

Aus der  
1. Medizinischen Klinik  
(Direktor: Univ. Prof. Dr. med. A. Schömig)  
und dem  
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung  
(Direktor: Prof. Dr. med. B. Gänsbacher)  
der  
Technischen Universität München

Angefertigt unter der Leitung von  
Frau PD Dr. med. I. Ott

Vorgelegt über den Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie  
(Vorstand: Univ. Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl)  
des Instituts für Tierpathologie der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

**Intramyokardiale Transplantation von humanen, mit IGF-II transduzierten,  
endothelialen Progenitorzellen in Nacktratten im akuten Myokardinfarktmodell**

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

von  
Wibke Sitz  
aus Beckum

München, 2006

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer  
Referent: Prof. Dr. Schmahl  
Koreferent: Prof. Dr. Sinowatz

Tag der Promotion: 9. Februar 2007

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Schrifttum.....	3
2.1	Der Myokardinfarkt .....	3
2.1.1	Koronare Herzkrankheit .....	3
2.1.2	Akutes Koronarsyndrom.....	3
2.1.3	Schicksal der Kardiomyozyten nach akutem Myokardinfarkt.....	4
2.1.3.1	Elektronenmikroskopische Veränderungen .....	4
2.1.3.2	Lichtmikroskopische Veränderungen.....	4
2.1.3.3	Frühe metabolische Störungen .....	5
2.1.3.4	Auswirkung auf die kontraktile Funktion.....	7
2.1.3.5	Reversible postischämische Dysfunktion und Übergang zur irreversiblen Myokardschädigung.....	7
2.1.3.6	Nekrose und Apoptose.....	8
2.1.3.6.1	Nekrose und Apoptose im Randbereich des Infarkts .....	9
2.1.3.6.2	Nekrose im Infarktzentrum .....	10
2.1.4	Umbauprozesse nach akutem Myokardinfarkt .....	10
2.1.4.1	Reparatur und Narbenbildung in der akuten Phase .....	10
2.1.4.2	Umbauprozesse in der chronischen Phase .....	12
2.1.4.3	Myokardiale Regeneration.....	13
2.1.4.3.1	Asymmetrische Zellteilung .....	14
2.1.4.3.2	Zellzyklus und Proliferation.....	14
2.2	Die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF-I und IGF-II) .....	16
2.2.1	Die Insulin-Familie.....	16
2.2.2	Evolution der Insulin-Familie .....	16
2.2.3	Das IGF-System .....	16
2.2.4	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-II (IGF-II) .....	19
2.2.4.1	Expression von IGF-II .....	19
2.2.5	IGF-Bindungsproteine .....	20
2.2.6	Rezeptoren des IGF-Systems .....	21
2.2.6.1	IGF-I-Rezeptor .....	21
2.2.6.2	Insulinrezeptor.....	25
2.2.6.3	IGF-II-Rezeptor.....	25
2.2.7	Physiologische Aktivität der IGFs .....	26

2.2.7.1	Knockout des IGF-Gens .....	27
2.2.7.2	Transgene Tiere .....	28
2.2.7.3	Zelluläre Funktion der IGFs.....	28
2.2.7.4	Tumorgenese .....	32
2.2.8	Bedeutung von IGF-II im Myokardinfarkt .....	33
2.2.8.1	Zellulärer Effekt von IGF-II im Myokardinfarkt .....	33
2.2.8.2	Wirkung von IGF-II im Myokardinfarktmodell .....	34
2.3	Endotheliale Progenitorzellen (EPC) .....	37
2.3.1	Der Hämangioblast.....	37
2.3.2	Charakteristika endothelialer Progenitorzellen .....	38
2.3.3	Wirkung endothelialer Progenitorzellen auf die Gefäßbildung .....	39
2.3.4	Wirkung endothelialer Progenitorzellen im Myokardinfarkt .....	39
2.3.5	Transdifferenzierung und Zellfusion.....	40
3	Eigene Untersuchungen .....	44
3.1	Zielvorstellungen .....	44
3.2	Material und Methoden .....	45
3.2.1	Gewinnung endothelialer Progenitorzellen aus Nabelschnurblut .....	45
3.2.1.1	Isolierung mononukleärer Zellen durch Dichtezentrifugation.....	45
3.2.1.2	Isolierung humaner CD34+ Zellen.....	46
3.2.1.3	Differenzierung humaner CD34+ Zellen zu EPC .....	47
3.2.2	IGF-II Überexpression in humanen EPC.....	47
3.2.2.1	Retrovirale Transfektion .....	48
3.2.3	Bestimmung der IGF-II Überexpression .....	50
3.2.3.1	Isolierung der Gesamt-RNA .....	50
3.2.3.2	Reverse Transkription.....	51
3.2.3.3	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	52
3.2.3.4	Gelelektrophorese.....	53
3.2.4	Versuchstiere und Haltungsbedingungen .....	54
3.2.5	Versuchsplan und Gruppeneinteilung .....	56
3.2.6	Verwendete Medikamente .....	59
3.2.7	Operationsvorbereitung .....	59
3.2.8	Chirurgischer Eingriff .....	60
3.2.9	Perioperative Komplikationen .....	62
3.2.10	Postoperative Komplikationen.....	63

3.2.11	Sonographische Untersuchung.....	64
3.2.12	Euthanasie und Probengewinnung .....	65
3.2.13	Probenaufarbeitung .....	66
3.2.13.1	Histomorphometrie .....	66
3.2.13.2	Immunhistologie und Immunfluoreszenz .....	67
3.2.13.2.1	Immunhistologie .....	68
3.2.13.2.2	Immunfluoreszenz .....	71
3.2.14	Zellproliferations-Assay .....	72
3.2.15	Statistische Berechnungen und Dokumentation .....	74
3.3	Ergebnisse.....	75
3.3.1	Gesteigerte RNA Expression in IGF-II transduzierten EPC .....	75
3.3.2	Ergebnisse der in vivo Untersuchungen .....	75
3.3.2.1	Perioperative Komplikationen .....	75
3.3.2.2	Postoperative Komplikationen .....	77
3.3.2.3	Linksventrikuläre Funktion.....	78
3.3.3	Ergebnisse der ex vivo Untersuchungen .....	80
3.3.3.1	Infarktgröße.....	80
3.3.3.2	Gefäßdichte .....	84
3.3.3.3	Anzahl muskulärer Zellen.....	85
3.3.3.4	Anzahl proliferierender Zellen .....	85
3.3.4	Wirkung von IGF-II auf die Proliferation ventrikulärer Kardiomyoblasten ...	91
4	Diskussion .....	93
4.1	Diskussion der Versuchsdurchführung und der Komplikationen.....	95
4.2	Diskussion der in vivo und ex vivo erhobenen Ergebnisse.....	96
4.2.1	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	96
4.2.2	Überexpression von IGF-II in EPC verbessert die linksventrikuläre Funktion	97
4.2.3	Überexpression von IGF-II in EPC verringert die Infarktgröße .....	99
4.2.4	Überexpression von IGF-II in EPC erhöht die Anzahl proliferierender Zellen im Myokard .....	100
4.2.5	Dosis- und Zeitabhängigkeit der Effekte von IGF-II .....	105
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick .....	106
5	Zusammenfassung .....	107
6	Summary .....	108
7	Literaturverzeichnis .....	109

8	Tabellenverzeichnis .....	121
9	Abbildungsverzeichnis.....	122
10	Abkürzungsverzeichnis.....	123
11	Danksagung.....	128

### 1 EINLEITUNG

Weltweit sterben jährlich mehr als 7 Mio. Menschen an den Folgen ischämischer Herzkrankheiten. Ab dem 60. Lebensjahr ist diese Krankheit die Todesursache Nummer eins (Mortalität 5,8 Mio./Jahr). Zwischen dem 15. und 59. Lebensjahr stellt sie nach HIV/AIDS die zweithäufigste Todesursache dar (Mortalität 1,3 Mio./Jahr).

Dabei sind in Industrieländern doppelt so viele Menschen betroffen, wie in Entwicklungsländern. Die Hauptrisikofaktoren wie Tabakkonsum, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, familiäre Disposition, Hypercholesterinämie und körperliche Inaktivität erklären 75 - 85 % neu auftretender Fälle der koronaren Herzkrankheit. Nur bei 5 % der erwachsenen Männer und Frauen in Industrieländern liegt ein niedriges Risiko mit optimalem Risikofaktorlevel vor (<http://www.who.int/whr/previous/en/>).

Trotz der Anwendung verschiedenster Therapien, wie der Revaskularisierung und der medikamentösen Langzeittherapie, die das Ziel haben ein Fortschreiten der Krankheit zu verhindern, kann es nach chronischer Myokardischämie und/oder einer Myokardnekrose, infolge eines Herzinfarkts, zur Reduktion der ventrikulären Pumpfunktion des Herzens und somit zur Herzinsuffizienz kommen (GIANNITSIS et al., 2004).

Im peripheren Blut adulter Menschen befinden sich endotheliale Vorläuferzellen (EPC). In vitro differenzieren diese Zellen zu ausgereiften Endothelzellen und im Gewebeischämiemodell tragen sie zur Vaskulogenese bei (MUROHARA, 2001). Experimentelle Myokardinfarktstudien zeigen, dass EPC nach intravenöser Applikation in die ischämische Infarktzone migrieren und die hämodynamische Funktion steigern (KAWAMOTO et al., 2001). Ein großes Hindernis für die therapeutische Anwendung beim Menschen stellt die limitierte Anzahl der im Blut vorhandenen EPC dar. OTT et al. (2005) zeigen, dass humane EPC unter Zellkulturbedingungen zu einer klinisch relevanten Anzahl expandiert werden können. Nach einer intramyokardialen Transplantation dieser Zellen im Ischämie/Reperusionsmodell der Nacktratte proliferieren die transplantierten Zellen, bilden vaskuläre Strukturen und verbessern die linksventrikuläre Funktion.

IGF-I und IGF-II (insulin-like-growth-factors) – Mitglieder der Familie der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren – sind wichtige Mitogene, die das Wachstum und den Metabolismus verschiedener Zellarten beeinflussen. Über Insulinrezeptoren werden v. a. metabolische und

## EINLEITUNG

---

anabole Vorgänge, wie der Glukoseverbrauch und die Proteinsynthese, beeinflusst. Die Aktivierung von IGF-I-Rezeptoren, hervorgerufen durch die Bindung von IGF an den Rezeptor, fördert die Proliferation und Differenzierung von Zellen. Über diesen Rezeptor wird auch die Apoptose gehemmt (JONES und CLEMMONS, 1995; O'DELL und DAY, 1998; ALLAN et al., 2001). IGF induziert in vitro die Proliferation und Differenzierung von Myoblasten des Skelettmuskels und das Wachstum von Kardiomyozyten (EWTON et al., 1994; HUANG et al., 2002). Experimentelle Studien zeigen, dass IGF in vivo Satellitenzellen im Skelettmuskel aktiviert und zur Muskelregeneration beiträgt (ALLEN und BOXHORN, 1989; HILL et al., 2003; CHARGE und RUDNICKI, 2004). Im Myokardinfarktmodell wird gezeigt, dass die Expression von IGF-II infolge einer Ischämie/Reperfusion erhöht wird. Durch eine intramyokardiale Applikation von IGF-II wird die linksventrikuläre Funktion nach einem Myokardinfarkt verbessert. (BATTLER et al., 1995; KLUGE et al., 1995; VOGT et al., 1997). Welche Bedeutung IGF im Myokard in Bezug auf die Proliferation und Differenzierung von residenten Vorläuferzellen hat, ist noch unklar.

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Wirkung von EPC, die IGF-II überexprimieren, im Vergleich zu EPC, die mit einem Leervektor transduziert sind, auf die linksventrikuläre Funktion nach einem Myokardinfarkt untersucht werden. Retroviral transduzierte humane EPC, die IGF-II überexprimieren und EPC, die mit einem Leervektor transduziert sind (EPC-pLXSN), werden nach experimenteller Ischämie und Reperfusion ins Myokard der Nacktratte transplantiert. In vivo wird echokardiographisch überprüft, ob durch die lokale Überexpression von IGF-II in EPC (EPC-IGF-II) – verglichen mit EPC-pLXSN – die linksventrikuläre Funktion nach einem Myokardinfarkt weiter verbessert werden kann.

Ex vivo soll untersucht werden, ob neben einer vaskulären Regeneration durch EPC zusätzlich eine myokardiale Regeneration durch die Überexpression von IGF-II erreicht werden kann.

Die Implantation transduzierter EPC-IGF-II könnte als Therapieprinzip zur simultanen Gefäß- und Muskelregeneration bei myokardialer Ischämie dienen. Autologe CD34+ Zellen können mit hämatologischen Standardverfahren aus dem Blut von Patienten gewonnen, expandiert und transduziert werden. Somit wäre die therapeutische Anwendung von EPC-IGF-II beim Menschen möglich.

## 2 SCHRIFTTUM

### 2.1 Der Myokardinfarkt

#### 2.1.1 Koronare Herzkrankheit

Die Hauptursache für die koronare Herzkrankheit (KHK) ist die Manifestation der Atherosklerose in den Herzkranzarterien, welche durch eine Koronarstenose eine Koronarinsuffizienz hervorruft. Die Koronarinsuffizienz bewirkt eine Myokardischämie, wodurch ein Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot im Myokard entsteht (GARRATT und MORGEN, 1990).

Die KHK wird in 6 Verlaufsformen unterteilt: die stabile Angina pectoris, das akute Koronarsyndrom, der plötzliche Herztod, die chronische Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen sowie die stumme Myokardischämie (GIANNITSIS et al., 2004).

#### 2.1.2 Akutes Koronarsyndrom

Das akute Koronarsyndrom umfasst die instabile Angina pectoris (Herzenge) und den akuten Myokardinfarkt (akuter Herzinfarkt). Der Herzinfarkt wird weiterhin in einen transmuralen Infarkt („Q-Wave“-Infarkt), bei welchem mehr als 50 % der Wanddicke des Myokards betroffen sind und einen nicht-transmuralen-Infarkt („non-Q-Wave“-Infarkt) unterteilt. Bei Letzterem ist der Infarkt auf die subendokardial gelegene Innenschicht des Myokards beschränkt. Anhand der klinischen Symptomatik kann die instabile Angina pectoris nicht von einem akuten Myokardinfarkt unterschieden werden. Einem Myokardinfarkt geht zu 50 % eine instabile Angina pectoris voraus. Zu 95 % entsteht der Myokardinfarkt durch Plaqueruptur in Gebieten atherosklerotisch veränderter Koronararterien im Rahmen einer KHK. Die Plaqueruptur führt zu einer umschriebenen Thrombenbildung mit Gefäßverschluss und anschließend zur Nekrose des Myokards. Der Herzinfarkt ist bei 30 % der Patienten die klinische Erstmanifestation einer KHK. Andere seltene Ursachen können Vaskulitiden, Embolien in das Koronarsystem, kongenitale Koronaranomalien und anhaltende Vasospasmen sein. Das Infarktgeschehen wird in die Phase der frühen Ischämie, der Gewebsnekrose, einer eventuellen Reperfusion, der Vernarbung und die Postinfarktphase mit Umbauvorgängen des Ventrikels (Remodeling) eingeteilt (GIANNITSIS et al., 2004).

Komplikationen, die nach einem Herzinfarkt auftreten, werden in Früh- und Spät komplikationen gegliedert. Die Frühkomplikationen werden in 3 Hauptgruppen unterteilt: Herzrhythmusstörungen, Linksherzinsuffizienz und Komplikationen bei ausgedehnter Nekrose (Rupturen). Die Spät komplikationen umfassen Herzinsuffizienz, Herzwandaneurysma, Arrhythmien, arterielle Embolien, Infarktrezidive und Perikarditiden (HEROLD et al., 2005).

### 2.1.3 Schicksal der Kardiomyozyten nach akutem Myokardinfarkt

#### 2.1.3.1 Elektronenmikroskopische Veränderungen

Erste ultrastrukturelle Veränderungen des Herzmuskels treten bereits innerhalb der ersten 20 Minuten nach Verschluss der Koronararterie auf. Ab diesem Zeitpunkt sinkt die Größe und Anzahl von Glykogengranula. Es entstehen intrazelluläre Ödeme, Schwellungen und Verformungen des transversalen tubulären Systems, des sarkoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien (VARGAS et al., 1999).

Mit zunehmender Dauer der Okklusion kommt es weiterhin zu einer inneren Zerreißung der Mitochondrien, zu einer amorphen, flockigen Aggregation des nukleären Chromatins und zur Relaxation von Myofibrillen. Im weiteren Verlauf gleichen die sarkoplasmatischen Retikula geschwollenen Bläschen. Die Mitochondrien sind stark vergrößert, enthalten Kalzium-Phosphat-Ablagerungen und es sind nur wenige Cristae vorhanden. Die Myofilamente sind verdünnt und fraktioniert, das Heterochromatin verschwindet und das Euchromatin dünnt aus. Es kommt zur Aggregation des Chromatins in der Peripherie des Nukleus, zur Desorientierung der Myofibrillen und zur Verklumpung der Mitochondrien (SCHOEN, 1999).

#### 2.1.3.2 Lichtmikroskopische Veränderungen

Im humanen Myokard wird ca. 8 Stunden nach dem Infarkt eine Ödematisierung des Interstitiums offensichtlich. Es kommt zur Nekrophanerose der Muskelfasern, zusammen mit einer Infiltration neutrophiler Leukozyten und roter Blutkörperchen. Zellkerne der Muskelzellen werden pyknotisch mit anschließender Karyolyse. Im weiteren Verlauf verklumpt das Zytoplasma und die Querstreifung geht verloren. In involvierten Muskelfasern treten fokale Hyalinisierungen auf. Ab dem 4. Tag beginnt an der Peripherie des Infarkts die Beseitigung der nekrotischen Fasern durch Makrophagen und Lymphozyten. Makrophagen

und Fibroblasten infiltrieren ins Myokard. Nach 10 Tagen sinkt die Zahl der Leukozyten und das Granulationsgewebe entsteht. Das Einwachsen von Blutgefäßen und Fibroblasten schreitet, begleitet von dem weiteren Abbau nekrotischer Muskelzellen, voran. Dieser Prozess setzt sich zusammen mit einer steigenden Kollagenisierung der Infarktzone in den folgenden 4 - 6 Wochen fort. Nach 6 Wochen ist die Infarktzone durch ein festes, zusammenhängendes Narbengewebe ersetzt (ANTMAN, 2000).

### 2.1.3.3 Frühe metabolische Störungen

Ischämisches Gewebe ist charakterisiert durch 3 Abnormalitäten:

- 1) Hypoxie, hervorgerufen durch eine insuffiziente Sauerstoffversorgung; der oxidative Metabolismus kann nicht aufrechterhalten werden;
- 2) eine Ansammlung toxischer Metaboliten; oft ein Ausdruck des Übergangs vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel;
- 3) die Entwicklung einer Azidose oder die Ansammlung von Wasserstoffionen, welche durch katabole Reaktionen in Abwesenheit geeigneter Elektronenakzeptoren entstehen.

Die kardiale Funktion ist von einem adäquaten Angebot hoch energetischer Phosphatverbindungen (v. a. ATP) abhängig. Unter aeroben Bedingungen werden diese hoch energetischen Phosphatverbindungen durch die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien gebildet. Die Mitochondrien nehmen mehr als 30 % des Intrazellularraumes der Myozyten ein, was die Bedeutung dieses Prozesses unterstreicht (PAGE und MCCALLISTER, 1973).

Die reduzierten Kofaktoren, die für die oxidative Phosphorylierung benötigt werden, entstehen aus dem Abbau von Glukose oder Fettsäuren und dem weiteren Abbau der Metaboliten im Zitratzyklus. Glukose wird über Transportproteine der Zellmembran in die Myozyten aufgenommen. Dieser Vorgang wird durch Insulin erleichtert. Die Glukose wird entweder als Glykogen gespeichert oder in der Glykolyse zu Pyruvat abgebaut. Dabei entsteht ein Nettogewinn von 2 mol ATP aus 1 mol Glukose. Unter aeroben Bedingungen wird das Pyruvat weiter zu AcetylCoenzym A (AcetylCoA) abgebaut. Das AcetylCoA wird in den Zitratzyklus eingeschleust und zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O oxidiert. Dabei entstehen reduzierte Kofaktoren (NADH und FADH<sub>2</sub>), die in die Mitochondrien transportiert werden. An der Mitochondrienmembran durchlaufen sie in Gegenwart von Sauerstoff eine Redoxreaktion (Atmungskette). Die hierbei frei werdende Energie wird in Form von ATP konserviert

## SCHRIFTTUM

---

(oxidative Phosphorylierung). Dabei entstehen insgesamt 36 mol ATP aus 1 mol Glukose (LÖFFLER, 1999).

Unter hypoxischen Bedingungen kann die oxidative Phosphorylierung nicht ablaufen und reduzierte Kofaktoren sammeln sich an. Dadurch wird die Oxidation von Pyruvat zu AcetylCoA gehemmt, so dass Pyruvat zu Laktat umgewandelt wird. Dadurch entstehen insgesamt nur 2 mol ATP aus 1 mol Glukose anstatt, wie unter aeroben Bedingungen, 36 mol ATP. Aus diesem Grund kann durch eine maximal mögliche anaerobe Glykolyse nur 7 % des normalen Energieverbrauchs der myokardialen Zellen gedeckt werden. Zusätzlich könnte Laktat einen toxischen Effekt auf die zytosolische und mitochondriale Funktion ausüben (KOBAYASHI und NEELY, 1979).

Der Anfall von Laktat und anderen organischen Säuren im Myokard führt zum Abfall des intrazellulären pH-Wertes. Die daraus resultierende Azidose inhibiert den anaeroben Metabolismus an vielen enzymatischen Stufen (LIEDTKE, 1981).

Unter aeroben Bedingungen stammen zwei Drittel der Energie, die die Herzmuskelzellen benötigen, aus Fettsäuren der  $\beta$ -Oxidation, welche z. T. in den myokardialen Zellen stattfindet. Fettsäuren werden zu Acylcoenzym A (AcylCoA) metabolisiert und über das Acyl-Carnitin-Transferase-System in die Mitochondrien transportiert. In den Mitochondrien wird das AcylCoA in AcetylCoA, welches anschließend im Zitratzyklus metabolisiert wird, umgewandelt. Hypoxische Zustände resultieren in einer Akkumulation von NADH und anderen reduzierten Kofaktoren. Diese inhibieren die  $\beta$ -Oxidation in den Mitochondrien und das Acyl-Carnitin-Transferase-System. Dadurch akkumuliert AcylCoA im Zytosol und verbindet sich mit Glycerol, was zu einer erhöhten Anzahl von Triglyzeriden in der ischämischen Zelle führt (BRACHFELD et al., 1972).

Eine hohe Anzahl an AcylCoA verhindert die Bildung von Estern aus Fettsäuren, so dass es zum Verlust der Fettsäuren und damit zum Verlust von Energie aus der Zelle kommt. Die Translokase, die für den Transport des in den Mitochondrien synthetisierten ATPs zum Zytosol verantwortlich ist, wird ebenfalls gehemmt. Diese Vorgänge vermindern weiterhin die Bereitstellung der Energie, die für eine normale Funktion der Kardiomyozyten nötig ist (VROBEL et al., 1982).

### 2.1.3.4 Auswirkung auf die kontraktile Funktion

Mit der Unterbrechung des koronaren Blutflusses sinkt die kontraktile Tätigkeit der ischämischen Region. Der intraventrikuläre Druck, der durch die Kontraktion der normal durchbluteten Areale aufgebaut wird, kann in der ischämischen Region nicht bewältigt werden, so dass es in dieser Region während der Systole zur Auswölbung des Myokards kommt. Hierdurch werden die Sarkomere stark überstreckt und beschädigt (CROZATIER et al., 1977).

Der Wechsel vom aeroben zum anaeroben Metabolismus geht mit einer stark verminderten Produktion hochenergetischer Phosphatverbindungen (v. a. ATP), welche für die Kontraktion erforderlich sind, einher. Die Erschöpfung des ATPs ist jedoch nicht der einzige Grund für die kontraktile Dysfunktion (GARRATT und MORGEN, 1990).

Kalzium nimmt eine zentrale Rolle in der Exzitations-Kontraktions-Kopplung ein. Eine akute Ischämie führt zu einem abnormalen intrazellulären Kalziumgehalt und einer abnormalen Kalziumausschüttung. Der verminderte Eintritt von Kalzium zu Anfang der Ischämie scheint für einige Abnormalitäten des Aktionspotentials und somit für das Auftreten von Arrhythmien verantwortlich zu sein (LEE et al., 1967; FABIATO, 1983).

Zusätzlich beeinträchtigt eine Azidose, die durch eine Ansammlung von organischen Säuren wie Laktat entsteht, sowohl die Aufnahme und Abgabe von Kalzium durch das sarkoplasmatische Retikulum, als auch die Sensitivität der kontraktile Elemente für Kalzium. Die Veränderungen des Kalziumgehalts und -sensitivität tragen zur Störung der normalen kontraktile Funktion bei (TADA et al., 1969; NAKAMARU und SCHWARTZ, 1970).

### 2.1.3.5 Reversible postischämische Dysfunktion und Übergang zur irreversiblen Myokardschädigung

1975 wurde erstmals das Phänomen der postischämischen Dysfunktion beschrieben. Es wird gezeigt, dass regionale mechanische Funktionen nach einer 5minütigen Okklusion für mehr als 3 Stunden unterdrückt bleiben. Diese postischämische Dysfunktion wird auch als „myocardial stunning“ („Myokard Betäubung“) bezeichnet. Es beschreibt die mechanische Dysfunktion, die nach bzw. durch eine Reperfusion auftritt. Die Dysfunktion ist aber reversibel und verläuft ohne irreversible Schädigungen des Myokards. Das myokardiale Stunning entsteht durch 2 Komponenten:

- 1) einer Komponente, die sich während der Ischämie entwickelt („ischemic injury“) und
- 2) einer Komponente, die sich nach der Reperfusion entwickelt („reperfusion injury“).

Die 2 Haupthypothesen zur Pathogenese des myokardialen Stunnings sind

1) die Entstehung freier Radikale, welche vom Sauerstoff abgeleitet werden („oxyradical hypothesis) und

2) eine transiente Kalzium Überlastung („calcium hypothesis“).

Bei Okklusionen, die länger als 20 Minuten andauern, schreitet die Schädigung weiter voran. Es kommt zum Gewebsuntergang und damit zu irreversiblen Schäden des Myokards. Daraus resultiert eine Mischung aus nekrotischem Myokard (irreversible Schädigung) und „betäubtem“ Myokard (reversible Schädigung) (BOLLI und MARBAN, 1999).

Der Integritätsverlust der Zellmembran scheint das Schlüsselmerkmal zu sein, in welchem sich die reversiblen und die irreversiblen Zellschädigungen voneinander unterscheiden. Vermutlich führen die Erschöpfung von ATP sowie die Anreicherung von toxischen Stoffwechselprodukten zur Unterbrechung grundlegender Ionenpumpen in der Membran. Dies hat zur Folge, dass die Zelle essentielle biochemische und elektrochemische Gradienten nicht aufrechterhalten kann. Ultrastrukturelle Veränderungen schreiten voran. In irreversibel geschädigten Zellen kommt es zur Entwicklung einer amorphen mitochondrialen Matrix und zu Zerreißen im Plasmalemm (CHIEN et al., 1978; JENNINGS und REIMER, 1981).

Charakteristisch für die frühe Ischämie ist der verminderte Eintritt von Kalzium in die Zelle. In irreversibel geschädigten Myozyten ist die zytosolische Konzentration von Kalzium stark erhöht. Diese Erhöhung beruht teilweise auf der beeinträchtigten Kalziumsequestration des sarkoplasmatischen Retikulums. Zusätzlich ist die Durchlässigkeit der Zellmembran für extrazelluläres Kalzium erhöht. Es kommt zur Bildung intrazellulärer Kalziumkomplexe, wodurch die Zelle irreversibel geschädigt wird (JENNINGS und GANOTE, 1974; WHALEN et al., 1974; CHIEN et al., 1979).

### 2.1.3.6 Nekrose und Apoptose

Schreitet die myokardiale Ischämie voran, folgt der Zelltod der Kardiomyozyten. Es wird zwischen einem „zufälligen“ Zelltod (Nekrose) und einem „programmierten“ Zelltod (Apoptose) unterschieden. Die Nekrose wird durch eine mangelnde Sauerstoffversorgung, die Erschöpfung des intrazellulären ATP-Vorrats und die Folgen der gestörten Kalziumhomöostase hervorgerufen. Daraus resultieren eine Schwellung der Zellen und die Zerreißen der Zellmembran. Durch die Membranschäden werden Zytoplasmabestandteile aus der Zelle freigesetzt, worauf eine inflammatorische Antwort erfolgt. Im Zellkern wird das Chromatin verdichtet (Kernpyknose), der Kern zerfällt (Karyorrhesis) und löst sich

schließlich auf. Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose auch an physiologischen Vorgängen, wie dem normalen Zellumsatz, beteiligt. Sie ist aber auch in die Progression vieler Krankheiten involviert. Hervorgerufen wird die Apoptose durch verschiedene chemische und physikalische Stimuli, wie z. B. Liganden, die an den Tumornekrose-Faktor-Rezeptor binden, Hitze oder die Eliminierung von Wachstumsfaktoren. Durch die Stimulation wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt, deren Signale an den Nukleus weiter geleitet werden. Diese Signale induzieren die Genexpression. Es entstehen Genprodukte die, entweder die Entstehung von proapoptotischen, oder von überlebensfördernden Mediatoren fördern. Im weiteren Verlauf der Apoptose schrumpft die Zelle im Gegensatz zur Nekrose. Subzelluläre Organellen bleiben bis zum finalen Stadium erhalten, apoptotische Körper (Zellfragmente) bleiben von der intakten Plasmamembran eingeschlossen. Dadurch, dass keine intrazellulären Bestandteile durch die Membran gelangen, löst die Apoptose keine sekundäre Entzündung aus. Im Endstadium kommt es zur spezifischen Proteolyse durch Caspasen, einer Familie von Aspartyl-spezifischen Cystein-Proteasen, und zur DNA-Fragmentation durch Desoxyribonukleasen. Die spezifische DNA-Fragmentation ist eine der bezeichnendsten biochemischen Eigenschaften der Apoptose. Das Chromatin des Nukleus kondensiert und nimmt die Form eines Halbmondes an, wodurch die Apoptose auch ultrastrukturell von der Nekrose unterschieden werden kann (HAUNSTETTER und IZUMO, 1998; TAKEMURA und FUJIWARA, 2004; TAKEMURA und FUJIWARA, 2006).

### 2.1.3.6.1 Nekrose und Apoptose im Randbereich des Infarkts

#### Koagulative Myozytolyse

Ein Resultat der Ischämie mit folgender Reperfusion ist die koagulative Myozytolyse („contraction band necrosis“) im Randbereich des Infarkts. Sie ist charakterisiert durch hyperkontrahierte Myofibrillen, welche durch den erhöhten Kalziumspiegel in sterbenden Zellen und der damit verbundenen Arretierung der Zellen im kontrahierten Stadium zustande kommen. Die kontraktile Einheiten und die Mitochondrien sind zerstört. Häufig kommt es zur Kalzifikation und vaskulären Kongestion. Die Vakuolisierung der Myozyten nach anhaltender Ischämie wird auch als Myozytolyse bezeichnet. Diese ist charakterisiert durch die Ödematisierung und Schwellung der Zellen sowie der Lyse der Myofibrillen und der Nuklei. Durch Lyse und Phagozytose der nekrotischen Myozyten und der Bildung von Narbengewebe kann es zur Heilung des Myokards kommen (ANTMAN, 2000; TAKEMURA und FUJIWARA, 2004).

### Apoptose im Randbereich des Infarkts

Die Apoptose, ein programmierter Zelltod, ist ein fundamentaler physiologischer und pathologischer Vorgang während des Lebens. Myokardiale Apoptose erreicht ihren Höhepunkt 4 - 12 Stunden nach einem akuten Myokardinfarkt (MI) und kann auch in der subakuten Phase (bis zu 60 Tage post MI) noch nachgewiesen werden (ABBATE et al., 2002).

Es besteht eine enge Korrelation zwischen der Apoptoserate und dem Ausmaß des Remodelings. Apoptose in der chronischen Phase von Herzerkrankungen führt zum weiteren Verlust von Kardiomyozyten und tritt als wiederkehrendes Merkmal im Endstadium des Herzversagens auf (SARASTE et al., 1999).

### 2.1.3.6.2 Nekrose im Infarktzentrum

#### Koagulative Nekrose

Besteht eine Ischämie über einen längeren Zeitraum (> 20 Minuten) kommt es im Zentrum des Infarkts zur Koagulationsnekrose. In diesem Bereich verbleiben die Muskelzellen im relaxierten Stadium und werden passiv gestreckt. Lichtmikroskopisch kann die Streckung der Myofibrillen, eine Pyknose der Kerne und eine vaskuläre Kongestion beobachtet werden. Es folgt eine Phagozytose der nekrotischen Muskelzellen (ANTMAN, 2000).

### 2.1.4 Umbauprozesse nach akutem Myokardinfarkt

#### 2.1.4.1 Reparatur und Narbenbildung in der akuten Phase

Kardiales Gewebe besteht aus einer muskulären Komponente, welche die Kardiomyozyten beinhaltet und einer interstitiellen Komponente, zu welcher die extrazelluläre Matrix und das Gefäßsystem gehören. Ein transmuraler Myokardinfarkt verursacht einen segmentalen Verlust von Kardiomyozyten. Dem Verlust von Kardiomyozyten folgt ein Prozess der Geweberegeneration (Remodeling) (SUN und WEBER, 2000).

