (Abb. 29). Die Frage, warum eine Signifikanz im ischämischen Herzen am Tag 7 in der Therapiegruppe festgestellt wurde, während im Knochenmark keine wesentliche Erhöhung der Zellen verzeichnet wurde, kann möglicherweise wie folgt erklärt werden: Im Knochenmark hat wahrscheinlich tatsächlich eine PHI-vermittelte Hochregulation aller untersuchten Zelltypen stattgefunden. Aufgrund der verbesserten Mobilisierung und des Homings dieser Zelltypen zum Herzen fehlen sie daher anteilig im Knochenmark. Mit Hilfe von Western Blot Analysen konnte unsere Arbeitsgruppe weiterhin zeigen, dass DMOG in der Lage ist, HIF1- α zu induzieren. Durch einen ELISA -Assay konnte unsere Arbeitshypothese verifiziert werden, dass die Hemmung des HIF-1 α Abbaus zu einer erhöhten Expression von SDF-1 führt. Die Analyse der Expression von CXCR4 mRNA auf mononukleäre Knochenmarkszellen bestätigte die Wirkung von PHI auf die mononukleäre Zellpopulation. Diese drei Versuche wurden von Britta Husse und Dr. Ghagde durchgeführt [164]. Die Wirkung einer PHI auf die einzelnen Subpopulationen wird nachfolgend detaillierter dargestellt.

5.1.3.1 Hemmung des HIF-1 α Abbaus durch selektive Inhibition der Prolyl-Hydroxylase erhöht pro-angiogenetischen Endothelzellen im ischämischen Herzen

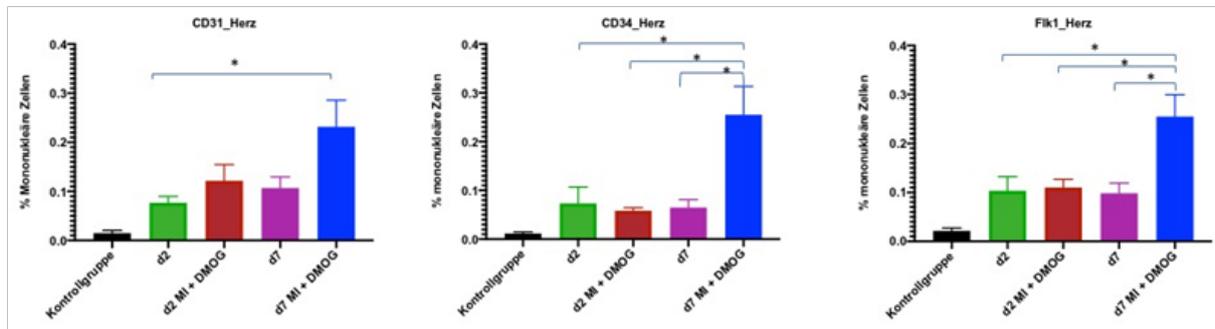


Abbildung 30: PHI erhöht den Anteil der pro-angiogenetischen Endothelzellen im ischämischen Herzen. Die Ergebnisse präsentieren den Mittelwert \pm SD (n = 6), *p < 0.05.

Pro-angiogenetische CD31-, Flk-1, und CD34- Zellen sind unter normoxischen Bedingungen kaum im Herzen nachweisbar. Postischämisch wurde eine Erhöhung dieser Zellpopulationen beobachtet, die im Verlauf ohne Therapie keine nennenswerten Veränderungen aufweisen. Unter 7 tägiger Therapie mit dem PHI DMOG wurde am Tag 7 ein signifikanter Anstieg verzeichnet und ließ eine verbesserte Angiogenese vermuten.

5.1.3.2 Hemmung des HIF-1 α Abbaus durch selektive Inhibition der Prolyl-Hydroxylase erhöht c-kit⁺- und Sca-1⁺CXCR4⁺EGFP⁺/CD11b⁺ Zellen im ischämischen Herzen

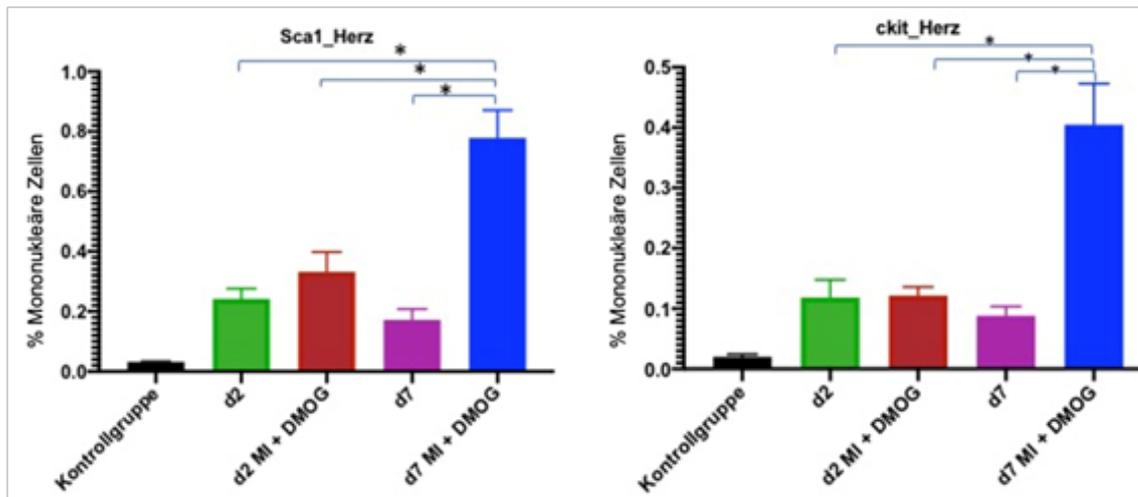


Abbildung 31: PHI erhöht den Anteil der c-kit⁺ und Sca-1⁺-Zellen im ischämischen Herzen. Die Ergebnisse präsentieren den Mittelwert \pm SD (n = 6), *p < 0.05.

Analog zum Anstieg pro-angiogenetischen CD31-, CD34- und Flk1-CD11b⁺ Zellen wurde eine Koexpression von CXCR4-EGFP⁺/CD11b⁺-Zellen mit den Stammzellmarkern c-kit und Sca-1 untersucht (Abb. 31). Unter Normoxie wurden kaum Sca-1 und c-kit-Zellen nachgewiesen. Postischämisch wurde am Tag 2 ein Anstieg der Zellen beobachtet, gefolgt von einer Abnahme am Tag 7. Unter Behandlung mit dem Prolylhydroxylase-Inhibitor DMOG zeigten sich am Tag 2 post MI keine relevanten Unterschiede in den beiden Gruppen. Am Tag 7 konnte dagegen eine signifikante Erhöhung der Zellen im ischämischen Herzen beobachtet werden. Trotz des beobachteten Anstiegs ist eine sichere Aussage über eine PHI-vermittelte Stammzellmobilisierung nicht möglich, da eine Koexpression mit weiteren Stammzellmarkern nicht untersucht wurde.

5.1.3.3 Hemmung des HIF-1 α Abbaus durch selektive Inhibition der Prolyl-Hydroxylase wirkt positiv auf das M2/M1-Verhältnis

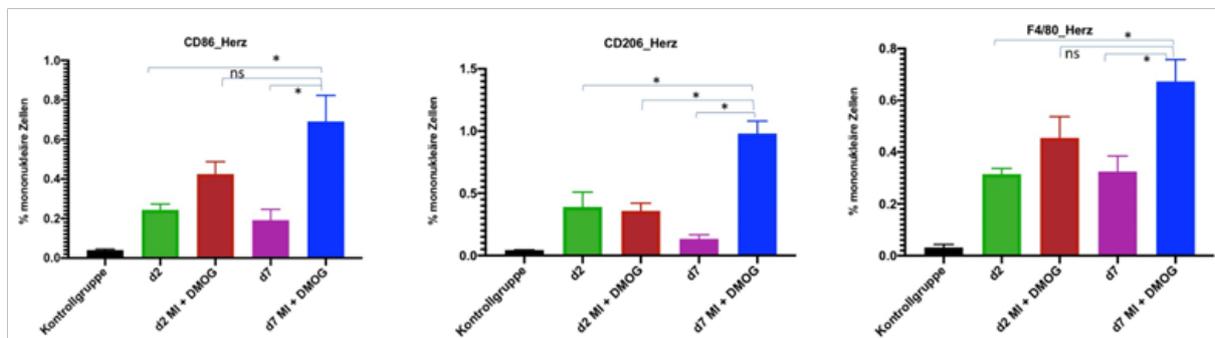


Abbildung 32: Nach PHI-Therapie fällt das Verhältnis M2-/M1-Makrophagen (CD206⁺/CD86⁺) zu Gunsten der M2-Makrophagen. Die Ergebnisse präsentieren den Mittelwert \pm SD (n = 6), *p < 0.05.

Nach 7-tägiger Behandlung mit einem PHI wurde ein signifikanter Anstieg der CD86-, CD206- und F4/80- Subpopulation beobachtet (Abb.32). Bei einem Vergleich der Ergebnisse von Tag 2 mit

Tag 7 mit und ohne Therapie (MI d2 vs. MI d7 sowie MI + DMOG d2 vs. MI + DMOG d7) konnte bei CD86- und F4/80-Subpopulation statistisch keine signifikante Veränderung festgestellt werden. Eine prozentuale Erhöhung der Zellen in der Therapiegruppe (MI + DMOG d2 vs. MI + DMOG d7) wurde jedoch beobachtet. Interessanterweise fand bei den CD206⁺-Zellen in der Therapiegruppe (MI + DMOG d2 vs. MI + DMOG d7) eine signifikante Erhöhung statt. Zudem beträgt das Verhältnis der CD206⁺/CD86⁺-Zellen am Tag 7 in der Infarktgruppe ohne Therapie (MI d7) 0,7 und in der Therapiegruppe (MI + DMOG d7) 1,42. Somit hat sich das M2/M1-Verhältnis nach der Therapie mit einem PHI verdoppelt und suggeriert eine Feinmodulation der Makrophagen zu Gunsten der reparativen M2-Makrophagen.

5.2 Hämodynamische Auswertung

5.2.1 Anmerkung zu den hämodynamischen Daten in dieser Arbeit

Die LAD-Ligation der Versuchstiere sowie die dargestellten hämodynamischen Messungen in dieser Arbeit wurden von der Verfasserin durchgeführt. Aufgrund der niedrigen Zahl der überlebenden Tiere und der damit verbundenen unzureichenden Vergleichbarkeit sowie Aussagekraft wurden die Hämodynamik-Messungen sowie die histologische Aufarbeitung der infarzierten Herzen von M. Messner, Universitätsklinik für Innere Medizin III - Kardiologie und Angiologie, Innsbruck, Österreich, wiederholt. Für die Veröffentlichung des Papers „Prolyl-hydroxylase inhibition induces SDF-1 associated with increased CXCR4⁺/CD11b⁺ subpopulations and cardiac repair“ (Ghadge et al., 2017) wurden ausschließlich hämodynamische Daten, die von M. Messner an der Medizinischen Uniklinik Innsbruck erhoben wurden, verwendet. Die hämodynamischen Daten von der Verfasserin sollen lediglich als Ergänzung zur veröffentlichten Arbeit verstanden und diskutiert werden.

5.2.2 Qualität der hämodynamischen Messung

Um die Wirkung der Therapie mit einem PHI auf die Hämodynamik zu untersuchen wurde vier Wochen nach erfolgreicher LAD-Ligation und Überleben der Tiere eine hämodynamische Messung mittels Conductance Messung oder Strömungsleitwert-Katheter-Technik durchgeführt.