Viele Mediatoren, wie neurohumorale Faktoren (Angiotensin II, Aldosteron, Endothelin I, Norepinephrin), Zytokine (Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-6 (IL-6)), Wachstumsfaktoren („transforming growth factor“ (TGF), „fibroblast growth factor“ (FGF)) und Enzyme (z. B. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)) sind am kardialen Remodeling beteiligt (TAKANO et al., 2003).

## SCHRIFTTUM

---

Diese Reparatur muss erfolgen, um eine strukturelle Stabilität des Infarktgebietes zu erhalten. Die Balance zwischen Kollagensynthese und -degradation ist ein erster bestimmender Faktor einer Fibrose des Gewebes (SUN und WEBER, 2000).

In der frühen Phase des Umbaus werden MMPs aktiviert. Sie ermöglichen eine enzymatische Digestion von extrazellulären Matrixproteinen. Ihre Aktivität wird auf transkriptioneller Ebene sowie durch Gewebeinhibitoren von MMPs (TIMPS) kontrolliert (MANABE et al., 2002).

Ischämischer Stress ist ein potenter Auslöser proinflammatorischer Zytokine, wie z. B. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6. Die Expression von Zytokinen steigt innerhalb der ersten Stunden bis hin zu einem Tag stark an (NIAN et al., 2004).

Dadurch kommt es zur Rekrutierung inflammatorischer Zellen. In den ersten Stunden nach einer Reperfusion infiltrieren neutrophile Granulozyten, gefolgt von Monozyten und Lymphozyten. Die inflammatorischen Zellen tragen zur proteolytischen Digestion und Phagozytose des infarzierten Gewebes bei und verschwinden innerhalb der ersten Wochen nach MI als eine Konsequenz des programmierten Zelltods (Apoptose). Zeitgleich befinden sich auch Myofibroblasten (myoFB) im Infarktgebiet. Ihr Ursprung ist noch nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich stammen sie von Fibroblasten ab, die ihren Phänotyp geändert haben. Angiotensin II, FGF, TGF, Katecholamine und Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren sind parakrine und autokrine Faktoren, die einen Effekt auf den Phänotyp und die Funktion von Fibroblasten haben. MyoFB sind verantwortlich für die Bildung einer Narbe durch Expression von v. a. fibrillären Kollagen Typ I und III. Sie verbleiben im Infarktgebiet und durchlaufen keine Apoptose, wie es in anderen verletzten Geweben, welche die Fähigkeit haben Parenchym zu regenerieren (z. B. Haut), der Fall ist. Im Myokard verbleibend, generieren sie weiterhin fibrogene Signale, wodurch die Gewebereparatur weiter geführt und eine Fibrose begünstigt wird. Die Formation eines vaskulären Netzwerkes beginnt im humanen Myokard 3 Tage nach MI. Dieses kapilläre Netzwerk kann verschiedenen Ursprungs sein. Zum einen kann es durch endotheliale Zellsprossung aus benachbarten Kapillaren (Angiogenese) entstehen. Zum anderen trägt auch die Transdifferenzierung von Progenitorzellen des Knochenmarks zu endothelialen Zellen (Vaskulogenese) zur Gefäßneubildung bei. Die Ausweitung von benachbarten Kollateralgefäßen (Arteriogenese) stellt eine weitere Möglichkeit zur Ausbildung eines vaskulären Netzwerkes im infarzierten Gebiet dar ((MANABE et al., 2002; SUN et al., 2002).

Nach einem großen transmuralen MI erscheint fibröses Gewebe auch im nicht-infarzierten Myokard (SUN und WEBER, 2000).

### 2.1.4.2 Umbauprozesse in der chronischen Phase

Obwohl die Umbauprozesse im Myokard (Remodeling) infolge einer Ischämie in ihrem Ursprung eine Adaptation zur Erhaltung normaler kardialer Funktionen darstellen, führt das Fortschreiten der Umbauprozesse zu einer progressiven Dekompensation des Myokards. Kardiales Remodeling spielt eine entscheidende Rolle in der Progression der Herzinsuffizienz nach MI. Das Ausmaß des Remodeling ist u. a. von der Infarktgröße abhängig. Große Infarkte induzieren eine stärkere Dilatation und einen erhöhten Wandstress des linken Ventrikels als kleine Infarkte. Zusätzlich zu Kardiomyozyten spielen auch Fibroblasten, extrazelluläre Matrixproteine und koronare Gefäße eine kritische Rolle im Prozess des Remodelings. Schreitet der Umbau des Myokards weiter voran (spätes Remodeling), so erfolgen komplexe architektonische Veränderungen sowohl im Infarktgebiet als auch im Nicht-Infarktgebiet. Spätes Remodeling führt zu einem weiteren Verlust von Kardiomyozyten durch Nekrose und Apoptose. Durch den Verlust von Kardiomyozyten wird die linksventrikuläre Wand weiter ausgedünnt und der Infarkt weitet sich aus. Die verbleibenden Myozyten werden überdehnt und die linksventrikuläre Wand dilatiert. Es folgt eine Hypertrophie der Kardiomyozyten sowie eine Kollagenakkumulation (Fibrose) (TAKANO et al., 2003).

Bei großen Infarkten und durch bestehen bleibende Stressfaktoren kann eine zweite Welle der Zytokinaktivierung auftreten. Dies ist eine der Ursachen des späten Remodelings, wodurch sich der Infarkt auf das nicht-infarzierte Myokard ausweitet (NIAN et al., 2004).

Eine erhöhte Konzentration des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  in der späten Phase des Remodelings zerstört das Kollagennetzwerk und trägt zur Progression der linksventrikulären Dysfunktion bei. IL-6 ist bei Patienten mit niedriger linksventrikulärer Funktion erhöht und an der Entstehung des Herzversagens nach einem Myokardinfarkt beteiligt. Sowohl Angiotensin II als auch ET-I führen zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten und induzieren die Kollagensynthese. Eine Akkumulation von fibrillärem Kollagen führt zu einer Fibrose im Myokard und stellt eine der Ursachen für das Auftreten der Herzinsuffizienz durch das Remodeling dar. Auch die in Kardiomyozyten durch Angiotensin II induzierte Produktion von TGF- $\beta$  spielt eine kritische Rolle in der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und Fibrose. Eine gesteigerte Aktivität der MMPs in der späten Phase des Umbaus führt zu einem verstärkten Abbau von Komponenten der extrazellulären Matrix sowie von fibrillärem Kollagen Typ I und III. Dies verhindert die Bildung einer stabilen Narbe und die Gefahr, dass das Myokard rupturiert, steigt (TAKANO et al., 2003).

### 2.1.4.3 Myokardiale Regeneration

Die Faktoren, die zur Entwicklung des Herzversagens führen, sind noch nicht vollständig erforscht. Neben der Kardiomyozytenhypertrophie, der Myozytendysfunktion und der myokardialen Fibrose scheint der Verlust von Kardiomyozyten eine Hauptrolle bei der Entstehung der Herzinsuffizienz zu spielen (HAUNSTETTER und IZUMO, 1998).

Ob das Herz eine Erkrankung überstehen kann, ist davon abhängig, ob eine myokardiale Regeneration im adulten Organ stattfindet oder ob diese Wachstumsadaptation auf das pränatale Leben begrenzt ist. Die Auffassung, dass das Herz ein terminal differenziertes Organ ist, unfähig Myozyten zu ersetzen, stand im Mittelpunkt der kardiovaskulären Forschung und therapeutischen Entwicklung in den vergangenen 50 Jahren. Die Annahme, dass die Anzahl der Kardiomyozyten kurz nach der Geburt die des Erwachsenen erreicht hat, würde bedeuten, dass diese Zellen 70-mal pro Minute ein Leben lang schlagen. Eine zwangsläufige Folge wäre, dass Myozyten unsterblich sind. Dies widerspricht der Auffassung von Zellalterung und Apoptose. Der Tod von Myozyten mit dem Alter und der chronische Verlust von Zellen in Abwesenheit einer Myozytenmultiplikation würden in einem Verschwinden des Organs nach wenigen Dekaden resultieren. Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass Kardiomyozyten sterben und dass im Herzen konstant in jedem Alter neue Kardiomyozyten gebildet werden (ANVERSA et al., 2006).

Verschiedene Forschungsgruppen dokumentieren die Aktivierung der Zellzyklusmaschinerie, der Karyogenese und der Zytokinese in Subpopulationen von Kardiomyozyten (BELTRAMI et al., 2001).

Jüngste Untersuchungen haben gezeigt, dass das Myokard adulter Säugetiere, inkl. das des Menschen, ein Reservoir an kardialen Stamm- und Progenitorzellen bzw. an Kardioblasten aufweist. Diese residenten Progenitorzellen besitzen die Fähigkeit den Phänotyp voll ausdifferenzierter Kardiomyozyten anzunehmen (LAUGWITZ et al., 2005; TORELLA et al., 2006).

Untersuchungen an Herzen verstorbener Herzinfarktpatienten ergeben, dass der Anteil mitotischer Myozyten 0,015 - 0,08 % beträgt. Dies ist für eine effektive Regeneration des Myokards durch Proliferation von Myozyten zu niedrig (MATHUR und MARTIN, 2004).

Die Reaktivierung von Subpopulationen oder eine Verstärkung der Proliferation kardialer Stamm- oder Progenitorzellen könnte die kontraktile Funktion des Myokards nach MI verbessern (DOWELL et al., 2003).

### 2.1.4.3.1 Asymmetrische Zellteilung

In postnatalem Gewebe verbleiben undifferenzierte adulte Stammzellen, während gleichzeitig hoch differenzierte Progenitorzellen hervorgebracht werden. Dies wird durch eine asymmetrische Zellteilung ermöglicht, bei welcher eine neue, undifferenzierte „Ersatz“-Stammzelle und eine sich differenzierende „Transit“-Tochterzelle entstehen. Gewebe wird entweder durch eine direkte Differenzierung der Tochterzellen oder – nach weiterer Teilung der Tochterzellen – durch weiter differenzierte Nachkommen gebildet. Letztendlich werden die Zellen, durch die Differenzierung zu Zellen eines bestimmten Gewebes, zu nichtteilungsfähigen terminal arretierten Zellen. Der Mechanismus, der die asymmetrische Zellteilung reguliert, ist nicht abschließend geklärt. Diskutiert werden u. a. zelluläre Mechanismen, bei denen das p53 Tumorsuppressorprotein und die Inosin-5`monophosphat Dehydrogenase die Genexpression regulieren und somit die asymmetrische Zellteilung beeinflussen. Eine andere Möglichkeit wäre eine spezifische Kommunikation zwischen neu geteilten Tochterzellen. Hierbei könnte es durch einen Zell-zu-Zell-Kontakt zur Instruktion zwischen den Zellen kommen, so dass eine Zelle als Stammzelle fungiert während die andere ein „Transitzell-Differenzierungsprogramm“ startet (SHERLEY, 2002).

### 2.1.4.3.2 Zellzyklus und Proliferation

Der Zellzyklus wird in 4 Phasen, die ineinander übergehen, unterteilt. Bevor eine Replikation der Zellen erfolgt, befindet sie sich in einer Ruhephase (G<sub>0</sub>-Phase). Empfangen Zellen ein mitotisches Signal, treten sie in die G<sub>1</sub>(G<sub>1</sub>)-Phase ein (DOWELL et al., 2003).

Die Induktion der G<sub>1</sub>-Phase wird von Wachstumsfaktoren, wie z. B. den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF-I und -II) durch Aktivierung des IGF-I-Rezeptors und der damit verbundenen Ras-Kaskade vermittelt (JONES und CLEMMONS, 1995) (siehe Kapitel 2.2.6.1).

Dadurch werden in der G<sub>1</sub>-Phase Enzyme synthetisiert, die für den Nukleotidmetabolismus erforderlich sind. In der G<sub>1</sub>-Phase gibt es den so genannten R-Punkt (Restriktionspunkt). Der R-Punkt verhindert den Eintritt der Zellen in die S(Synthese)-Phase solange nicht ein Schwellenwert von mitogenen Ereignissen überschritten ist. Hierzu zählt z. B. die Expression

## SCHRIFTTUM

---

von frühen Genprodukten (z. B. *myc*, *jun*, *fos*) sowie von G1-Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) (PLANAS-SILVA und WEINBERG, 1997).

Unterschiedliche Cyclin-CDK-Komplexe werden für verschiedene Zellzyklusabläufe benötigt. Die Aktivität dieser Komplexe wird durch CAK (CDK activators: Cyclin H/CDK7) und CKI (CDK inhibitors: p15, p16, p18 usw.) reguliert. In der G1-Phase werden 2 Klassen von Cyclinen aktiviert (D-Typ-Cycline und Cyclin E). Nach einer Komplexbildung mit ihrem jeweiligen katalytischen Partner (D-Typ-Cycline assoziieren mit CDK4 oder CDK6; E-Cycline assoziieren mit CDK2) vermitteln sie die Phosphorylierung von Mitgliedern der „pocket protein family“ (Rb, p107, p130). Dies führt zur Freisetzung von E2F-Transkriptionsfaktoren, welche für die Initiierung der S-Phase erforderlich sind. Die Progression des Zellzykluses in der S-Phase wird durch Cyclin-A (assoziiert mit CDK2) gesteuert (HUNTER und PINES, 1994).

In dieser Phase duplizieren Zellen ihre Chromosomen. Anschließend treten die Zellen in die G2(gap 2)-Phase ein, in welcher die Chromosomen kondensieren. Die Regulation dieser Phase erfolgt über Cyclin-B (assoziiert mit der Cyclin-abhängigen Kinase *cdc2*). Es werden Proteine produziert, die für die Initiierung der M(Mitose)-Phase benötigt werden. In der M-Phase löst sich die Kernmembran auf und die kondensierten Chromosomen ordnen sich in der Äquatorialebene an. Folgend trennen sich die Schwesterchromatiden und bilden zwei separate Nuklei (Karyokinese). Durch Partition des Zytoplasmas (Zytokinese) kommt es zur Ausbildung zweier Tochterzellen (PINES und RIEDER, 2001; DOWELL et al., 2003).

### 2.2 Die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF-I und IGF-II)

#### 2.2.1 Die Insulin-Familie

Die Insulin-Familie beinhaltet die Insulin-, Relaxin- und IGF-Gene. Relaxin wird in den Ovarien produziert und fördert den Umbau des weiblichen Reproduktionstraktes bei der Geburt. Die m-RNA des Insulins wird nur in den  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas produziert. IGF-I und IGF-II werden in vielen Geweben, wie z. B. in Leber, Herz, Lunge, Nieren, Pankreas, Milz, Kolon, Gehirn und Hypophyse, in unterschiedlichen Konzentrationen synthetisiert. Die Insulin-ähnlichen Wachstumshormone und Insulin sind verwandte Polypeptide, die eine große Sequenzhomologie und ein ähnliches biologisches Aktivitätsspektrum aufweisen (BELL et al., 1985).

#### 2.2.2 Evolution der Insulin-Familie

Im menschlichen Genom liegen das Insulin- und IGF-II-Gen nahe beieinander auf dem Chromosom 11. Das IGF-I- und Relaxin-Gen liegen auf anderen Chromosomen. Da beide IGFs eine 47 %ige Identität zu Insulin aufweisen, ist es wahrscheinlich, dass die primordialen IGF-Gene zur gleichen Zeit entstanden sind. Beim IGF-I-Gen folgte eine Duplikation und simultane Translokation zu einem anderen Chromosom. Das IGF-II-Gen hingegen verblieb in der Nähe seines Ursprungsgens. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der Mitglieder der Insulin-Familie, so weist ihre Homologie darauf hin, dass zuerst die Ursprungslinie des Insulins und des Relaxins auseinander gingen und dann die IGFs von der Insulinlinie differierten (BELL et al., 1985).

#### 2.2.3 Das IGF-System

Das IGF-System beinhaltet IGF-I und IGF-II, die Typ I und Typ II Rezeptoren (IGF-IR, IGF-IIR), eine Proteinfamilie die IGF bindet (IGFBP), und IGFBP spaltende Proteasen (ALLAN et al., 2001).

IGF-I und IGF-II sind 7-kDa Polypeptide, die eine strukturelle Homologie mit Proinsulin teilen. Diese Proteine werden auch als Somatomedine bezeichnet, da sie in vielen Geweben eine wachstumsfördernde Eigenschaft aufweisen und ihre Bioaktivität mit Antikörpern gegen Insulin nicht unterdrückt werden kann (ROSEN, 1999).

## SCHRIFTTUM

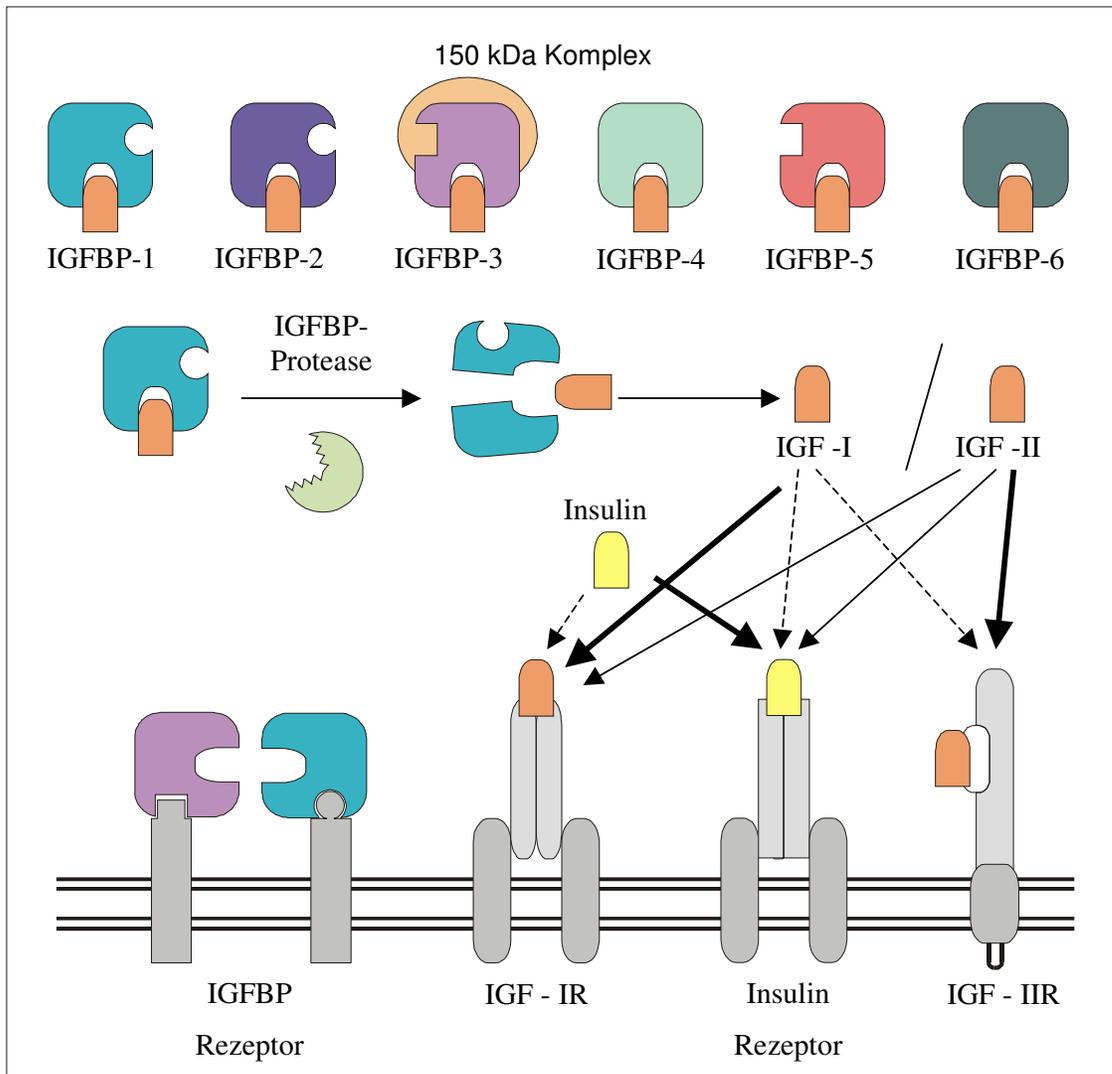
---

IGF-I ist ein Einzelketten-Polypeptid das aus 70 Aminosäuren (AS) besteht, die durch 3 Disulfidbrücken verbunden sind. Die primäre Struktur des IGF-II ist der des IGF-I ähnlich; 45 von 73 AS-Positionen (62 %) sind identisch (RINDERKNECHT und HUMBEL, 1978a; RINDERKNECHT und HUMBEL, 1978b).

Die Aktivität und Halbwertszeit der IGFs wird durch ihre Kopplung an Bindungsproteine (IGFBP) reguliert. KIM et al. (1997) postulieren eine IGFBP Superfamilie, welche in 6 IGFBPs mit hoher Affinität (IGFBP 1-6) und 4 IGFBPs niedriger Affinität eingeteilt wird. Diese Proteine regulieren das Zellwachstum durch IGF abhängige und unabhängige Aktionen. HWA et al. (1999) beschreiben für die Gruppe mit niedriger Affinität 9 IGF verwandte Bindungsproteine (IGFBP-rP1-9).

Beide IGFs interagieren mit spezifischen Zelloberflächenrezeptoren, die als Typ I und Typ II IGF Rezeptoren (IGF-IR, IGF-IIR) bezeichnet werden, sowie mit Insulinrezeptoren (IR) (ALLAN et al., 2001) (siehe Abbildung 1).

An IGFBP gebundenes IGF ist unfähig an die Plasmamembranrezeptoren zu binden. Es ist biologisch inaktiv. In die Dissoziation der IGFs von den IGFBPs sind Proteasen einbezogen, welche die Bindung der IGFs von den IGFBPs lösen und zu einer Proteolyse der Bindungsproteine führen. Nach der Dissoziation ist IGF biologisch aktiv und kann an die Rezeptoren binden (CAMPBELL et al., 1992).



**Abbildung 1. Komponenten der IGF-Familie und Insulin**

Dargestellt sind die 6 Bindungsproteine (IGFBP) des IGF-Systems. Der größte Teil, des im Serum zirkulierenden IGFs, liegt als 150 kDa Komplex vor (IGFBP3+ALS+IGF). Für IGFBP-1, -2, -3 und -5 sind spezifische Zelloberflächenrezeptoren bekannt. Gebundenes IGF ist biologisch inaktiv. IGF-Proteasen spalten IGF und ihre Bindungsproteine, so dass IGF an Rezeptoren binden kann. IGF-II wird vom IGF-IIR, IGF-IR und Insulinrezeptor mit einer ähnlich hohen Affinität gebunden. IGF-I bindet hauptsächlich an den IGF-IR und mit niedriger Affinität an den IGF-IIR und den Insulinrezeptor. Insulin bindet mit hoher Affinität an seinen eigenen Rezeptor und mit niedriger Affinität an den IGF-IR. Insulin bindet nicht an den IGF-IIR (modifiziert nach ALLAN et al., 2001).

### 2.2.4 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-II (IGF-II)

IGF-II, welches auch als Somatomedin A und Multiplication Stimulating Activity (MSA) bekannt ist, kann nahezu von jedem Säugetierzelltyp synthetisiert und exportiert werden. Das IGF-Regulierungssystem ist in jedem Organ gewebespezifisch. Die IGFs zirkulieren in einem molaren Verhältnis von 2 : 1 (IGF-II : IGF-I). 99 % des IGFs ist im Serum an IGFBP gebunden (ROSEN, 1999).

#### 2.2.4.1 Expression von IGF-II

Das humane IGF-II Gen wurde 1978 vollständig von Rinderknecht und Humbel beschrieben (RINDERKNECHT und HUMBEL, 1978b).

Es besteht aus 9 Exons. Der 5' Bereich des Gens besteht aus den nicht kodierenden Exons 1 - 6. Exon 7, 8 und 9 sind kodierende Bereiche. Den Exons 1, 4, 5 und 6 geht jeweils eine separate Promotorregion voraus. Durch die 4 Promotoren werden verschiedene IGF-II-(prä)-m-RNAs mit unterschiedlichen untranslatierten Regionen exprimiert (TEERINK et al., 1994).

Alternatives Spleißen der prä-m-RNAs bewirkt die Entstehung von m-RNAs in den Größen 6,0; 5,3; 5,0; 4,8 und 2,2 kb. Sie kodieren alle für ein Protein. Durch posttranskriptionelle Prozessierung entsteht eine weitere, 1,8 kb große, m-RNA (SUSSENBACH et al., 1992; HOLTHUIZEN et al., 1993).

Die verschiedenen m-RNAs werden entwicklungs- und gewebespezifisch exprimiert. Die Promotoren P2 - P4 sind in vielen embryonalen Geweben aktiv (und bleiben während der Entwicklung in fast allen nicht hepatischen Geweben angeschaltet). In der Leber werden die Promotoren P2 - P4 nach der Geburt abgeschaltet. Gleichzeitig wird der Promotor P1 aktiviert (TEERINK et al., 1994).

Das IGF-II Gen gehört zu den Genen, die parental Allel-spezifisch exprimiert und als „imprinted gens“ bezeichnet werden. In normalen Zellen ist das maternale Gen nicht aktiv (es hat einen genomischen Stempel) und es wird nur das paternale Allel transkribiert. Das IGF-II-Gen liegt auf dem Chromosom 11 nahe dem H19 Gen, welches einen genomischen Stempel auf dem paternalen Allel hat. Der Prozess des Imprintings ist ein frühes Ereignis zum Zeitpunkt der Gametogenese. Der Verlust des IGF-II Imprintings („Loss of imprinting“, LOI) wird bei einer Vielfalt von Tumoren (Wilms' Tumoren, Lungenkrebs, Prostatakrebs,

Rhabdmyosarkomen usw.) beobachtet. Der genaue Zusammenhang zum H19-Gen, welches eine Tumorsuppressor Funktion haben könnte, ist nicht genau bekannt. Beim Wilms' Tumor ist das Imprinting oft mit einer reduzierten Expression des H19-Gens verbunden (KHANDWALA et al., 2000).

Nach BANERJEE et al. (1995) kontrolliert das kondensierte Chromatin des H19-Gens die Transkription des IGF-II.

IGF-II wird als ein Prä-pro-Protein synthetisiert. Nach Abspaltung der Signalsequenz (die für die Sekretion des IGFs verantwortlich ist) des Prä-pro-Proteins am N-Terminus wird das COOH-terminale E-Peptid des Pro-IGFs entfernt. Es entsteht das ausgereifte, 67 AS lange, 7,5 kDA große IGF-II-Protein. Das ausgereifte Polypeptid kann in 4 Domänen unterteilt werden (B-, C-, A-, und D-Domäne), welche homolog zu den B- und A-Ketten des ausgereiften Insulins sowie zu den B-, C-, A- und D-Domänen des IGF-I sind (VALENZANO et al., 1997).

Im Gegensatz zu IGF-I bestehen von IGF-II zusätzlich zur nicht glykosylierten Form auch mindestens 12 Isoformen mit unterschiedlich hohem Molekulargewicht (VALENZANO et al., 1995).

### 2.2.5 IGF-Bindungsproteine

Der größte Teil des im Serum zirkulierenden IGFs ist an Proteine, die eine hohe Affinität zu IGF aufweisen, gebunden (IGFBP1-6). Die 6 IGFBP teilen eine Strukturhomologie und eine spezifische Bindung zu IGF. Ihnen werden 4 Hauptfunktionen zugeschrieben, die essentiell für die Kontrolle und Regulation der biologischen Aktivität des IGFs sind. Zu den Hauptfunktionen zählen

- 1) die Funktion als Transportprotein im Plasma und die Kontrolle des Efflux von IGF aus dem vaskulären Raum;
- 2) die Verlängerung der Halbwertszeit des IGFs und die Regulation ihrer metabolischen Beseitigung;
- 3) die gewebe- und zellspezifische Lokalisation des IGFs und
- 4) die Regulation der Interaktion des IGFs mit dem IGF Rezeptor.

75 % des IGFs liegt im Plasma als ein 150 kDA tenär Komplex, bestehend aus IGF, dem IGFBP3 und einer säurelabilen Untereinheit (ALS) vor (siehe Abbildung 1). Assoziiert mit diesem Komplex kann das IGF die Kapillarmembran nicht passieren. Frei im Plasma vorhandenes IGF hat eine Halbwertszeit von 10 Minuten. Durch die Komplexbildung wird

diese um 12 bis 15 Stunden verlängert. Die restlichen IGFBPs sind wesentlich kleiner als IGFBP3 und können die Kapillarmembran passieren (JONES und CLEMMONS, 1995).

Neben den IGFBPs gibt es IGFBP verwandte Proteine (IGFBP-rPs), die eine strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zu IGFBP aufweisen. Sie binden ebenfalls IGF, jedoch mit einer geringeren Affinität. Ihre physiologische Rolle im IGF-System ist noch nicht geklärt (HWA et al., 1999).

### 2.2.6 Rezeptoren des IGF-Systems

Die IGFs binden an drei verschiedene Rezeptoren, den IGF-I-Rezeptor (IGF-IR, Typ-I-Rez.), den IGF-II-Rezeptor (IGF-IIR, Typ-II-Rez., Mannose-6-Phosphat (M6P)/IGF-II-Rezeptor) und den Insulinrezeptor (IR). Der IGF-IR bindet IGF-II mit einer ca. 5 - 12fach und Insulin mit einer 100 - 1000fach niedrigeren Affinität als IGF-I. Die Affinität des IGF-IIR zu IGF-I ist um das 500fache niedriger als zu IGF-II. Allerdings bindet er kein Insulin. Wohingegen IGF auch an den Insulinrezeptor bindet. Dadurch wird der Rezeptor aktiviert, wodurch eine metabole und im geringen Maße eine mitogene Wirkung auf die Zellen ausgeübt wird (siehe Abbildung 1). Die intrazelluläre Signaltransduktion der IGFs wird hauptsächlich über den IGF-IR vermittelt (JONES und CLEMMONS, 1995).

#### 2.2.6.1 IGF-I-Rezeptor

IGFs (IGF-I und IGF-II) sind für eine Reihe unterschiedlicher Prozesse essentiell. Zu diesen Prozessen gehören der Ablauf des Zellzykluses, wodurch die Zellproliferation ausgelöst wird, sowie die Regulation des programmierten Zelltods. Sie induzieren die Zelldifferenzierung indem sie die Aktivität bestimmter Enzyme in der Zelle stimulieren. Diese Effekte – sowohl von zirkulierendem als auch von autokrin und parakrin wirkendem IGF – werden in erster Linie durch den IGF-IR vermittelt (LEROITH, 2000).

Der IGF-IR weist eine hohe Homologie zum Insulinrezeptor auf und bindet neben IGF-I und -II auch Insulin (JONES und CLEMMONS, 1995).

Der IGF-IR ist ein heterotetrameres Glykoprotein, welches sich aus zwei  $\alpha$ -Untereinheiten und zwei  $\beta$ -Untereinheiten zusammensetzt. Die  $\alpha$ -Untereinheiten liegen extrazellulär und binden die Liganden. Die  $\beta$ -Untereinheiten bestehen aus einem kurzen extrazellulären, einem membranüberbrückenden und einem großen intrazytoplasmatischen Segment. Die

intrazytoplasmatische Region beinhaltet einen Tyrosinkinase-Bereich sowie Tyrosin- und Serinphosphorylierungsstellen (STEWART und ROTWEIN, 1996a).

Die Bindung eines Liganden (IGF-I, IGF-II) an den extrazellulären Rezeptor ( $\alpha$ -Untereinheit) löst eine Autophosphorylierung der  $\beta$ -Untereinheit aus und stimuliert die Tyrosinkinase-Aktivität. Eine Autophosphorylierung findet an 3 Tyrosinresten der Kinasedomäne in der  $\beta$ -Untereinheit sowie evtl. an anderen Tyrosinen innerhalb des Carboxylendes und im juxtamembranösen Bereich statt. Die Tyrosin-Phosphorylierung des IGF-IRs hat zwei verschiedene Folgen. Zum einen ist die Tyrosinkinase-Aktivität (diese phosphoryliert andere Substrate, die Tyrosin enthalten) des Rezeptors erhöht, zum anderen stellen die phosphorylierten Tyrosinreste Bindungsstellen für verschiedene Proteine („Docking-Protein“), die die Signalkaskade des IGF-IR vermitteln, dar (LEROITH, 2000; LEROITH et al., 1995).

Zu den Docking-Proteinen zählt u. a. das Insulin-Rezeptorsubstrat-1 (IRS-1), das als Hauptsubstrat des aktivierten IGF-IR gilt. Das IRS-1 enthält mehrere Tyrosine, welche durch die Tyrosinkinase des aktivierten IGF-IR phosphoryliert werden. Die phosphorylierten Tyrosine stellen wiederum Bindungsmotive für intrazelluläre Proteine, die SH<sub>2</sub>-Domänen aufweisen, dar. Zu diesen komplexbildenden Proteinen gehören u. a. Grb2 (Growth factor receptor bound-2-protein) und p85 (regulatorische Untereinheit der Phosphoinositol-3-Kinase) (STEWART und ROTWEIN, 1996a).

Grb2 bindet mit einer SH<sub>2</sub>-Domäne an das tyrosinphosphorylierte IRS und mit einer SH<sub>3</sub>-Domäne an das Sos (Son of sevenless). Sos ist ein Guaninnukleotid-Austauschprotein, das in die Umwandlung von inaktiviertem Ras-GDP zu aktivem Ras-GTP involviert ist (LEROITH et al., 1995; PRUETT et al., 1995).

Aktiviertes Ras stimuliert die MAP(mitogen-activated protein)-Kinase (MAPK), wodurch eine Signalkaskade ausgelöst wird. In dieser Signalkaskade werden ERKs (extrazelluläre signalvermittelnde Proteinkinase) durch Phosphorylierung aktiviert. Aktivierte ERKs vermitteln Signale an den Nukleus, wodurch die Genexpression reguliert wird (BLENIS, 1993; STEWART und ROTWEIN, 1996a).

Ein anderes frühes Phosphotyrosin-Substrat des aktivierten IGF-IR ist Shc (scr homology domain-containing protein). Die Shc-Familie setzt sich zusammen aus 3 Proteinen, die eine einzelne SH<sub>2</sub>-Domäne beinhalten. Wie IRS-1 assoziiert Shc mit Grb2 und aktiviert die Ras-Kaskade (und folgend die MAPK-Kaskade) durch einen Grb2-Sos-Komplex. Durch die Aktivierung der MAPK-Signalkaskade werden eine Reihe zellulärer und nukleärer Proteine reguliert, wozu auch Transkriptionsfaktoren wie c-fos und c-myc gehören. Diese

Regulierung ist wichtig für die Steuerung des Zellwachstums und der Mitogenese (HERNANDEZ-SANCHEZ et al., 1995; LEROITH et al., 1995).

Neben Grb2, bindet aktiviertes IRS-1 über die SH<sub>2</sub>-Domäne auch an die regulatorische Untereinheit (p85) der Phosphoinosit-3-Kinase (PI3-K). p85 ist über eine SH<sub>3</sub>-Domäne mit der katalytischen Untereinheit der PI3-K verbunden (p110) (LEROITH, 2000).

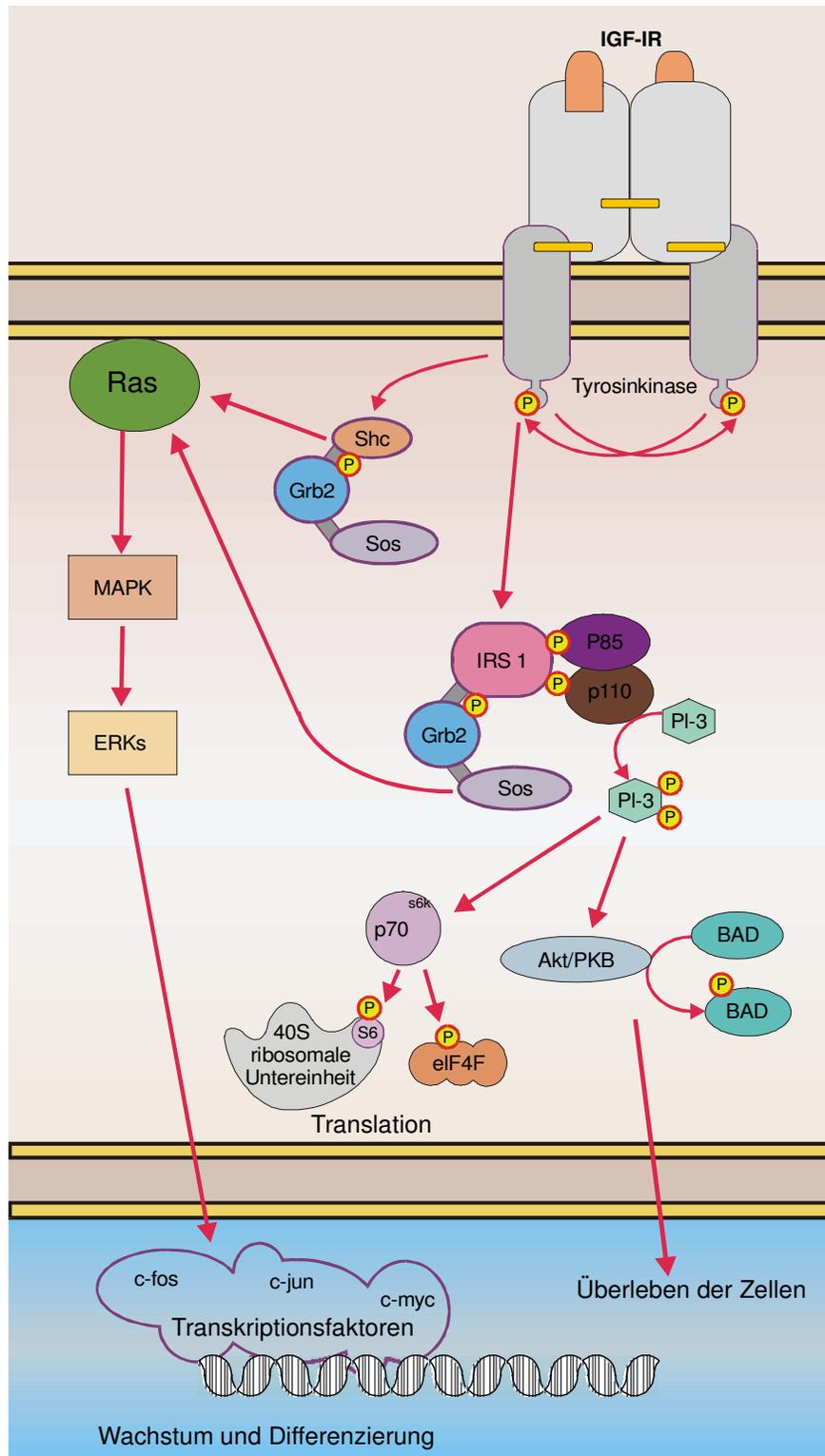
Die Komplexbildung von aktiviertem IRS-1 mit Grb2 aktiviert die katalytische Untereinheit p110 der PI3-K. Die PI3-Kinasen sind Lipidkinasen, die durch Aktivierung der katalytischen Untereinheit p110 den Anhang eines Phosphatmoleküls an Phosphatidylinositol katalysieren. Durch die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol werden nachgeordnete Kinasen aktiviert, die den biologischen Effekt von PI3-K vermitteln. Zu diesen Kinasen gehören z. B. die Akt/Proteinkinase B (PKB) und die p70<sup>s6</sup>-Kinase (MEDINA und SANTISTEBAN, 2000; KOBAYASHI et al., 2005).

Nach Aktivierung der Akt/PKB durch PI3-K kommt es zur Phosphorylierung von BAD. BAD ist ein Protein, das den Zelltod fördert. Nach einer Phosphorylierung von BAD durch Akt wird die zelltodfördernde Wirkung von BAD inaktiviert. Auch wenn einige Autoren davon ausgehen, dass es alternative Signalwege gibt, durch welche der IGF-IR seinen antiapoptischen Effekt bewirkt, scheint der oben beschriebene jedoch der Hauptsignalweg zu sein (PERUZZI et al., 1999).

Die ebenfalls der PI3-K nachgeordnete p70<sup>s6k</sup> ist ein Schlüsselpunkt der Proteinsynthese. Diese Kinase phosphoryliert ein S6 Protein der 40S Untereinheit der Ribosomen, welches die Translationsaktivität steigern könnte. Ein weiterer Faktor, der in diesem Zusammenhang durch Phosphorylierung aktiviert wird und zum Anstieg der translationalen Aktivität beiträgt, ist der Translations-Induktionsfaktor-eIF4E (SCHLUTER und PIPER, 1999).

Die beiden beschriebenen Kaskaden (Ras/MAPK und PI3-K) stellen die Hauptsignalwege des durch IGF aktivierten IGF-IR dar. Ursprünglich ging man davon aus, dass der Ras/MAPK-Signalweg vor allem die proliferativen Effekte und der PI3-Kinase-Signalweg hauptsächlich antiapoptische Effekte der IGFs vermittelt. Neuere Studien weisen daraufhin, dass beide Signalwege auch beide Effekte vermitteln (LEROITH, 2000).

In Abbildung 2 sind die IGF-IR-Signalkaskaden schematisch dargestellt.



**Abbildung 2. Schematische Darstellung der intrazellulären Signalwege des IGF-IR**

Die Bindung von IGF an den IGF-I-Rezeptor (IGF-IR) bewirkt die Autophosphorylierung des Rezeptors. Dadurch werden das Insulinrezeptorsubstrat-1 (IRS-1) und Shc phosphoryliert. Beide Substrate assoziieren mit PI3-Kinase und Grb2 (p84/p110). Grb2 assoziiert mit Sos (mammalian exchange factor protein Son of sevenless), wodurch Ras aktiviert wird. Aktiviertes Ras initiiert die Stimulation der MAP(mitogen-activated

protein)-Kinase-Signalkaskade. Folgend kommt es zur Aktivierung von ERKs (extrazelluläre signalvermittelnde Proteinkinasen). ERKs senden Signale an den Nukleus, durch welche die Genexpression reguliert wird. Ein weiterer Signalweg des aktivierten IRS-1 erfolgt dadurch, dass es die regulatorische Untereinheit (p85) der Phosphoinosit-3-Kinase (PI3-K) bindet. p85 ist mit der katalytischen Untereinheit p110 verbunden. Biologische Effekte der PI3-K werden über nachgeordnete Kinasen wie z. B. Akt/Proteinkinase B (PKB) und p70<sup>s6k</sup> vermittelt. Nach Aktivierung der Akt/PKB kommt es zur Phosphorylierung von BAD. Durch Phosphorylierung des BAD wird seine zelltothfördernde Wirkung inaktiviert. p70<sup>s6k</sup> ist ebenfalls der PI3-K nachgeordnet und in die Proteinsynthese involviert. Diese Kinase phosphoryliert ein S6 Protein der 40S Untereinheit der Ribosomen, was die Translationsaktivität steigert. Ein weiterer Faktor, der aktiviert wird und an der Translation beteiligt ist, ist der Translations-Induktionssfaktor-eIF4E (modifiziert nach LEROITH et al., 1995).

### 2.2.6.2 Insulinrezeptor

Der Insulinrezeptor (IR) ist in seiner Topographie und Sequenz dem IGF-IR sehr ähnlich. Er besteht, wie der IGF-IR, aus zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Untereinheiten. Die zytoplasmatische Signaltransduktion, die sich der Rezeptorautophosphorylierung anschließt, scheint bei beiden sehr ähnlich zu verlaufen. Der IR wird durch eine Ligandenbindung aktiviert, worauf eine Phosphorylierung von IRS-1 folgt. Die Phosphorylierung von IRS-1 bewirkt eine Aktivierung der PI3-K- und MAPK-Signalkaskade (JONES und CLEMMONS, 1995).

Neben Insulin sind auch IGF-I und IGF-II Liganden des IR. Insulin und IGF-I binden mit hoher Affinität (im niedrigen nanomolaren Bereich) an ihre „eigenen“ Rezeptoren, aber nur mit niedriger Affinität (im hohen nanomolaren Bereich) an verwandte Rezeptoren. Im Gegensatz dazu hat IGF-II eine hohe Affinität zu beiden verwandten Rezeptoren. Der IR erhält die Fähigkeit IGF-II mit einer hohen Affinität zu binden, wahrscheinlich durch Alternatives Spleißen des Exons 11 (NAKAE et al., 2001) (siehe Abbildung 3).

### 2.2.6.3 IGF-II-Rezeptor

Der IGF-IIR hat keine strukturelle Ähnlichkeit mit dem IGF-IR. Er besteht hauptsächlich aus einer extrazellulären Domäne. Die kurze zytoplasmatische Domäne weist keine Homologie zur Tyrosinkinase-Domäne des IGF-IRs auf (SKLAR et al., 1989).

Der IGF-IIR ist identisch mit dem Kationen-unabhängigen Mannose-6-Phosphat Rezeptor. Der IGF-IIR weist eine Bindungsstelle für das IGF-II und eine weitere Bindungsstelle für lysosomale Enzyme, die M6P enthalten auf, und kann beide Substrate simultan binden (NISSLEY und KIESS, 1991).

Der an die Zelloberfläche gebundene IGF-IIR bewirkt die Internalisierung (in die Zelle) und die Degradation von IGF-II (durch Lysosomen) und ist somit an der Regulierung der extrazellulären IGF-II Konzentration beteiligt (JONES und CLEMMONS, 1995) (siehe Abbildung 3).

Neben der gebundenen Form des IGF-IIR kann der Rezeptor auch frei im Serum zirkulieren. Frei zirkulierend bindet er signifikant große Mengen IGF-II und fungiert als ein spezifisches IGF-II-Bindungsprotein (GELATO et al., 1989).

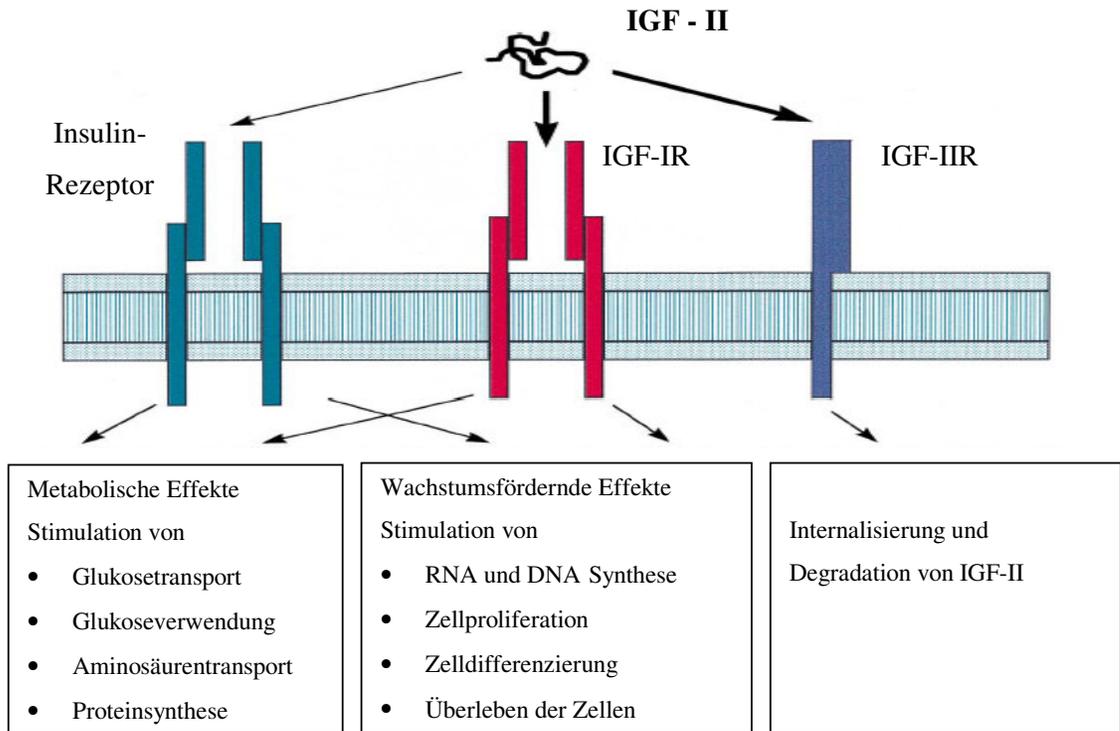
Weniger klar ist, ob der Rezeptor auch metabolische und wachstumsfördernde Effekte von IGF-II vermittelt. Der Rezeptor ist an GTP-Bindungsproteine gekoppelt, die durch Bindung von IGF-II an den Rezeptor aktiviert werden. Die Blockierung des IGF-IIR hat aber keinen Einfluss auf den biologischen Effekt von IGF-II in Hepatozyten und L6 Myoblasten. Im Gegensatz dazu führt die Blockierung des IGF-IR zur Inhibierung der zellulären Funktion des IGF-II. Dies zeigt, dass biologische Effekte von IGF-II, wie die Stimulation der Proliferation, Differenzierung und Hemmung der Apoptose, hauptsächlich über den IGF-IR vermittelt werden (JONES und CLEMMONS, 1995) (siehe Kapitel 2.2.6.1).

### 2.2.7 Physiologische Aktivität der IGFs

1985 beschreiben BELL et al., dass Insulin und die IGFs kurzfristige metabolische Veränderungen hervorrufen und längerfristig eine wachstumsfördernde Wirkung haben. Insulin ist effektiver darin, kurzzeitige metabolische Effekte zu bewirken, wohingegen IGFs besser das Wachstum fördern.

Die IGFs sind wichtige Mitogene, die das Zellwachstum und den Zellmetabolismus beeinflussen. Zusätzlich zu den endokrinen Effekten zirkulierender IGFs, haben lokal produzierte IGFs parakrine und autokrine Effekte auf die Zellproliferation. Der mitogene Effekt wird vor allem durch Interaktionen mit dem IGF-IR ausgeübt (ALLAN et al., 2001) (siehe Abbildung 2 und 3).

Der IGF-IR kommt in der Zellmembran vieler Zellarten vor und vermittelt nicht nur die Effekte von IGF-I und II, sondern auch von Insulin, wenn dieses in hohen Konzentrationen vorliegt (JONES und CLEMMONS, 1995) (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 3. Interaktion von IGF-II mit Rezeptoren**

Der Insulin- und der IGF-I-Rezeptor weisen eine starke Ähnlichkeit auf. Beide sind Heterotetramere, die aus zwei extrazellulären  $\alpha$ -Untereinheiten und zwei transmembranösen  $\beta$ -Untereinheiten bestehen. Der primäre Effekt, der durch die Aktivierung des IGF-IR hervorgerufen wird, ist die Wachstumsförderung. Daneben werden in geringerem Maße auch metabolische Effekte vermittelt. Durch eine Aktivierung des Insulin-Rezeptors werden hauptsächlich metabolische Effekte vermittelt. Der IGF-IIR besteht aus einem Einzelstrang und bindet v. a. IGF-II. Durch Bindung an den IGF-IIR wird IGF-II internalisiert und degradiert (modifiziert nach O'DELL und DAY, 1998).

#### 2.2.7.1 Knockout des IGF-Gens

Erste direkte Beweise für die physiologische Rolle von IGF-II im embryonalen Wachstum wurden durch die Inaktivierung des IGF-II-Gens im Tiermodell erbracht. Knockouts weisen im Vergleich zum Wildtyp ein um 60 % vermindertes Körpergewicht auf. Die wachstumsdefizienten Tiere sind ansonsten normal entwickelt und fertil (DECHIARA et al., 1990).

Tiere mit Fehlen beider IGFs oder Tiere mit defizientem IGF-IR und IGF-IIR zeigen einen starken Zwergwuchs. Ihre Körpergröße beträgt 30 % der Wildtyp-Körpergröße. Die Tiere sterben bei der Geburt an Lungendefekten (STEWART und ROTWEIN, 1996a).

### 2.2.7.2 Transgene Tiere

Transgene Mäuse, die IGF-II überexprimieren, weisen als Adulte eine erhöhte IGF-II Konzentration im Serum auf. Diese Erhöhung ist assoziiert mit signifikanten Veränderungen der Körperzusammensetzung. Adulte transgene Mäuse, deren IGF-II Konzentration im Serum (42 - 60 nM) erhöht ist, sind kleiner als Tiere der Kontrollgruppe. Im Gegensatz zu ihrem Körperwachstum ist ihr Organwachstum erhöht. Die auffallendste Veränderung ihrer Körperzusammensetzung ist eine starke Reduktion des Körperfetts, welche 54 % bis 74 % der gesamten Reduktion des Körpergewichts ausmacht. Der Mechanismus, durch welchen das Körperfett reduziert wird, ist noch nicht erforscht. Durch die erhöhten IGF-II Konzentrationen im Serum entwickelt sich eine Hypoglykämie. Diese metabolen Effekte von IGF-II werden durch die Reaktionen des IGF-II mit dem IGF-IR und dem IR vermittelt (ROGLER et al., 1994; WOLF et al., 1994).

### 2.2.7.3 Zelluläre Funktion der IGFs

#### Proliferation

Viele Zellarten zeigen eine mitogene Reaktion durch eine Stimulation mit IGF. Zu diesen Zellen gehören u. a. Fibroblasten, Keratinozyten, Osteoblasten, Follikelzellen der Schilddrüse, glatte Muskelzellen, Skelettmuskelzellen, neuronale Zellen, mesangiale Zellen, erythrozytäre Progenitorzellen, Thymusepithelzellen, Oozyten, Granulosazellen und verschiedene Krebszelllinien. Im Serum-freien Medium stimuliert IGF-II die DNA-Synthese in Spermogonien der Ratte. Humane erythrozytäre Progenitorzellen und T-Lymphozyten werden durch eine Stimulierung des IGF-IR zur Proliferation angeregt (JONES und CLEMMONS, 1995).

Die Aktivierung des IGF-IR durch seine Liganden IGF-I, IGF-II und Insulin ist entscheidend bei der Kontrolle der zellulären Proliferation vieler Zellarten (SELL et al., 1994).

Durch Bindung seiner Liganden wird der IGF-IR aktiviert. Es folgt eine Konformationsänderung, aus der eine Autophosphorylierung resultiert. Anschließend werden Tyrosine verschiedener zellulärer Substrate phosphoryliert und aktiviert. Zwei primäre Substrate sind das IRS-1 und Shc. Sie aktivieren den MAPK-Signalweg (siehe Kapitel 2.2.6.1). Die Aktivierung dieses Signalwegs führt zur erhöhten Expression der m-RNA des Transkriptionsfaktors c-fos und des Cyclin-D-Proteins. Die Akkumulation von Cyclin-D ist

somit abhängig von Wachstumsfaktoren. Diese Akkumulation ist eine Voraussetzung dafür, dass die Zellen den Restriktionspunkt in der G1-Phase des Zellzykluses passieren und in die S-Phase eintreten können (COOLICAN et al., 1997) (siehe auch Kapitel 2.1.4.3.2).

Die Stimulierung humaner embryonaler Stammzell-Kardiomyozyten zur Proliferation in vitro ist unabhängig von typischen exogenen Signalen, wie dem Serum, den Adhäsionsfaktoren oder der Zelldichte. Die Induktion der Proliferation dieser Zellen erfolgt durch IGF-I und IGF-II und ist von der Konzentration des IGFs abhängig. Die Anzahl proliferierender Zellen sinkt mit zunehmender Differenzierung der Zellen (MCDEVITT et al., 2005).

### Zelldifferenzierung

Lange Zeit ging man davon aus, dass mitogene Substanzen die Myogenese (Differenzierung von Myoblasten zu Muskelzellen) blockieren, da sie Myoblasten in der G1-Phase des Zellzykluses forcieren in die S-Phase einzutreten. Dadurch würde eine Fusion zur Bildung von postmitotischen Myotuben verhindert, da diese in der G1 Phase des Zellzykluses stattfindet (COOLICAN et al., 1997).

Heute steht fest, dass nicht alle mitogenen Substanzen die myogene Differenzierung inhibieren. Insulin stimuliert in supraphysiologischen Konzentrationen die Differenzierung von Myoblasten. IGF stimuliert die terminale Differenzierung stärker als Insulin, welches in Bezug auf die Differenzierung wie ein IGF-Analogon wirkt. Die IGF-Familie stimuliert, anders als andere mitogene Wachstumsfaktoren, sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung von Myoblasten in Zellkultur. Beide Effekte werden über den IGF-IR vermittelt (FLORINI et al., 1996).

Die Proliferation ist die initiale Antwort von Myoblasten auf die Aktivierung des IGF-IR durch seine Liganden und wird über den MAPK-Signalweg vermittelt. Die Differenzierung von Myoblasten erfolgt in einer zweiten Phase, nachdem der MAPK-Signalweg unterbrochen ist. Welche externen Stimuli in vivo zu dieser Unterbrechung führen, ist nicht erforscht. In dieser zweiten Phase wird der PI3-K/p70<sup>s6K</sup>-Signalweg aktiviert, wodurch die Translation von p21-Cyclin-abhängigen-Kinase-Inhibitoren und Myogenin erhöht wird. Diese Faktoren sind an der Differenzierung von Myoblasten beteiligt. Myogenin gehört zur MyoD Familie und ist direkt mit der terminalen myogenen Differenzierung assoziiert. In Zusammenhang mit der Differenzierung ist die Kreatinkinaseaktivität erhöht und kann biochemisch nachgewiesen werden. Morphologische Veränderungen, wie die Fusion von Myoblasten zu Myotuben, können mikroskopisch beurteilt werden (COOLICAN et al., 1997).

Unter bestimmten Bedingungen sezernieren Myoblasten IGF-II. Dadurch übt IGF-II eine autokrine Funktion aus und induziert die Differenzierung der Zellen. Dabei korreliert die Rate der spontanen Differenzierung mit der Konzentration von autokrin sezerniertem IGF-II. Eine Inhibierung der ersten 5 Codons des IGF-II verhindert die Differenzierung von Myoblasten. Ein deutlicher Hinweis darauf, dass autokrin sezerniertes IGF-II eine tragende Funktion bei der Differenzierung erfüllt (FLORINI et al., 1991).

Die Differenzierung neuraler Stammzellen ist ebenfalls von IGF abhängig. IGF stimuliert den PI3-Kinase-Akt-Signalweg und führt zu einer erhöhten Phosphorylierung von Akt in proliferierenden und differenzierenden Stammzellen des Bulbus olfaktorii. Die Differenzierung dieser Stammzellen wird durch eine Hemmung des PI3-Kinase-Signalwegs herabgesetzt (OTAEGI et al., 2006).

IGF-II fördert weiterhin die Differenzierung von Osteoklasten, Chondrozyten, neuronalen Zellen, Adipozyten und Osteoblasten (JONES und CLEMMONS, 1995).

### Apoptose

Eine weitere zelluläre Funktion von IGF-I und IGF-II ist es, den Zelltod zu hemmen (siehe Abbildung 2 und 3). Diese Funktion übt IGF u. a. auf hämatopoetische Zellen, Myoblasten, Neuronen, Oligodendrozyten, hämatopoetische Zellen, Fibroblasten sowie auf eine Vielzahl von Tumorzelllinien aus (JONES und CLEMMONS, 1995; STEWART und ROTWEIN, 1996a).

## SCHRIFTTUM

**Tabelle 1. Zelluläre Wirkung von IGF in vitro**

\* Zellen sind mit IGF transduziert; LV: Leervektor; neonat.: neonatal; r: Ratten; h: humane; k: Kaninchen; KM: Kardiomyozyten; hESC-KM: humane embryonale Stammzellkardiomyozyten; HUVECs: human umbilical vein endothelial cell; UMVECS: human uterin microvascular endothelial cells; Myobl.: Myoblasten; C2AS12: C2-Myoblasten transfiziert mit IGF-II-Antisense (IGF-II Expression dauerhaft unterdrückt); Sol8- und C2-Myobl.: Myoblasten mit hoher autokriner IGF-II Produktion; L6-Myobl.: Myoblasten mit niedriger autokriner IGF-II Produktion, + positiver Einfluss, (+) geringer positiver Einfluss, 0 kein Einfluss

[1] (SU et al., 2003), [2] (MCDEVITT et al., 2005), [3] (FULLER et al., 1992), [4] (HUANG et al., 2002), [5] (EWTON et al., 1994), [6] (DECKER et al., 1995), [7] (LAWLOR und ROTWEIN, 2000), [8] (COOLICAN et al., 1997), [9] (FLORINI et al., 1991), [10] (STEWART und ROTWEIN, 1996b), [11] (HERR et al., 2003), [12] (LEE et al., 2000; SU et al., 2003)

Zellart	IGF-Supplementierung	Angiogenese	Proliferation Prot.synth. (S)	Differenzierung	Apoptosehemmung	Migration	Hyperthrophie	Autor
neonat. rKM/ hKM (fetal)	IGF-I IGFII -IGF-I* -IGF-II* -LV*				+ + + + 0			[1]
hESC-KM	IGF-I IGF-II		+ +					[2]
rKM	IGF-I IGF-II		(S)+ (S)+					[3]
rKM	IGF-II						+	[4]
L6 Myobl.	IGF-I IGF-II		+ (+)	(+) +				[5]
kMyozyten	IGF-I IGF-II		(S)+ (S)(+)				+ (+)	[6]
C2AS12 C2AS12 C2-Myobl.	- +IGF-I -				0 + (+)			[7]
L6-Myobl.	IGF-I		+					[8]
Sol8Myobl C2 Myobl. L6 Myobl. C2AS12 C2AS12	- - - - + IGF-II			+ + (+) 0 +				[9]
C2AS12	IGF-I IGF-II		+ +	+ +	+ +			[10]
UMVECS	IGF-II IGF-I	+	(+) +			+ +		[11]
HUVECs	IGF-II	+				+		[1, 12]

### Zellmetabolismus

Neben Langzeiteffekten auf die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung verschiedener Zellarten, die den Effekten von Wachstumsfaktoren ähneln, übt IGF auch metabolische Effekte aus. Der PI3-Kinase Signalweg, der durch Bindung von IGF-I, IGF-II und Insulin an den IGF-IR oder den IR aktiviert wird, ist essentiell für die Transduktion metabolischer Effekte. Zu diesen zählen die Stimulation des Glukosetransports sowie die Protein- und Glykogensynthese (REN et al., 1999).

Eine intravenöse Applikation von rekombinantem IGF-II induziert in adulten Ratten eine Hypoglykämie, die mit einer erhöhten 2-Desoxyglukoseaufnahme des Gewebes und einer erhöhten Glykogenbildung im Skelettmuskel einhergeht. Diese akuten metabolischen Effekte des IGF-II können über den Insulinrezeptor oder den IGF-IR vermittelt werden (siehe Abbildung 3). In vitro Studien mit Rattenhepatozyten, die keinen IGF-IR aufweisen, bestätigen die Aktivität des IGF-II im Glukosemetabolismus über den IR (ROGLER et al., 1994).

Die Mitglieder der IGF-Familie stimulieren auch anabole Prozesse in Skelettmuskelzellen. Der anabole Effekt entsteht durch die Erhöhung der Proteinsynthese und die Verminderung der Proteinolyse durch Bindung von IGF an seine Rezeptoren (FLORINI et al., 1996).

#### 2.2.7.4 Tumorgenese

Sowohl IGF-I als auch IGF-II wird eine kanzerogene Wirkung zugeschrieben. Das IGF-System (IGF-I, IGF-II, IGF-IR, IGF-IIR, IGFBPs) spielt eine wichtige Rolle bei der normalen Zellproliferation und der malignen Transformation. Während des Übergangs vom benignen zum malignen Stadium werden häufig qualitative und quantitative Komponentenveränderungen des IGF-Systems gefunden. In humanen Pankreastumoren ist z. B. die Anzahl der IGF-IR in der Zellmembran erhöht. Eine Dysregulation der IGFBPs tritt u. a. bei Neuroblastomen, Nephroblastomen und akuter lymphoblastischer Leukämie auf. Pädiatrische Tumoren und Syndrome (z. B. das Beckwith-Wiedemann Syndrom), die mit solchen Tumoren assoziiert sind, zeigen eine erhöhte Expression des IGF-II-Gens. Transgene Mäuse, die IGF-II überexprimieren, weisen ein erhöhtes Tumorrisiko auf. Auch in der Tumorgenese des Rhabdomyosarkoms und des hepatozellulären Sarkoms soll IGF-II eine wichtige Rolle spielen. Erhöhte Serumkonzentrationen von IGFBP-1 treten bei Patienten mit

primären Leber- und Ovarialtumoren auf. Ein Anstieg der IGF-BP-2-Konzentration kommt bei histologisch unterschiedlichen Tumoren vor, wie z. B. Lungentumoren, Wilms' Tumoren, Prostatakrebs, Kolorektaltumoren, Ovarialtumoren und Gehirntumoren. Erhöhte IGF-I- und erniedrigte IGF-BP-3-Konzentrationen wurden bei Patienten mit Lungenkrebs gefunden (SCHIRMACHER et al., 1992; ZUMKELLER, 2001).

Schon eine geringe Erhöhung der IGF-I-Konzentration im Serum birgt ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Prostata-, Brust- und Kolontumoren. Die IGFs werden allgegenwärtig exprimiert und fungieren als endokrine, parakrine und autokrine Wachstumsfaktoren. IGF aktiviert den IGF-IR, welcher häufig in Krebszellen überexprimiert wird. Der aktivierte IGF-IR initiiert eine Reihe intrazellulärer Signalkaskaden, durch die der Verlauf des Zellzyklus verstärkt wird und die Apoptose verringert wird. Diese Effekte resultieren in einer Akkumulation von Tumorzellen und fördern somit die Entwicklung und das Wachstum von Tumoren (WU et al., 2002).

### 2.2.8 Bedeutung von IGF-II im Myokardinfarkt

#### 2.2.8.1 Zellulärer Effekt von IGF-II im Myokardinfarkt

##### Einfluss auf die Gefäßbildung

Während der humanen Lungenentwicklung ist die Expression der IGFs und des IGF-IRs sowohl im Epithel der Atemwege als auch im Gefäßendothel stark erhöht. Der Einsatz neutralisierender Antikörper in Lungenexplantaten zur Untersuchung der Funktion des IGF-Systems auf die Vaskulogenese, resultiert in einer signifikant herabgesetzten Anzahl von CD34+ endothelialen Zellen. In vitro steigert IGF-II die Migration von endothelialen Zellen aus humanem Nabelschnurblut (HUVECs) und fördert die Bildung eines kapillar-ähnlichen Netzwerkes. Durch IGF-II werden Kinasen (z. B. p38MAPK) in den HUVECs phosphoryliert und aktiviert. Durch IGF werden verschiedene Signalwege aktiviert, durch die die Proliferation und Differenzierung von endothelialen Zellen stimuliert und die Apoptose gehemmt wird. Somit können die IGFs die Gefäßbildung durch Aktivierung und morphologische Differenzierung von endothelialen Zellen induzieren. IGF-I und -II sind auch in einem murinen Retinamodell als potente angiogenetische Faktoren bekannt (HAN et al., 2003; SU et al., 2003).

IGF-II bewirkt die Expression des Hypoxie-induzierten Faktors 1 $\alpha$ . Dieser aktiviert die Transkription von VEGF, wodurch die Adaptation an eine Hypoxie durch eine gesteigerte Angiogenese gefördert werden könnte (FELDSER et al., 1999).