Hämodynamische Daten der Kontrollgruppe befinden sich im Normbereich für Mäuse, die mit Ketamin und Xylazin anästhesiert wurden [165]. Daraus folgt, dass die Messung methodisch korrekt durchgeführt und die Daten ordnungsgemäß erhoben wurden.

5.2.3 Erhobene hämodynamische Parameter nach 30 Tagen mit und ohne Therapie

Ein Vergleich der Parameter in der Therapiegruppe mit der infarzierten Gruppe ergab eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion nach einer Behandlung mit einem PHI (siehe Tabelle 11).

Das endsystolische Volumen (ESV) bei den therapierten Tieren war mit $36,17 \pm 2 \mu\text{L}$ um den Faktor 1,15 geringer als das ESV von $41,52 \pm 3 \mu\text{L}$ in der MI-Gruppe. Ein geringeres enddiastolisches Volumen von $44,81 \pm 2 \mu\text{L}$ unter Therapie zeigte sich im Gegensatz zu $47,13 \pm 2 \mu\text{L}$ in der MI-Gruppe.

Zur Beurteilung der linksventrikulären Kontraktilität wurden das Schlagvolumen, das Herzzeitvolu-

men (HZV; Cardiac output), die Ejektionsfraktion (EF), die Schlagkraft und dP/dt max betrachtet. Im Vergleich zur infarzierten Gruppe konnte in der Therapiegruppe eine Verbesserung des Schlagvolumen um 20%, der Ejektionsfraktion und des Herzzeitvolumen um 25%, der Schlagkraft um 26% und dP/dt um 11% in der Therapiegruppe erreicht werden.

Zur Überprüfung der Wirkung von DMOG auf den Gefäßwiderstand infarzierter Tiere, wurde auch die arterielle Nachlast (Ea) bestimmt. Dabei zeigte sich eine verbesserte arterielle Elastizität von $13,00 \pm 1,31$ mmHg/ μ L auf $10,57 \pm 1,69$ mmHg/ μ L.

Zusammenfassend verbessern sich die kardiale Pumpfunktion mit Ejektionsfraktion, dem Schlagvolumen, dem Herzzeitvolumen und der Schlagkraft unter der PHI-Therapie.

	Kontrolle (n=5)	MI d30 (n=7)	MI + DMOG d30 (n=5)
Herzfrequenz (bpm)	363,20 \pm 17,38	295,18 \pm 22,50	295,60 \pm 19,25
Maximales Volumen (μ L)	34,07 \pm 1,47	47,52 \pm 2,28	45,16 \pm 2,06
Minimales Volumen (μ L)	19,67 \pm 1,25	40,21 \pm 2,65	36,17 \pm 1,83
Endsystolisches Volumen (μ L)	20,46 \pm 1,30	41,52 \pm 2,63	36,78 \pm 1,94
Enddiastolisches Volumen (μ L)	32,98 \pm 1,55	47,13 \pm 2,25	44,81 \pm 2,12
Maximaler Druck (mmHg)	98,12 \pm 6,27	90,67 \pm 3,96	89,59 \pm 6,47
Minimaler Druck (mmHg)	6,59 \pm 0,77	4,48 \pm 1,09	3,87 \pm 0,63
Endsystolischer Druck (mmHg)	92,98 \pm 8,33	90,40 \pm 3,11	92,85 \pm 4,83
Enddiastolischer Druck (mmHg)	9,08 \pm 0,59	10,61 \pm 1,70	8,14 \pm 0,99
Schlagvolumen (μ L)	18,39 \pm 1,99	7,31 \pm 0,61	9,01 \pm 1,04
Ejektionsfraktion (%)	55,89 \pm 7,99	15,91 \pm 2,08	19,94 \pm 1,96
Herzzeitvolumen (μ L /min)	6621,61 \pm 680,44	2168,93 \pm 274,85	2702,29 \pm 437,40
Schlagkraft (mmHg* μ L)	1450,73 \pm 157,47	477,07 \pm 40,82	602,63 \pm 55,38
Arterielle Elastizität Ea (mmHg/ μ L)	5,43 \pm 0,94	13,00 \pm 1,31	10,57 \pm 1,69
dP/dt max (mmHg/sec)	8472,28 \pm 818,88	4916,14 \pm 516,69	5443,20 \pm 305,50
Tau_w (msec)	11,27 \pm 1,26	12,01 \pm 1,36	13,46 \pm 0,64

Tabelle 12: Hämodynamische Messdaten

5.3 Postischämische Mortalität

Sowohl für die FACS-Analyse als auch für die hämodynamische Untersuchung wurden initial pro Gruppe n=10 Versuchstiere geplant.

Bei der LAD-Ligation sind mehrere Tiere innerhalb der ersten 2 Stunden infolge von Akutkomplikationen verstorben. In der MI + saline Gruppe sind die Endpunkte (Tod) vor allem innerhalb der ersten 48h aufgetreten, ein zweiter einschneidender Zeitpunkt schien der 5. Tag postoperativ zu sein. In der mit DMOG behandelten Gruppe war die Verteilung der Endpunkte bis Tag 9 postopera-

tiv gelockert, wobei in der DMOG behandelter Herzkathetergruppe 2 Endpunkte innerhalb der ersten 10 Tagen auftraten. Dennoch gibt es zwischen den beiden therapierten und nicht-therapierten Gruppen keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Überlebens.

Bei der Durchführung der hämodynamischen Messungen kam es zu operativen Komplikationen, die die terminale n-Zahl deutlich reduzierten. Dazu gehörten beispielsweise starker Blutverlust, Narkosekomplikationen, Aortendissektion und Ventrikelruptur durch Verschieben des Katheters. In den nachfolgend aufgeführten Mortalitätskurven wurden nur Ereignisse (Tod) innerhalb der 30 Tage nach LAD-Ligation dokumentiert. Die Ereignisse/Zwischenfälle am Tag der hämodynamischen Messung wurden hierbei nicht berücksichtigt.

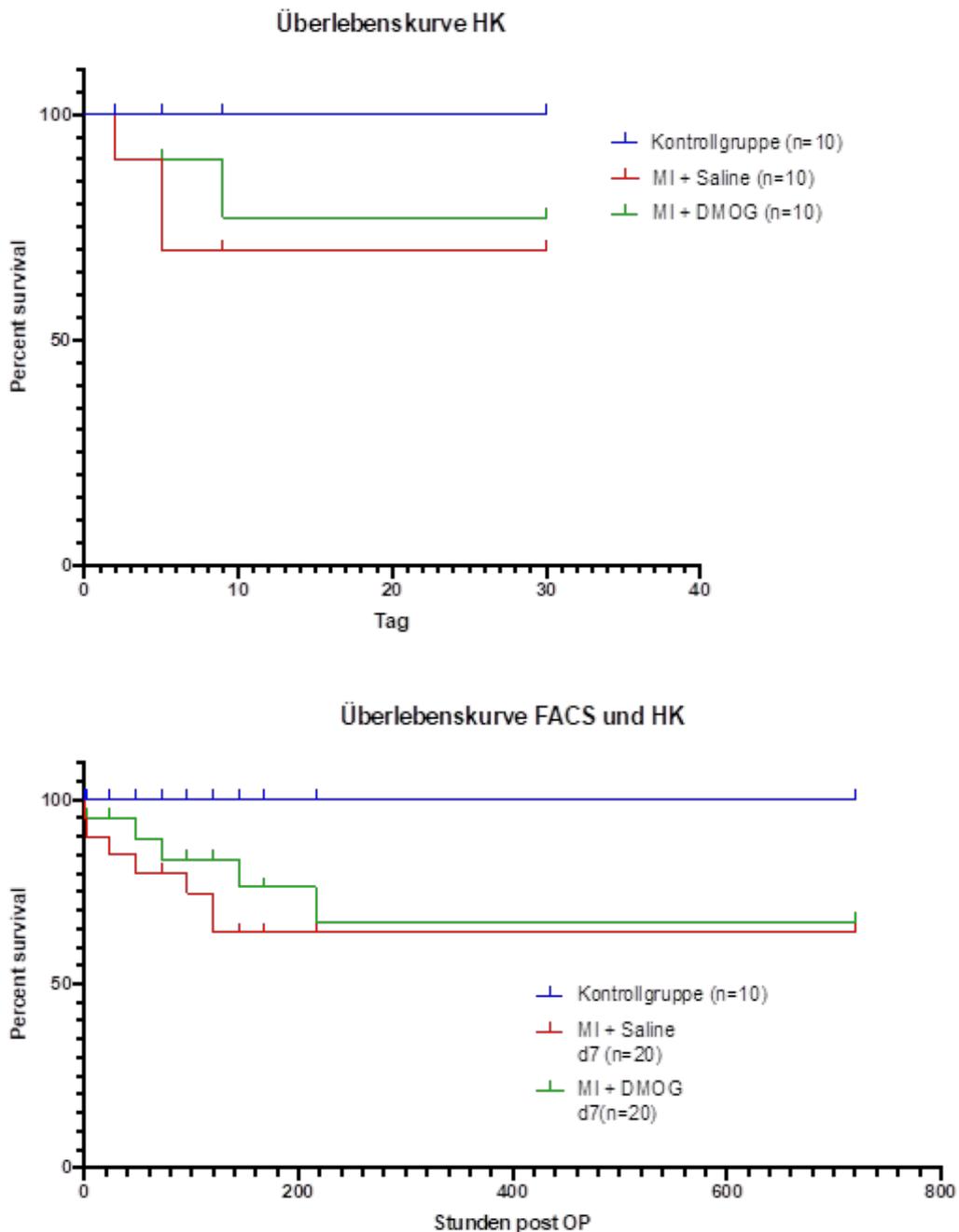


Abbildung 33: Mortalitätskurve

VI. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit widmete sich der Identifizierung der CXCR4⁺-Population und ihrer Rolle im postischämischen Herzen. Basierend auf dem gegenwärtigen wissenschaftlichen Kenntnisstand über die SDF1-CXCR4-Achse hat unsere Arbeitsgruppe die Inhibition der Prolylhydroxylase als ein potentiell Therapieziel in Aussicht gestellt. Uns interessierte vor allem die Wirkung eines PHI auf die CXCR4⁺-Zellpopulation sowie auf die kardiale Pumpfunktion.

In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass unter normoxischen Bedingungen ein Großteil der CXCR4⁺-Zellen im Knochenmark nachgewiesen werden konnte, während ihre Präsenz im Herzen kaum vorhanden war. Postischämisch haben wir jedoch eine Erhöhung der CXCR4⁺-Zellen sowohl im Knochenmark als auch im Herzen festgestellt. Durch die Markierung der CXCR4⁺-Zellen mit dem Oberflächenmarker CD45 konnte ihr Ursprung am ehesten im blutbildenden System des Knochenmarks auf Leukozyten identifiziert werden. Weiterführende FACS-Analysen deuteten auf eine entscheidende Beteiligung der CD11b⁺Zellpopulation beim kardialen Reparaturprozess hin. Insbesondere konnten wir mit unseren Versuchen zeigen, dass die systemische Applikation des Prolylhydroxylase-Inhibitors DMOG zu einer verstärkten Rekrutierung der CXCR4⁺-Zellen führte. Diese verstärkte Rekrutierung der CXCR4⁺-Zellen wurde sowohl durch einen wahrscheinlich effektiveren Verlauf der Entzündungsreaktion als auch durch die parakrinen Effekte der rekrutierten Zellen begünstigt. Als Resultat beobachteten wir eine verbesserte Herzfunktion in der Gruppe der therapierten Tiere. Im Folgenden werden die einzelnen Aspekte ausführlicher diskutiert.