### Einfluss auf Kardiomyozyten

1989 wurde die Expression der IGF-Gene und ihrer korrespondierenden Membranrezeptoren in ventrikulären Kardiomyozyten von normotensiven und spontan hypertensiven Rattenjungtieren (SHR) untersucht. Zellmembranen neonataler Kardiomyozyten weisen IGF-I- und IGF-II-Rezeptoren auf. In den Zellen werden IGF-II m-RNA Transkripte exprimiert. Die Expression von IGF-II ist auf die Kardiomyozyten beschränkt und ist bei spontan hypertensiven Ratten erhöht. Daraus kann geschlossen werden, dass das lokal produzierte IGF in einer autokrinen oder parakrinen Weise agiert und das Wachstum und die Reifung der Kardiomyozyten in der Herzentwicklung der Ratte moduliert (ENGELMANN et al., 1989).

In vitro führt eine Behandlung mit IGF-II zu einer Erhöhung des totalen Protein- sowie des kontraktiven Proteingehalts in adulten Kaninchen Kardiomyozyten (DECKER et al., 1995).

An kultivierten neonatalen myokardialen Zellen wird die Wirkung von IGF auf die Kontraktilität untersucht. In einer Konzentration von 25 bzw. 50 ng/ml steigert IGF-II die Kontraktilität von neonatalen myokardialen Zellen um 13 bzw. 18 % (VETTER et al., 1988). Das Myokard passt sich mechanischen und physiologischen Stimuli durch die Hypertrophie seiner Kardiomyozyten an. Adulte ventrikuläre Kardiomyozyten, die in Serum-freien Medium kultiviert sind, zeigen durch eine Zugabe von IGF-II ein schnelles und direkt induziertes hypertrophes Wachstum. Dies geht mit einer Steigerung ihrer Größe, der totalen Proteinsynthese und der Transkription muskelspezifischer Gene einher (HUANG et al., 2002).

### 2.2.8.2 Wirkung von IGF-II im Myokardinfarktmodell

In einem Ischämiemodell am Schwein (Okklusion der LAD) wird gezeigt, dass IGF-I, IGF-II, IGF-IR und IGFBP im Myokard exprimiert werden. Der operative Eingriff (Thorakotomie und Okklusion mit anschließender Reperfusion) führt zu einer frühen und signifikant erhöhten Expression der IGF-II m-RNA. Auch Kontroll-Tiere (Thorakotomie ohne Okklusion) zeigen eine frühe, aber nicht signifikante Erhöhung der IGF-II m-RNA. Dies lässt die Annahme zu, dass das IGF-II-Gen durch Stress (Anästhesie, chirurgischer Eingriff) aktiviert wird und durch eine Ischämie/Reperfusion weiter erhöht bleibt (KLUGE et al., 1995).

Durch wiederholte, kurze myokardiale Ischämien wird ebenfalls die Expression der IGF-II m-RNA und des IGF-II-Proteins erhöht. Eine intramyokardiale Infusion von humanem rekombinantem IGF-II vor der Okklusion der LAD kann die Größe des myokardialen Infarkts signifikant senken. Folglich ist IGF-II kardioprotektiv und ahmt eine ischämische Präkonditionierung nach. Dieser Effekt des IGF-II basiert vermutlich auf der Aktivierung des Insulin-Rezeptors oder des IGF-IRs (VOGT et al., 1997).

Anhand eines Mikroembolisationsmodells am Schwein wird der Effekt von exogenem IGF-II auf die regionale myokardiale Funktion im Bereich eines Infarkts untersucht. Exogenes IGF-II wird über Beads, die auf das Infarktareal aufgelegt werden, an den Infarktbereich abgegeben. Es zeigt sich, dass die kardiale Funktion durch IGF-II verbessert wird. Die Ursache könnte die Induktion einer Hypertrophie der Myozyten und eine signifikante Erhöhung von CD34+ Progenitorzellen im Periinfarktbereich sein (BATTLER et al., 1995).

Auch KOTLYAR et al. (2001) zeigen in einem experimentellem Mikroembolisationsmodell am Schwein, dass eine Verabreichung von exogenem IGF-I oder IGF-II im Bereich des akuten Myokardinfarkts (auflegen von Beads mit IGF-I bzw. IGF-II auf das Myokard), die regionale myokardiale Funktion verbessert. Zusätzlich wird eine reduzierte Serumkonzentration von Herz-spezifischem, kontraktilen Troponin I – ein hoch sensitiver Marker für Myokardzellverletzungen – in der frühen Phase nach dem Infarkt gemessen. Eine Erhöhung von Aktin und Desmin – muskelspezifische Marker – kann 4 Wochen nach dem Infarkt in und um die Infarktzone festgestellt werden. Die DNA-Fragmentation – ein Charakteristikum der Apoptose – ist im Areal des Infarkts signifikant herabgesetzt. Die zelluläre Protektion, gekoppelt mit der Synthese von kontraktilen Proteinen, könnte die verbesserte linksventrikuläre Funktion erklären. In der Infarkt- und Randzone ist die Gefäßdicke erhöht, was ebenfalls zu der verbesserten Funktion beitragen könnte.

Kardiomyozyten können mit adenoviralen Vektoren, die IGF-I oder IGF-II exprimieren, effektiv transduziert werden. Die Transduktion von Kardiomyozyten mit IGF resultiert in einer dosis- und zeitabhängigen Expression von IGF-Proteinen, wodurch gleichzeitig die Apoptose gehemmt wird. In vitro zeigt sich ein langsamer, aber anhaltender Anstieg der IGF-Konzentration. Durch diesen Anstieg der IGF-Konzentration wird ein nahezu kompletter Schutz vor Ischämie-/Reoxidationsstress erreicht. Die subkutane Applikation von Matrigel-Plaques zusammen mit Zellen, die IGF-I oder IGF-II überexprimieren, in Nacktmäuse stimuliert die Neovaskularisation. IGF-I bewirkt eine ausgeprägtere Gefäßbildung als IGF-II. Obwohl die kontinuierliche Expression von IGF ideal für eine kardioprotektive Wirkung sein könnte, ist ein anhaltendes proangiogenetisches Signal

## SCHRIFTTUM

eventuell schädlich, weshalb das weniger proangiogenetische IGF-II die bessere Wahl bei einem anhaltenden Expressionsvektor sein könnte (SU et al., 2003).

Die systemische Gabe von IGF ist nicht unproblematisch, da zirkulierendes IGF auch im Tumorwachstum eine Rolle spielen kann. Die wiederholte intravenöse Gabe kann mit Nebeneffekten, wie einer Hypoglykämie und Veränderungen des Lipidstoffwechsels, verbunden sein. Die systemische Applikation von IGF wird weiterhin durch die Anwesenheit vieler IGF-BP im Serum verkompliziert. Die lokale Überexpression von IGF im Herzen scheint somit einen beträchtlichen Vorteil vor der systemischen Zufuhr von IGF-Proteinen zu haben (REN et al., 1999; SU et al., 2003).

**Tabelle 2. Wirkung von IGF im Myokardinfarktmodell**

Die Applikation von IGF erfolgte in allen angegebenen Studien intramyokardial.

I/R: Infarkt/Reperfusion; MI: Myokardinfarkt durch permanente Okklusion der LAD; Schw: Schwein; + positiver Einfluss; (+) geringer positiver Effekt; 0 kein Einfluss; muskul.: muskulärer; Ventrik.: ventrikuläre; sonst.: Sonstiges; \* Anzahl der überlebenden transplantierten Zellen; H: Hypertrophie der Kardiomyozyten; HGF+IGF-I: hepatocyte growth factor mit IGF-I Zugabe; BMC-IGF-I: Bone marrow cells transfiziert mit IGF-I; mESC+IGF-I: embryonale Mausstammzellen mit IGF-I-Zugabe; [1] (VOGT et al., 1997), [2] (BATTLER et al., 1995), [3] (KOTLYAR et al., 2001), [4] (LINKE et al., 2005), [5] (URBANEK et al., 2005), [6] (KOFIDIS et al., 2004), [7] (YAU et al., 2005)

Modell	Tierart	Applikation von IGF	Angiogenese	Proliferation	Anzahl muskul. Zellen	Apoptosehemmung	Infarktgröße	Ventrik. Funktion	sonst.	Autor
I/R	Schw	IGF-II					+			[1]
MI	Schw	IGF-II	+					+	H	[2]
MI	Schw	IGF-I IGF-II	+		+	+		+		[3]
MI	Hund	HGF+IGF-I	+	+	+	+	0	+		[4]
MI	Maus	HGF+IGF-I	+	+	+	+	0	+		[5]
MI	Maus	mESC+IGF-I	+		+			+		[6]
MI	Ratte	BMC-IGF-I			+	+		+	*+	[7]

### 2.3 Endotheliale Progenitorzellen (EPC)

Fortschreitende ventrikuläre Umbauprozesse nach einem Myokardinfarkt bewirken eine progressive Expansion des Infarktareals und eine Dilatation des linken Ventrikels und können zu einer Herzinsuffizienz führen. Die Steigerung der Kardiomyozytenregeneration sowie die Stimulation der Neovaskulogenese innerhalb des Infarktgebietes könnten die negativen Einflüsse des Remodelings beschränken. Progenitorzellen aus dem Knochenmark oder dem Blut könnten die Neovaskularisation des ischämischen Myokards steigern und zur Regeneration des Myokards nach MI beitragen (ASSMUS et al., 2002).

OTT et al. (2005) zeigen, dass endotheliale Vorläuferzellen unter Zellkulturbedingungen bis zu einer Anzahl von  $10^{15}$  Zellen expandiert werden können. Nach intramyokardialer Transplantation dieser Zellen in einem Ischämie/Reperusionsmodell proliferieren die transplantierten Zellen, bilden vaskuläre Strukturen und verbessern die linksventrikuläre Funktion.

Die Stimulation der Neovaskularisation wirkt sich durch einen gesteigerten myokardialen Blutfluss positiv auf das späte myokardiale Remodeling aus und könnte dadurch die Verbesserung der linksventrikulären Funktion bewirken (ASSMUS et al., 2002).

Derzeitig wird eine kontroverse Diskussion darüber geführt, ob eine Steigerung der linksventrikulären Funktion nach Transplantation von Knochenmarkszellen bzw. endothelialer Progenitorzellen aus peripherem Blut auch aus einer Transdifferenzierung dieser Zellen zu Kardiomyozyten resultieren könnte (ORLIC et al., 2001; MURRY et al., 2004; EISENBERG et al., 2006; GRUH et al., 2006).

#### 2.3.1 Der Hämangioblast

Endotheliale Progenitorzellen (EPC) und hämatopoetische Stammzellen (HSC) stammen von einem gemeinsamen Vorläufer, dem Hämangioblasten, ab (MUROHARA, 2001).

Erste Studien der Embryonalentwicklung ordnen den Hämangioblasten als eine gemeinsame Vorläuferzelle von Blutzellen und Zellen der Gefäßwand ein. Spätere Untersuchungen demonstrieren, dass verschiedene Gene, die während der frühen hämatopoetischen Entwicklung aktiviert sind, auch im vaskulären Endothel exprimiert werden. Gezielte Genstudien embryonaler Stammzellen haben Flk-1, SCL und Runx-1 als wichtige regulatorische Moleküle identifiziert, durch deren Regulation sowohl hämatopoetische als

auch vaskuläre Zellen entstehen. Hämangioblasten exprimieren Antigene, wie CD34 und CD133, die auch hämatopoetischen und endothelialen Zellen gemeinsam sind. Somit sind Hämangioblasten durch ihr hämatopoetisches und endotheliales Potential charakterisiert (BAILEY und FLEMING, 2003; MULLER et al., 2005).

### 2.3.2 Charakteristika endothelialer Progenitorzellen

Derzeit existiert noch keine einheitliche Definition einer endothelialen Progenitorzelle (EGGERMANN et al., 2003).

Sie wird primär anhand der Expression von Oberflächenantigenen identifiziert. EPC und ausgereifte endotheliale Zellen (EC) werden über die Expression von endothelialen Markern, wie VEGF-Rezeptor-2 (VEGF-2, KDR), vascular endothelial-cadherin (VE-cadherin), von Willebrand Faktor (vWF), CD31, CD34 und CD146 definiert. Da eindeutige Marker für EPC fehlen, werden diese durch ihre Fähigkeit acetyliertes LDL aufzunehmen und an Ulex europeus Agglutinin (UEA-1) zu binden charakterisiert. Diese Marker beschreiben EPC allerdings nicht eindeutig. So handelt es sich bei der Mehrheit von Zellen, die acetyliertes LDL aufnehmen und die Fähigkeit haben UEA-1 zu binden, um Zellen myelozytärer Herkunft. Zudem können auch CD14+ Monozyten in Kultur einen EC-ähnlichen Phänotyp hervorbringen. Es gibt Marker, die eine Differenzierung zwischen EPC und ausgereiften EC ermöglichen könnten. AC133 ist einer dieser spezifischen Marker für endotheliale Progenitorzellen. Ein weiteres Kennzeichen von Stamm- und Progenitorzellen ist ihre Fähigkeit zu proliferieren und sich zu funktionsfähigen Nachkommen zu differenzieren (INGRAM et al., 2005; OTT et al., 2005).

INGRAM et al. (2004) schlagen eine andere Einteilung vor, in der EPC, gewonnen aus peripherem Blut und aus Nabelschnurblut, analog zur Einteilung des hämatopoetischen Systems, nach ihrem Potential zur klonalen Expansion und zur Proliferation unterschieden werden.

### 2.3.3 Wirkung endothelialer Progenitorzellen auf die Gefäßbildung

Neue Gefäße entstehen hauptsächlich durch Vaskulogenese oder Angiogenese. Die Vaskulogenese bezieht sich auf die Vor-Ort-Formation von Blutgefäßen durch EPC oder Angioblasten. Sie beginnt mit der Formation von Zellanhäufungen oder Blutinseln. Die EPC befinden sich in der Peripherie der Blutinseln; die hämatopoetischen Stammzellen (HSC) in deren Zentrum. EPC differenzieren zu vaskulären Endothelzellen (EC) und HSC zu reifen Blutzellen. Das Wachstum und die Fusion von Blutinseln führen letztendlich zur kapillären Netzwerkstruktur im Embryo. Im Gegensatz dazu ist die Angiogenese ein Prozess, der durch eine Sprossung neuer Kapillaren aus prä-existierenden, ausgereiften EC entsteht. Der grundlegende Mechanismus der Angiogenese ist die proliferatorische und migratorische Aktivität der EC. Lange Zeit ging man davon aus, dass die Vaskulogenese auf den Embryo begrenzt ist und die neovaskuläre Formation in adulten Individuen alleine eine Konsequenz der Angiogenese sei. Widersprüchlich zu dieser Begrenzung ist die Entdeckung, dass im peripheren Blut von adulten Individuen EPC vorhanden sind, die vermutlich von CD34+ mononukleären Blutzellen stammen. In vitro differenzieren diese Zellen zu ausgereiften EC. Im Gewebeischämiemodell gliedern sich transplantierte EPC an Stellen aktiver Angiogenese ein. Dies lässt vermuten, dass natürlich zirkulierende EPC oder transplantierte EPC in die Neovaskularisation in adulten Individuen involviert sind (MUROHARA, 2001).

EPC werden durch ischämische Stimuli in adulten Tieren aus dem Knochenmark freigesetzt. Ex vivo können sie aus mononukleären Zellen, die aus dem Knochenmark oder dem Blut gewonnen werden, expandiert werden. Sie kommen auch in humanem Nabelschnurblut vor, so dass dieses eine Quelle für die Isolation von EPC darstellt (MUROHARA, 2001; MULLER et al., 2005).

### 2.3.4 Wirkung endothelialer Progenitorzellen im Myokardinfarkt

Durch einen akuten Myokardinfarkt (MI) werden Kardiomyozyten nekrotisch und fortschreitend durch Fibrose und die Bildung einer Narbe ersetzt. Dies führt zum Verlust der regionalen kontraktile Funktion (KIM, 2003).

Im Tiermodell führt eine Ischämie zur Mobilisation von EPC aus dem Knochenmark ins periphere Blut. Die EPC richten sich auf das ischämische Gebiet aus (Homing), in welchem sie in neue Gefäße inkorporieren und zu reifen EC differenzieren (ASAHARA et al., 1999).

Diese physiologische Antwort der EPC auf eine Ischämie ist die Grundlage zur Entwicklung neuer zellulärer Therapieansätze. Im Myokardinfarktmodell der Nacktratte wird deutlich, dass transplantierte humane, *ex vivo* amplifizierte EPC zu Endothelzellen differenzieren, zur Neovaskularisation beitragen und helfen, die linksventrikuläre Funktion zu bewahren (DAVANI et al., 2005).

EPC tragen zur Induktion der Vaskulogenese und Angiogenese bei, wodurch hypertrophierte Myozyten vor der Apoptose geschützt und somit die Kollagenablagerung und Narbenbildung reduziert werden. Dadurch kann die Reduktion der linksventrikulären Funktion nach experimentellem Myokardinfarkt vermindert werden (KOCHER et al., 2001).

### 2.3.5 Transdifferenzierung und Zellfusion

Gegenwärtig ist noch nicht eindeutig geklärt, ob transplantierte Zellen die Verbesserung der linksventrikulären Funktion durch eine Steigerung der Gefäßbildung oder durch eine Transdifferenzierung zu Kardiomyozyten bewirken (GRUH et al., 2006).

Die Bezeichnung Transdifferenzierung beschreibt ursprünglich die Fähigkeit scheinbar voll ausdifferenzierter embryonaler Stammzellen eines Gewebes zu Zellen einer anderen Gewebeart zu differenzieren. Heute versteht man unter Transdifferenzierung, dass Stammzellen aus postnatalem somatischem Gewebe die Fähigkeit haben, nach einem Transfer in ein anderes Gewebe, Zellen mit Charakteristika des „neuen“ Gewebes zu bilden (SHERLEY, 2002).

Für eine Transdifferenzierung ist eine Reprogrammierung der Chromatinkonfiguration erforderlich. Diese wird hauptsächlich durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren gesteuert, wodurch es zur Formation spezifischer Abkömmlinge kommt (ANVERSA et al., 2004).

Eine *in vitro* Studie zeigt, dass in einer Kokultur von Knochenmarksstammzellen (Donorzelle) und Gewebe embryonaler Kükenherzen (Rezipientenzellen), die Donorzellen in das Herzgewebe inkorporieren und durch Transdifferenzierung den Myozytenphänotyp der Rezipientenzelle exprimieren (EISENBERG et al., 2006).

In anderen Publikationen wird die Zellfusion als ein alternativer Mechanismus zur Zellreprogrammierung durch eine Transdifferenzierung angeführt. Die Fusion bewirkt eine Generierung von Hybridzellen mit ursprünglichen Charakteristika der Donorzelle und gleich-

zeitiger Expression von Zellmarkern und Charakteristika des Rezipienten (TERADA et al., 2002; ALVAREZ-DOLADO et al., 2003).

Ergebnisse andere Studien widerlegen die Transdifferenzierung und die Zellfusion. So wird im Mausinfarktmodell gezeigt, dass nach der Transplantation von Knochenmarkzellen die Anzahl der transplantierten Zellen nur vorübergehend erhöht ist. Es werden keine Hinweise auf eine Transdifferenzierung oder eine Fusion gefunden (BALSAM et al., 2004; MURRY et al., 2004; NYGREN et al., 2004).

BADORFF et al. (2003) beschreiben, dass in einer Kokultur von humanen EPC und neonatalen Rattenkardiomyozyten, die EPC phänotypische Charakteristika von Kardiomyozyten – wie eine erhöhte Zelllänge und Fläche sowie die Expression und Organisation von Sarkomerproteinen ( $\alpha$ -sacomic Aktin) – widerspiegeln. Zusätzlich zeigen sie funktionelle Charakteristika von Kardiomyozyten; z. B. eine Exzitations-Kontraktions-Kopplung. Die funktionelle Integration ins Herzgewebe beinhaltet die elektrische Kopplung mit benachbarten Kardiomyozyten. Transferexperimente sollen Hinweise auf interzelluläre Verbindungen durch gap junctions geben. Eine Zell-zu-Zellverbindung ist essentiell für die Transdifferenzierung. Eine Zellfusion ist in dieser Studie nicht die Ursache für phänotypische Änderungen, da auch die Kokultivierung mit Paraformaldehyd fixierten, toten Kardiomyozyten zur Änderungen des Phänotyps führt.

Zu ähnlichen Ergebnissen kommen YEH et al. (2003) in einem in vivo Modell, in welchem, nach induziertem M, applizierte humane CD34+ Zellen zu vaskulären Endothelzellen, zu glatten Muskelzellen sowie zu Kardiomyozyten transdifferenzieren. Die von den transplantierten EPC abgeleiteten Zellen weisen die Morphologie ausgereifter Kardiomyozyten auf.

Andere Studien belegen, dass die Kokultur von humanen EPC und neonatalen Rattenkardiomyozyten zu keiner Transdifferenzierung der Donorzelle zu funktionell aktiven Kardiomyozyten führt. Gegen eine Transdifferenzierung spricht, dass Veränderungen der Zellmorphologie und -größe sowohl in Kokultur als auch in Monokultur der EPC festgestellt werden können. Zudem ist die Zellgröße der Rattenkardiomyozyten signifikant größer als die der kokultivierten EPC. Durch eine Fluoreszenzmarkierung kann eine Erhöhung doppelpositiver Zellen ( $\alpha$ -Aktin-gelabelte Kardiomyozyten; Dil-gelabelte huEPC) gefunden werden. Eine Gegenanalyse mit monokultivierten Rattenkardiomyozyten ergibt aber ebenfalls eine erhöhte Anzahl doppelpositiver Kardiomyozyten. Ursache dafür sind  $\alpha$ -Aktin positive Kardiomyozyten, die eine rote Dil-Autofluoreszenz aufweisen. Zusätzlich wird vermutet, dass die doppelpositiven Zellen aus der Kokultur zum einen durch

Fusion von Rattenkardiomyozyten mit gelabelten humanen EPC Fragmenten entstanden sein könnten, oder es sich zum anderen um Kardiomyozyten handelt, die über oder in der Nähe von gelabelten EPC liegen. Zur weiteren Abklärung einer Transdifferenzierung wird die Expression humaner kardialer Gene (Kkx2.5, GATA-4, FOG-2, Troponin I) mittels RT-PCR untersucht. Keiner dieser Transkriptionsfaktoren, die spezifisch in Entwicklungsstadien humaner Kardiomyozyten exprimiert werden, können detektiert werden. Somit ergibt sich in dieser Untersuchung kein Hinweis auf eine Transdifferenzierung von EPC zu Kardiomyozyten. Zusätzlich wird demonstriert, dass konventionelle Dual-labelling-FACS-Analysen auch in Kombination mit einer 2D-Immunfluoreszenz und der 3D-Konfokalmikroskopie nicht ausreichen, um eine Transdifferenzierung zu bestätigen. Etwaige Ergebnisse müssten mit Vorsicht interpretiert werden (GRUH et al., 2006).

KOYANAGI et al. (2005) stellen die Hypothese auf, dass EPC in Kokultur mit neonatalen Rattenkardiomyozyten vorübergehende ultrafeine zelluläre Verbindungen aufbauen. Diese Art der vorübergehenden Zellfusion, welche zum Austausch von makromolekularen Komplexen führt, könnte zur Übernahme des kardiomyozytären Phänotyps der EPC während der Kokultur beitragen, ohne dass eine permanente zelluläre oder nukleäre Fusion auftritt.

## SCHRIFTTUM

**Tabelle 3. Transdifferenzierung/Fusion von aus dem Knochenmark stammender Zellen**

m: Maus; r: Ratte; h: humane; KMZ: Knochenmarkzellen; PB: peripheral blood; KM: Kardiomyozyten; (E)GFP: (enhanced) green fluorescent protein; DiO/DiL: Fluorochrome; HLA: human leucocyt antigen; MI: experimenteller Myokardinfarkt; ♀ weiblich; ♂ männlich;

[1] (EISENBERG et al., 2006), [2] (GARBADE et al., 2005), [3] (ORLIC et al., 2001), [4] (ALVAREZ-DOLADO et al., 2003), [5] (TERADA et al., 2002), [6] (NYGREN et al., 2004), [7] (MURRY et al., 2004), [8] (BALSAM et al., 2004), [9] (BADORFF et al., 2003), [10] (YEH et al., 2003), [11] (ZHANG et al., 2004), [12] (GRUH et al., 2006), [12] (KOYANAGI et al., 2005)

Spenderzelle	Empfänger/Kokultur	Markierung der Spenderzelle	Schlussfolgerung	Autor
<b>mKMZ</b>	embryonale Hühnerherzen	β- galaktosidase reporter	Differenzierung, keine Fusion	[1]
<b>hKMZ</b>	neonatale rKM	DiO	Zellfusion und Transdifferenzierung	[2]
♂ <b>mKMZ</b>	MI- ♀Maus	EGFP Y-Chromosom	Generierung von KM	[3]
<b>mKMZ</b>	intraperitoneale Transplantation in Mäuse	GFP	Spontane Zellfusion	[4]
♀ <b>mKMZ</b>	embryonale ♂-mKM	GFP X-Chromosom	Spontane Fusion	[5]
<b>mKMZ</b>	MI-Maus	GFP	Generierung v. KM durch Fusion, keine Transdifferenzierung	[6]
<b>mKMZ</b>	MI-Maus	EGFP	keine Fusion, keine Transdifferenzierung, keine Generierung von KM	[7]
<b>mKMZ</b>	MI-Maus	GFP	keine Transdifferenzierung, keine Fusion	[8]
<b>hPB-EPC</b>	neonatale rKM	HLA	Transdifferenzierung, Zell-zu-Zellverbindung, keine Fusion	[9]
<b>hPB-EPC</b>	MI-Maus	HLA	Transdifferenzierung durch Zell-zu-Zellverbindung, evtl. Fusion	[10]
<b>hPB-EPC</b>	MI-Maus	HLA humanes-X- Chromosom	Transformation durch Fusion und Transdifferenzierung	[11]
<b>hPB-EPC</b>	neonatale rKM	Dil	keine Fusion, keine Transdifferenzierung	[12]
<b>hPB-EPC</b>	neonatale rKM	Dil	Transiente Zellfusion durch Nanotubes ohne zelluläre oder nukleäre Fusion	[13]

### 3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

#### 3.1 Zielvorstellungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob nach intramyokardialer Transplantation von EPC-IGF-II, durch die lokale Überexpression von IGF-II, die linksventrikuläre Funktion sowie die vaskuläre und myokardiale Regeneration nach Ischämie und Reperfusion im Vergleich zur Transplantation von EPC, die mit einem Leervektor (EPC-pLXSN) transduziert sind, verbessert wird.

Echokardiographisch wird die Ejektionfraktion (EF) als Parameter der Herzfunktion bestimmt. Die EF soll Auskunft darüber geben, ob durch IGF-II, überexprimiert in EPC, eine weitere Steigerung der ventrikulären Funktion nach Myokardinfarkt im Vergleich zu EPC-pLXSN erreicht werden kann.

Ex vivo soll untersucht werden, ob durch EPC-IGF-II, die Neovaskularisation gefördert und gleichzeitig durch die Überexpression von IGF-II die Proliferation von Kardiomyoblasten induziert und die Infarktgröße vermindert werden kann.

### 3.2 Material und Methoden

#### 3.2.1 Gewinnung endothelialer Progenitorzellen aus Nabelschnurblut

Das Blut wird aus der Nabelschnur gesunder Neugeborener, mit Einverständnis der Eltern, entnommen. Die Gewinnung erfolgt nach einem, von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Technischen Universität München, anerkannten Protokoll. Das Blut wird bei Raumtemperatur gelagert und binnen 24 Stunden verarbeitet.

##### 3.2.1.1 Isolierung mononukleärer Zellen durch Dichtezentrifugation

Mononukleäre Zellen werden durch eine Dichtezentrifugation aus dem Nabelschnurblut isoliert. Die Dichtezentrifugation ist ein physikalisches Trennverfahren, durch das in einer Ultrazentrifuge Blutbestandteile unterschiedlicher Dichte sortiert werden. Als Reagenz wird Ficoll (Ficoll-Hypaque, Seromed, Berlin), ein ungeladenes Saccharose-Polymer mit einer Dichte von 1,077 g eingesetzt. In ein Falconröhrchen werden 15 ml Ficoll gegeben. Dieses wird mit heparinisiertem und PBS-verdünntem Blut überschichtet, ohne dass es zu einer Durchmischung kommt. In einer Zentrifuge wird das Falcon bei 2100 U/min für 15 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Blutbestandteile, deren Dichte größer als 1.077 g ist (z. B. Erythrozyten), passieren die Ficollschicht. Mononukleäre Zellen (Dicht < 1.077g) sammeln sich in der Interphase, welche zwischen dem Ficollplaque und der Serumphase liegt.

Der Überstand inkl. Zellpellet, in dem sich die mononukleären Zellen befinden, wird abgenommen, in ein neues Falconröhrchen mit PBS (phosphat buffered saline) gegeben und bei 1600 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet zusammen mit einem Puffer in ein Falconröhrchen gegeben. Aus dieser Suspension werden 20 µl entnommen und 20 µl Türk-Lösung beigemischt. Zum Auszählen wird ein Teil des Gemisches auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen.

Aus dem Zellpellet, in dem sich die mononukleären Zellen befinden, werden CD34+ Zellen durch das MACS-Verfahren isoliert.

### 3.2.1.2 Isolierung humaner CD34+ Zellen

Humane CD34+ Zellen werden aus mononukleären Zellen, die wie unter 3.2.1.1 beschrieben gewonnen werden, durch Anwendung des MACS-Verfahrens isoliert. Das Prinzip der MACS (magnetic activated cell separation) ist es, aus einer heterogenen Zellsuspension mit einem Konjugat, bestehend aus Antikörpern (AK) und supramagnetischen Partikeln (Mikrobeads), eine spezifische Art von Zellen zu markieren und mit Hilfe eines permanenten Magnetfeldes zu selektieren. Mikrobeads sind Dextranpolymere, die mit Eisenoxid beschichtet sind und eine durchschnittliche Partikelgröße von 50 nm aufweisen. Der Permanentmagnet enthält seltene Erden (z. B. Barium-Neodyn) und erzeugt in Kombination mit Säulen, die eine Matrix aus ferromagnetischen Stahlkügelchen enthalten, hochgradiente Magnetfelder.

Angewandt wird das direkte (Mikrobead ist mit Primären-AK konjugiert), positive (der verwendete AK ist gegen die zu isolierende Zellart gerichtet) Zellseparationsprinzip.

Das Mikrobead-Kit (Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit®) sowie der Magnetische-Zellsortierer werden von der Firma Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, bezogen. Das Kit beinhaltet ein FcR-Blocking-Reagenz und Mikrobeads, die mit monoklonalen Maus-anti-humanen-CD34-Antikörpern (Klon QBEND/10, Isotyp Maus IgG) konjugiert sind.

Die durch Dichtezentrifugation gewonnene Zellsuspension (siehe Kap. 3.2.1.1) wird bei 1400 U/min 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das verbleibende Zellpellet mit dem FcR-Blocking-Reagenz und den Mikrobeads bei 4 °C für 30 Minuten inkubiert. Das FcR-Blocking-Reagenz verhindert die Bindung des Antikörpers an unerwünschte Fc-Rezeptoren. Die Mikrobeads docken durch den AK an CD34+ Zellen an. Zur inkubierten Zellsuspension wird HF-Puffer gegeben und die Suspension bei 1600 U/min zentrifugiert. 3 ml HF-Puffer werden zum Anfeuchten in die, mit Stahlwolle gefüllte Säule gegeben. Die Säule ist von einem Permanentmagneten umgeben. Die Zellsuspension wird auf die Säule gegeben. Die markierten Zellen bleiben innerhalb des Magnetfeldes in der Stahlwolle hängen. Unmarkierte Zellen passieren ungehindert und werden in einem Falconröhrchen aufgefangen. In diesem werden sie mit 2 ml HF-Puffer versetzt und erneut auf die Säule aufgegeben. Die Säule wird anschließend 3-mal mit HF-Puffer gespült, dann mit 5 ml HF-Puffer befüllt und aus dem Magnetfeld genommen. Die markierten Zellen lösen sich von der Säule und werden zusammen mit HF-Puffer in einem gesonderten Gefäß aufgefangen. Eine zweite Säule wird ins Magnetfeld gebracht und angefeuchtet. Die

Suspension mit den markierten Zellen wird erneut über die Säule gegeben, um durch Wiederholung des Separationsvorgangs den Reinheitsgrad zu erhöhen. Die Säule wird gespült, mit HF-Puffer befüllt und aus dem Magnetfeld genommen. Schließlich werden die CD34+ Zellen zusammen mit dem Puffer aufgefangen.

20 µl der Zellsuspension werden mit Trypanblau vermischt, in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und ausgezählt. Die restliche Zellsuspension wird abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wird mit 3 ml EBM-2 vermischt und in eine mit Fibronectin beschichtete 6-Well-Platte gegeben.