6.1 Die Charakterisierung der CXCR4⁺-Population und ihrer Rolle im ischämischen Herzen

Die ersten FACS-Analysen ergaben, dass in der CD45⁺CXCR4⁺EGFP⁺-Population im Knochenmark eine hohe Koexpression von CD11b-Monozyten beobachtet wurde, die postischämisch signifikant anstieg [162] (siehe Abb. 23). Ein Anstieg der CD45⁺/CXCR4⁺EGFP⁺/CD11b⁺ - Zellpopulation wurde auch im ischämischen Herzen festgestellt. Zusätzlich zeigte sich eine postischämische Hochregulierung der koexprimierten CD4⁺-T-Zellen, CD20⁺-B-Zellen und der pro-angiogenetisch wirkenden CD31, CD34, Flk-1- Endothelzellen sowie der Sca-1⁺-, c-kit⁺- und c-kit⁺Sca⁺Lin⁻ - Zellen, welche unter Normoxie nur in geringem Prozentsatz nachgewiesen wurden. Der Anteil von CD45⁻ CXCR4⁺-Population war nur geringfügig nachweisbar. Bei genauerer Betrachtung wurde jedoch festgestellt, dass in der CD45⁻ Population des Knochenmarks auch eine Zunahme von Zellen mit CD11b⁺, CD31⁺, Flk-1, c-kit⁺, Sca⁺ Expression zu beobachten war (Abb. 23: obere Diagramme). Die CD45⁻c-kit⁺Sca⁺Lin⁻ Population im Knochenmark nahm am 7. Tag postischämisch ab, während CD45⁺c-kit⁺Sca⁺Lin⁻ Zellen minimal erhöht waren. Shivtiel et al. schlugen vor, dass Stamm- und Progenitorzellen die CD45 Expression modulieren können, was ihre Retention, ihr Überleben und ihre Motilität beeinflussen würde. Insbesondere stellten sie auch eine stressabhängige Erhöhung der CD45⁺CD11b⁺ Population fest [158]. Obwohl keine definitive Aussage über die Rekrutierung von hämatopoetische Stammzellen getroffen werden kann, bekräftigten diese Daten die Rolle der SDF-1/CXCR4-Achse im postischämischen Herzen. Möglicherweise handelte es sich bei der CXCR4⁺c-kit⁺,

- Sca-1⁺, -c-kit⁺Sca⁺Lin⁻ Population um jene Progenitorzellen, von denen berichtet wurde, dass sie sich zu Endothelzellen und glatten Muskelzellen differenzieren können bzw. parakrin zur kardialen Regeneration und Reparatur beitragen können [49, 163, 164].

Der auffallend hohe Anteil an CD45⁺CXCR4⁺EGFP⁺ CD11b⁻ - Zellen am 7. Tag postischämisch deutete auf eine akzelerierte monozytäre Zelleinwanderung hin. Der Oberflächenmarker CD11b wird vor allem auf Monozyten/Makrophagen, Granulozyten, Dendritischen Zellen, natürliche Killerzellen sowie T- und B-Zellen exprimiert. Als Integrin α -M ist er mit Integrin- β 2 (CD18) assoziiert und beispielsweise an der Zytotoxizität von NK-Zellen sowie an der Zelladhäsion und Diapedese von Monozyten und Neutrophilen beteiligt [166]. Des Weiteren wurden CD11b positiven Zellen VEGF-vermittelt eine günstige Wirkung auf die Angiogenese zugeschrieben [151]. Die Erhöhung der CD45⁺CXCR4⁺EGFP⁺ CD11b⁻ - Zellen ließ auf eine relevante Beteiligung der CXCR4⁺-Zellen als Monozyten/Makrophagen an der kardialen Reparatur hindeuten. Die deutliche Koexpression von CD31 und CD11b auf CXCR4- EGFP⁺ Zellen in der Immunfluoreszenzfärbung zeigte, dass die erhobenen FACS-Daten mittels einer zweiten Methode repliziert werden können [164]. Den aktuellen Kenntnissen nach sind Monozyten im Blut zirkulierende Zellen des Immunsystems, die für die Zerstörung körperfremder Strukturen durch Phagozytose und die Aktivierung der erworbenen Immunabwehr mittels Antigenpräsentation zuständig sind. Nach der Bildung im Knochenmark und Mobilisierung ins Blut zirkulieren sie dort 1 bis 3 Tage. Bei Kontakt mit Infektionen und Entzündungsreaktionen wandern sie in das betroffene Gewebe ein. Während der Einwanderung in das Gewebe differenzieren sich Monozyten in Makrophagen. In Abhängigkeit der Mikroumgebung können sich Monozyten in unterschiedliche Richtung differenzieren und in den einen oder anderen Subtyp polarisieren [167-169]. Letzteres wird als Klassenwechsel bezeichnet. Es wird zwischen folgenden Subtypen unterschieden:

a) Klassisch aktivierte Monozyten (Ly6C⁺ high/middle), die zu M1-Makrophagen differenzieren und über die Sekretion von IL-6, IL-12, TNF- α , IL-1 β , IL-23 anti-inflammatorisch wirken können.

b) Patrollierende Monozyten (Ly6C⁻ low), die sich aus Ly6C⁺-Population entwickeln und dann den kleinen Gefäßen entlang wandern. Bei vaskulären Entzündungsreaktion können sie sich zu M2 Makrophagen differenzieren und über die Sekretion von IL-10 und TGF- β anti-inflammatorisch agieren. M2-Makrophagen wird außerdem eine pro-angiogenetische Wirkung zugeschrieben [162]. Bei den M2-Makrophagen wird zusätzlich zwischen 3 Subtypen unterschieden, M2a-, M2b- und M2c, die unterschiedliche Wirkmechanismen aufweisen [170].

Im Entzündungsgewebe im Allgemeinen und im ischämischen Herzen im Einzelnen fällt das Verhältnis M1- /M2-Makrophagen in der frühen Entzündungsphase zu Gunsten der M1-Makrophagen aus. In der reparativen Phase kommt die Rolle der M2-Makrophagen zum Tragen. Ein Klassenwechsel zwischen M1- und M2- ist in Abhängigkeit ihrer Mikroumgebung möglich. Es gibt auch Vermutungen, dass Makrophagen existieren, die sowohl Oberflächenproteine von M1 als auch von M2 gleichzeitig exprimieren [162, 169, 171].

Bei der vorliegenden Arbeit haben weiterführende Untersuchungen der CXCR4⁺EGFP⁺ CD11b⁺- Subpopulation auf eine Koexpression mit den Makrophagenmarkern CD86, CD206 und F4/80 einen postischämischen Anstieg der untersuchten Subpopulation ergeben. CD86 gilt als ein Oberflächenprotein der M1-Makrophagen. CD206 ist ein Mannoserezeptor, der auf M2a-Makrophagen exprimiert wird. Das Oberflächenantigen F4/80 wird speziell auf Mausmakrophagen und dendriti-

schen Zellen exprimiert. Es existieren Hinweise, dass F4/80 mit der CD8-T-Zell-Aktivierung assoziiert ist und dadurch pro-inflammatorisch wirkt [172]. Andererseits wurde über Ly6C-F4/80⁺ Makrophagen in der späten reparativen Inflammationsphase im Herzen berichtet, die pro-inflammatorische Wirkung entfalten [173, 174].

Während der Anteil der reparativen CD206⁺-Makrophagen im ischämischen Herzen am Tag 7 im Vergleich zu Tag 2 signifikant abnahm, nahm der Anteil der pro-inflammatorischen CD86⁺-Makrophagen nur geringfügig ab, F4/80⁺-Makrophagen blieben dagegen gleichbleibend exprimiert. Im Knochenmark bestand in der nicht-therapierten Gruppe weiterhin eine Hochregulierung der CD86⁺- und F4/80⁺-Makrophagen am Tag 7 postischämisch.

Unsere Daten stehen im Einklang mit der gängigen Literatur, dass Monozyten/Makrophagen postischämisch zum Herzen rekrutiert werden [175]. Jedoch sind die Daten bezüglich des Verhältnisses der CD11b⁺CD86⁺/CD206⁺-Zellen in der nicht-therapierten Gruppe am zweiten Tag postischämisch im Vergleich zum siebten Tag konträr zu einigen anderen Forschungsarbeiten [162, 176]. Außerdem widersprechen sie der gängigen Annahme, dass M1-Makrophagen die frühe Inflammationsphase und M2 die Spätphase [44, 175] dominieren, wobei die Entzündungsphasen ein bis zwei Wochen dauern können [44]. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die untersuchten CD86⁺-Zellen zufälligerweise in der Frühphase als Vorbereitung auf einen Klassenwechsel ebenfalls CD206 exprimierten, wie Ben-Mordechai et al. veröffentlichte [162] und somit die Anzahl der CD206⁺-Zellen falsch erhöht gemessen wurde. Das Verhältnis M1-/M2-Makrophagen in der nicht-therapierten Gruppe fiel in unserer Untersuchung am Tag 7 zu Gunsten der CD86⁺-markierten Zellen aus. Dieser Befund könnte auch dadurch erklärt werden, dass eine Polarisation in Richtung M2-Makrophagen wegen fortbestehender Inflammation oder notwendiger ausgiebiger Debrisbeseitigung aufgrund eines großen Infarktes nicht möglich war. Eine prolongierte Entzündungsreaktion hat ein schlechteres Outcome hinsichtlich des Remodeling-Prozesses zur Folge [177]. Zudem handelte es sich hierbei um CXCR4⁺/EGFP⁺/CD11b⁺/CD86⁺ bzw. CXCR4⁺/EGFP⁺/CD11b⁺/CD206⁺-Zellen, die entsprechend des SDF-1-Gefälles agierten. Wie oben bereits erwähnt, wird SDF-1 bis zu 72h im postischämischen Herzen hoch exprimiert und fällt danach allmählich ab [23, 129]. Daraus folgt, dass CXCR4⁺-Zellen vor allem in diesen 72h zum Herzen angezogen werden. Gemäß des SDF1-CXCR4-Gefälles beobachteten wir von Tag 2 auf Tag 7 eine Abnahme der CXCR4⁺/EGFP⁺/CD11b⁺ Zellen. Dies legt nahe, dass mehr CXCR4⁺-Zellen zum ischämischen Herzen gelockt werden könnten, um den Anteil der rekrutierten Makrophagen zu erhöhen. Eine erhöhte Anzahl von Makrophagen könnte die Debrisbeseitigung effektiver gestalten, woraus ein früherer und verstärkter M1/M2-Klassenwechsel resultiert [178].

Interessanterweise ist der Anteil der F4/80⁺-Zellen in der nicht-therapierten Gruppe am Tag 2 und Tag 7 annähernd gleichbleibend. In der Literatur werden den F4/80 präsentierenden Zellen sowohl pro-inflammatorische als auch anti-inflammatorisch/pro-angiogenetische Wirkungen zugeschrieben [168, 172-174]. Daraus könnte schlussgefolgert werden, dass bei diesen Zellen ein Klassenwechsel von pro-inflammatorisch in der Frühphase der Entzündungsreaktion zu möglicherweise anti-inflammatorisch in der Spätphase stattfindet. Eine Erhöhung der CD11b⁺/F4/80⁺-Zellen in der Spätphase könnte also positiv auf die kardiale Reparatur wirken. Da CD11b auch von neutrophilen Granulozyten exprimiert werden, könnte die postischämische Heilung auch zusätzlich auf die Polarisation der Makrophagen in Richtung M2c-Phänotypus zurückzuführen sein [179].

Da bei kardialen Reparaturprozessen endotheliale und pro-angiogenetische CD31, Flk-1, CD34, c-kit und Sca-1 Zellpopulationen auch eine wichtige Rolle einnehmen [180], wurde, im Hinblick auf die parakrine Wirkung der Zellen, ihre Koexpression auf CXCR4⁺/EGFP⁺/CD11b⁺ untersucht. Es zeigte sich, dass insbesondere Sca-1-Zellen postischämisch rekrutiert werden, während die anderen Zelltypen nur in geringen Maßen anstiegen.

6.2 Die Wirkung des Prolylhydroxylase-Inhibitors auf die CXCR4⁺-Population

Um unsere Arbeitshypothese bezüglich des positiven Effektes von PHI auf die CXCR4⁺-Population zu untersuchen, wurden DMOG-behandelte Tiere an Tag 2 und an Tag 7 einer FACS-Analyse unterzogen. Im Knochenmark und im Herzen beobachteten wir eine Erhöhung der CXCR4⁺/EGFP⁺/CD11b⁺-Population an beiden Zeitpunkten (siehe Abb.27). In der nicht-therapierten Gruppe nahm der Anteil der CXCR4⁺/EGFP⁺/CD11b⁺-Zellen im ischämischen Herzen von Tag 2 bis Tag 7 ab, während in der Therapiegruppe ein Anstieg zu beobachten war. Insbesondere war der Anteil der kardialen CXCR4⁺/EGFP⁺/CD11b⁺-Zellen am Tag 7 in der Therapiegruppe im Vergleich mit der nicht-therapierten Gruppe signifikant erhöht. Ein Vergleich der CXCR4⁺/EGFP⁺/CD11b⁺-Zellen in beiden Gruppen im Knochenmark ergab keinen signifikanten Unterschied, obwohl der prozentuale Anteil der CXCR4⁺/EGFP⁺/CD11b⁺ Population in der Therapiegruppe höher war. Die anhaltend erhöhte CXCR4⁺/EGFP⁺/CD11b⁺ Population am Tag 7 in der Therapiegruppe deutet auf eine verstärkte Mobilisierung und ein erfolgreiches Homing zum ischämischen Herzen durch PHI hin. Besonders hervorzuheben ist vor allem das veränderte Verhältnis M2-/M1-Makrophagen (CD206⁺/CD86⁺) zugunsten der M2-Makrophagen nach der Behandlung mit PHI. Während dieses Verhältnis in der MI-Gruppe am Tag 7 mit 0,7 zugunsten der pro-inflammatorischen CD11b⁺CD86⁺-Zellen lag, betrug es in der mit DMOG therapierten Gruppe am Tag 7 1,42. Diese Daten suggerieren, dass PHI eine Feinmodulation der Makrophagen von einem pro-inflammatorischen zu einem anti-inflammatorischen und pro-angiogenetischen Zustand ermöglicht.

Die weiterführende Untersuchung der CXCR4⁺-EGFP⁺/CD11b⁺ auf ihre Koexpression mit den Oberflächenmarkern CD31, CD34 und Flk-1 sowie c-kit und Sca-1, neben den Makrophagenmarkern F4/80, dem M1-Marker CD86 und dem M2-Marker CD206, ergab eine signifikante Erhöhung der untersuchten Subpopulationen im ischämischen Herzen, insbesondere in der Therapiegruppe am Tag 7 (Abb. 28). Im Knochenmark wurde nur bei der CD86⁺ und F4/80⁺-Population ein signifikanter Anstieg festgestellt (Abb. 29). Die Frage, warum eine Signifikanz im ischämischen Herzen am Tag 7 in der Therapiegruppe festgestellt wurde, während im Knochenmark keine wesentliche Erhöhung der Zellen verzeichnet wurde, kann möglicherweise wie folgt erklärt werden: Im Knochenmark hat wahrscheinlich tatsächlich eine PHI-vermittelte Hochregulation aller untersuchten Zelltypen stattgefunden. Aufgrund der verbesserten Mobilisierung und des Homings dieser Zelltypen zum Herzen fehlen sie daher anteilig im Knochenmark.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse suggerieren, dass eine Hemmung des HIF-1 α -Abbaus durch selektive Inhibition der Prolyl-Hydroxylase die Herzfunktion verbessern könnte, in dem zusätzlich CXCR4⁺-Zellen rekrutiert werden, die die Angiogenese und das Remodeling positiv beeinflussen. Die deutliche Koexpression von CD11b und CXCR4-EGFP⁺ Zellen in der Immunfluoreszenzfärbung,

der Nachweis von HIF1- α -Expression im Zellkern mittels Western Blot und die erhöhte SDF1-Expression im ELISA -Assay sowie der erhöhte CXCR4-mRNA-Gehalt auf mononukleären Knochenmarkzellen bestätigten die positive Wirkung von PHI auf die mononukleäre Zellpopulation. Einen positiven Effekt der pharmakologischen Behandlung mit PHI auf Stammzellmobilisierung und Stammzellhoming wurde von einigen Arbeitsgruppen berichtet ([181-183]). In dieser Arbeit haben wir ebenfalls einen PHI-induzierten Anstieg der Sca-1 und c-kit-Zellen beobachtet. Es ist jedoch wichtig anzumerken, dass in dieser Arbeit keine Koexpression mit anderen Stammzellmarkern untersucht wurde, um eine genaue Identifizierung dieser Zellpopulationen vorzunehmen. Daher kann keine definitive Aussage über eine PHI-vermittelte Stammzellmobilisierung getroffen werden. Es bedarf weiterer Experimente, die eine detailliertere Charakterisierung dieser Zellpopulationen und ihre genaue Rolle in der kardialen Regeneration ermöglichen, um eine definitive Aussage über eine PHI-vermittelte Stammzellmobilisierung zu treffen. Es gibt Hinweise darauf, dass die beobachteten c-kit⁺ und Sca-1⁺ Zellpopulationen in der vorliegenden Arbeit eher endotheliale Zellen oder Mastzellen waren, die durch ihre parakrine Wirkung zur kardialen Regeneration beitragen können [184-186].

6.3 Die Wirkung des Prolylhydroxylase-Inhibitors auf die postischämische Herzfunktion

Um die Wirkung der Therapie mit einem PHI auf die Herzfunktion zu untersuchen wurde vier Wochen nach erfolgreicher LAD-Ligation und dem Überleben der Tiere eine hämodynamische Messung mittels Conductance Messung oder Strömungsleitwert-Katheter-Technik durchgeführt. Ein Vergleich der Parameter in der Therapiegruppe mit der infarzierten Gruppe ergab eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion um 20-25% nach einer Behandlung mit einem Prolylhydroxylase-Inhibitor. An dieser Stelle ist anzuführen, dass die hämodynamische Messung stark abhängig ist von äußeren Einflüssen, wie beispielsweise der Qualität der technischen/operativen Ausführung, der Temperatur und der Narkosetiefe. Auch wenn sich die erhobenen hämodynamischen Daten der Kontrollgruppe im Normbereich für Mäuse befanden, die mit Ketamin und Xylazin anästhesiert wurden [165] und daraus geschlossen werden konnte, dass die Messung methodisch korrekt durchgeführt und die Daten ordnungsgemäß erhoben wurden, handelte es sich hierbei jedoch um lebende Organismen, die unterschiedlich auf äußere Einflüsse reagieren. Die Conductance Messung zur Bestimmung der Hämodynamik ist eine schwierig zu erlernende Methodik, die gleichzeitig aufgrund ihrer Invasivität in der Regel nur einmal bei einem Tier durchgeführt werden kann. Bei der geringen Anzahl an Versuchstieren und unterschiedlichen Gruppengrößen (n=7 in der nichttherapierten und n=5 in der therapierten Gruppe) ist die Aussagekraft vor allem in der therapierten Gruppe gering. Die Conductance Messung hat jedoch den Vorteil, dass mit ihr einige spezifische Messungen zur Beurteilung der linksventrikulären Funktion durchgeführt werden können, welche unabhängig von Vor-/Nachlast oder Herzfrequenz sind, da sich die Kathetersignale proportional zum Ventrikelvolumen verhalten [163]. Die erhobenen hämodynamischen Messungen sind dennoch als wegweisend zu betrachten, da sich unsere Ergebnisse in Studien einreihen, in denen eine Behandlung mit DMOG einen positiven Effekt auf die kardiale Funktion nach einem akuten Herzinfarkt ergab [137, 187].

Um den positiven Effekt der PHI-Therapie auf die postischämische kardiale Funktion und Remodeling weiter zu untersuchen und zu verifizieren, wurde der Versuch von M. Messner (wie oben erwähnt) wiederholt und um die Histologie sowie weitere Methodik ergänzt. Hierbei zeigte sich, dass die kardiale Funktion unter der DMOG-Therapie signifikant gebessert wurde. Sowohl das Schlagvolumen, das Herzzeitvolumen sowie die Schlagkraft waren in der Therapiegruppe signifikant erhöht im Vergleich zur nicht therapierten Gruppe. Die histologische Untersuchung bestätigte ebenfalls den positiven Effekt der DMOG-Therapie hinsichtlich der Infarktgröße und der postischämischen ventrikulären Dilatation. Des Weiteren konnte er mittels TUNEL-Essay zeigen, dass die apoptotischen Zellen unter der PHI-Therapie reduziert werden. Durch die Quantifizierung der CD31⁺ Gefäße in der Peri-Infarktzone konnte der positive Effekt der DMOG-Therapie auf die Neovaskularisation bestätigt werden [164].

6.4 Limitationen der Arbeit

In dieser Arbeit wurde ein Mausmodell verwendet, bei dem die zugrundeliegenden pathophysiologischen Abläufe bezüglich der Myokardischämie mit denen des Menschen vergleichbar sind. Die LAD-Ligation ist ein gut etabliertes Modell zur Infarktinduktion und bietet gegenüber anderen größeren Tiermodellen (Hunde, Schweine) den Vorteil, dass die Versuche nicht nur keiner großen Räumlichkeiten bedürfen, sondern auch einen geringeren operativen und personellen Aufwand erfordern [188].

Bei der LAD-Ligation im Tiermodell kommt es jedoch zu variablen Infarktgrößen. Dies ist, ähnlich wie beim Menschen, auf die individuelle Anatomie des Koronargefäßsystems zurückzuführen. Da die Äste der LAD das Myokard bereits nahe an ihrem Ursprung unter dem linken Herzohr penetrieren, wird die Ligatur meist „blind“ durchgeführt [189]. Die operationsbedingte variable Infarktgröße macht einen Vergleich mit Herzinfarkten beim Menschen schwieriger. Dennoch muss eingeräumt werden, dass die Infarktgröße beim Menschen je nach Lokalisation der Verschlussstelle auch stark variieren kann und dass nicht nur die Infarktlokalisierung allein, sondern auch der sogenannte Reperfusionsschaden nach einer erfolgreichen Revaskularisierung (PTCA) für die terminale Infarktgröße mit verantwortlich ist [190, 191]. Mit dieser Methode der operativen LAD-Läsion können reproduzierbare Infarktgrößen mit mäßigem kardialen Remodeling dargestellt werden, so dass hier ein repräsentativer Vergleich zu klinischen Studien möglich ist [192]. Bei dieser Arbeit wurde ein akuter ischämischer Myokardinfarkt vorausgesetzt, der keine Akutbehandlung wie etwa durch Reperfusion mittels PTCA oder Lyse oder medikamentöse postischämische Standardtherapie erhalten hat. Prä- und postoperative, klinisch nicht erfassbare Infektionen, die die Ergebnisse beeinflussen können, konnten im Rahmen der Versuche nicht sicher ausgeschlossen werden. Der Einfluss von Vorerkrankungen und Risikofaktoren, die bei Menschen zur Bildung der KHK führen, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

Lebend- und Totfarbstoffe wurden bei den FACS-Analysen nicht verwendet. Die Entscheidung basierte unter anderem auf der Überlegung, dass lebende CXCR4-Zellpopulation das Signal eGFP emittieren. Steff et. al. hat gezeigt, dass eGFP eine vergleichbare Kinetik und Sensitivität wie herkömmliche Apoptosemarker Annexin-V, Propidium Iodid und ROS aufweist [161]. Die Verwendung von 7AAD hat sich zum Zeitpunkt des Versuchs in kardialen FACS-Analysen noch nicht etabliert. Für

unsere Experimente haben wir uns an der wichtigen und hochrangig publizierten Referenzarbeit von Ben-Mordechai et. al orientiert, bei der ebenfalls auf eine Vitalitätsfärbung verzichtet wurde [162].