### 3.2.1.3 Differenzierung humaner CD34+ Zellen zu EPC

Die mit der MACS-Technik isolierten CD34+ Zellen werden auf fibronectinbeschichteten Zellkulturplatten (10 µg/cm<sup>2</sup> CellSystems GmbH, St. Katharinen) in IMDM (Gibco, Paisley, UK) mit 10 %igem Pferde- und 10 %igem fetalem Kälberserum (PAN-Biotech, Aidenbach) kultiviert. Das Serum ist supplementiert mit Penicillin/Streptomycin (Gipco, Paisley, UK), 50 ng/ml SCF (recombinant human stem cell factor, R&D Systems, Abingdon, UK), 50 ng/ml VEGF (vascular endothelial growth factor, R&D Systems, Abingdon, UK), 20 ng/ml FGF-2 (basic fibroblast growth factor, R&D Systems, Abingdon, UK) und 20 ng/ml SCGFβ, (stem cell growth factor, Peprotech, London, UK). Das Medium (ECM) wird 3-mal pro Woche gewechselt. Nach 3 Wochen werden die Zellen vom ECM in EGM-2 (CellSystems GmbH, St. Katharinen) verbracht. Zur Analyse der Endothelzellkolonien bildenden Einheiten werden CD34+ Zellen in einer Verdünnungsreihe in 24-Well-Platten verbracht und wie oben beschrieben kultiviert. Zwischen dem 21. und 35. Tag werden die 24-Well-Platten auf das Vorhandensein von Endothelzellkolonien untersucht.

### 3.2.2 IGF-II Überexpression in humanen EPC

Die gewonnenen EPC (siehe Kapitel 3.2.1) werden retroviral transfiziert. Die retrovirale Transfektion zur Überexpression von IGF-II in humanen EPC wird von der Arbeitsgruppe Dr. Robert Oostendorp, III. Medizinische Klinik der TU München, durchgeführt. Die transduzierten Zellen werden freundlicherweise für dieses Projekt zur Verfügung gestellt.

### Retroviren

Als Retroviren werden RNA-Viren bezeichnet, die eine reverse Transkriptase enthalten. Die reverse Transkriptase ist ein Enzym, das die Synthese eines zur viralen RNA komplementären DNA-Stranges katalysiert.

Der Infektionszyklus der Retroviren:

Sind spezifische Rezeptoren auf einer Wirtszelle vorhanden, kommt es zur Bindung des Virus-Hüllenproteins an die Wirtszelle. Dadurch wird die Internalisierung des Virus durch Endozytose ausgelöst. Im Zytoplasma zerfällt das Nukleokapsid und die virale RNA wird durch die reverse Transkriptase in DNA (Provirus-DNA) umgeschrieben. Im Zellkern wird das gesamte Virusgenom (Provirus-DNA) stabil in die Wirts-DNA (durch Virus eigene Integrase) eingebaut. Die Provirus-DNA wird transkribiert (zelleigene RNA-Polymerase II). Dabei entstehen RNA sowie durch Translation der m-RNA Struktur- und Enzymproteine. Diese werden zusammen mit der RNA zu neuen, abknospenden, infektiösen Virenpartikeln verpackt.

#### 3.2.2.1 Retrovirale Transfektion

Der retrovirale Gentransfer wird zur stabilen Transduktion von Zellen eingesetzt. Es soll eine stabile Überexpression von IGF-II in EPC durch eine retrovirale Transfektion erreicht werden. IGF-II wird als cDNA Plasmid im pOTB7 Vektor von der ATCC (American Type Culture Collection, Manassas (VA), USA) über die Firma Promochem (LGC Promochem GmbH, Wesel) erworben (Kat.Nr.: MGC-8683). Das retrovirale Gentransfersystem besteht aus Sicherheitsgründen aus 2 Komponenten:

1. dem retroviralen Vektor (pLXSN, Retro-X®, BD-Clontech, Mountainview, CA, USA) und
2. der Verpackungszelllinie (PT67, RetroPack®, BD-Clontech, Mountainview, CA, USA).

Der pLXSN Vektor beinhaltet die retroviralen „Long term repeats“ (LTRs) des Moloney Maus Leukämie Virus (5' MoMuLv LTR) und des Moloney Maus Sarkoma Virus (3' MoMuSv LTR), über welche die Integration des Retrovirus in die DNA der Zielzelle erfolgt. Sie fungieren gleichzeitig als Promotor für das Transgen. Zwischen den LTRs liegt das Verpackungssignal psi und die „multiple cloning site“ (MCS). In diesem Bereich, liegen die Schnittstellen EcoR I und Xho I, welche enzymatisch geöffnet werden, bevor die Ligation des Transgens, welches aus dem Ausgangsvektor (pOTB7) herausgeschnitten wurde, erfolgt.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

---

In diesem Vektor erfolgt die Klonierung des Transgens. Die MCS flankierend, liegt der „early SV40“ Promotor vor dem Neomycin Resistenzgen (eukaryotischer Selektionsmarker). Anhand des Neomycin Resistenzgens können die infizierten Zellen selektioniert werden.

Der pLXSN Vektor enthält kein gag (group-specific-antigen: kodiert das Kapsidprotein)-, pol (polymerase: kodiert die reverse Transkriptase)- oder env (envelop: kodiert das Hüllenprotein)-Gen, und kann somit nach einer Infektion keine neuen Partikel bilden und keine viralen Gene übertragen. Die Verpackungszelllinie PT67 enthält die gag-, env- und pol-Gene. Durch Translation dieser Gene entstehen die Proteine, die zur Produktion infektiöser Retroviren benötigt werden. Die Verpackungszelllinien enthalten aber nicht das Verpackungssignal psi, so dass die gag-, env- und pol-Gene nicht mit in das Virion eingebaut werden können.

Nach der liposomalen Transfektion (Lipofektion) der Verpackungszelllinie mit dem Vektor, der das Verpackungs-Signalelement (psi) enthält, kommt es zur Transkription. Zum einen entstehen durch Translation die nötigen Strukturproteine, zum anderen RNA, die zusammen infektiöse, replikationsdefiziente Viruspartikel ergeben und in den Überstand sezerniert werden. Die auf NIH/3T3 basierende Verpackungszelllinie PT67 ist mit einem amphotropischen 10A1 env-Gen transfiziert. Die viralen Partikel besitzen somit das 10A1-Glykoprotein (Rezeptoren; GALV und Ram-1) auf ihrer Membran, wodurch sie eine breite Wirtsspezifität innerhalb der Säugetiere (inkl. humaner Zellen) erhalten. Somit können mit diesen replikationsdefekten Virionen humane EPC infiziert werden. Nach Transduktion der Virionen in die EPC wird die virale DNA, in welche das Transgen integriert ist, in das Genom der Zielzelle eingebaut. Es folgt die Expression des Transgens sowie des Selektionsmarkers (Neomycin Resistenzgen).

Für eine Transplantation werden  $10^6$  EPC durch die Zugabe von Virusüberstand transduziert. Die Produktion des IGF-II in EPC-pLXSN-IGF-II-Zellen (EPC-IGF-II) wird nach Amplifizierung durch RT-PCR in einer Gelelektrophorese überprüft (Detektion der IGF-II spezifischen Gensequenz).

Zusätzlich werden  $10^6$  EPC mit dem Vektor pLXSN, ohne Einbau der IGF-II cDNA, retroviral transduziert („Leervektor“; EPC-pLXSN).

Durch Zugabe von 0,4 mg/ml Gentamycin® (Neomycin) zum Virusmedium werden stabile Zellen, die den pLXSN Vektor enthalten, selektiert.

### 3.2.3 Bestimmung der IGF-II Überexpression

Die IGF-II spezifische DNA Sequenz soll zur Überprüfung der Expression von IGF-II in EPC-IGF-II genutzt werden. Um die Expression des IGF-II in EPC überprüfen zu können, muss in einem ersten Schritt die RNA aus den Zellen isoliert werden (Isolierung der Gesamt-RNA). Im zweiten Schritt wird die RNA in DNA umgeschrieben (Reverse Transkription). Die daraus gewonnene cDNA wird in der Polymerasekettenreaktion (PCR) als Matrize verwendet. Durch spezifische Primer und eine Taq-Polymerase wird in der PCR die für IGF-II spezifische DNA Sequenz amplifiziert. Die spezifische, amplifizierte DNA wird in einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Fragment-Banden können durch Fluoreszenz sichtbar gemacht werden. Die erwartete Fragmentgröße des IGF-II (aus EPC-IGF-II) liegt bei 319 bp. Es wird erwartet, dass EPC-pLXSN kein IGF-II exprimieren. J82 (Blasenkarzinomzellen) werden als Negativ-Kontrolle mitgeführt.

#### 3.2.3.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Angewandt wird das RNeasy Verfahren unter Verwendung des RNeasy Mini Kits® der Firma QIAGEN (QIAGEN GmbH, Hilden). Dieses Verfahren nutzt eine selektive Bindungseigenschaft einer Silicagel Membran in Kombination mit einer Mikrozentrifugationstechnik. Zuerst werden die kultivierten Zellen lysiert. Da die Proben reich an RNasen sind, wird der RLT Puffer zuvor mit  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) versetzt. Anschließend wird das Zellkulturmedium mit einer Pipette abgenommen und die Zellen durch Zugabe des RLT- $\beta$ -ME Gemisches (350  $\mu$ l RLT : 3,5  $\mu$ l  $\beta$ -ME) aufgeschlossen. Das Lysat wird mit 70 %igem Ethanol durch Pippetierung vermischt. 700  $\mu$ l der Probe werden auf die RNeasy-Spin-Säule gegeben, welche in einem 2 ml Sammelröhrchen platziert ist und für 15 sek. bei 10000 U/min zentrifugiert. Die Gesamt-RNA bindet an die Membran. Übrige Substanzen werden durch Spülen entfernt. Zum Waschen der Membran werden 700  $\mu$ l RW1 Puffer auf die Säule gegeben und erneut für 15 sek. zentrifugiert. RPE Puffer wird mit Ethanol (96 %ig) verdünnt und 500  $\mu$ l der RPE-Puffer-Lösung zum Waschen auf die Säule aufgetragen und für 15 sek. zentrifugiert. Die Waschung wird mit einer Zentrifugationszeit von 2 Minuten wiederholt. Die RNeasy-Spin-Säule kommt nun in ein 1,5 ml Sammelröhrchen. 40  $\mu$ l RNase-freies-Wasser wird direkt auf die Säulenmembran aufgegeben und die Säule für 1 Minute bei 1000 U/min zentrifugiert, um die RNA zu eluieren. Die isolierte RNA wird bis zur Verwendung in der Reversen Transkription auf Eis gelegt.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

**Tabelle 4. Arbeitsschritte zur Isolierung der Gesamt-RNA**

<b>Arbeitsschritte</b>	<b>Reagenz/Puffer</b>	<b>Zentrifugationszeit</b>	<b>U/min</b>
<b>Zellyse</b>	RLT- $\beta$ -ME	----	
<b>Bindungskapazität</b>	70 %iges Ethanol	----	
<b>Transfer des Lysats auf die Säule</b>		15 sek.	10000
<b>Waschung 1</b>	RW1	15 sek.	10000
<b>Waschung 2</b>	RPE + Ethanol	15 sek.	10000
<b>Waschung 3</b>	RPE + Ethanol	2 min	10000
<b>Eluation der RNA</b>	RNase-freies- Wasser	1 min	10000

### 3.2.3.2 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird die reverse Transkriptase genutzt, um in vitro von einer RNA Matrize einen cDNA-Erststrang zu synthetisieren. Die reverse Transkriptase ist ein Enzym das gewöhnlich von Retroviren stammt, die RNA beinhalten. Das multifunktionelle Enzym hat 3 verschiedene Enzymaktivitäten: 1. eine RNA abhängige DNA Polymerase (RNA abhängige DNA Synthese), 2. eine Hybrid abhängige Exoribonuklease (Umbau der RNA zu RNA-DNA-Hybriden) und 3. eine DNA abhängige DNA Polymerase (DNA abhängige DNA Synthese). In vivo wird durch die Kombination der 3 Aktivitäten das einzelsträngige RNA-Genom in eine doppelsträngige DNA transkribiert. Für die Reverse Transkription in vitro werden die ersten beiden Aktivitäten genutzt, um eine Einzelstrang-cDNA zu produzieren. Die reverse Transkriptase benötigt zur Initiierung der DNA-Synthese einen Primer. Verwendet werden Random-Primer, die spezifisch mit dem Poly-A-Schwanz der m-RNA hybridisieren.

Im folgenden Protokoll wird das Omniscript-Reverse-Transcriptions-Kit® der Firma QIAGEN (QIAGEN GmbH, Hilden) verwendet. Falls nicht anders gekennzeichnet, entstammen die Reagenzien diesem Kit.

500 ng der isolierten Gesamt-RNA (siehe Kap. 3.2.3.1) werden aufgetaut. 1  $\mu$ g Random Primer (Random Primer, Invitrogen GmbH, Karlsruhe), 2  $\mu$ l RT Puffer (10fach konzentriert), 2  $\mu$ l dNTP Mix (dATP, dCTP, dTTP, dGTP; je 0,5 mM) und 20  $\mu$ l RNase-freies-Wasser werden bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend sofort auf Eis gestellt. 0,5  $\mu$ l RNase Inhibitor (Superase-In®, Ambion Ltd., Huntington, Cambridgeshire, UK) werden auf

10 Einheiten/ $\mu$ l durch Zugabe von eiskaltem, einfach konzentriertem RT-Puffer (mit RNase-freiem-Wasser verdünnt) verdünnt. Die Lösungen werden je 5 sek. auf einem Vortex gemischt. Primer, Puffer, dNTP Mix, Wasser, RNase Inhibitor und Omniscript-Reverse-Transkriptase werden zu einem „Master Mix“ zusammen gegeben und vermischt. Dieser Master Mix wird in Reaktionsgefäße gegeben und auf Eis gestellt. Die RNA wird dem Master Mix zugegeben, kurz gemischt (5 sek. vortexen) und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird das Reverse-Transkriptionsgemisch bis zur Anwendung in der PCR auf Eis gelagert.

### 3.2.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Das Verfahren der PCR (Polymerase chain reaction) ermöglicht eine schnelle Amplifikation von spezifischen DNA-Segmenten. Die PCR-Methode ist empfindlich genug, um ein einziges DNA-Molekül aus einer Probe zu detektieren. Zur Durchführung der PCR werde 2,5  $\mu$ l DNA Polymerase Puffer (Eppendorf AG, Hamburg), 0,5  $\mu$ l dNTP Mix (25 mM dNTP Mix, Invitrogen GmbH, Karlsruhe), je 0,5  $\mu$ l Primerlösung (10  $\mu$ M Primer-Sense: cgtctgtggggaccgcg, 10  $\mu$ M Primer-Antisense: gaacgcctcgagctccttg, MWG Biotech, München) aufgetaut und auf Eis gestellt. Die aufgetauten Reagenzien werden mit 25  $\mu$ l Aqua dest. und 0,5  $\mu$ l Taq-Polymerase (Taq DNA Polymerase, Eppendorf AG, Hamburg) zum Master Mix vermischt und in Reaktionsgefäße verbracht. Anschließend werden 75 ng cDNA (Reverse-Transkriptase-Reaktionsgemisch: siehe Kap. 3.2.3.2) hinzugegeben und auf Eis gestellt, bis der Thermocycler eingestellt ist. Der Thermocycler wird, wie in Tabelle 5 dargestellt, programmiert. Das Mastermix-cDNA-Gemisch wird in den Thermocycler gegeben und das Programm gestartet.

Im ersten Schritt des Thermocyclerprogramms wird die DNA durch Erhitzen denaturiert (94 °C). Im zweiten Schritt erfolgt das Annealing. Hierzu wird die Temperatur auf 56 °C gesenkt. Die Oligonukleotidprimer sind komplementär zu einer kurzen Sequenz im Strang des gesuchten DNA-Segments. Sie positionieren sich exakt hinter das Ende der zu amplifizierenden Sequenz. Im dritten Schritt wird die Temperatur auf 72 °C erhöht, um einen komplementären Strang der definierten DNA Sequenz mit Hilfe der hitzestabilen Taq-DNA-Polymerase und der 4 verschiedenen Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) zu synthetisieren. Die Taq-Polymerase verlängert die Primer, die mit der DNA hybridisiert sind, in 5'- 3' Richtung durch komplementäre Anlagerung von Desoxyribonukleotiden an den DNA Strang

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

---

(Extension). Durch Wiederholung dieser 3 Schritte wird die Zielsequenz exponentiell amplifiziert.

Die amplifizierte DNA wird nach Ablauf des Thermocyclerprogramms in der Gelelektrophorese charakterisiert.

**Tabelle 5. Einstellung des Thermocyclers zur Durchführung der PCR**

	<b>Temperatur in °C</b>	<b>Zeit in Sekunden</b>
<b>Initiale Denaturierung</b>	94	60
<b>3-Schritt-Zyklus (25 Zyklen)</b>		
<b>Denaturierung</b>	94	10
<b>Annealing</b>	56	30
<b>Extension</b>	72	30
<b>Abschließende Extension</b>	72	120

### 3.2.3.4 Gelelektrophorese

Das Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese basiert darauf, dass in einem elektrischen Feld bei neutralem pH negativ geladenen Nukleinsäuren zur Anode wandern. Je nach Größe (Anzahl der Basenpaare) wandert die DNA unterschiedlich schnell durch das als Molekularsieb wirkende Gel. Dabei wandern kurze, negativ geladene DNA-Fragment am schnellsten in Richtung der Anode.

Zur Herstellung des Gels werden 1,5 g Agarose (Roti®agarose, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) zusammen mit 100 ml TBE-Puffer (Ultra Pure® TBE-Puffer, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) erhitzt. Nach Abkühlung wird Ethidiumbromid zugegeben. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Das Gel wird in eine Form gegossen und ein Kamm für die Probenaschen eingesetzt. Nach Erkalten wird der Kamm entfernt, die amplifizierte DNA mit Bromphenolblau Ladepuffer (zur Markierung der Lauffront) versetzt und in die Probenaschen appliziert. Nun wird solange eine Spannung angelegt (80 – 100 V), bis das Bromphenolblau die Mitte des Gels erreicht hat. Die DNA wird auf einem Transluminator durch UV-Licht sichtbar gemacht und in einer Bilddatei gespeichert. Die Größe der DNA (Anzahl der bp) wird anhand der 100-bp-DNA-Leiter abgelesen.

### 3.2.4 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die Versuche werden am Modell der RNU-Ratte durchgeführt. Bezogen werden diese Tiere von der Firma Charles River (Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland), welche diesen Stamm seit 1994, in Anlehnung an eine rnu Mutation einer Auszucht-Kolonie von Rowett Hooded Ratten (Schottland) züchtet. Diese Mutante ist charakteristisch thymuslos und im homozygoten Zustand nackt bzw. weist eine flaumige Behaarung auf. In Analogie zur Nackt-Maus sind die Tiere immundefizient.

Als SPF (spezifisch pathogenfreie) Labornagetiere unterliegen sie einem Gesundheitsüberwachungsprogramm nach Empfehlungen der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Association). Dieses setzt sich zusammen aus serologischen Untersuchungen und einem Gesundheitsüberwachungsprogramm. Letzteres beinhaltet regelmäßige bakteriologische, pathologische und parasitologische Untersuchungen. Im Rahmen dieser Arbeit werden 58 Tiere verwendet. Das Alter der Tiere liegt zu Versuchsbeginn zwischen 4 und 5 Wochen. Ihr Gewicht beträgt 180 bis 280 g. Es werden nur männliche Tiere verwendet. Zur Eingewöhnung werden die Tiere, eine Woche vor Versuchsbeginn, im Tierbereich des Instituts für experimentelle Onkologie und Therapieforschung im Klinikum rechts der Isar eingestallt. Der Labornagetierestall ist mit einer Klimaanlage ausgestattet, durch die die Raumtemperatur (22 - 23 °C) und die Luftfeuchtigkeit (55 %) konstant gehalten werden. Durch eine Lichtanlage ist ein Hell/Dunkelrhythmus im Intervall von 12 Stunden gegeben. Das Handling der immunsupprimierten Nacktratten erfolgt innerhalb der Stallung ausschließlich behandschuht unter einem Airflow (Flow, EBECO, Deutschland). Bis zum ersten operativen Einsatz werden die Tiere zu zweit aufgestellt. Um Verletzungen durch den Artgenossen nach dem chirurgischen Eingriff zu verhindern, werden die Tiere nach der Operation einzeln aufgestellt. Die Makrolon Typ III-erhöhten Käfige haben ein Volumen von 14,4 dm<sup>3</sup>. Zum Schutz vor Allophagie-bedingten Verdauungsproblemen wird das sterile altromin® Fasereinstreu (Altromin, Lage) post operationem durch Heu ersetzt. Die alimentäre Versorgung erfolgt durch Ssniff-Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse (R/M-H, Ssniff GmbH, Soest). Wasser erhalten die Tiere ad libitum.

Die Untersuchungen, chirurgischen Eingriffe sowie die Organentnahme erfolgen in den Operationsräumen im Zentrum für präklinische Forschung des Klinikums rechts der Isar, München. Im Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie des Klinikums

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

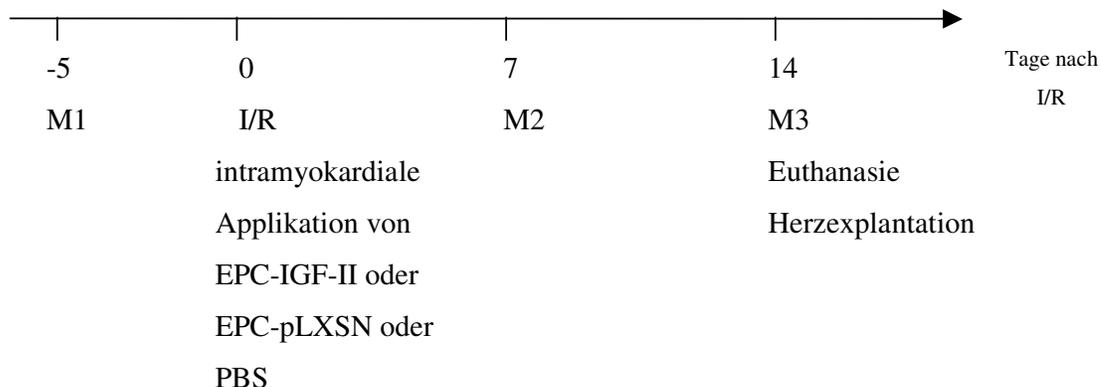
---

werden die Paraffinpräparate histologisch aufbereitet. Die immunhistochemischen Untersuchungen erfolgen in den Räumlichkeiten der Experimentellen Kardiologie des Deutschen Herzzentrums, München.

Am 27.09.2004 wurde das Tiervorhaben gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

3.2.5 Versuchsplan und Gruppeneinteilung

**Versuchstiergruppe 1**



**Abbildung 4. Zeiteinteilung des 14 Tage Versuchs**

M1 erste Ultraschalluntersuchung, M2 zweite Ultraschalluntersuchung, M3 dritte Ultraschalluntersuchung, I/R Ischämie/Reperfusion, Zellgruppen: Transplantation von EPC-pLXSN oder EPC-IGF-II; Kontrollgruppe: Injektion von PBS

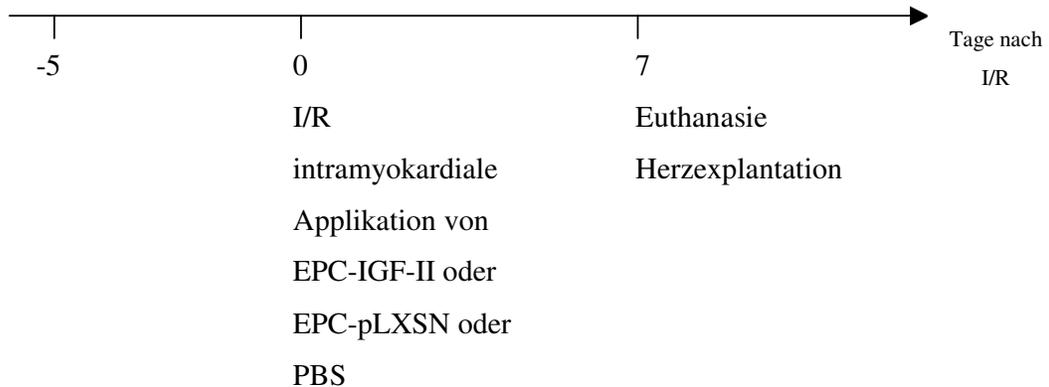
Die Gruppe besteht aus 39 Tieren. Die Dauer des Versuchs beträgt 14 Tage. 5 Tage (Tag -5) vor dem chirurgischen Eingriff werden die physiologischen sonographischen Werte ermittelt. Am Tag 0 wird die Thorakotomie mit anschließender Ligatur der LAD (left anterior descending artery) und Reperfusion nach 30 Minuten durchgeführt. Die Gruppe lässt sich in 3 Untergruppen einteilen. Der Untergruppe A werden 1 Mio. humane EPC-pLXSN-IGF-II-Zellen (EPC-IGF-II) in 150 µl PBS injiziert. Die Untergruppe B erhält eine Applikation von 1 Mio. EPC-pLXSN in 150 µl PBS. Der Kontrollgruppe (Untergruppe C) werden 150 µl PBS intramyokardial verabreicht. Die Injektion erfolgt an definierten Stellen des Myokards in der Periinfarktzone. Am Tag 7 sowie am Tag 14 wird die sonographische Untersuchung wiederholt. Im Anschluss an die dritte Ultraschalluntersuchung werden die Tiere euthanasiert. Das Herz wird explantiert und in Formalin fixiert.

**Tabelle 6. Versuchsplan zum 14 Tage Versuch**

Zellgruppen: Transplantation von EPC-pLXSN oder EPC-IGF-II; Kontrollgruppe: Injektion von PBS

Gruppe 1	Tierzahl	Versuchsdauer in Tagen	Injektion
Untergruppe A	14	14	EPC-IGF-II
Untergruppe B	10	14	EPC-pLXSN
Untergruppe C	15	14	PBS

**Versuchstiergruppe 2**



**Abbildung 5. Zeiteinteilung des 7 Tage Versuchs**

I/R Ischämie/Reperfusion, Zellgruppen: Transplantation von EPC-pLXSN oder EPC-IGF-II; Kontrollgruppe: Injektion von PBS

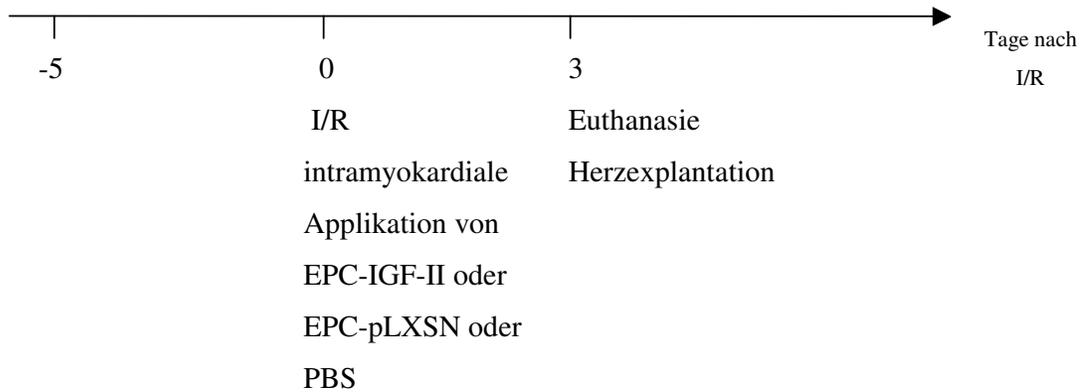
In der 2. Versuchstiergruppe werden insgesamt 10 Tiere verwendet. Der Versuch dauert 7 Tage. Am Tag 0 wird die Thorakotomie mit anschließender Ligatur der LAD und Reperfusion nach 30 Minuten durchgeführt. Es folgt die Applikation von 1 Mio. EPC-IGF-II Zellen in 150 µl PBS in die Randareale des Infarkts bei der Untergruppe A EPC-pLXSN in 150 µl PBS werden der Untergruppe B injiziert. Der Untergruppe C werden 150 µl PBS ohne Zellen verabreicht. Nach 7 Tagen wird die Euthanasie durchgeführt. Das Herz wird entnommen und in Formalin fixiert.

**Tabelle 7. Versuchsplan zum 7 Tage Versuch**

Zellgruppen: Transplantation von EPC-pLXSN oder EPC-IGF-II; Kontrollgruppe: Injektion von PBS

<b>Gruppe 2</b>	<b>Tierzahl</b>	<b>Versuchsdauer in Tagen</b>	<b>Injektion</b>
<b>Untergruppe A</b>	3	7	EPC-IGF-II
<b>Untergruppe B</b>	4	7	EPC-pLXSN
<b>Untergruppe C</b>	3	7	PBS

**Versuchstiergruppe 3**



**Abbildung 6. Zeiteinteilung des 3 Tage Versuchs**

I/R Ischämie/Reperfusion, Zellgruppen: Transplantation von EPC-pLXSN oder EPC-IGF-II; Kontrollgruppe: Injektion von PBS

Diese Gruppe besteht aus 9 Tieren. Nach Ischämie und Reperfusion werden 3 Tieren EPC-IGF-II in 150 µl PBS und weiteren 3 Tieren EPC-pLXSN in 150 µl PBS injiziert. Einer Kontrollgruppe von 3 Tieren werden 150 µl PBS verabreicht. Die Euthanasie erfolgt 72 Stunden nach der Operation. Das Herz wird entnommen und in Formalin fixiert.

**Tabelle 8. Versuchsplan zum 3 Tage Versuch**

Zellgruppen: Transplantation von EPC-pLXSN oder EPC-IGF-II; Kontrollgruppe: Injektion von PBS

<b>Gruppe 3</b>	<b>Tierzahl</b>	<b>Versuchsdauer in Tagen</b>	<b>Injektion</b>
<b>Untergruppe A</b>	3	3	EPC-IGF-II
<b>Untergruppe B</b>	3	3	EPC-pLXSN
<b>Untergruppe C</b>	3	3	PBS

### 3.2.6 Verwendete Medikamente

Die Anästhesie während der Operation und der Ultraschalluntersuchungen wird durch eine Injektionsnarkose erreicht. Verwendet wird eine vollständig antagonisierbare Dreifachkombination, bestehend aus Midazolam (Dormicum® 2 mg/kg KG), Medetomidin (Domitor® 0,15 mg/kg KG) und Fentanyl (Fentanyl® 0,005 mg/kg KG), welche intramuskulär (i. m.) verabreicht wird.

Nach Beendigung des Eingriffs wird durch subkutane (s. c.) Injektion der Antagonisten Atipamezol (Antisedan® 0,75 mg/kg KG) und Flumazil (Anexate® 0,2 mg/kg KG) die Narkose aufgehoben. Das Antidot Naloxan (Narcanti® 0,12 mg/kg KG) wird nicht verwendet, um die postoperative Analgesie nicht negativ zu beeinflussen.

Die postoperative Analgesie wird durch eine 6-malige Applikation von Buprenorphin (Temgesic® 0,1 mg/kg KG) s. c. und Metamizol-Natrium (Novalgin®) p. os abgedeckt. Die Medikamentengabe erfolgt im 12 Stunden Intervall. Die erste Temgesic-Applikation erfolgt 20 Minuten vor Narkoseende, damit die analgetische Wirkung mit dem Erwachen der Tiere einsetzt. Die erste Gabe des Novalgins® erfolgt, wenn der Schluckreflex des Tieres nach der Narkose vollständig zurückgekehrt ist.

Mit Eintritt des Toleranzstadiums wird zum Schutz vor dem Austrocknen eine Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Roche, Grenzach-Wyhlen) auf die Cornea aufgebracht.

### 3.2.7 Operationsvorbereitung

Erreichen die Tiere nach der Injektion der Dreifachkombination das Anästhesiestadium 3, Stufe 1, werden sie zuerst gewogen und dann mit einer modifizierten Venenverweilkanüle (VENFLON PRO, 16GA, Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden) intubiert. Zu diesem Zweck werden sie mit ihren oberen Schneidezähnen an einer Plexiglashalterung fixiert. Unter zur Hilfenahme eines Wattestäbchens wird die Zunge in rostraler Richtung fixiert und der Tubus, der durch einen eingeführten Draht verstärkt ist, in die Trachea eingebracht. Das intubierte Tier wird in Seitenlage auf eine Wärmeplatte gelegt und an eine volumengesteuerte Beatmungspumpe (Anesthesia Workstation, Voelker GmbH, Kaltenkirchen) angeschlossen. Mit einer Beatmungsfrequenz von 55 Zügen pro Minute wird dem Tier 100 % Sauerstoff zugeführt. Die Vordergliedmaßen des auf der rechten Seite liegenden Tieres werden nach cranio-distal gestreckt und mit einem Leukoplaststeifen fixiert. In Höhe des Metapodiums der

Hintergliedmaßen wird der Sensor eines Pulsoximeters (Nonin 8600V, Omega) angebracht. Zur Temperaturkontrolle wird ein Fieberthermometer rektal eingeführt. Das Operationsfeld wird rasiert und desinfiziert (Cutasept® F, Bode Chemie, Hamburg und Braunol®, Braun, Melsungen) und mit einem sterilen Lochtuch abgedeckt.

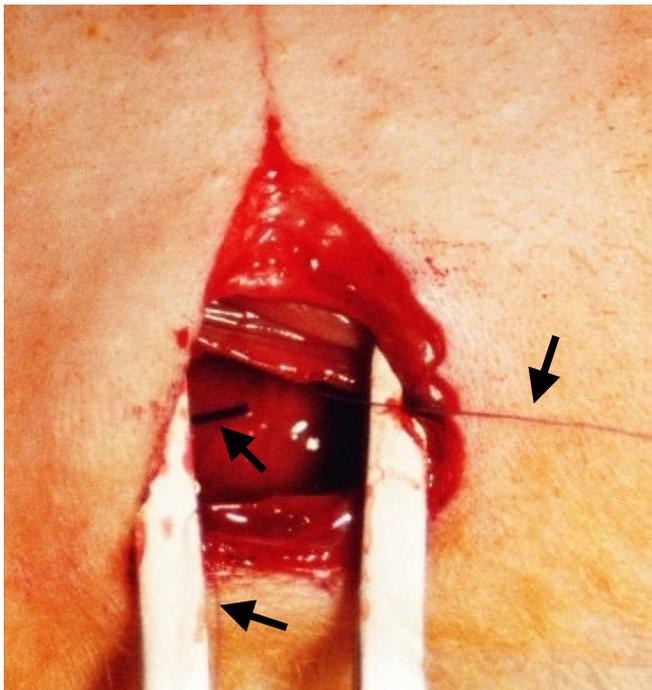
### 3.2.8 Chirurgischer Eingriff

Zur Thorakotomie wird die Haut der Brustwand fingerbreit hinter dem Margo caudalis der Skapula in einer Länge von ca. 2 cm mit einem Skalpell in proximo-distaler Richtung inzidiert. Das distale Ende des Hautschnitts muss dabei proximal der A. thoracica liegen. Mit einer Schere wird die Muskulatur der Thoraxwand durch Spreizen der Scherenschenkel stumpf präpariert. Dabei werden Anteile des M. cutaneus trunci, des M. latissimus dorsi sowie des M. serratus ventralis thoracis in ihrem Faserverlauf getrennt. Das Cavum pectoris wird im dritten Intercostalraum eröffnet. Mit einer Pinzette wird die craniale Rippe erfasst, die Scherenspitze durchdringt die Mm. intercostales externa und interna sowie die Pleura costalis. Ein „ploppartiges“ Geräusch – erzeugt durch die Aufhebung des Unterdrucks in der Brusthöhle – zeigt den Eintritt in das Cavum pleurae sinister an. Die Scherenschenkel werden dicht unter den Rippen ein wenig weiter eingeführt und gespreizt, so dass der Zugang in die Brusthöhle erweitert wird. Nach Einsetzen eines Rippenspreizers wird mit einem Wattetupfer der Lobus caudalis sinister der Lunge nach cranial verlegt, um eine freie Sicht auf den Herzbeutel zu erhalten. Mit einem Mikrodissektor wird die Pleura pericardii durchtrennt und das Cavum pericardii eröffnet. Das linke Herzohr wird vorsichtig nach cranial verlagert. Darunter wird die LAD (left anterior descending artery) sichtbar, welche sich in ihrem weiteren Verlauf längs über den linken Ventrikel bis in die Herzspitze erstreckt. Ein chirurgischer Knoten wird um die LAD, möglichst nah an ihrem Abzweig aus der A. coronaria sinistra, angelegt (Vicryl, 6-0, TF-1, Ethicon, Norderstedt). Ein 3 mm langes Fadenstück (0-0, Vicryl, Ethicon, Norderstedt) wird dem Knoten untergelegt. Anschließend wird der Knoten zugezogen. In diesem Moment beginnt die 30minütige Ischämie. Ist der Sitz der Ligatur korrekt, wird das Myokard im Versorgungsgebiet der LAD distal der Ligatur bläss. Die Größe des ischämischen Areals wird visuell beurteilt. Nur Tiere mit vergleichbar großen ischämischen Arealen werden in die Auswertung einbezogen. Während dieser Phase wird das Monitoring fortgesetzt. Dieses umfasst die Kontrolle des Sauerstoffgehaltes und der Pulsfrequenz via Pulsoximeter, der Körpertemperatur sowie der optischen Überwachung auf Arrhythmien.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

---

Nach einer halben Stunde wird die Ligatur mit einem Mikrodissektor wieder gelöst und die Phase der Reperfusion beginnt. Die Injektionssuspension wird in einer Insulinspritze (Becton, Dickinson, Helsingborg, Schweden) aufgezogen und gleichmäßig an definierten Stellen im Randareal des ischämischen Gebietes in das Myokard gespritzt. Injiziert werden je nach Versuchsgruppe 1 Mio. EPC-pLXSN oder EPC-IGF-II in 150 µl PBS oder 150µl PBS ohne Zellen. Die Applikation wird geblindet vorgenommen, d. h. dem Operateur ist nicht bekannt, welche Suspension verabreicht wird. Die Brusthöhle wird mit einem, in steriler NaCl-Lösung getränkten Wattestab ausgetupft, um Verklebungen zu vermeiden. Der Rippenspreizer wird entfernt. Mit 3 bis 4 Einzelheften (Vicryl, 3-0, Ethicon, Norderstedt), welche die dritte und vierte Rippe umfassen, wird der Thorax verschlossen. Die Muskulatur wird durch eine fortlaufende Naht nach Kürschner (Vicryl, 6-0, TF-1, Ethicon, Norderstedt) adaptiert. Die abschließende Hautnaht besteht aus 3 bis 4 U-Heften (Vicryl, 3-0, Ethicon, Norderstedt). Die Narkose wird antagonisiert und das Tier mit Eintreten des Schluckreflexes extubiert. Das Tier wird in einem Käfig auf einen Handschuh, der mit körperwarmem Wasser gefüllt ist, gelagert und bis zum vollständigen Erwachen beobachtet. Im Anschluss wird der Käfig mit Heu gefüllt und für ca. 6 Stunden unter eine Rotlichtlampe gestellt. Die analgetische Nachsorge erfolgt wie oben beschrieben.



**Abbildung 7. Blick auf den linken Ventrikel nach Thorakotomie und Eröffnung des Herzbeutels**

Nach Eröffnung der Brusthöhle wird ein Rippenspreizer eingesetzt und anschließend der Herzbeutel eröffnet. Pfeile zeigen den vorgelegten Faden sowie den Unterlegfaden zur Ligatur der LAD des linken Ventrikels an.

### 3.2.9 Perioperative Komplikationen

Als Komplikationen während der OP treten Blutverlust, verminderte Sauerstoffsättigung des peripheren Gewebes und Arrhythmien auf. Der Blutverlust und die verminderte Sauerstoffsättigung werden je nach Schweregrad als geringgradige, mittelgradige bzw. hochgradige eingestuft.

**Tabelle 9. Perioperative Komplikationen: Definition des Komplikationsgrades**

<b>Grad der Komplikation</b>	<b>O<sub>2</sub>- Sättigung in %</b>	<b>Blutverlust in ml</b>
<b>geringgradig</b>	90 - 100	< 0,1
<b>mittelgradig</b>	85 - 90	0,1 - 0,5
<b>hochgradig</b>	< 85	> 0,5

Geringgradige Blutungen treten bei Verletzungen kleinerer Gefäße auf. Mittelgradige beim Umstechen der LAD, wenn hierbei kleinere Seitenäste oder die LAD selbst leicht verletzt werden. Hochgradige Blutverluste entstehen durch starke Schädigung der LAD oder Schädigung des Herzohres. Die Blutungen werden durch Kompression mit einem Tupfer gestillt. Der Ausgleich eines hochgradigen Blutverlusts wird durch eine Volumensubstitution unterstützt (0,9 % NaCl-Lösung s. c., Delta Select GmbH, Dreieich). Die Sauerstoffsättigung der Peripherie wird während der Operation mit einem Pulsoxymeter gemessen. Sinkt die Sauerstoffsättigung intraoperativ länger als eine Minute unter 90 % wird die Atemluft in der postoperativen Aufwachphase mit Sauerstoff angereichert. Die Höhe und Gleichmäßigkeit der Herzfrequenz wird durch das Pulsoxymeter und in der Ischämie- und frühen Reperfusionphase zusätzlich adspektorisch überwacht. Beim Auftreten von Arrhythmien wird der linken Ventrikelwand ein Schlag mit einem Wattestab versetzt und 0,1 ml des Antiarrhythmikums Amiodaron (Cordarex®) auf das Myokard getropft.

**Tabelle 10. Perioperative Komplikationen: Überwachung und Maßnahmen**

<b>Komplikationen</b>	<b>Überwachung</b>	<b>Maßnahmen</b>
<b>Verringerte O<sub>2</sub>-Sättigung</b>	Pulsoxymeter	O <sub>2</sub> Anreicherung der Atemluft post OP
<b>Blutverlust</b>	adspektorisch	Kompression Volumensubstitution
<b>Arrhythmie</b>	Pulsoxymeter adspektorisch	Kardialer Schlag, Amiodaron

### 3.2.10 Postoperative Komplikationen

Postoperativ wird im Zusammenhang mit der Gabe der Analgetika im 12 Stunden Intervall in den ersten 72 Stunden nach Infarkt und anschließend einmal täglich, der Zustand der Tiere überprüft. In einer Allgemein-Untersuchung wird besonderes Augenmerk auf Veränderungen, die auf Schmerzen oder Herz-Kreislaufversagen hindeuten, gelegt. Hierbei wird das Allgemeinbefinden, die Körperhaltung, das Pflegeverhalten, das Temperament, der Ernährungs- und Hydratationszustand, die Atemfrequenz, der Herzstoß, die Körperwärme (mit besonderer Beachtung der Gliedmaßen), die Atmung, die Symmetrie bzw. der Umfang des Thorax und Abdomens untersucht. Treten mittelgradige bis hochgradige Veränderungen auf, werden die Tiere wie unter 3.2.12 beschrieben euthanasiert.

### 3.2.11 Sonographische Untersuchung

Die Tiere der Gruppe 1 (Versuchsdauer 14 Tage) werden 5 Tage vor der Operation echokardiographisch untersucht. 7 und 14 Tage nach der Operation wird die Echokardiographie wiederholt. Die Tiere werden unter Narkose intubiert und an ein Beatmungsgerät angeschlossen. Die Untersuchungen erfolgen mit einem humanmedizinischen Sonographiegerät (GE Vivid Five, 10 MHz-Sonde, Horten, Norwegen). Durch Aufsetzen des Schallkopfes lateral der Medianebene des Tieres wird ein Längsschnitt durch den linken Ventrikel und den Vorhof angelegt. Das EDV (enddiastolisches Volumen) und das ESV (endsystolisches Volumen) des linken Ventrikels werden planimetriert und daraus die Auswurfrate des linken Ventrikels (EF) bestimmt.

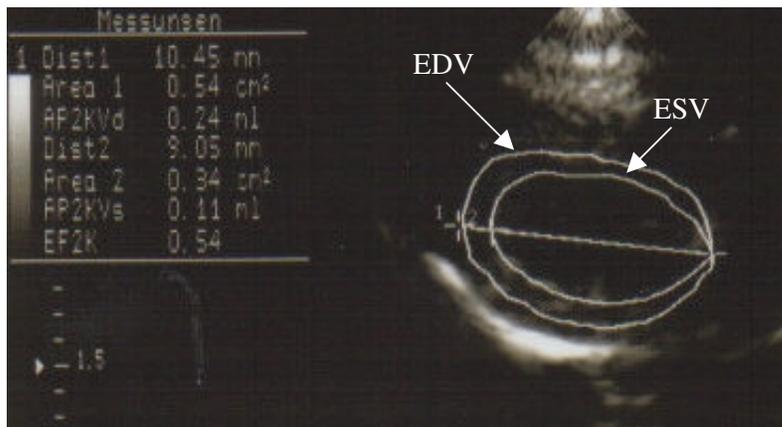
Die EF errechnet sich wie folgt:

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

EF: Ejection Fraction

LV (EDV): Left ventricle Enddiastolic Volume

LV (ESV): Left ventricle Endsystolic Volume

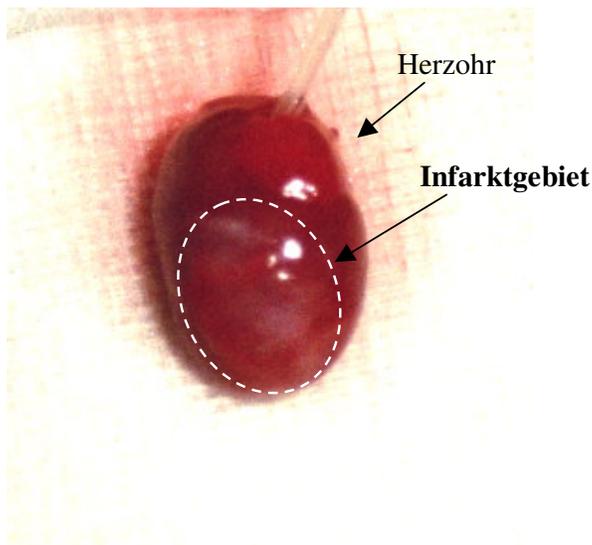


**Abbildung 8. Echokardiographische Darstellung des linken Ventrikels**

Es werden die innerventrikulären Volumina in der Enddiastole und Endsystole sowie der Durchmesser des linken Ventrikels gemessen.

### 3.2.12 Euthanasie und Probengewinnung

Je nach Gruppenzugehörigkeit werden die Tiere 3, 7 oder 14 Tage nach der Operation durch die Überdosis eines Anästhetikums (80 - 100 mg/kg KM Pentobarbital, Narcoren®, Rhone-Merieux GmbH, Laupheim) eingeschläfert. Die Applikation erfolgt i. v. über den Venenwinkel. Nach Eintritt des Todes wird das Herz entnommen, mit steriler NaCl-Lösung blutleer gespült und mit einem Schnitt durch die Transversalebene in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte wird bei -80 °C schockgefroren, die andere für 24 Stunden in 4 %igem Formalin fixiert.



**Abbildung 9. Explantiertes Rattenherz**

Das explantierte Herz wird mit NaCl blutleer gespült. Ansicht auf den linken Ventrikel mit Myokardinfarkt. Die Infarktzone stellt sich hellrot-weißlich dar.

### 3.2.13 Probenaufarbeitung

Die in Formalin fixierte Herzhälfte wird in Paraffin eingebettet und an einem Serien-Schnitt-Mikrotom in 2 µm dünne Scheiben geschnitten. Zur "Entfaltung" werden die Schnitte zunächst für ca. 1 Minute in ein 40 °C warmes Wasserbad (Paraffin Streckbad, TF35, MEDITE Medizintechnik, Burgdorf) gelegt und anschließend auf Objektträger (SuperFrost®Objektträger, Roth, Karlsruhe) und SuperFrostPlus-Objektträger (Menzel GmbH, Braunschweig) aufgezogen. SuperFrostPlus-Objektträger werden zuvor mit einer Klebermischung (Pritt®-Bastelkleber, Henkel, Düsseldorf + Poly-L-Lysin Lösung, Sigma Diagnostic INC., St. Luis) bestrichen, um ein gutes Anhaften der histologischen Präparate während der immunhistologischen Weiterverarbeitung zu gewährleisten. Pro Ebene werden 10 Objektträger bezogen; zwischen den Schnittebenen besteht ein Abstand von 30 µm. Nach 15minütiger Trocknung bei 37 °C in einem Inkubator können die SuperFrost-Objektträger mit Elastica-van-Gieson (EvG) gefärbt werden. Die SuperFrostPlus-Objektträger werden über Nacht in einem Brutschrank (56 °C) getrocknet. Die Präparate werden zum Entparaffinieren 2-mal für 10 Minuten in Xylol, zur Rehydrierung in eine absteigende Alkoholreihe verbracht.

Rehydrierung:

10 Minuten in 100 Vol. % Ethanol

10 Minuten in 96 Vol. % Ethanol

5 Minuten in 70 Vol. % Ethanol

5 Minuten in 50 Vol % Ethanol

5 Minuten in Aqua dest.

#### 3.2.13.1 Histomorphometrie

Bei allen Tieren der Gruppe 1 (14 Tage-Versuch) wird die Infarktgröße ausgemessen. Zur Bestimmung der Infarktgröße wird ein Präparat jeder Ebene mit einer Elastica-van-Gieson-Färbung weiter verarbeitet. In der EvG-Färbung stellt sich das kollagene Bindegewebe des Infarktgebietes durch Pikrinsäure-Säurefuchsin rot dar. Die Muskulatur färbt sich gelb-braun. Die gefärbten Objektträger werden mit 10facher Vergrößerung fotografiert und im „Axio Vision“ Programm (Zeiss, München-Halbergmoos) gespeichert.

Die Fläche des linken Ventrikels (total LV area), die Fläche der linken Cavität (LV cavity area), die Fläche des kollagenen Bindegewebes, die als Infarktfläche (Infarction area) gilt, und

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

---

die Wanddicken im Infarktgebiet (scar thickness) sowie im gesunden Bereich (non infarcted septal thickness) werden mit Hilfe des Bildanalyseprogramms „Sigma Scan Pro5, Image Analysis Version 5.0.0“ planimetrisch ausgewertet. Die Infarktgröße wird als Prozent der Zirkumferenz des gesamten linken Ventrikels angegeben (relative Infarktgröße).

### 3.2.13.2 Immunhistologie und Immunfluoreszenz

Als Detektionssystem zur Darstellung von Desmin, einem intermediären Filamentprotein, welches in glatter Muskulatur, im Herz- und Skelettmuskel exprimiert wird, wird die Avidin-Biotin-Methode (ABC-Methode) eingesetzt.

Die Labelled-Strep-Avidin-Biotin-Methode (LSAB-Methode) wird zur Detektion von  $\alpha$ -smc(alpha smooth muscle)-Aktin eingesetzt. Glattes Muskelzellaktin wird im normalen glatten Muskel und in myoepithelialen Zellen und auch in Tumoren exprimiert, die von diesen Zellen abgeleitet werden. Die Detektion des Aktins wird zur quantitativen Analyse von Gefäßen genutzt.

Der Proliferationsmarker Ki67 wird durch ein Fluorochrom sichtbar gemacht. Während des Zellzyklus wird das Ki67-Antigen in der G1-, S-, G2- und M-Phase exprimiert. Ruhende Zellen (G0-Phase) exprimieren das Ki67-Antigen nicht.

**Tabelle 11. Marker und auszuwertende Bereiche der immunhistologischen Färbungen und der Immunfluoreszenzfärbung**

<b>Darzustellendes AG</b>	<b>Ki67-AG</b>	<b>Desmin-AG</b>	<b>smc-Aktin-AG</b>
<b>Marker</b>	Proliferationsmarker	Intermediär-Filamentproteinmarker	Mesangialer Proliferationsmarker
<b>Auswertung</b>	Quantitative Analyse proliferierender Zellen im Infarkt-/Rand-/gesunden Bereich	Quantitative Analyse muskulärer Zellen im Rand- u. Infarktbereich	Quantitative Analyse der Gefäßdicke im Infarkt-/Rand-/gesunden Bereich

### 3.2.13.2.1 Immunhistologie

Prinzip der LSAB (Labelled-Streptavidin-Biotin)- bzw. ABC (Avidin-Biotin-Komplex)-Methode:

Die ABC- bzw. LSAB-Methode ist eine indirekte Methode, um ein bestimmtes Antigen (AG) darzustellen, d. h. nicht der Primärantikörper ist an ein Chromogen bzw. ein Markergen gekoppelt sondern erst der Sekundär- bzw. Tertiärantikörper. Dieses Detektionssystem basiert auf der hohen Affinität von Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) bzw. Avidin (Hühnereiweiß) zu Biotin. Das darzustellende AG wird mit einem unkonjugierten Primärantikörper markiert. Der Sekundärantikörper ist über kovalente Bindungen mit Biotin verbunden. Als Brückenantikörper bindet der Sekundärantikörper einerseits an die Fc-Fragmente der ersten Schicht und andererseits an das Streptavidin/Avidin der dritten Schicht. Das Tertiärreagenz besteht bei der LSAB-Methode aus enzymmarkiertem Streptavidin.

Bei der ABC-Methode entsteht durch Mischen der Komponenten Avidin und dem biotinmarkierten Enzym ein Avidin-Biotin-Enzymkomplex. Sowohl Streptavidin als auch Avidin weisen 4 Bindungsstellen für Biotin auf. Als Enzymmarker wird die alkalische Phosphatase (AP) verwendet. Bei Zugabe einer Chromogen-Substratlösung werden farblose Chromogene in gefärbte, unlösliche Produkte umgewandelt. Durch die AP werden Naphtholphosphatester des Substrats in Phenolverbindungen und Phosphate gespalten. Die Phenole reagieren mit farblosen Diazoniumsalzen des Chromogens, so dass sich unlösliche Azofarbstoffe bilden und der AG-Komplex visualisiert wird. Als Chromogen wird Liquid Permanent Red (LPR) (DakoCytomation) verwendet, welches am Zielantigen ein permanentes, rotes Reaktionsprodukt bildet.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

---

**Tabelle 12. Immunhistochemische Detektionsmethoden**

LSAB (Labelled-Streptavidin-Biotin)- und ABC (Avidin-Biotin-Komplex)-Methode

<b>Detektionsmethode</b>	<b>ABC</b>	<b>LSAB</b>
<b>Hohe Affinität zu Biotin</b>	Avidin (Hühnereiweiß)	Streptavidin ( <i>Streptomyces avidinii</i> )
<b>Primär-AK</b>	unkonjugiert	unkonjugiert
<b>Sekundär-AK</b>	biotinyliert	biotinyliert
<b>Tertiär Reagenz</b>	Avidin + Biotin-Enzymkomplex	enzymmarkiertes Streptavidin
<b>Enzym</b>	AP	AP
<b>Chromogen</b>	LPR	LPR

Immunhistologische Färbungen

Epitopendemaskierung

Eine Fixierung mit Formalin beruht v. a. auf einer Reaktion des Formalins mit basischen Aminosäuren. Dabei entstehen quervernetzte Hydroxymethylenbrücken. Entstehen reversible Konformationsänderungen, durch Reaktionen des Formalins mit Aminosäuren aus der Umgebung, so können diese durch proteolytische und/oder hitzeinduzierte Antigen-demaskierung wieder rückgängig gemacht werden.

Hitzeinduzierte Antigen-demaskierung

Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung werden die Objektträger zur Epitopendemaskierung in einen Dampfgerar, der mit Aqua dest. und Trispuffer (pH6) (DAKO Target Retrieval Solution 1 : 10 verdünnt mit Aqua dest.) gefüllt ist, gebracht. Die Retrieval-Lösung ist vortemperiert. Die Präparate werden für 30 Minuten gekocht. Die anschließende Abkühlung erfolgt langsam.

Färbung der Paraffinschnitte mit anti- $\alpha$ -smc-Aktin-AK

Detektionssystem: LSAB-AP

Gefärbt werden die Herzpräparate der Versuchstiergruppe 1.

Die Proben sind, wie oben beschrieben, getrocknet, entparaffiniert und rehydriert.

Die Präparate werden nach jedem Arbeitsschritt 3-mal mit Trispuffer gespült. Der primäre monoklonale-Maus-anti-humane- $\alpha$ -smooth-muscle-Aktin-AK (Klon: 1A4) der Firma Dako Corporation, Carpinteria, USA wird auf die Präparate aufgegeben und 10 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wird der sekundäre

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

biotinylierte-anti-Kaninchen- und anti-Maus-AK (Link, Dako LSAB®2 Kit, AP, Dako Corporation, Carpinteria, USA) für 10 Minuten auf die Proben aufgetragen. Das Streptavidin-Alkaline-Phosphatase-Konjugat (Streptavidin Alkaline Phosphatase, Dako LSAB®2 Kit, AP) wird folgend für 10 Minuten aufgegeben. Danach wird das Chromogen (Liquid Permanent Red, DakoCytomation, Dänemark) hinzugegeben. Die Inkubation der Präparate mit der Substrat-Chromogen-Lösung dauert 5 Minuten. Abschließend werden die Schnitte mit Hämalaun gegengefärbt, gespült, in Xylol eingestellt und eingedeckelt.

**Tabelle 13. Materialien zur immunhistologischen  $\alpha$ -smc-Aktin-Färbung**

Materialien		Hersteller
<b>Primär-AK Klon</b>	Maus-anti-humanes- $\alpha$ -smc-Aktin-IgG2a monoklonal (1A4)	Dako Corporation, Carpinteria, USA
<b>Sekundär-AK</b>	biotinyliertes anti-Kaninchen-, anti-Maus-IgG	Dako Corporation, Carpinteria, USA
<b>Enzymkonjugat</b>	LSAB-AP	Dako Corporation, Carpinteria, USA
<b>Chromogen</b>	LPR	DakoCytomation, Dänemark
<b>Gegenfärbung</b>	Hämalaun	Merck, Darmstadt

Färbung der Paraffinschnitte mit anti-Desmin-AK

Detektionssystem: ABC-AP

Gefärbt werden die Herzpräparate der Versuchstiergruppe 1.

Die Proben sind, wie oben beschrieben, getrocknet, entparaffiniert, rehydriert und demaskiert. Nach jedem Arbeitsschritt werden die Objektträger 3-mal mit Tris-Puffer gespült. Vor der Zugabe des Primär-AK werden die Präparate mit einer Normalserum-Blockierlösung (Vectastain®ABC-AP Kit, Normal-Ziegen-Serum, Linaris, Wertheim-Bettingen) behandelt, um eine unspezifische Bindung der AK zu verhindern. Nach diesem Schritt erfolgt keine Spülung. Der Primär-AK (polyklonaler Kaninchen-anti-humaner-Desmin-AK) der Firma Abcam, Cambridge, England wird mit einem Diluenten im Verhältnis 1 : 300 verdünnt, aufgetragen und für 1 Stunde inkubiert. Die Objektträger werden 3-mal mit Tris-Puffer gespült, gründlich abgeschüttelt und in eine feuchte Kammer gelegt. Anschließend wird der biotinylierte Sekundär-AK, ein polyklonaler Kaninchen IgG-AK, (Vectastain®, ABC-AP Kit Ziege-anti-Kaninchen IgG: Biotin, Linaris, Wertheim-Bettingen) aufgetropft und für 30 Minuten inkubiert. Das Avidin-Biotin-Alkalische-Phosphatase-Gemisch (Vectastain®, ABC-AP Kit, Reagent A: Avidin DH solution und Reagent B: AP) wird eine halbe Stunde vor

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Gebrauch angesetzt, auf die Objektträger gegeben und eine Stunde inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe des Chromogens (Dako®, Liquid Permanent Red, DakoCytomation, Dänemark). Die Präparate werden mit der Substrat-Chromogen-Lösung 5 Minuten inkubiert. Abschließend werden die Präparate mit Hämalaun gegengefärbt, gespült, in Xylol eingestellt und eingedeckelt.

**Tabelle 14. Materialien zur immunhistologischen Desmin-Färbung**

<b>Materialien</b>		<b>Hersteller</b>
<b>Primär-AK Klon</b>	Kaninchen-anti-Desmin-IgG polyklonal	Abcam, Cambridge, England
<b>Sekundär-AK</b>	biotinyliertes anti-Kaninchen- IgG	Linaris, Wertheim-Bettingen
<b>Enzymkonjugat</b>	ABC-AP	Linaris, Wertheim-Bettingen
<b>Chromogen</b>	LPR	DakoCytomation, Dänemark
<b>Gegenfärbung</b>	Hämalaun	Merck, Darmstadt

### 3.2.13.2.2 Immunfluoreszenz

Bei der Immunfluoreszenzfärbung von Ki67+ Zellen werden Sekundärantikörper eingesetzt, die mit einem Fluorochrom markiert sind. Durch Energieanregung kommt es zum farbigen Aufleuchten des Fluorochroms (sekundäre Fluoreszenz). Dabei haben die verschiedenen Fluorochrome die Fähigkeit, Licht einer jeweils bestimmten Wellenlänge aufzunehmen (Absorption) und Photonen in einem anderen jeweils spezifischen Wellenlängenbereich abzugeben (Emission). Der Sekundärantikörper zur Darstellung von Ki67+ Zellen ist mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC), einem Derivat des Fluoreszeins, welches gelb-grün leuchtet, markiert. Das Absorptionsspektrum liegt bei 495 nm, das Emissionsspektrum bei 528 nm. Als Gegenfärbung wird der blaue Farbstoff DAPI (4,6-Diamino-2-Phenylindol) verwendet. Eine Negativ-Kontrolle wird mitgeführt, um gegebenenfalls eine Autofluoreszenz des Gewebes bei der Auswertung der Präparate berücksichtigen zu können.

#### Immunfluoreszenzfärbung des Ki67-AGs

Gefärbt werden die Herzpräparate der Tiergruppe 1, 2 und 3.

Die Präparate sind getrocknet und entparaffiniert. Vor der Färbung werden die Schnitte über Nacht in Trispuffer (4 °C) gelagert. Die Demaskierung des Gewebes erfolgt, wie oben beschrieben, im Dampfgerar. Nach jedem der folgenden Arbeitsschritte erfolgt eine Waschung mit Trispuffer. Der primäre Ki67-Maus-AK (BD-Pharmingen, Heidelberg), der

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

---

mit einem Diluenten im Verhältnis 1 : 50 versetzt ist, wird auf die Objektträger aufgegeben und für eine Stunde bei 4 °C, lichtgeschützt und in einer feuchten Kammer, inkubiert. Der Sekundär-AK, der gegen den Primär-Ki67-Maus-AK gerichtet ist, ist an den Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt. Verdünnt im Verhältnis 1 : 50 wird er auf den Objektträger aufgetragen und bei einer Temperatur von 4 °C in einer feuchten Kammer, vor Licht geschützt inkubiert. Die Präparate werden mit dem Einschlussmedium Dapi (Dako® Fluorescent Mounting Medium, Dako GmbH, Hamburg) gefärbt und eingedeckelt.

**Tabelle 15. Materialien zur Immunfluoreszenzfärbung (Ki67)**

Materialien		Hersteller
<b>Primär-AK Klon</b>	Maus-anti-Ki67-IgG1 monoklonal (B56)	Pharmingen BD, Heidelberg
<b>Sekundär- AK</b>	Esel-anti-Maus-IgG, H+L	Dianova, Hamburg
<b>Fluorochrom</b>	FITC	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK
<b>Gegenfärbung</b>	DAPI	Dako, Hamburg

### 3.2.14 Zellproliferations-Assay

Der Zellproliferations-ELISA (enzym-linked immunosorbent assay) ist ein kolorimetrischer Immuntest, mit welchem die Zellproliferation bewertet wird. Es soll die Induktion der Zellproliferation von H9C2 Zellen durch IGF-II nachgewiesen und quantifiziert werden. H9C2 Zellen sind immortale, ventrikuläre, myoblastäre Zellen, welche von ATCC (American Type Culture Collection, Rockwill, USA) erworben werden. Die Methode basiert auf der Messung von BrdU (5-Brom-2'-deoxyuridin), dass bei der DNA-Synthese anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut wird. Verwendet wird ein Zell-Proliferation-ELISA Kit der Firma Roche (Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen).

H9C2 Zellen werden in DMEM® (Dulbeccos modified Eagle Medium, Bio-Whittackers, Veviers, Belgien) und 10 %igem FCS (fetal calf serum) bei 37 °C kultiviert. Die Passagezeit beträgt 48 Stunden. Danach werden sie trypsinisiert und entweder weiterpassagiert oder für den Proliferations-ELISA verwendet.

Für den Proliferations-ELISA werden die H9C2 Zellen mit unterschiedlich hoch konzentrierten IGF-II Lösungen (0, 1, 10, 20 und 25 ng IGF-II/ml) in einer 96-Well-Platte kultiviert. Pro Well werden 3000 H9C2 Zellen ausgelegt. Das Endvolumen beträgt 100 µl/Well.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

---

Die Inkubation erfolgt in feuchter Atmosphäre bei 37 °C für 24 Stunden. Pro Well (100 µl) werden 10 µl BrdU-labelling-Lösung (BrdU verdünnt mit sterilem Kulturmedium im Verhältnis 1:100) zu einer Endkonzentration von 10 µM BrdU/Well vermischt. Es folgt eine Reinkubation bei 37 °C für 20 Stunden. Das Labelling-Medium wird anschließend durch Absaugen entfernt. Durch Zugabe und Inkubation (30 min bei 20 °C) von FIXDenat (200 µl/Well) werden die Zellen fixiert und die DNA denaturiert. Die Denaturierung wird durchgeführt, um die Zugänglichkeit eines Antikörpers zur Detektion des inkorporierten BrdU zu verbessern. Anschließend wird die FIXDenat-Lösung entfernt. Die Anti-BrdU-POD-Stammlösung beinhaltet einen monoklonalen Antikörper aus Maus-Maus-Hybridzellen (Klon BMG 6H8, Fab-Fragmente), welcher mit Peroxidase (POD) konjugiert ist. Die Anti-BrdU-POD-Stammlösung wird mit einer Antikörper-Verdünnungslösung (AK-dilution-solution) im Verhältnis 1 : 1000 zu einer Anti-BrdU-POD-Arbeitslösung vermischt. In jedes Well werden 100 µl der Arbeitslösung gegeben. Die 96-Well-Platten werden für 90 Minuten bei 20 °C inkubiert. Der BrdU-Antikörper bindet an BrdU, das in neu synthetisierte, zelluläre DNA eingebaut ist. Das Antikörperkonjugat wird entfernt und die Platten werden 3-mal mit 300 µl Waschlösung (Waschpufferkonzentrat (PBS) verdünnt mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1 : 10) pro Well gewaschen. Danach wird die Waschlösung entfernt. Es folgt die Zugabe von 100 µl/Well Substratlösung (TBM: Tetramethyl-Benzidin). Die Inkubation erfolgt bei 20 °C. Die Immunkomplexe werden anhand einer folgenden Substratreaktion detektiert.

Das Reaktionsprodukt wird bei der Messung seines Absorptionsvermögens durch ein Spektrophotometer (ELISA Reader) bei 370 nm quantifiziert. Die Farbentwicklung und die bedingten Absorptionswerte korrelieren direkt mit der Menge der synthetisierten DNA und damit mit der Anzahl proliferierender Zellen in der entsprechenden Mikrokultur.