Es wurde versucht, die Tiere entsprechend der beschriebenen Protokolle mit größter Sorgfalt zu behandeln. Dennoch handelte es sich hierbei um Untersuchungen in einem lebenden, genetisch veränderten Organismus mit komplexen Stoffwechselfvorgängen, so dass die daraus resultierenden Ergebnisse nicht nur schwierig zu interpretieren, sondern auch nur bedingt vergleichbar sind mit den Vorgängen im menschlichen Körper. Der positive Effekt der Behandlung mit dem PHI auf die Angiogenese wurde hier gemutmaßt und nicht untersucht. Der Einfluss des PHI auf die Angiogenese wurde jedoch in nachfolgenden Arbeiten unserer Arbeitsgruppe mittels immunhistochemischer Färbung der infarzierten Herzen am 7. und 30. postischämischen Tag verifiziert. Ebenso war die Wirkung des PHI auf die Mobilisierung und das Homing von SDF-1-Zellen kein Gegenstand der Untersuchung, wurde aber durch Arbeiten unserer Arbeitsgruppe bestätigt [164]. Die Aussagekraft der erhobenen hämodynamischen Daten wurde gemindert durch unterschiedliche Gruppengröße und Gruppenzahl. Wie oben bereits erwähnt konnte der positive Effekt der DMOG-Therapie auf die kardiale Funktion durch M. Messner verifiziert werden. Hieraus kann abgeleitet werden, dass die in dieser Arbeit erhobenen hämodynamischen Daten valide sind. Zudem wurde in dieser Arbeit keine histologische Untersuchung des Herzens hinsichtlich der Infarktgröße durchgeführt, wohl aber in weiterführenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, bei der eine reduzierte Infarktgröße nach einer DMOG-Therapie vermessen wurde [164]. Weitere Limitation betrifft vor allem die DMOG vermittelte Aktivierung weiterer HIF-1-induzierter Zielgene wie Erythropoetin, Lactat-Dehydrogenase-A, Endothelin-1, VEGF, PDGF und NOS = Nitric Oxide Synthase [187]. Auch wurden hier die intrazellulären Molekularmechanismen, die eine Inhibition der Prolylhydroxylase nach sich ziehen [136], nicht näher erläutert. Als Inhibitor der Prolylhydroxylase wurde in dieser Arbeit DMOG (Dimethylloxalylglycine) verwendet. Mayorga et al. zeigten, dass DMOG seine Wirkung vor allem über die SDF-1/CXCR4-Achse entfaltet und dass DMOG als postischämischer „CXCR4-Induktor“ kardiale CXCR4-Zellen hochregulieren kann [183]. Allerdings ist DMOG zellpermeabel und wird als unspezifischer Pan-Prolylhydroxylase-Inhibitor bei Menschen kaum klinischer Anwendung finden.

VII. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die koronare Herzkrankheit (KHK) bleibt auch im 21. Jahrhundert weltweit die häufigste Krankheits- und Todesursache. Trotz des medizinischen Fortschritts kommt es in Folge einer KHK zum akuten Myokardinfarkt, nicht selten mit Komplikationen wie kardiogenem Schock und plötzlichem Herztod. Wird die akute Gefahr erst einmal abgewendet, muss sich der Patient auf eine lebenslange konservative Therapie gefasst machen. In vielen Fällen entwickelt der Patient trotz guter Compliance eine chronisch-sekundäre Herzinsuffizienz. Mit den bislang etablierten Therapieansätzen kann eine Verminderung des pathologischen Remodelings erreicht werden. Die Ultima Ratio im fortgeschrittenen Stadium einer chronischen Herzinsuffizienz liegt noch in einer Herztransplantation, welche zum einen durch den Mangel an zur Verfügung stehenden Spenderorganen und zum

ändern durch immunologische Komplikationen oft nicht realisierbar ist [11-14]. Aus diesem Grund gewinnt die Forschung an alternativen Therapiemöglichkeiten zur längerfristigen kardialen Regeneration zunehmend an Bedeutung. Dabei wurde viel Hoffnung auf eine zellbasierte Therapie gesetzt und intensiv geforscht. Die Regeneration des Herzens ist ein komplexer Prozess, der eine optimal abgestimmte Zusammenarbeit und Kommunikation vieler verschiedener Zelltypen erfordert. In diesem Zusammenhang hat sich die SDF-1/CXCR4-Achse als ein wichtiges therapeutisches Ziel heraus kristallisiert [193].

Mit der vorliegenden Arbeit konnten wir einen kleinen Beitrag zum Verständnis der SDF-1/CXCR4-Achse vermittelten kardialen Reparatur leisten. Wir konnten zeigen, dass unter normoxischen Bedingungen CXCR4⁺-Zellen im Herzen kaum nachgewiesen werden können. Nach einem Herzinfarkt konnten CXCR4⁺EGFP⁺/CD11b⁺-Zellen als führende Zellpopulation im ischämischen Herzen identifiziert werden. Unsere Daten deuten darauf hin, dass CXCR4⁺-Zellen eine wichtige Rolle in der postischämischen kardialen Inflammationsreaktion einnehmen, in dem sie als Monozyten/Makrophagen möglicherweise die Intensität der Inflammation steuern. Basierend auf der postischämischen SDF-1/CXCR4-Expression im Herzen haben wir die Hypothese aufgestellt, dass eine medikamentös induzierte Anreicherung der CXCR4-Zellen eine positive Wirkung auf die postischämische Herzfunktion haben würde. Ein interessanter therapeutischer Ansatzpunkt ist die Inhibition des Enzyms HIF-Prolylhydroxylase (siehe Kapitel 2.6.1). Durch die systemische Applikation des Prolylhydroxylase-Inhibitors DMOG nach einem Myokardinfarkt konnten wir eine verstärkte Rekrutierung der CXCR4⁺-Zellen im Herzen nachweisen. Diese verstärkte Rekrutierung wurde sowohl durch einen wahrscheinlich effektiveren Ablauf der Entzündungsreaktion als auch durch die parakrinen Effekte der rekrutierten Zellen begünstigt. In der Gruppe der behandelten Tiere konnte eine verbesserte Hämodynamik beobachtet werden. Insbesondere ist die Feinmodulation der CD86/M1-Makrophagen in Richtung CD206/M2-Makrophagen zu nennen, welche mit einer verbesserten Hämodynamik und einer gesteigerten Angiogenese einherging. Letztere wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, aber durch weiterführende Versuche unserer Arbeitsgruppe im Rahmen der Behandlung mit DMOG bestätigt [164]. Andere Arbeitsgruppen haben ebenfalls über die Rolle der SDF-1/CXCR4-Achse in der postischämischen Angiogenese berichtet [194, 195], wodurch die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe als wissenschaftlich fundiert betrachtet werden können. Eine sichere Aussage über die durch PHI vermittelte Stammzellmobilisierung konnten wir jedoch nicht treffen, da eine Koexpression mit weiteren Stammzellmarkern nicht untersucht wurde.

In Verbindung mit den Arbeiten, in denen die postischämische kardioprotektive Wirkung durch Prolylhydroxylase-Inhibitoren postuliert wurde (siehe Kapitel 2.6.1), könnte die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 durch Hemmung der Prolylhydroxylasen ein effektiver therapeutischer Ansatz für die kardiale Reparatur darstellen [196, 197]. Insbesondere da Prolylhydroxylasen-Inhibitoren wie Roxadustat bereits von der EMA, sowie in China und Japan zur Therapie der renalen Anämie bei chronischer Niereninsuffizienz zugelassen wurden [131-133, 135], könnte möglicherweise schnell die Entscheidung fallen, diese ebenfalls in der Behandlung kardialer Erkrankungen einzusetzen. Dennoch ist Vorsicht geboten.

Aufgrund der positiven Ergebnisse aus der präklinischen Grundlagenforschung wurden in der Vergangenheit schnell klinische Studien mit Patienten durchgeführt (Siehe Kapitel 2.2.3.1-3). Es ist jedoch nicht gelungen, die signifikant kardioprotektiven Effekte aus den Tierexperimenten erfolg-

reich in der klinischen Anwendung zu reproduzieren. Eine Erklärung für den Misserfolg könnte sein, dass die Patienten nach Infarkt schnell revaskularisiert wurden und eine intensiviertere neurohumorale Therapie verordnet bekamen, die das Postinfarktremodeling aufhalten. Eine weitere Limitation könnte das fortgeschrittene Alter der Patienten sowie ihre Vorerkrankungen darstellen [198]. Das Alter und die Vorerkrankungen verändern die Rahmenbedingungen im Zielgewebe. Darüber hinaus treten bei älteren Patienten häufig medikamentöse Interaktionen auf, da sie oft eine Vielzahl verschiedener Medikamente einnehmen [199, 200].

Im Falle des Transkriptionsfaktors HIF-1 hat Moslehi et al. berichtet, dass eine chronische Aktivierung des Transkriptionsfaktors (vergleichbar mit der Langzeitanwendung mit einem der Inhibitoren) eine dilatative Kardiomyopathie verursachen kann, auch wenn HIF-vermittelte pro-angiogene Effekte beobachtet wurden [201]. Zudem weisen die derzeit verfügbaren Prolylhydroxylase-Inhibitoren eine unzureichende Spezifität für die einzelnen Isoformen auf. Molidustat hemmt beispielsweise hauptsächlich das Enzym Prolylhydroxylase 2, Daprodustat PH-2 und PH-3, während Roxadustat alle drei Isoformen hemmt [202]. Dies erklärt auch die zahlreichen Nebenwirkungen, die mit der Behandlung durch Prolylhydroxylase-Inhibitoren einhergehen. Für die kardiale Reparatur ist eine anti-ischämische Behandlung erforderlich, bei der insbesondere die Erythropoese und das karzinogene Potential möglichst gering gehalten werden. Die zugrunde liegenden Mechanismen, die den therapeutischen Langzeiteffekt beeinflussen, müssen detailliert untersucht werden. Der Erfolg der zellbasierten Therapie kann nur langfristig erhalten bleiben, wenn möglichst viele limitierende Faktoren aufgeschlüsselt werden, um eine Therapieoptimierung vornehmen zu können [203]. Das Herz ist ein komplexes Organ in einem noch komplexeren Organismus. Dank der Vielzahl an Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet in den letzten drei bis vier Jahrzehnten konnten wichtige Erkenntnisse gewonnen werden. Dennoch gestaltet sich die Translation der Ergebnisse aus den präklinischen Arbeiten in die klinische Therapie als schwierig. In den letzten Jahren haben viele Wissenschaftler im Rahmen des Programms „European Union (EU)-CARDIOPROTECTION Cooperation in Science and Technology (COST) Action, CA16225“ zusammengearbeitet, um neue Wege zu erforschen und ein multimodales Therapiekonzept für die Kardioprotektion zu entwickeln [204, 205]. Für die kardiale Regeneration und Protektion liegt ein langer Weg mit vielen Herausforderungen, aber auch großem Entwicklungspotential. Es bleibt spannend zu sehen, wohin uns dieser Weg führen wird.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Dalen, J.E., et al., The epidemic of the 20(th) century: coronary heart disease. *Am J Med*, 2014. 127(9): p. 807-12.
2. Mensah, G.A., et al., Decline in Cardiovascular Mortality: Possible Causes and Implications. *Circ Res*, 2017. 120(2): p. 366-380.
3. Roth, G.A., et al., Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol*, 2017. 70(1): p. 1-25.
4. Pfeffer, M.A. and E. Braunwald, Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*, 1990. 81(4): p. 1161-72.
5. Frangogiannis, N.G., Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Compr Physiol*, 2015. 5(4): p. 1841-75.
6. Dawber, T.R., et al., Some factors associated with the development of coronary heart disease: six years' follow-up experience in the Framingham study. *Am J Public Health Nations Health*, 1959. 49: p. 1349-56.
7. Thomas, H.E., Jr., et al., Cholesterol-phospholipid ratio in the prediction of coronary heart disease. The Framingham study. *N Engl J Med*, 1966. 274(13): p. 701-5.
8. Kannel, W.B., W.P. Castelli, and P.M. McNamara, Cigarette smoking and risk of coronary heart disease. Epidemiologic clues to pathogenesis. The Framingham Study. *Natl Cancer Inst Monogr*, 1968. 28: p. 9-20.
9. Kannel, W.B., W.P. Castelli, and P.M. McNamara, Serum lipid fractions and risk of coronary heart disease. The Framingham study. *Minn Med*, 1969. 52(8): p. 1225-30.
10. Kannel, W.B., M.J. Schwartz, and P.M. McNamara, Blood pressure and risk of coronary heart disease: the Framingham study. *Dis Chest*, 1969. 56(1): p. 43-52.
11. Yancy, C.W., et al., 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation*, 2013. 128(16): p. 1810-52.
12. Ponikowski, P., et al., 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail*, 2016. 18(8): p. 891-975.
13. Yancy, C.W., et al., 2017 ACC/AHA/HFSA Focused Update of the 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Failure Society of America. *J Card Fail*, 2017. 23(8): p. 628-651.
14. van der Meer, P., H.K. Gaggin, and G.W. Dec, ACC/AHA Versus ESC Guidelines on Heart Failure: JACC Guideline Comparison. *J Am Coll Cardiol*, 2019. 73(21): p. 2756-2768.
15. Hansson, E.M., M.E. Lindsay, and K.R. Chien, Regeneration next: toward heart stem cell therapeutics. *Cell Stem Cell*, 2009. 5(4): p. 364-77.

16. Hansson, E.M. and U. Lendahl, Regenerative medicine for the treatment of heart disease. *J Intern Med*, 2013. 273(3): p. 235-45.
17. Brunner, S., et al., Erythropoietin administration after myocardial infarction in mice attenuates ischemic cardiomyopathy associated with enhanced homing of bone marrow-derived progenitor cells via the CXCR-4/SDF-1 axis. *FASEB J*, 2009. 23(2): p. 351-61.
18. Zaruba, M.M., et al., Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction. *Cell Stem Cell*, 2009. 4(4): p. 313-23.
19. Huber, B.C., et al., Parathyroid hormone is a DPP-IV inhibitor and increases SDF-1-driven homing of CXCR4(+) stem cells into the ischaemic heart. *Cardiovasc Res*, 2011. 90(3): p. 529-37.
20. Theiss, H.D., et al., Dual stem cell therapy after myocardial infarction acts specifically by enhanced homing via the SDF-1/CXCR4 axis. *Stem Cell Res*, 2011. 7(3): p. 244-55.
21. Brunner, S., et al., The cardioprotective effects of parathyroid hormone are independent of endogenous granulocyte-colony stimulating factor release. *Cardiovasc Res*, 2012. 93(2): p. 330-9.
22. Morimoto, H., et al., Bone marrow-derived CXCR4+ cells mobilized by macrophage colony-stimulating factor participate in the reduction of infarct area and improvement of cardiac remodeling after myocardial infarction in mice. *Am J Pathol*, 2007. 171(3): p. 755-66.
23. Zaruba, M.M. and W.M. Franz, Role of the SDF-1-CXCR4 axis in stem cell-based therapies for ischemic cardiomyopathy. *Expert Opin Biol Ther*, 2010. 10(3): p. 321-35.
24. Takahashi, M., Role of the SDF-1/CXCR4 system in myocardial infarction. *Circ J*, 2010. 74(3): p. 418-23.
25. Frangogiannis, N.G., The stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis in cardiac injury and repair. *J Am Coll Cardiol*, 2011. 58(23): p. 2424-6.
26. Penn, M.S., et al., SDF-1 in myocardial repair. *Gene Ther*, 2012. 19(6): p. 583-7.
27. Karsner, H.T., O. Saphir, and T.W. Todd, The State of the Cardiac Muscle in Hypertrophy and Atrophy. *Am J Pathol*, 1925. 1(4): p. 351-372 1.
28. Macmahon, H.E., Hyperplasia and Regeneration of the Myocardium in Infants and in Children. *Am J Pathol*, 1937. 13(5): p. 845-854 5.
29. Robledo, M., Myocardial regeneration in young rats. *Am J Pathol*, 1956. 32(6): p. 1215-39.
30. Kajstura, J., et al., Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(15): p. 8801-5.
31. Beltrami, A.P., et al., Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2001. 344(23): p. 1750-7.
32. Soonpaa, M.H. and L.J. Field, Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ Res*, 1998. 83(1): p. 15-26.
33. Orlic, D., et al., Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 2001. 410(6829): p. 701-5.

34. Murry, C.E., et al., Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*, 2004. 428(6983): p. 664-8.
35. Balsam, L.B., et al., Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*, 2004. 428(6983): p. 668-73.
36. Zaruba, M.M., et al., Parathyroid hormone treatment after myocardial infarction promotes cardiac repair by enhanced neovascularization and cell survival. *Cardiovasc Res*, 2008. 77(4): p. 722-31.
37. Bergmann, O., et al., Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*, 2009. 324(5923): p. 98-102.
38. Bergmann, O., et al., Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell*, 2015. 161(7): p. 1566-75.
39. Kehat, I. and L. Gepstein, Human embryonic stem cells for myocardial regeneration. *Heart Fail Rev*, 2003. 8(3): p. 229-36.
40. Chien, K.R., I.J. Domian, and K.K. Parker, Cardiogenesis and the complex biology of regenerative cardiovascular medicine. *Science*, 2008. 322(5907): p. 1494-7.
41. Chien, K.R., Regenerative medicine and human models of human disease. *Nature*, 2008. 453(7193): p. 302-5.
42. Laflamme, M.A. and C.E. Murry, Regenerating the heart. *Nat Biotechnol*, 2005. 23(7): p. 845-56.
43. Caulfield, J.B., R. Leinbach, and H. Gold, The relationship of myocardial infarct size and prognosis. *Circulation*, 1976. 53(3 Suppl): p. I141-4.
44. Frangogiannis, N.G., The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res*, 2008. 58(2): p. 88-111.
45. Orlic, D., et al., Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(18): p. 10344-9.
46. Toma, C., et al., Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, 2002. 105(1): p. 93-8.
47. Mirotsov, M., et al., Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(5): p. 1643-8.
48. Hatzistergos, K.E., et al., Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res*, 2010. 107(7): p. 913-22.
49. Loffredo, F.S., et al., Bone marrow-derived cell therapy stimulates endogenous cardiomyocyte progenitors and promotes cardiac repair. *Cell Stem Cell*, 2011. 8(4): p. 389-98.
50. Hsieh, P.C., et al., Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med*, 2007. 13(8): p. 970-4.
51. Zakrzewski, W., et al., Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther*, 2019. 10(1): p. 68.
52. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981. 292(5819): p. 154-6.
53. Martin, G.R., Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultu

- red in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. 78(12): p. 7634-8.
54. Thomson, J.A., et al., Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998. 282(5391): p. 1145-7.
 55. Wilmut, I., et al., Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997. 385(6619): p. 810-3.
 56. Mitalipov, S.M., et al., Reprogramming following somatic cell nuclear transfer in primates is dependent upon nuclear remodeling. *Hum Reprod*, 2007. 22(8): p. 2232-42.
 57. Keller, G.M., In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol*, 1995. 7(6): p. 862-9.
 58. Smith, A.G., Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001. 17: p. 435-62.
 59. Takahashi, K. and S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006. 126(4): p. 663-76.
 60. Yu, J., et al., Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007. 318(5858): p. 1917-20.
 61. Takahashi, K., et al., Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007. 131(5): p. 861-72.
 62. Park, I.H., et al., Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 2008. 451(7175): p. 141-6.
 63. Stadtfeld, M., et al., Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 2008. 322(5903): p. 945-9.
 64. Okita, K., et al., Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, 2008. 322(5903): p. 949-53.
 65. Kaji, K., et al., Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*, 2009. 458(7239): p. 771-5.
 66. Woltjen, K., et al., piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009. 458(7239): p. 766-70.
 67. Kim, D., et al., Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*, 2009. 4(6): p. 472-6.
 68. Mauro, A., Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*, 1961. 9: p. 493-5.
 69. Muir, A.R., A.H. Kanji, and D. Allbrook, The structure of the satellite cells in skeletal muscle. *J Anat*, 1965. 99(Pt 3): p. 435-44.
 70. Schultz, E. and K.M. McCormick, Skeletal muscle satellite cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 1994. 123: p. 213-57.
 71. Hawke, T.J. and D.J. Garry, Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* (1985), 2001. 91(2): p. 534-51.
 72. Taylor, D.A., et al., Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med*, 1998. 4(8): p. 929-33.
 73. Ghostine, S., et al., Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional struc

- ture and function after myocardial infarction. *Circulation*, 2002. 106(12 Suppl 1): p. 1131-6.
74. Menasche, P., et al., Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*, 2001. 357(9252): p. 279-80.
 75. Menasche, P., et al., The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation*, 2008. 117(9): p. 1189-200.
 76. Reinecke, H., V. Poppa, and C.E. Murry, Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *J Mol Cell Cardiol*, 2002. 34(2): p. 241-9.
 77. Rubart, M., et al., Spontaneous and evoked intracellular calcium transients in donor-derived myocytes following intracardiac myoblast transplantation. *J Clin Invest*, 2004. 114(6): p. 775-83.
 78. Jackson, K.A., et al., Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*, 2001. 107(11): p. 1395-402.
 79. Orlic, D., et al., Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci*, 2001. 938: p. 221-9; discussion 229-30.
 80. Deindl, E., et al., G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis. *FASEB J*, 2006. 20(7): p. 956-8.
 81. Lunde, K., et al., Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2006. 355(12): p. 1199-209.
 82. Engelman, M.G., et al., Autologous bone marrow stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor after subacute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing late revascularization: final results from the G-CSF-STEMI (Granulocyte Colony-Stimulating Factor ST-Segment Elevation Myocardial Infarction) trial. *J Am Coll Cardiol*, 2006. 48(8): p. 1712-21.
 83. Zohlnhofer, D., et al., Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2006. 295(9): p. 1003-10.
 84. Wollert, K.C., et al., Intracoronary autologous bone marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST-2 randomised placebo-controlled clinical trial. *Eur Heart J*, 2017. 38(39): p. 2936-2943.
 85. Wollert, K.C., et al., Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*, 2004. 364(9429): p. 141-8.
 86. Schachinger, V., et al., Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2006. 355(12): p. 1210-21.
 87. Schachinger, V., et al., Intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells abrogates adverse left ventricular remodelling post-acute myocardial infarction: insights from the reinfusion of enriched progenitor cells and infarct remodelling in acute myocardial infarction (REPAIR-AMI) trial. *Eur J Heart Fail*, 2009. 11(10): p. 973-9.