### 3.2.15 Statistische Berechnungen und Dokumentation

Die Ergebnisse der Untersuchungen werden für jede Gruppe (Kontrolle, EPC-pLXSN, EPC-IGF-II) als Mittelwert (MW) zusammen mit dem Standardfehler (SEM) angegeben. Die Berechnung erfolgt mit Hilfe der SPSS Version 10.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, USA). Die Mittelwertsunterschiede zwischen den Zell- und Kontrollgruppen werden anhand von t-Tests auf Signifikanz geprüft. Als statistisch signifikant gilt ein Wert, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  ist. Der Wert zeigt eine Tendenz an, wenn  $p < 0,1$  ist.

## 3.3 Ergebnisse

### 3.3.1 Gesteigerte RNA Expression in IGF-II transduzierten EPC

In der Gelelektrophorese wurde der Erfolg der retroviralen Transduktion von IGF-II im pLXSN Vektor in EPC untersucht. Als Vergleich wurde die DNA von EPC-pLXSN aufgetrennt. J82-Zellen (Blasenkarzinomzellen) wurden als Negativ-Kontrolle mitgeprüft.

Nach der Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte die Umschreibung in DNA durch eine reverse Transkription. Die DNA wurde amplifiziert (PCR) und anschließend in der Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Fragmentbanden stellten sich durch Immunfluoreszenz dar. Die Größe der DNA (Anzahl der Basenpaare) wurde anhand einer 100 bp DNA-Leiter bestimmt. Nach Abschluss der Laufzeit wurde die DNA auf einem Transluminator mit kurzzeitigem UV-Licht sichtbar gemacht. Das Ergebnis wurde als Bilddatei gespeichert.

Für IGF-II wurde eine Basenpaaranzahl von 319 erwartet. Die Abbildung 10 zeigt die Höhe der Fragmentbanden nach Beendigung der Laufzeit. Die Fragmentbande der DNA aus EPC-IGF-II liegt, abgelesen an der bp-Leiter, bei 319 bp, was für IGF-II spezifisch ist. Die Laufreihen der EPC-pLXSN und J82-Zellen weisen keine IGF-II spezifischen Fragmentbande auf.

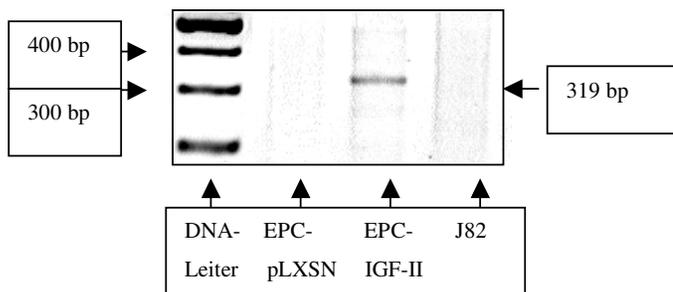


Abbildung 10. Laufmuster der Gelelektrophorese

### 3.3.2 Ergebnisse der in vivo Untersuchungen

#### 3.3.2.1 Perioperative Komplikationen

Nahe der Ansatzstelle des linken Herzohres zweigt die LAD (left anterior descending artery) als erster Seitenast aus der linken Koronararterie ab. Diese Stelle ist deutlich sichtbar und dient als Anhaltspunkt für den Verlauf der LAD.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Nach der Eröffnung und Verlagerung des linken Herzohres war die LAD in insgesamt 89,7 % der Fälle deutlich sichtbar. Bei 6 von 58 Tieren (10,3 %) konnte die LAD auf Grund ihrer tiefen intramuralen Lage nicht gesehen werden. Die Ligatur der LAD erfolgte in diesen Fällen „blind“. Bei 5 von diesen 6 Tieren war keine eindeutige Ischämie sichtbar und die Tiere wurden nicht in die Versuchsauswertung einbezogen. Bei einem dieser Tiere konnte die Ligatur trotzdem erfolgreich durchgeführt werden.

Der Grad des Blutverlustes wurde in gering, mittel und hoch eingeteilt.

Bei dem Abbinden der LAD traten bei insgesamt 41,4 % der Tiere Blutungen auf. Dabei handelte es sich bei 19,0 % um geringe und bei 17,2 % um mittelgradige Blutungen. 5,2 % der 58 Tiere erlitten einen hochgradigen Blutverlust und starben intra operationem. Respiratorische Komplikationen traten insgesamt bei 5,2 %, Arrhythmien bei insgesamt 10,3 % der Tiere auf. Zwischen den Tiergruppen bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich des Auftretens von Komplikationen. Tabelle 16 stellt dar, wie hoch der prozentuale Anteil der perioperativen Komplikationen in den einzelnen Gruppen war.

**Tabelle 16. Perioperative Komplikationen der Versuchstiergruppen 1 - 3**

Zellgruppen: Transplantation von EPC-pLXSN oder EPC-IGF-II; Kontrollgruppe: Injektion von PBS, n Anzahl der Tiere, LAD left anterior descending artery, + geringgradig, ++ mittelgradig, +++ hochgradig  
Es besteht keine Signifikanz zwischen den Gruppen.

<b>Komplikationen</b>	<b>Kontrolle (n = 21)</b>	<b>EPC-pLXSN (n = 17)</b>	<b>EPC-IGF-II (n = 20)</b>
<b>LAD nicht sichtbar</b>	4,8 %	17,6 %	10,0 %
<b>Ischämie +</b>	4,8 %	11,8 %	10,0 %
<b>Ischämie +++</b>	95,2 %	88,2 %	90,0 %
<b>Blutungen insgesamt</b>	42,9 %	47,1 %	35,0 %
<b>+</b>	19,0 %	23,5 %	15,0 %
<b>++</b>	14,3 %	23,5 %	15,0 %
<b>+++</b>	9,5 %	x	5,0 %
<b>Respiratorische Probleme</b>	0,0 %	5,9 %	10,0 %
<b>+</b>	x	x	x
<b>++</b>	x	5,9 %	10,0 %
<b>+++</b>	x	x	x
<b>Arrhythmien</b>	14,3 %	11,8 %	5,0 %
<b>Tod intra operationem</b>	9,5 %	x	5,0 %

### 3.3.2.2 Postoperative Komplikationen

Der Zustand der Tiere wurde postoperativ im Intervall von 12 Stunden und ab der 72. Stunde einmal täglich überprüft. Ein besonderes Augenmerk wurde auf Veränderungen, die auf Schmerzen oder Herz-Kreislaufversagen hindeuten, gelegt. Hierbei wurde das Allgemeinbefinden, die Körperhaltung, das Pflegeverhalten, das Temperament, der Ernährungs- und Hydratationszustand, die Atemfrequenz, der Herzstoß, die Körperwärme (mit besonderer Beachtung der Gliedmaßen), die Atmung sowie die Symmetrie bzw. der Umfang des Thorax und Abdomens untersucht. In der Kontroll- und der EPC-IGF-II-Gruppe verstarb innerhalb der ersten 10 Stunden nach Myokardinfarkt je eines der Tiere. Bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung des Herzens war eine hochgradige Blässe des linken Ventrikels zu sehen. Die Lunge war dunkelrot und unvollständig retrahiert. Die Schnittfläche war feucht und blutig, in den Bronchien war blutiger Schaum. In der EPC-pLXSN-Gruppe entstanden durch postoperative Komplikationen keine Tierverluste. In Bezug auf die postoperative Sterblichkeit bestand keine Signifikanz zwischen den Gruppen. Im Rahmen der Untersuchung der Tiere im 12 Stunden Intervall ergaben sich keine mittel- oder hochgradigen Beeinträchtigungen des Allgemeinbefindens, so dass keines der Tiere auf Grund postoperativer Komplikationen eingeschläfert wurde.

**Tabelle 17. Postoperative Komplikationen der Versuchstiergruppen 1 - 3**

Zellgruppen: Transplantation von EPC-pLXSN oder EPC-IGF-II; Kontrollgruppe: Injektion von PBS, n Anzahl der Tiere, es besteht keine Signifikanz zwischen den Gruppen.

<b>Postoperative Komplikationen</b>	<b>Kontrolle (n = 21)</b>	<b>EPC-pLXSN (n = 17)</b>	<b>EPC-IGF-II (n = 20)</b>
<b>Tod post OP</b>	4,8 %	0,0 %	5,0 %

### 3.3.2.3 Linksventrikuläre Funktion

Durch eine 30minütige Okklusion wurde bei Nacktratten eine myokardiale Ischämie verursacht. Der Umfang der Ischämie wurde intra operationem anhand der Ausdehnung und Stärke der Blässe visuell beurteilt. Eine intramyokardiale Applikation erhielten nur Tiere mit visuell vergleichbaren Infarktgrößen. Die Zellgabe sowie die sonographischen Untersuchungen erfolgten geblindet.

Die sonographischen Untersuchungen wurden durchgeführt, um Veränderungen der linksventrikulären Funktion zu verschiedenen Zeitpunkten nach Myokardinfarkt zu detektieren. Dabei wurden die 3 Gruppen (Kontroll-, EPC-pLXSN- und EPC-IGF-II-Gruppe) zu 3 verschiedenen Zeitpunkten verglichen. Vor MI wurde der Basalwert ermittelt. Die Untersuchungen wurden am 7. und 14. Tag nach myokardialer Ischämie/Reperfusion wiederholt. Aus den gemessenen enddiastolischen und endsystolischen Volumina (EDV, ESV) konnte die Auswurfrate des linken Ventrikels (EF %) berechnet werden.

EF (in %)

Der physiologische Basalwert der EF, der vor der Operation für die 3 Gruppen ermittelt wurde, betrug durchschnittlich  $56,5 \pm 0,4$  %. 7 Tage nach der OP sank die EF der Kontrollgruppe auf einen Mittelwert von  $48,7 \pm 1,3$  %. Die EF der EPC-pLXSN-Gruppe lag bei  $50,2 \pm 0,6$  %. Signifikant geringer war die Reduktion der EF in der EPC-IGF-II-Gruppe ( $54,2 \pm 0,9$  %) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p = 0,004$ ) und zur EPC-pLXSN-Gruppe ( $p = 0,002$ ). Nach 14 Tagen sank der EF-Wert der Kontrolltiere weiter auf  $47,3 \pm 1,8$  %. In der EPC-pLXSN-Gruppe stieg die EF auf  $51,4 \pm 0,7$  % und war signifikant höher als die EF der Kontrollgruppe ( $p = 0,05$ ). Der EF-Wert der EPC-IGF-II Tiere war nach 14 Tagen um  $0,6$  % gesunken und betrug  $53,6 \pm 0,5$  %. Im Vergleich zur Kontroll- und EPC-pLXSN-Gruppe war die EF der EPC-IGF-II-Gruppe signifikant höher ( $p = 0,005$  vs. Kontrolle;  $p = 0,019$  vs. EPC-pLXSN). In Tabelle 18 werden die EF-Werte der Kontrollgruppe denen der EPC-pLXSN-Gruppe gegenübergestellt. Tabelle 19 zeigt die Gegenüberstellung der EF-Werte der EPC-pLXSN- und der EPC-IGF-II-Gruppe.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

---

**Tabelle 18. Gegenüberstellung der linksventrikulären Auswurffraktion (EF) der Kontroll- und der EPC-pLXSN-Gruppe**

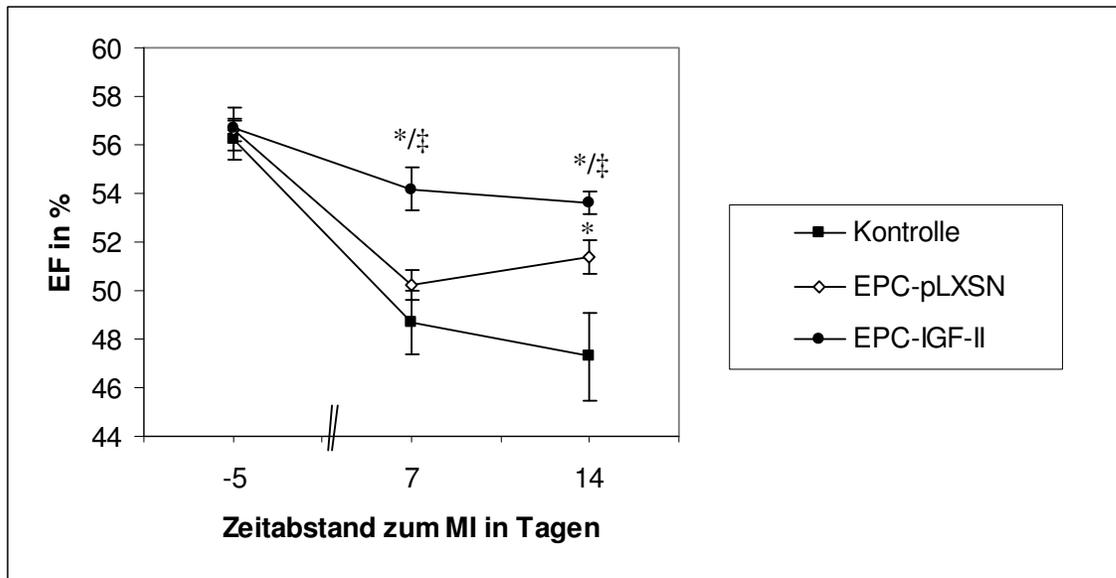
Zellgruppe: Transplantation von EPC-pLXSN; Kontrollgruppe: Injektion von PBS, MI Myokardinfarkt, MW Mittelwert, SEM Standardfehler, n Anzahl der Tiere, p-Wert Irrtumswahrscheinlichkeit, n.s. nicht signifikant

Zeitabstand zum MI	Kontrolle	EPC-pLXSN	p-Wert
	MW ± SEM (n = 11)	MW ± SEM (n = 9)	
<b>vor</b>	56,2 ± 0,8	56,6 ± 0,5	n.s.
<b>7d post</b>	48,7 ± 1,3	50,2 ± 0,6	n.s.
<b>14d post</b>	47,3 ± 1,8	51,4 ± 0,7	p = 0,05

**Tabelle 19. Gegenüberstellung der linksventrikulären Auswurffraktion (EF) der pLXSN- und der EPC-IGF-II-Gruppe**

Zellgruppen: Transplantation von EPC-pLXSN oder EPC-IGF-II, MI Myokardinfarkt, MW Mittelwert, SEM Standardfehler, n Anzahl der Tiere, p-Wert Irrtumswahrscheinlichkeit, n.s. nicht signifikant

Zeitabstand zum MI	EPC-pLXSN	EPC-IGF-II	p-Wert
	MW ± SEM (n = 9)	MW ± SEM (n = 10)	
<b>vor</b>	56,6 ± 0,5	56,7 ± 0,9	n.s.
<b>7d post</b>	50,2 ± 0,6	54,2 ± 0,9	p = 0,002
<b>14d post</b>	51,4 ± 0,7	53,6 ± 0,5	p = 0,019



**Abbildung 11. Linksventrikuläre Auswurfraction (EF) der Versuchstiergruppen**

-5 Tage: Ultraschalluntersuchung vor experimentellem Myokardinfarkt; 7 Tage und 14 Tage: Zeitabstand zwischen experimentellem Myokardinfarkt und der sonographischen Untersuchung, Zellgruppen: Transplantation von EPC-pLXSN oder EPC-IGF-II; Kontrollgruppe: Injektion von PBS, \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, ‡  $p < 0,05$  vs. EPC-pLXSN,  $p$  Irrtumswahrscheinlichkeit

### 3.3.3 Ergebnisse der ex vivo Untersuchungen

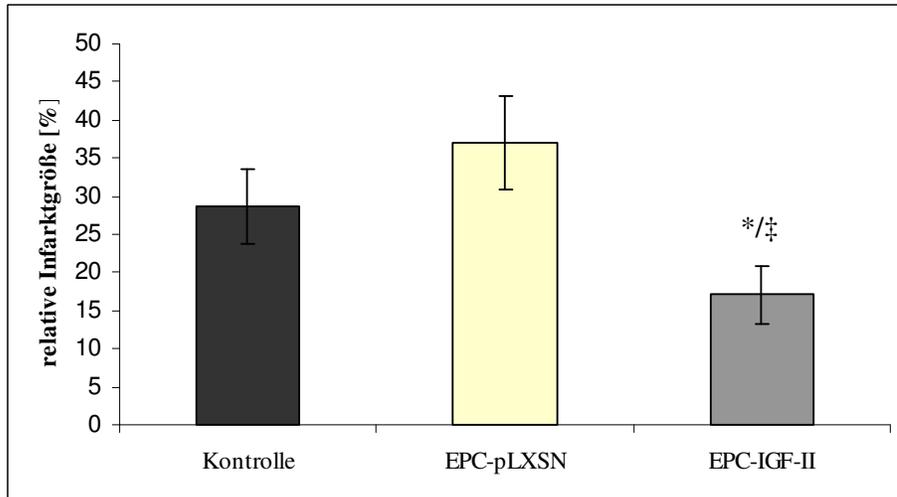
Es wurden nur Präparate ausgewertet, die von Tiere stammten, bei denen nach 30minütiger Okklusion der LAD visuell vergleichbar große ischämische Areale vorlagen. Die intramyokardiale Transplantation von EPC-pLXSN, EPC-IGF-II bzw. des PBS erfolgte, wie unter 3.2.8 beschrieben, geblindet.

#### 3.3.3.1 Infarktgröße

Gewebeschnitte des Herzens wurden mit EvG gefärbt und zur weiteren Auswertung mit 10facher Vergrößerung fotografiert. Die Fläche des linken Ventrikels, die Fläche der linken Cavität, die Infarktfläche (Fläche des kollagenen Bindegewebes) und die Wanddicken sowohl im Infarktgebiet als auch im gesunden Bereich, wurden mit Hilfe des Bildanalyseprogramms „Sigma Scan Pro5, Image Analysis Version 5.0.0“ planimetrisch ausgewertet und der Prozentanteil des Infarkts an der linken Herzhälfte berechnet (relative Infarktgröße). Damit konnte die relative Infarktgröße für insgesamt 30 Tiere, die 14 Tage nach MI euthanasiert wurden, berechnet werden. 10 Tiere erhielten nach Ischämie/Reperfusion eine intramyokardiale Applikation von EPC-IGF-II. Eine intramyokardiale Applikation von EPC-pLXSN wurde bei 9 Tieren durchgeführt. Eine Kontrollgruppe, der intramyokardial PBS

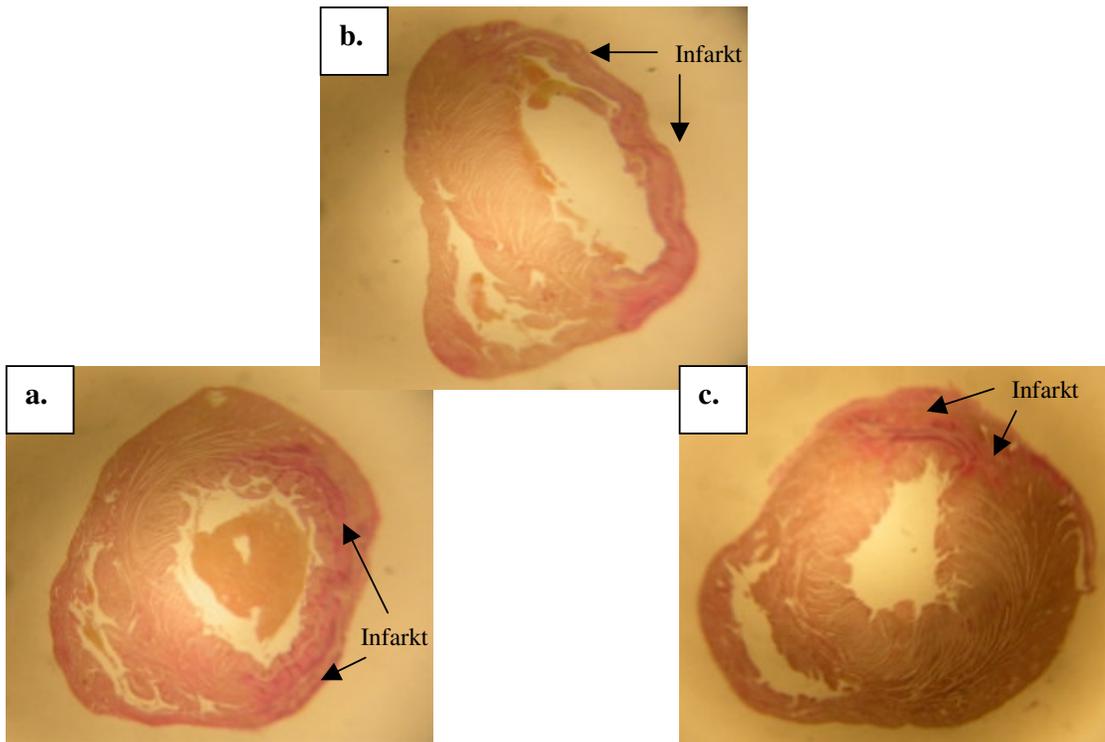
nach Ischämie/Reperfusion verabreicht wurde, bestand aus 11 Tieren. Bei der Kontrollgruppe ergab sich eine rel. Infarktgröße von  $28,7 \pm 5,0 \%$ , für die EPC-pLXSN Gruppe ein Mittelwert von  $37,0 \pm 6,1 \%$ . In der EPC-IGF-II-Gruppe war die rel. Infarktgröße ( $17,1 \pm 3,9 \%$ ) im Vergleich zur EPC-pLXSN-Gruppe signifikant ( $p = 0,02$ ) und im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell ( $p < 0,09$ ) kleiner. Die Abbildung 13 zeigt Herzpräparate mit repräsentativen Infarktgrößen. In Tabelle 20 sind die Ergebnisse der histomorphometrischen und histologischen Auswertung der Kontrollgruppe im Vergleich zur EPC-pLXSN-Gruppe dargestellt. Die Gegenüberstellung der Ergebnisse der EPC-pLXSN- und der EPC-IGF-II-Gruppe ist in Tabelle 21 dargestellt.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN



**Abbildung 12. Relative Infarktgröße: Prozentuales Verhältnis von infarziertem zu intaktem Myokard des linken Ventrikels 14 Tage nach MI**

Zellgruppen: Transplantation von EPC-pLXSN oder EPC-IGF-II; Kontrollgruppe: Injektion von PBS, p-Wert Irrtumswahrscheinlichkeit, \*  $p < 0,1$  vs. Kontrolle, ‡  $p < 0,05$  vs. EPC-pLXSN, MI Myokardinfarkt



**Abbildung 13. Rattenmyokard, EvG-Färbung**

Gruppenspezifisch repräsentative Querschnittspräparate des Rattenmyokards mit Infarkt (rot gefärbter Bereich) und Wandverdünnung im Versorgungsgebiet der LAD in der linken Ventrikelwand, Vergrößerung 10x;

- a. Kontrollgruppe,
- b. EPC-pLXSN-Gruppe,
- c. EPC-IGF-II-Gruppe

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

**Tabelle 20. Gegenüberstellung der Ergebnisse histomorphometrischer und immunhistologischer Untersuchungen der Kontroll- und der EPC-pLXSN-Gruppe**

Zellgruppen: Transplantation von EPC-pLXSN; Kontrollgruppe: Injektion von PBS, MW Mittelwert, SEM Standardfehler, n Anzahl der Tiere, p-Wert Irrtumswahrscheinlichkeit, n.s. nicht signifikant, \* Angabe der rel. Infarktgröße als Anteil des linken Ventrikels in %

Anzahl positiver Zellen	Kontrolle MW ± SEM (n = 11)	EPC-pLXSN MW ± SEM (n = 9)	p-Wert
<b>rel. Infarktgröße*</b>	28,7 ± 5,0	37,0 ± 6,1	n.s.
<b>Aktin Infarkt</b>	11,0 ± 1,9	14,4 ± 2,5	n.s.
<b>Aktin Rand</b>	4,7 ± 0,8	4,3 ± 0,4	n.s.
<b>Aktin Gesund</b>	2,2 ± 0,5	2,6 ± 0,5	n.s.
<b>Desmin Infarkt</b>	0 ± 0,0	0 ± 0,0	n.s.
<b>Desmin Rand</b>	44,7 ± 4,3	54,5 ± 5,4	n.s.

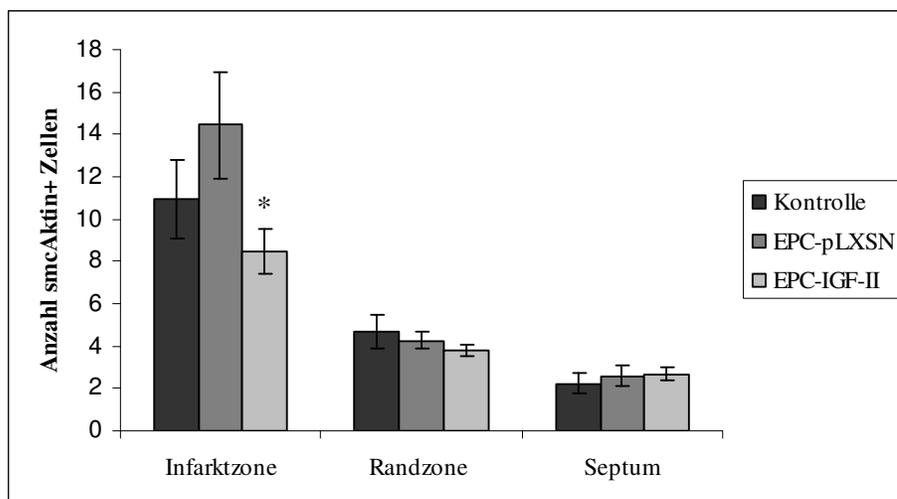
**Tabelle 21. Gegenüberstellung der Ergebnisse histomorphometrischer und immunhistologischer Untersuchungen der EPC-pLXSN- und der EPC-IGF-II-Gruppe**

Zellgruppen: Transplantation von EPC-pLXSN oder EPC-IGF-II, MW Mittelwert, SEM Standardfehler, n Anzahl der Tiere, p-Wert Irrtumswahrscheinlichkeit, n.s. nicht signifikant, \* Angabe der rel. Infarktgröße als Anteil des linken Ventrikels in %

Anzahl positiver Zellen	EPC-pLXSN MW ± SEM (n = 9)	EPC-IGF-II MW ± SEM (n = 10)	p-Wert
<b>rel. Infarktgröße*</b>	37,0 ± 6,1	17,1 ± 3,9	p = 0,02
<b>Aktin Infarkt</b>	14,4 ± 2,5	8,4 ± 1,1	p = 0,05
<b>Aktin Rand</b>	4,3 ± 0,4	3,8 ± 0,3	n.s.
<b>Aktin Gesund</b>	2,6 ± 0,5	2,7 ± 0,3	n.s.
<b>Desmin Infarkt</b>	0 ± 0,0	0 ± 0,0	n.s.
<b>Desmin Rand</b>	54,5 ± 5,4	58,0 ± 4,9	n.s.

3.3.3.2 Gefäßdichte

Anhand der Visualisierung von smc-Aktin-Antigenen durch eine Antikörpermarkierung wurde eine quantitative Analyse der Gefäße durchgeführt. Die Gefäßdichte wurde in den Herzpräparaten der Tiere, die 14 Tage nach Ischämie/Reperfusion euthanasiert wurden, bestimmt. In den 3 Gruppen (Kontrolle, EPC-pLXSN und EPC-IGF-II) wurde die Anzahl Aktin+ Zellen mit Hilfe eines Mikroskops im Infarktgebiet, in der Randzone und im gesunden Gewebe (Septum) ausgezählt. Ein Vergleich der 3 Gruppen ergab kaum Differenzen in der mittleren Zellzahl für das gesunde Areal (Kontrolle:  $2,2 \pm 0,5$  Aktin+ Zellen; EPC-pLXSN:  $2,6 \pm 0,5$  Aktin+ Zellen; EPC-IGF-II:  $2,7 \pm 0,3$  Aktin+ Zellen). Im Randbereich befanden sich entsprechend  $4,7 \pm 0,8$  (Kontrolle) vs.  $4,3 \pm 0,4$  (EPC-pLXSN) vs.  $3,8 \pm 0,3$  (EPC-IGF-II) Aktin+ Zellen. Es bestand keine Signifikanz zwischen den Gruppen für den gesunden und den Randbereich. Im Infarktgebiet der Kontrollgruppe befanden sich im Durchschnitt  $11,0 \pm 1,9$  Aktin+ Zellen. In der EPC-pLXSN-Gruppe war die Anzahl mit  $14,4 \pm 2,5$  Aktin+ Zellen höher. Wiederum bestand keine Signifikanz. In der EPC-IGF-II-Gruppe ist die Anzahl der Aktin+ Zellen ( $8,4 \pm 1,1$ ) im Infarktgebiet signifikant geringer als in der EPC-pLXSN-Gruppe ( $p = 0,05$ ).



**Abbildung 14. Gefäßdichte 14 Tage nach Myokardinfarkt**

Zellgruppen: Transplantation von EPC-pLXSN oder EPC-IGF-II; Kontrollgruppe: Injektion von PBS, p-Wert Irrtumswahrscheinlichkeit, \*  $p < 0,05$  vs. EPC-pLXSN

### 3.3.3.3 Anzahl muskulärer Zellen

Zur quantitativen Auswertung muskulärer Zellen wird Desmin, ein Intermediärfilament, in Gewebepräparate der Herzen durch Antikörpermarkierung detektiert. Die Anzahl Desmin positiver Filamente (Desmin+ Filamente) wird in den 3 Gruppen (Kontroll-, EPC-pLXSN- und EPC-IGF-II-Gruppe) jeweils im Infarkt- und Randgebiet bestimmt.

In Tabelle 20 wird die Anzahl Desmin+ Filamente im Randgebiet des Infarkts 14 Tage nach MI im Vergleich zwischen der Kontroll- und der EPC-pLXSN-Gruppe und in Tabelle 21 zwischen der EPC-pLXSN- und der EPC-IGF-II-Gruppe aufgeführt.

In der Kontrollgruppe wurden in diesem Gebiet  $44,7 \pm 4,3$  Desmin+ Filamente gezählt. Für die EPC-pLXSN-Gruppe ergab sich ein Mittelwert von  $54,5 \pm 5,4$  Desmin+ Zellen. In der EPC-IGF-II-Gruppe war die Anzahl Desmin+ Filamente ( $58,0 \pm 4,9$ ) tendenziell höher als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,08$ ). Zwischen den Gruppen bestand keine Signifikanz. Im Infarktgebiet befanden sich keine gefärbten Desminfilamente.

### 3.3.3.4 Anzahl proliferierender Zellen

Um die Zahl proliferierender Zellen bestimmen zu können, wurden histologischen Präparate der Herzen der 3 Gruppen (Kontroll-, EPC-pLXSN- und EPC-IGF-II-Gruppe) mit einem fluorochrommarkierten Antikörper gegen das Ki67 Antigen behandelt. Das Ki67 Antigen wird nur in Zellen, die den Zellzyklus durchlaufen exprimiert. Die Zahl proliferierender Zellen wurde im Infarktbereich, im Randbereich und im Gesunden (Septum) bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte zu 3 Zeitpunkten (3d, 7d und 14d nach MI). In Tabelle 22 wird die Anzahl der Ki67+ Zellen der Kontroll- und der EPC-pLXSN-Gruppe und in Tabelle 23 die der EPC-pLXSN- und der EPC-IGF-II-Gruppe vergleichend dargestellt.

3 Tage nach MI befanden sich im Durchschnitt  $242,7 \pm 160,4$  Ki67+ Zellen im Infarktgebiet der Kontrollgruppe, 2,7mal mehr als in der EPC-pLXSN-Gruppe ( $89,2 \pm 57,2$ ). Im Randbereich war die Anzahl Ki67+ Zellen in der EPC-pLXSN-Gruppe ( $206,3 \pm 31,9$ ) höher als in der Kontrollgruppe ( $180,1 \pm 50,0$ ). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der EPC-pLXSN- und der Kontrollgruppe.

In beiden Gruppen fiel nach 7 Tagen die Zahl Ki67+ Zellen in der Rand- und Infarktzone auf weniger als 30 Ki67+ Zellen ab. Nach 14 Tagen sank die Zahl Ki67+ Zellen in der

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

---

Kontrollgruppe um mehr als das 1,5fache (Infarkt:  $17,5 \pm 2,2$ ; Rand:  $13,8 \pm 2,0$ ). In der EPC-pLXSN-Gruppe blieb die Anzahl Ki67+ Zellen nahezu unverändert (Infarkt:  $27,0 \pm 3,9$ ; Rand:  $22,7 \pm 3,3$ ). 14 Tage nach MI war die Anzahl Ki67+ Zellen in der Kontrollgruppe im Infarktgebiet tendenziell ( $p = 0,06$ ) und im Randgebiet signifikant ( $p = 0,04$ ) niedriger als in der EPC-pLXSN-Gruppe.

3 Tage nach Induktion des Infarkts bestand zwischen der EPC-pLXSN-Gruppe und der EPC-IGF-II-Gruppe (Infarkt:  $139,9 \pm 49,6$ ; Rand:  $167,1 \pm 25,2$  Ki67+ Zellen) kein signifikanter Unterschied in der Anzahl Ki67+ Zellen. Nach 7 Tagen fiel die Anzahl Ki67+ Zellen in der EPC-IGF-II-Gruppe ( $92,6 \pm 20,1$  Zellen), blieb aber im Infarktgebiet tendenziell höher als in der EPC-pLXSN-Gruppe ( $p = 0,07$ ) und der Kontrollgruppe ( $p = 0,08$ ). Nach 14 Tagen waren die Zellzahlen der Ki67+ Zellen in der EPC-IGF-II-Gruppe (Infarkt:  $27,6 \pm 4,4$ ; Rand:  $22,1 \pm 3,1$ ) und der EPC-pLXSN vergleichbar hoch. Die Anzahl der Ki67+ Zellen in der EPC-IGF-II-Gruppe war im Infarktgebiet tendenziell ( $p = 0,06$ ) und im Randgebiet signifikant ( $p = 0,04$ ) höher im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Für den Randbereich ergab sich keine Signifikanz im Vergleich der 3 Gruppen.