88. Strauer, B.E., M. Yousef, and C.M. Schannwell, The acute and long-term effects of intracoronary Stem cell Transplantation in 191 patients with chronic heart failure: the STAR-heart study. *Eur J Heart Fail*, 2010. 12(7): p. 721-9.
89. Herreros, J., et al., Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *Eur Heart J*, 2003. 24(22): p. 2012-20.
90. Messina, E., et al., Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*, 2004. 95(9): p. 911-21.
91. Zaruba, M.M., et al., Cardiomyogenic potential of C-kit(+)-expressing cells derived from neonatal and adult mouse hearts. *Circulation*, 2010. 121(18): p. 1992-2000.
92. Beltrami, A.P., et al., Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, 2003. 114(6): p. 763-76.
93. Oh, H., et al., Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(21): p. 12313-8.
94. Bolli, R., et al., Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet*, 2011. 378(9806): p. 1847-57.
95. Makkar, R.R., et al., Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet*, 2012. 379(9819): p. 895-904.
96. Malliaras, K., et al., Intracoronary cardiosphere-derived cells after myocardial infarction: evidence of therapeutic regeneration in the final 1-year results of the CADUCEUS trial (CARDiosphere-Derived autologous stem CELls to reverse ventricular dysfunction). *J Am Coll Cardiol*, 2014. 63(2): p. 110-22.
97. Bolli, R., et al., Rationale and Design of the CONCERT-HF Trial (Combination of Mesenchymal and c-kit(+) Cardiac Stem Cells As Regenerative Therapy for Heart Failure). *Circ Res*, 2018. 122(12): p. 1703-1715.
98. Bolli, R., et al., A Phase II study of autologous mesenchymal stromal cells and c-kit positive cardiac cells, alone or in combination, in patients with ischaemic heart failure: the CCTRN CONCERT-HF trial. *Eur J Heart Fail*, 2021. 23(4): p. 661-674.
99. Bolli, R., et al., After the storm: an objective appraisal of the efficacy of c-kit+ cardiac progenitor cells in preclinical models of heart disease. *Can J Physiol Pharmacol*, 2021. 99(2): p. 129-139.
100. Chiong, M., et al., Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell Death Dis*, 2011. 2: p. e244.
101. Huang, S., et al., Molecular MRI of acute necrosis with a novel DNA-binding gadolinium chelate: kinetics of cell death and clearance in infarcted myocardium. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2011. 4(6): p. 729-37.
102. Kajstura, J., et al., Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest*, 1996. 74(1): p. 86-107.
103. Abbate, A., et al., Infarct-related artery occlusion, tissue markers of ischaemia, and increased apoptosis in the peri-infarct viable myocardium. *Eur Heart J*, 2005. 26(19): p. 2039-45.
104. Frangogiannis, N.G., The inflammatory response in myocardial injury, repair, and

- remodelling. *Nat Rev Cardiol*, 2014. 11(5): p. 255-65.
105. Broughton, K.M., et al., Mechanisms of Cardiac Repair and Regeneration. *Circ Res*, 2018. 122(8): p. 1151-1163.
 106. Zimmermann, W.H., et al., Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med*, 2006. 12(4): p. 452-8.
 107. Sekine, H., et al., Endothelial cell coculture within tissue-engineered cardiomyocyte sheets enhances neovascularization and improves cardiac function of ischemic hearts. *Circulation*, 2008. 118(14 Suppl): p. S145-52.
 108. Shimizu, T., et al., Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res*, 2002. 90(3): p. e40.
 109. Ott, H.C., et al., Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*, 2008. 14(2): p. 213-21.
 110. Li, Z., et al., Imaging survival and function of transplanted cardiac resident stem cells. *J Am Coll Cardiol*, 2009. 53(14): p. 1229-40.
 111. Swijnenburg, R.J., et al., Timing of bone marrow cell delivery has minimal effects on cell viability and cardiac recovery after myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2010. 3(1): p. 77-85.
 112. Fazel, S., et al., Cardioprotective c-kit⁺ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *J Clin Invest*, 2006. 116(7): p. 1865-77.
 113. Wysoczynski, M., A. Khan, and R. Bolli, New Paradigms in Cell Therapy: Repeated Dosing, Intravenous Delivery, Immunomodulatory Actions, and New Cell Types. *Circ Res*, 2018. 123(2): p. 138-158.
 114. Nervi, B., D.C. Link, and J.F. DiPersio, Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *J Cell Biochem*, 2006. 99(3): p. 690-705.
 115. Yu, L., et al., Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene*, 2006. 374: p. 174-9.
 116. Debnath, B., et al., Small molecule inhibitors of CXCR4. *Theranostics*, 2013. 3(1): p. 47-75.
 117. McGrath, K.E., et al., Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4. *Dev Biol*, 1999. 213(2): p. 442-56.
 118. Broxmeyer, H.E., et al., AMD3100 and CD26 modulate mobilization, engraftment, and survival of hematopoietic stem and progenitor cells mediated by the SDF-1/CXCL12-CXCR4 axis. *Ann NY Acad Sci*, 2007. 1106: p. 1-19.
 119. Morrison, S.J., N. Uchida, and I.L. Weissman, The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995. 11: p. 35-71.
 120. Levesque, J.P., et al., Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest*, 2003. 111(2): p. 187-96.
 121. Laufs, U., et al., Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*, 2004. 109(2): p. 220-6.

122. Rehman, J., et al., Exercise acutely increases circulating endothelial progenitor cells and monocyte-/macrophage-derived angiogenic cells. *J Am Coll Cardiol*, 2004. 43(12): p. 2314-8.
123. Segret, A., et al., Structural localization and expression of CXCL12 and CXCR4 in rat heart and isolated cardiac myocytes. *J Histochem Cytochem*, 2007. 55(2): p. 141-50.
124. Lauzier, M.C., et al., [HIF-1 activation during tumor progression: implications and consequences]. *Bull Cancer*, 2006. 93(4): p. 349-56.
125. Ceradini, D.J. and G.C. Gurtner, Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue. *Trends Cardiovasc Med*, 2005. 15(2): p. 57-63.
126. Ceradini, D.J., et al., Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*, 2004. 10(8): p. 858-64.
127. Dery, M.A., M.D. Michaud, and D.E. Richard, Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005. 37(3): p. 535-40.
128. Page, E.L., et al., Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem*, 2002. 277(50): p. 48403-9.
129. Abbott, J.D., et al., Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation*, 2004. 110(21): p. 3300-5.
130. Myllyharju, J., Prolyl 4-hydroxylases, key enzymes in the synthesis of collagens and regulation of the response to hypoxia, and their roles as treatment targets. *Ann Med*, 2008. 40(6): p. 402-17.
131. Gupta, N. and J.B. Wish, Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Inhibitors: A Potential New Treatment for Anemia in Patients With CKD. *Am J Kidney Dis*, 2017. 69(6): p. 815-826.
132. Akizawa, T., et al., Roxadustat Treatment of Chronic Kidney Disease-Associated Anemia in Japanese Patients Not on Dialysis: A Phase 2, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Adv Ther*, 2019. 36(6): p. 1438-1454.
133. Chen, N., et al., Roxadustat Treatment for Anemia in Patients Undergoing Long-Term Dialysis. *N Engl J Med*, 2019. 381(11): p. 1011-1022.
134. Li, J., V.H. Haase, and C.M. Hao, Updates on Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Inhibitors in the Treatment of Renal Anemia. *Kidney Dis (Basel)*, 2023. 9(1): p. 1-11.
135. Singh, A., et al., Hypoxia-inducible factor (HIF) prolyl hydroxylase inhibitors induce autophagy and have a protective effect in an in-vitro ischaemia model. *Sci Rep*, 2020. 10(1): p. 1597.
136. Selvaraju, V., et al., Molecular mechanisms of action and therapeutic uses of pharmacological inhibitors of HIF-prolyl 4-hydroxylases for treatment of ischemic diseases. *Antioxid Redox Signal*, 2014. 20(16): p. 2631-65.
137. Eckle, T., et al., Hypoxia-inducible factor-1 is central to cardioprotection: a new paradigm for ischemic preconditioning. *Circulation*, 2008. 118(2): p. 166-75.
138. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986. 74(5): p. 1124-36.

139. Ockaili, R., et al., HIF-1 activation attenuates postischemic myocardial injury: role for heme oxygenase-1 in modulating microvascular chemokine generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. 289(2): p. H542-8.
140. Philipp, S., et al., Stabilization of hypoxia inducible factor rather than modulation of collagen metabolism improves cardiac function after acute myocardial infarction in rats. *Eur J Heart Fail*, 2006. 8(4): p. 347-54.
141. Bao, W., et al., Chronic inhibition of hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase improves ventricular performance, remodeling, and vascularity after myocardial infarction in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010. 56(2): p. 147-55.
142. Natarajan, R., et al., Hypoxia inducible factor-1 activation by prolyl 4-hydroxylase-2 gene silencing attenuates myocardial ischemia reperfusion injury. *Circ Res*, 2006. 98(1): p. 133-40.
143. Huang, M., et al., Short hairpin RNA interference therapy for ischemic heart disease. *Circulation*, 2008. 118(14 Suppl): p. S226-33.
144. Natarajan, R., et al., Activation of hypoxia-inducible factor-1 via prolyl-4 hydroxylase-2 gene silencing attenuates acute inflammatory responses in postischemic myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. 293(3): p. H1571-80.
145. Hyvarinen, J., et al., Hearts of hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase-2 hypomorphic mice show protection against acute ischemia-reperfusion injury. *J Biol Chem*, 2010. 285(18): p. 13646-57.
146. Tang, Y.L., et al., Hypoxic preconditioning enhances the benefit of cardiac progenitor cell therapy for treatment of myocardial infarction by inducing CXCR4 expression. *Circ Res*, 2009. 104(10): p. 1209-16.
147. Miller-Kasprzak, E. and P.P. Jagodzinski, Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2007. 55(4): p. 247-59.
148. Giannotti, G., et al., Impaired endothelial repair capacity of early endothelial progenitor cells in prehypertension: relation to endothelial dysfunction. *Hypertension*, 2010. 55(6): p. 1389-97.
149. Sieveking, D.P., et al., Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay. *J Am Coll Cardiol*, 2008. 51(6): p. 660-8.
150. Jin, D.K., et al., Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4+ hemangiocytes. *Nat Med*, 2006. 12(5): p. 557-67.
151. Grunewald, M., et al., VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell*, 2006. 124(1): p. 175-89.
152. Zhang, M., et al., SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *FASEB J*, 2007. 21(12): p. 3197-207.
153. Askari, A.T., et al., Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet*, 2003. 362(9385): p. 697-703.
154. Segers, V.F., et al., Local delivery of protease-resistant stromal cell derived factor-1

- for stem cell recruitment after myocardial infarction. *Circulation*, 2007. 116(15): p. 1683-92.
155. Senyo, S.E., et al., Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature*, 2013. 493(7432): p. 433-6.
 156. Hsueh, Y.C., et al., Prostaglandin E(2) promotes post-infarction cardiomyocyte replenishment by endogenous stem cells. *EMBO Mol Med*, 2014. 6(4): p. 496-503.
 157. Saxena, A., I. Russo, and N.G. Frangogiannis, Inflammation as a therapeutic target in myocardial infarction: learning from past failures to meet future challenges. *Transl Res*, 2016. 167(1): p. 152-66.
 158. Chen, B. and N.G. Frangogiannis, Immune cells in repair of the infarcted myocardium. *Microcirculation*, 2017. 24(1).
 159. Fontaine, D.A. and D.B. Davis, Attention to Background Strain Is Essential for Metabolic Research: C57BL/6 and the International Knockout Mouse Consortium. *Diabetes*, 2016. 65(1): p. 25-33.
 160. Picot, J., et al., Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*, 2012. 64(2): p. 109-30.
 161. Steff, A.M., et al., Detection of a decrease in green fluorescent protein fluorescence for the monitoring of cell death: an assay amenable to high-throughput screening technologies. *Cytometry*, 2001. 45(4): p. 237-43.
 162. Ben-Mordechai, T., et al., Macrophage subpopulations are essential for infarct repair with and without stem cell therapy. *J Am Coll Cardiol*, 2013. 62(20): p. 1890-901.
 163. Baan, J., et al., Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. *Circulation*, 1984. 70(5): p. 812-23.
 164. Ghadge, S.K., et al., Prolyl-hydroxylase inhibition induces SDF-1 associated with increased CXCR4+/CD11b+ subpopulations and cardiac repair. *J Mol Med (Berl)*, 2017. 95(8): p. 825-837.
 165. Pacher, P., et al., Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat Protoc*, 2008. 3(9): p. 1422-34.
 166. Solovjov, D.A., E. Pluskota, and E.F. Plow, Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. *J Biol Chem*, 2005. 280(2): p. 1336-45.
 167. Gordon, S. and A. Plueddemann, Macrophage Clearance of Apoptotic Cells: A Critical Assessment. *Front Immunol*, 2018. 9: p. 127.
 168. Frangogiannis, N.G., Inflammation in cardiac injury, repair and regeneration. *Curr Opin Cardiol*, 2015. 30(3): p. 240-5.
 169. Li, Y.H., et al., Occurrences and Functions of Ly6C(hi) and Ly6C(lo) Macrophages in Health and Disease. *Front Immunol*, 2022. 13: p. 901672.
 170. Mantovani, A., et al., The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 2004. 25(12): p. 677-86.
 171. Parisi, L., et al., Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders? *J Immunol Res*, 2018. 2018: p. 8917804.
 172. Lin, H.H., et al., The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *J Exp Med*, 2005. 201(10): p. 1615-25.

173. Hilgendorf, I., et al., Ly-6Chigh monocytes depend on Nr4a1 to balance both in inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium. *Circ Res*, 2014. 114(10): p. 1611-22.
174. Auffray, C., et al., Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*, 2007. 317(5838): p. 666-70.
175. Baci, D., et al., Innate Immunity Effector Cells as Inflammatory Drivers of Cardiac Fibrosis. *Int J Mol Sci*, 2020. 21(19).
176. Leuschner, F., et al., Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopenesis. *J Exp Med*, 2012. 209(1): p. 123-37.
177. Frangogiannis, N.G., The immune system and the remodeling infarcted heart: cell biological insights and therapeutic opportunities. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2014. 63(3): p. 185-95.
178. Jordan, E.R., et al., Comparison of two timed artificial insemination (TAI) protocols for management of first insemination postpartum. *J Dairy Sci*, 2002. 85(4): p. 1002-8.
179. Horckmans, M., et al., Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype. *Eur Heart J*, 2017. 38(3): p. 187-197.
180. Dimmeler, S., A.M. Zeiher, and M.D. Schneider, Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest*, 2005. 115(3): p. 572-83.
181. Forristal, C.E., et al., HIF-1alpha is required for hematopoietic stem cell mobilization and 4-prolyl hydroxylase inhibitors enhance mobilization by stabilizing HIF-1alpha. *Leukemia*, 2015. 29(6): p. 1366-78.
182. Takaku, M., et al., Systemic preconditioning by a prolyl hydroxylase inhibitor promotes prevention of skin flap necrosis via HIF-1-induced bone marrow-derived cells. *PLoS One*, 2012. 7(8): p. e42964.
183. Mayorga, M., et al., Early upregulation of myocardial CXCR4 expression is critical for dimethylxalylglycine-induced cardiac improvement in acute myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016. 310(1): p. H20-8.
184. Marino, F., et al., Role of c-Kit in Myocardial Regeneration and Aging. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019. 10: p. 371.
185. Sandstedt, J., et al., Human C-kit+CD45- cardiac stem cells are heterogeneous and display both cardiac and endothelial commitment by single-cell qPCR analysis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. 443(1): p. 234-8.
186. Legere, S.A., et al., Mast Cells in Cardiac Fibrosis: New Insights Suggest Opportunities for Intervention. *Front Immunol*, 2019. 10: p. 580.
187. Poynter, J.A., et al., Systemic pretreatment with dimethylxalylglycine increases myocardial HIF-1alpha and VEGF production and improves functional recovery after acute ischemia/reperfusion. *Surgery*, 2011. 150(2): p. 278-83.
188. Michael, L.H., et al., Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol*, 1995. 269(6 Pt 2): p. H2147-54.
189. Ahn, D., et al., 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*, 2004. 286(3): p. H1201-7.

190. Rosano, G.M., et al., Cardiac metabolism in myocardial ischemia. *Curr Pharm Des*, 2008. 14(25): p. 2551-62.
191. Whelan, R.S., V. Kaplinskiy, and R.N. Kitsis, Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol*, 2010. 72: p. 19-44.
192. van den Bos, E.J., et al., A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. 289(3): p. H1291-300.
193. Bianchi, M.E. and R. Mezzapelle, The Chemokine Receptor CXCR4 in Cell Proliferation and Tissue Regeneration. *Front Immunol*, 2020. 11: p. 2109.
194. Das, S., et al., A Unique Collateral Artery Development Program Promotes Neonatal Heart Regeneration. *Cell*, 2019. 176(5): p. 1128-1142 e18.
195. Marin-Juez, R., et al., Coronary Revascularization During Heart Regeneration Is Regulated by Epicardial and Endocardial Cues and Forms a Scaffold for Cardiomyocyte Repopulation. *Dev Cell*, 2019. 51(4): p. 503-515 e4.
196. Martin-Puig, S., D. Tello, and J. Aragones, Novel perspectives on the PHD-HIF oxygen sensing pathway in cardioprotection mediated by IPC and RIPC. *Front Physiol*, 2015. 6: p. 137.
197. Jatho, A., et al., Precisely Tuned Inhibition of HIF Prolyl Hydroxylases Is Key for Cardioprotection After Ischemia. *Circ Res*, 2021. 128(8): p. 1208-1210.
198. Dimmeler, S. and A. Leri, Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy. *Circ Res*, 2008. 102(11): p. 1319-30.
199. de Oliveira, M.L.R., et al., Frequency and characterization of potential drug interactions in dentistry-a cross-sectional study. *Clin Oral Investig*, 2022. 26(11): p. 6829-6837.
200. Bleszynska, E., et al., Pharmacological Interactions in the Elderly. *Medicina (Kaunas)*, 2020. 56(7).
201. Moslehi, J., et al., Loss of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in cardiomyocytes phenocopies ischemic cardiomyopathy. *Circulation*, 2010. 122(10): p. 1004-16.
202. Hirota, K., HIF-alpha Prolyl Hydroxylase Inhibitors and Their Implications for Biomedicine: A Comprehensive Review. *Biomedicines*, 2021. 9(5).
203. Peng, H., et al., Cardiac Cell Therapy: Insights into the Mechanisms of Tissue Repair. *Int J Mol Sci*, 2021. 22(3).
204. Davidson, S.M., et al., Multitarget Strategies to Reduce Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol*, 2019. 73(1): p. 89-99.
205. Ferdinandy, P., et al., Interaction of Cardiovascular Nonmodifiable Risk Factors, Comorbidities and Comedications With Ischemia/Reperfusion Injury and Cardioprotection by Pharmacological Treatments and Ischemic Conditioning. *Pharmacol Rev*, 2023. 75(1): p. 159-216.

IX. DANKSAGUNG

„Fürchte dich nicht vor dem langsamen Vorwärtsgehen, aber fürchte dich vor dem Stehenbleiben.“

Inspiziert von diesem chinesisch-vietnamesischen Sprichwort möchte ich meine Dankbarkeit für die Unterstützung auf meinem wissenschaftlichen Weg ausdrücken. Auf diesem langen Weg konnte ich mich zeitweise nur langsam dem Ziel nähern, hatte es aber nie aus den Augen verloren. Trotz zeitweiliger Zweifel habe ich dank der unermüdlichen Unterstützung und Motivation vieler Menschen meine Dissertation in der vorliegenden Form fertiggestellt.

Besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Wolfgang-Michael Franz und Assoz. Prof. PD Dr. Marc-Michael Zaruba bedanken, die mir nicht nur das interessante Thema meiner Doktorarbeit anvertrauten, sondern mich in die Welt der wissenschaftlichen Forschung eingeführt haben. Ihre herausragende Unterstützung, ob aus der Nähe oder Ferne, war von unschätzbarem Wert und hat mir ermöglicht, mich in der wissenschaftlichen Welt zu orientieren.

Ein herzlicher und freundlicher Dank gebührt Dr. med. Maximilian Doppelhammer, Dr. med. vet. Sarah Kühenthal und Dr. med. vet. Stefanie Ebner für ihre Einweisung in die LAD-Ligatur sowie Herzkathetertechnik. Ich möchte ihnen auch für den wissenschaftlichen Beistand und für viele andere Hilfestellungen danken. Ebenso danke ich unserer technischen Assistentin Judith Arcifa und unseren Tierpflegerinnen für ihre stets tatkräftige Unterstützung. Ein großes Dankeschön geht außerdem an alle Kollegen der Arbeitsgruppe, insbesondere meine MitdoktorandInnen, für eine unvergessliche Zeit in Großhadern.

Zu ausdrücklichem Dank verpflichtet bin ich der Schülerstiftung „Talent im Land“, die mich in meinen Schülerjahren finanziell und ideell gefördert und mich zum Studium geführt hat. Ich danke der Heinrich-Böll-Stiftung für ihre finanzielle Unterstützung, die mir das Medizinstudium in München in der Form ermöglichte. Insbesondere bedanke ich mich bei der Stiftung für die wertvolle ideelle Förderung in all den Jahren, die mich nachhaltig beeinflusst hat. Ich danke dem FöFoLe-Programm der Medizinischen Fakultät für seine Förderung im Rahmen der Promotion.

Ich möchte auch den MitarbeiterInnen des Dekanats der Medizinischen Fakultät für ihre Geduld und Unterstützung bei meinen zahlreichen Fragen danken.

Meine aufrichtige Dankbarkeit gilt meiner Familie für ihre endlose Geduld, ihre Hilfsbereitschaft, ihr unglaubliches Verständnis und ihren Rückhalt in all den Jahren: Meinem geliebten Großvater, „ông Kiêm“, möchte ich eine besondere Wertschätzung ausdrücken. Sein Lebensweg und seine Erfahrungen haben mich geprägt und mich gelehrt, Mut und Ausdauer in schwierigen Zeiten zu zeigen. Besonderer Dank gebührt auch meinen Schwiegereltern, Barbara und Herbert Gayer, die sich unermüdlich darum bemüht haben, den Lesern sprachliche und gestalterische Fehler zu ersparen. Ebenfalls möchte ich Heike Roth meinen aufrichtigen Dank aussprechen, die sich liebevoll um meine Kinder gekümmert hat, damit ich mich meiner Arbeit widmen konnte. Mein größter Dank gilt meinem Mann, Jan Gayer, und meinen Kindern, Florian und Hanna, die mich emotional gestärkt haben und mich in allen Höhen und Tiefen begleitet haben. Danke, dass ihr immer für mich da wart.