Die Abbildungen 16, 18 und 20 zeigen repräsentative Photos analysierter Herzpräparate nach Immunfluoreszenzfärbung des Ki67-Antigens in den 3 Gruppen 3, 7 und 14 Tage nach MI.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

**Tabelle 22. Gegenüberstellung der Anzahl proliferierender Zellen 3 Tage, 7 Tage und 14 Tage nach Ischämie/Reperfusion in der Kontrollgruppe und der EPC-pLXSN-Gruppe**

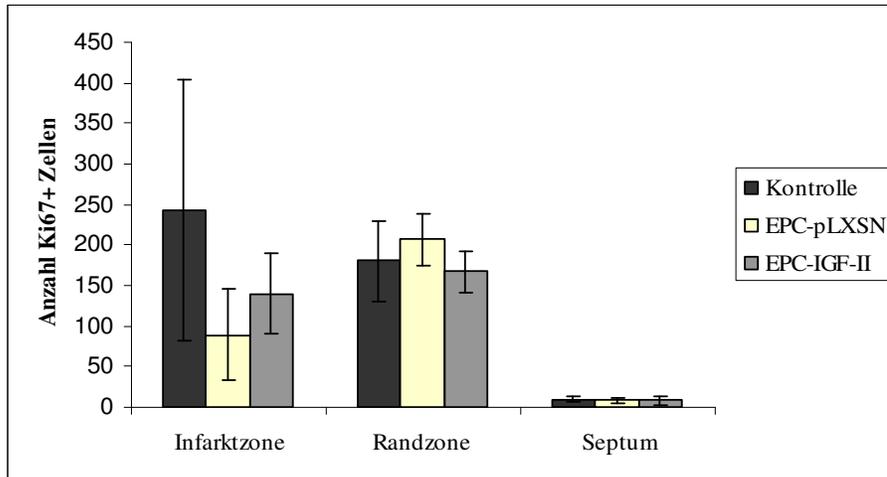
Zellgruppe: Transplantation von EPC-pLXSN; Kontrollgruppe: Injektion von PBS, MW Mittelwert, SEM Standardfehler, n Anzahl der Tiere, p-Wert Irrtumswahrscheinlichkeit, n.s. nicht signifikant, I/R Ischämie/Reperfusion

Zeit nach I/R	Analysierter Bereich	Kontrolle MW ± SEM (n = 11)	EPC-pLXSN MW ± SEM (n = 9)	p-Wert
3 d	Infarkt	242,7 ± 160,4	89,2 ± 57,2	n.s.
	Rand	180,1 ± 50,0	206,3 ± 31,9	n.s.
	Gesund	9,4 ± 3,2	8,2 ± 2,9	n.s.
7 d	Infarkt	27,5 ± 1,9	27,9 ± 8,7	n.s.
	Rand	20,8 ± 0,8	21,9 ± 4,7	n.s.
	Gesund	2,3 ± 0,2	2,4 ± 0,1	n.s.
14 d	Infarkt	17,5 ± 2,2	27,0 ± 3,9	p = 0,06
	Rand	13,8 ± 2,0	22,7 ± 3,3	p = 0,04
	Gesund	7,4 ± 1,6	14,7 ± 3,4	n.s.

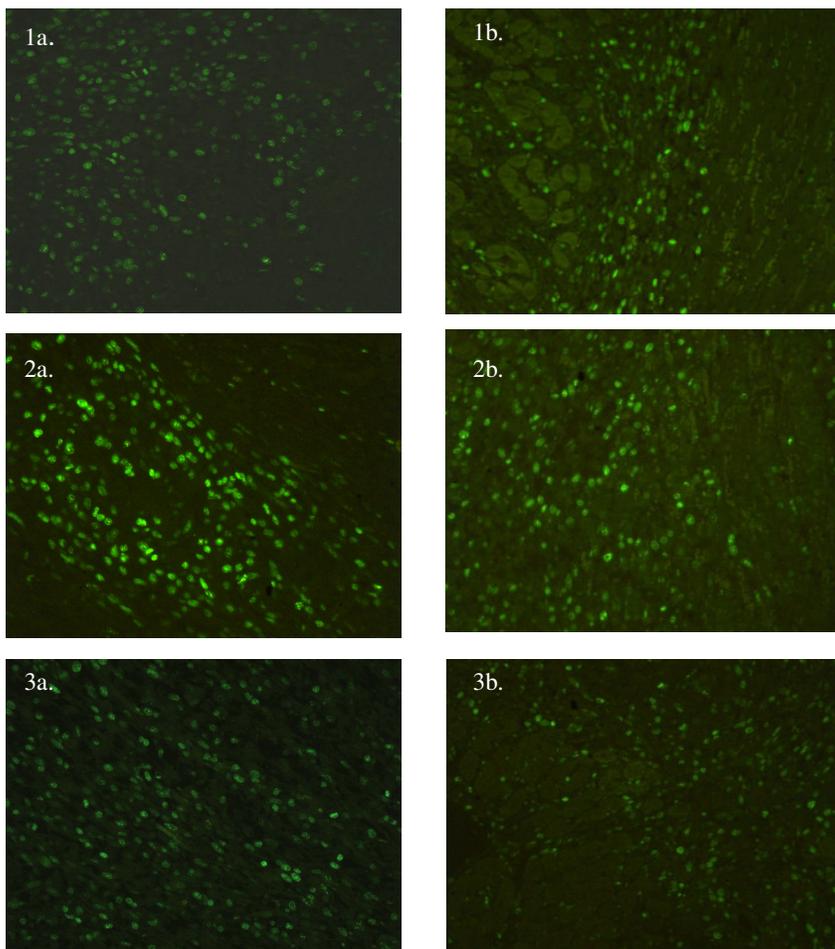
**Tabelle 23. Gegenüberstellung der Anzahl proliferierender Zellen 3 Tage, 7 Tage und 14 Tage nach Ischämie/Reperfusion in der EPC-pLXSN-Gruppe und der EPC-IGF-II -Gruppe**

Zellgruppe: Transplantation von EPC-pLXSN; Kontrollgruppe: Injektion von PBS, MW Mittelwert, SEM Standardfehler, n Anzahl der Tiere, p-Wert Irrtumswahrscheinlichkeit, n.s. nicht signifikant, I/R Ischämie/Reperfusion

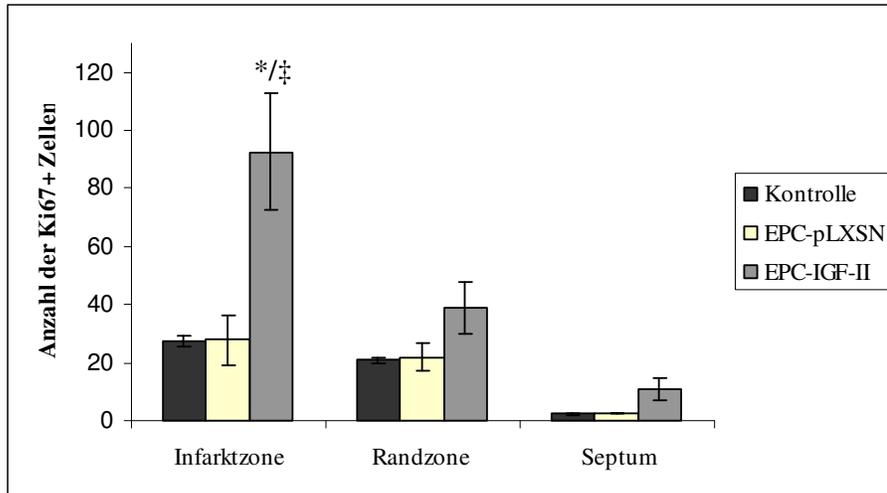
Zeit nach I/R	Analysierter Bereich	EPC-pLXSN MW ± SEM (n = 9)	EPC-IGF-II MW ± SEM (n = 10)	p-Wert
3 d	Infarkt	89,2 ± 57,2	139,9 ± 49,6	n.s.
	Rand	206,3 ± 31,9	167,1 ± 25,2	n.s.
	Gesund	8,2 ± 2,9	7,8 ± 5,3	n.s.
7 d	Infarkt	27,9 ± 8,7	92,6 ± 20,1	p = 0,07
	Rand	21,9 ± 4,7	39,0 ± 9,0	n.s.
	Gesund	2,4 ± 0,1	10,7 ± 3,9	n.s.
14 d	Infarkt	27,0 ± 3,9	27,6 ± 4,4	n.s.
	Rand	22,7 ± 3,3	22,1 ± 3,1	n.s.
	Gesund	14,7 ± 3,4	11,6 ± 2,0	n.s.



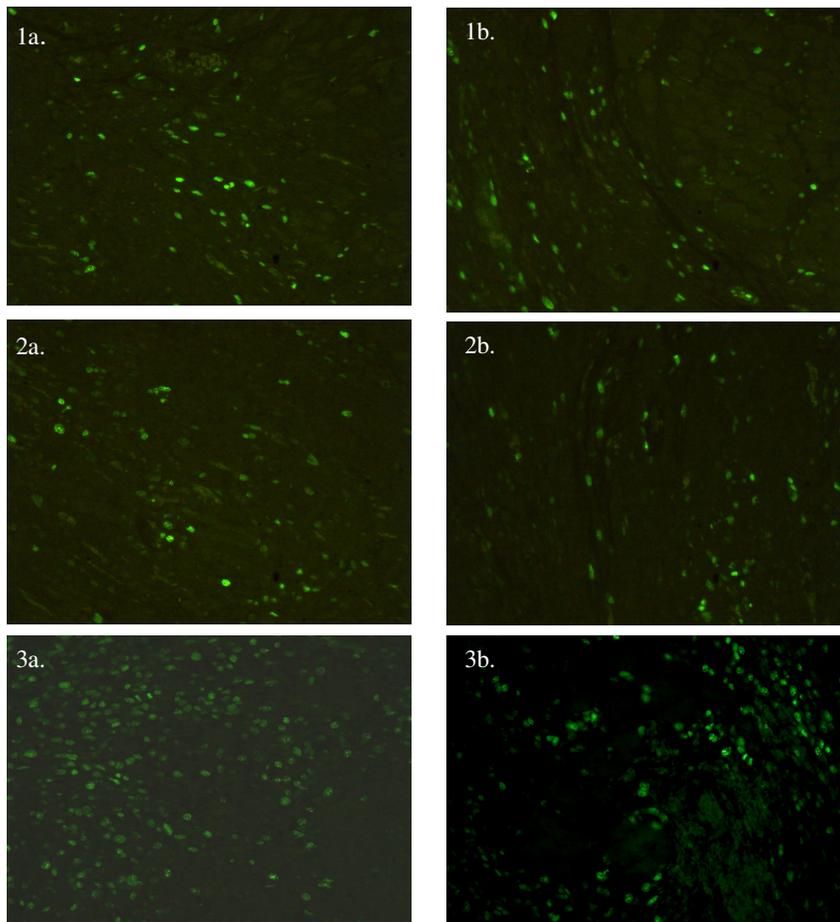
**Abbildung 15. Anzahl proliferierender Zellen 3 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt**  
 Zellgruppen: Transplantation von EPC-pLXSN oder EPC-IGF-II; Kontrollgruppe: Injektion von PBS  
 Es besteht keine Signifikanz zwischen den Gruppen



**Abbildung 16. Ki67+ Zellen 3 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt**  
 Darstellung gruppenspezifischer Photos der Ki67-Immunfluoreszenzfärbung vom Infarkt- und Randgebiet, Vergrößerung 20x, 1a. Kontrolle Infarkt, 1b. Kontrolle Rand; 2a. EPC-pLXSN Infarkt, 2b. EPC-pLXSN Rand; 3a. EPC-IGF-II Infarkt, 3b. EPC-IGF-II Rand

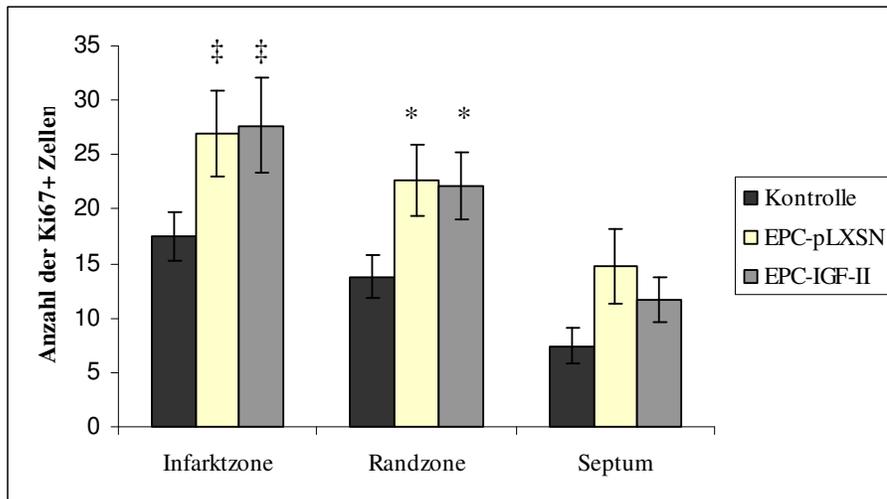


**Abbildung 17. Anzahl proliferierender Zellen 7 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt**  
 Zellgruppen: Transplantation von EPC-pLXSN oder EPC-IGF-II; Kontrollgruppe: Injektion von PBS, \*  $p < 0,1$  vs. Kontrolle, ‡  $p < 0,1$  vs. EPC-pLXSN, p-Wert Irrtumswahrscheinlichkeit

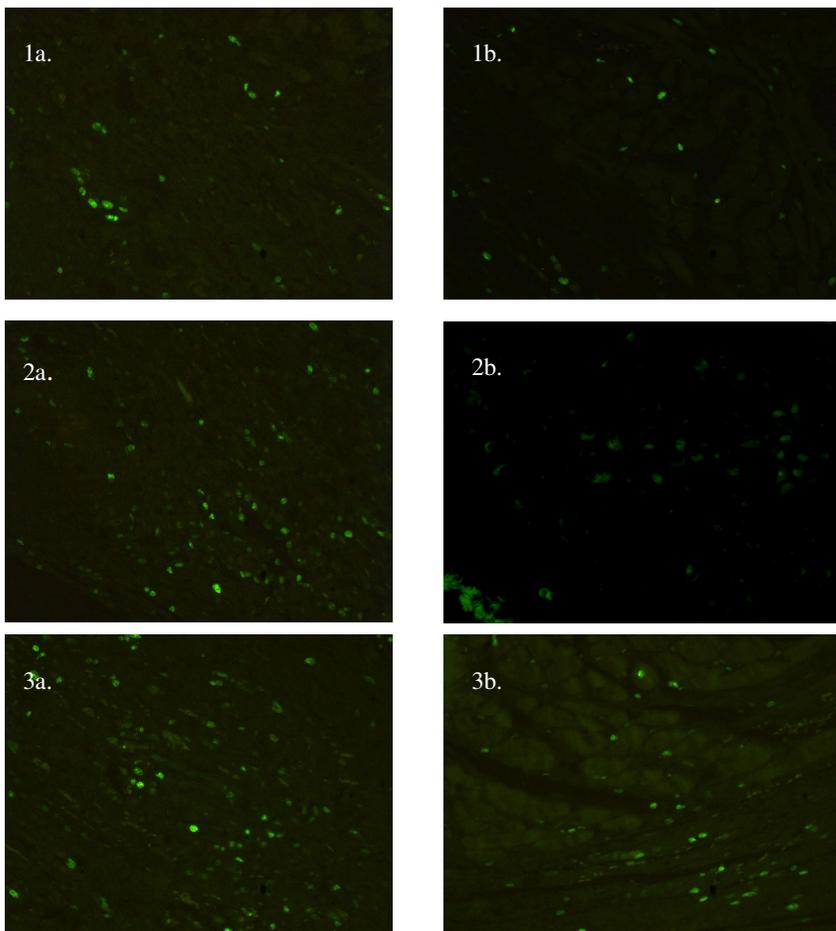


**Abbildung 18. Ki67+ Zellen 7 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt**  
 Darstellung gruppenspezifischer Photos der Ki67-Immunfluoreszenzfärbung vom Infarkt- und Randgebiet, Vergrößerung 20x, 1a. Kontrolle Infarkt, 1b. Kontrolle Rand; 2a. EPC-pLXSN Infarkt, 2b. EPC-pLXSN Rand; 3a. EPC-IGF-II Infarkt, 3b. EPC-IGF-II Rand

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN



**Abbildung 19. Anzahl proliferierender Zellen 14 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt**  
 Zellgruppen: Transplantation von EPC-pLXSN oder EPC-IGF-II; Kontrollgruppe: Injektion von PBS, p-Wert  
 Irrtumswahrscheinlichkeit, \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, ‡  $p < 0,1$  vs. Kontrolle



**Abbildung 20. Ki67+ Zellen 14 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt**  
 Darstellung gruppenspezifischer Photos der Ki67-Immunfluoreszenzfärbung vom Infarkt- und Randgebiet, Vergrößerung 20x, 1a. Kontrolle Infarkt, 1b. Kontrolle Rand; 2a. EPC-pLXSN Infarkt, 2b. EPC-pLXSN Rand; 3a. EPC-IGF-II Infarkt, 3b. EPC-IGF-II Rand

### 3.3.4 Wirkung von IGF-II auf die Proliferation ventrikulärer Kardiomyoblasten

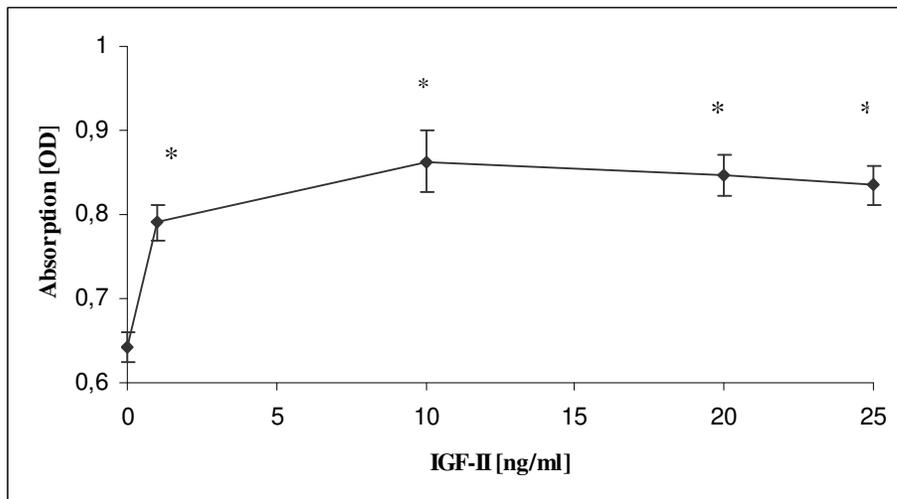
Mit Hilfe des Zellproliferations-Assays wurde die Induktion der Zellproliferation in ventrikulären Kardiomyoblasten (H9C2) durch IGF-II nachgewiesen und quantifiziert. BrdU, welches in die DNA proliferierender Zellen inkorporiert wurde, bildete ein Reaktionsprodukt, dessen Absorption durch ein Spektrophotometer (ELISA Reader) bei 370 nm quantifiziert wurde. Die Farbentwicklung und die bedingte Absorptionsintensität korreliert bei diesem Verfahren direkt mit der Menge der synthetisierten DNA und damit mit der Anzahl proliferierender Zellen in der entsprechenden Mikrokultur. Verglichen wurden die Absorptionswerte nach Inkubation der Zellen ohne (Kontrolle), mit 1ng, 10 ng, 20 ng und 25 ng IGF-II pro ml.

Eine Inkubation der Zellen ohne IGF-II Supplementierung (Kontrolle) ergab eine Absorption von  $0,64 \pm 0,02$  OD (optical density). Nach Zugabe von 1 ng IGF-II pro ml stieg die Absorption auf  $0,79 \pm 0,02$  OD. Die höchste Proliferationsrate war nach einem Zusatz von 10 ng/mg zu verzeichnen ( $0,86 \pm 0,04$  OD). Durch Behandlung der Zellen mit 20 ng IGF-II pro ml ergab sich eine Absorption von  $0,85 \pm 0,02$  OD. Eine OD von  $0,84 \pm 0,02$  ergab sich bei einer IGF-II Konzentration von 25 ng/ml.

**Tabelle 24. Ergebnisse des Proliferations-Assays**

Konz. Konzentration, OD optical density, MW Mittelwert, SEM Standardabweichung, p-Wert Irrtumswahrscheinlichkeit

<b>IGF-II Konz. ng/ml</b>	<b>Absorption in OD [370 nm] MW <math>\pm</math> SEM</b>	<b>p-Wert</b>
<b>0</b>	0,64 $\pm$ 0,02	
<b>1</b>	0,79 $\pm$ 0,02	< 0,001
<b>10</b>	0,86 $\pm$ 0,04	< 0,001
<b>20</b>	0,85 $\pm$ 0,02	< 0,001
<b>25</b>	0,84 $\pm$ 0,02	< 0,001



**Abbildung 21. Proliferations-ELISA: BrdU Inkorporation in H9C2 Zellen**

Die Absorption korreliert mit der Inkorporation von BrdU in die DNA und damit mit der Zahl proliferierender ventrikuläre Kardiomyoblasten (H9C2), \*  $p < 0,001$  vs. Kontrolle, p-Wert: Irrtumswahrscheinlichkeit

### 4 DISKUSSION

Im peripheren Blut adulter Menschen befinden sich endotheliale Vorläuferzellen (EPC), die in vitro zu ausgereiften Endothelzellen differenzieren (MUROHARA, 2001).

Experimentelle Myokardinfarktstudien zeigen, dass EPC nach intravenöser Applikation in die ischämische Infarktzone migrieren und die hämodynamische Funktion steigern (KAWAMOTO et al., 2001).

Ein großes Hindernis für die therapeutische Anwendung beim Menschen stellte die limitierte Anzahl der im Blut vorhandenen EPC dar. Bisherige Untersuchungen zeigen, dass humane EPC zu einer klinisch relevanten Anzahl expandiert werden können und nach intramyokardialer Transplantation im Ischämie/Reperfusionsmodell der Nackratte proliferieren, vaskuläre Strukturen bilden und die linksventrikuläre Funktion verbessern (OTT et al., 2005).

Als Ziel wissenschaftlicher Arbeiten gilt es nun herauszufinden, wie die linksventrikuläre Funktion weiter gesteigert und die myokardiale Regeneration verbessert werden kann.

In experimentellen Studien wird gezeigt, dass durch eine myokardiale Ischämie die Expression von IGF-II im Myokard erhöht wird (KLUGE et al., 1995; VOGT et al., 1997). Der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor-II (IGF-II) vermittelt nicht nur metabolische und anabole Effekte, wie eine erhöhte Glukoseaufnahme in die Zelle und eine verstärkte Proteinsynthese, sondern stimuliert über den IGF-IR auch die Proliferation sowie die Differenzierung und inhibiert die Apoptose von myoblastären Zellen (FLORINI et al., 1991; EWTON et al., 1994; COOLICAN et al., 1997). Im Myokardinfarktmodell wird durch Applikation von rekombinantem IGF-II die linksventrikuläre Funktion nach MI gesteigert und die Infarktgröße vermindert (BATTLER et al., 1995; VOGT et al., 1997; KOTLYAR et al., 2001).

Durch eine kombinierte Applikation von EPC und IGF-II nach MI könnte die linksventrikuläre Funktion somit weiter gesteigert werden. Dabei würden EPC die vaskuläre Regeneration fördern, IGF-II die myokardiale Regeneration steigern und die Apoptose von Kardiomyozyten hemmen.

Die systemische Gabe von IGF wird als nicht unproblematisch angesehen, da zirkulierendes IGF eine Rolle bei der Kanzerogenese spielen könnte. Zusätzlich kann eine wiederholte intravenöse Gabe Nebeneffekte, wie eine Hypoglykämie und Veränderungen des Lipidstoffwechsels, hervorrufen (REN et al., 1999; SU et al., 2003). Zudem hat frei im Serum vorliegendes IGF-II eine Halbwertszeit von lediglich 10 Minuten. Eine Assoziation des IGFs

## DISKUSSION

---

mit IGFBP verlängert zwar die Halbwertszeit, jedoch kann IGF, das an IGFBP gebunden ist, die Kapillarmembran zumeist nicht passieren (JONES und CLEMMONS, 1995).

Eine intramyokardiale Applikation von IGF-II hat somit gegenüber der systemischen Zufuhr von IGF einen beträchtlichen Vorteil. Auch im Myokard kann IGF-II über IGF-II-Rezeptoren internalisiert und degradiert werden, so dass durch eine einmalige intramyokardiale Applikation keine dauerhafte Konzentrationserhöhung von IGF-II im Myokard erreicht wird. Im Gegensatz dazu kann durch die Transplantation von Zellen, die IGF-II überexprimieren eine dauerhafte und lokale Überexpression von IGF-II erreicht werden. Dies hat den Vorteil, dass trotz der Degradation von IGF-II durch den IGF-IIR anhaltend erhöhte Konzentrationen von IGF-II im Myokard erreicht werden. Die erhöhte Konzentration von exogenem IGF-II könnte dadurch Effekte des endogenen IGF-II verstärken.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass nach retroviraler Transduktion von EPC mit pLXSN Vektoren, die das IGF-II-Gen enthalten, diese Zellen IGF-II überexprimieren. Im Gegensatz dazu exprimieren EPC, die mit einem Leervektor transduziert sind, kein IGF-II. Die Wirkung humaner EPC, die IGF-II überexprimieren, wurde im Ischämie/Reperusionsmodell an athymischen Ratten untersucht. Im Bezug auf die klinische Situation ist dieses Modell sehr relevant. Das Therapieziel bei Koronarstenosen ist, durch interventionelle Techniken, wie der Ballondilatation und Stentimplantation, eine möglichst baldige Reperfusion des ischämischen Gewebes zu erreichen. Die Reperfusion ist assoziiert mit der Gefahr des myokardialen Stunnings (BOLLI und MARBAN, 1999), dessen Auswirkungen durch dieses Modell (Ischämie/Reperfusion) mit einbezogen wurden. Die Transplantation von humanen transduzierten EPC ist direkt auf die klinische Situation übertragbar, da EPC mit hämatologischen Standardverfahren aus dem Blut von Patienten gewonnen und transduziert werden können. Probleme der Xenotransplantation im Verlauf der durchgeführten Versuche wurden durch die Wahl der rnu-Ratte (thymuslose Nacktratte) als Modelltier umgangen. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass die myokardiale Reparatur in Ratten im Vergleich zum Menschen doppelt so schnell erfolgen kann (VIRAG und MURRY, 2003).

### 4.1 Diskussion der Versuchsdurchführung und der Komplikationen

Zur Durchführung der Ischämie und Reperfusion wurde die LAD für 30 Minuten ligiert und anschließend reperfundiert. Die Transplantation (EPC-pLXSN, EPC-IGF-II bzw. PBS ohne Zellen in der Kontrolle) wurde in der frühen Phase der Reperfusion durchgeführt. Die LAD war nach Eröffnung des Thorax und Verlagerung des linken Herzohres bei über 90 % der Tiere deutlich sichtbar. Konnte diese, bedingt durch anatomische Variationen, nicht gesehen werden, erfolgte die Ligatur blind. Nach Okklusion der LAD wurde in jedem Tier die Größe des ischämischen Areals visuell bewertet. Nur Tiere mit vergleichbar großen ischämischen Arealen wurden in die weitere Auswertung mit einbezogen. Um Manipulationen zu vermeiden, war dem Operateur nicht bekannt welche Suspension transplantiert wurde. Auch die sonographischen Untersuchungen wurden geblindet durchgeführt.

Bei der Ligatur der LAD konnte es zu Blutungen kommen. Leichte Verletzungen kleinerer Gefäße oder kleinerer Seitenäste der LAD waren häufig die Ursache für geringe bis mittlere Blutungen. Diese waren durch Kompression gut zu stillen und stellten im weiteren Verlauf kein Problem dar. Hochgradige Blutverluste entstanden durch starke Schädigung der LAD bei 3 Tieren. Diese Blutungen konnten nicht gestillt werden, weshalb die Tiere intra operationem verstarben. 2 Tiere verstarben nach der Operation (siehe unten) an den Folgen des Myokardinfarkts. Insgesamt ergab sich damit eine Sterblichkeit von 8,6 %. In vergleichbaren Untersuchungen zur experimentellen Induktion eines Myokardinfarkts ist in der Literatur eine Sterblichkeit der Tiere von 33 % angegeben (JOHNS und OLSON, 1954), so dass die Sterblichkeit der Tiere im Rahmen dieses Projekts als gering eingestuft werden kann.

Respiratorische Probleme konnten ein Absinken der Sauerstoffsättigung in der Peripherie verursachen. Zum einen traten diese Probleme durch die Eröffnung des Thorax auf, wodurch der Unterdruck im Thorax aufgehoben wurde. Dadurch konnte ein Kollabieren der linken Lunge verursacht werden.

Zum anderen entstanden Respirationsprobleme nach der Okklusion der LAD. Diese wurden durch eine Lungenstauung (passive Hyperämie) hervorgerufen. Durch die Okklusion der LAD wurde die linksventrikuläre Funktion vermindert. Respiratorische Probleme entstanden dabei durch einen Rückstau des Blutes aus der linken Herzkammer in die Lungenstrombahn.

Arrhythmien der linken Ventrikelwand, die in der Ischämie- und der Reperfusionsphase auftraten, lassen sich auf Überleitungsstörungen des Reizleitungssystems des Herzens, die durch die induzierte Myokardischämie entstanden, zurückführen.

Post operationem verstarben 2 Tiere (3,4 %) an den Folgen des Myokardinfarkts durch akutes Kreislaufversagen. In einer pathologisch-anatomischen Untersuchung zeigten sich Symptome einer akuten Stauungslunge. Diese entstand, wie oben beschrieben, durch einen Rückstau des Blutes aus der linken Herzkammer in die Lungenstrombahn und war eine Folge der Verminderung der linksventrikulären Funktion nach Myokardinfarkt.

Zwischen den Gruppen bestand für keine der aufgetretenen Komplikationen ein signifikanter Unterschied. Dies weist darauf hin, dass die Transplantation von EPC-pLXSN bzw. EPC-IGF-II weder einen Einfluss auf auftretende Komplikationen während der OP noch auf die Sterblichkeit nach der OP haben.

### **4.2 Diskussion der in vivo und ex vivo erhobenen Ergebnisse**

#### 4.2.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Nach der Ischämie wurde durch intramyokardiale Transplantation von EPC-pLXSN die linksventrikuläre Funktion im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verbessert ( $p < 0,05$ ). Durch die transplantierten EPC-IGF-II wurde die Reduktion der linksventrikulären Funktion weiterhin vermindert ( $p = 0,002$  vs. EPC-pLXSN nach 7 Tagen und  $p = 0,019$  nach 14 Tagen). Die histomorphometrische Auswertung ergab, dass nach Transplantation von EPC-IGF-II die relative Infarktgröße im Vergleich zu EPC-pLXSN signifikant kleiner war ( $p = 0,02$ ). 7 Tage nach dem Myokardinfarkt war die Anzahl proliferierender Zellen in der EPC-IGF-II- im Gegensatz zur EPC-pLXSN-Gruppe tendenziell höher ( $p = 0,07$ ). 14 Tagen nach dem Myokardinfarkt stieg die Anzahl proliferierender Zellen in beiden Gruppen gleich stark an. In der Kontrollgruppe war die Anzahl proliferierender Zellen 14 Tage nach Infarkt signifikant niedriger im Vergleich zur EPC-pLXSN-Gruppe ( $p = 0,04$ ) und EPC-IGF-II-Gruppe ( $p = 0,04$ ). Zur selben Zeit ist in der EPC-IGF-II-Gruppe die Anzahl Desmin-Filamente höher und die Gefäßdichte im Infarktgebiet signifikant niedriger als in der EPC-pLXSN-Gruppe ( $p = 0,05$ ).

### 4.2.2 Überexpression von IGF-II in EPC verbessert die linksventrikuläre Funktion

#### **EPC-pLXSN verbessern die linksventrikuläre Funktion nach einem Myokardinfarkt**

5 Tage vor, sowie 7 und 14 Tage nach Myokardinfarkt wurden die Tiere aller 3 Gruppen (Kontroll-, EPC-pLXSN- und EPC-IGF-II-Gruppe) echokardiographisch untersucht. Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF), ein Parameter für die linksventrikuläre Funktion, wurden mit Hilfe der enddiastolischen und endsystolischen Volumina berechnet. Wie erwartet, waren die physiologischen Basalwerte der EF vor MI bei allen 3 Gruppen nahezu identisch. Die echokardiographischen Messungen nach Ischämie/Reperfusion ergaben, dass der physiologische Basalwert, als Folge der Reduktion der linksventrikulären Funktion, in der Kontrollgruppe nach 7 Tagen durchschnittlich um 7,5 % absank. In dieser Gruppe schritt die Verschlechterung der linksventrikulären Funktion weiter voran. Auch in der EPC-pLXSN-Gruppe fiel die linksventrikuläre Funktion (um 6,4 % am 7. Tag nach MI). Im Gegensatz zur Kontrollgruppe verbesserte sich durch die Transplantation von EPC-pLXSN die linksventrikuläre Funktion bis zum 14. Tag signifikant. Die EF war zu diesem Zeitpunkt jedoch immer noch um 5,2 % geringer als der physiologische Ausgangswert.

Bisherige Untersuchungen an einem Ischämie/Reperfusionsmodell in Ratten zeigen, dass nach intramyokardialer Transplantation von EPC die linksventrikuläre Funktion nach 14 Tagen im Vergleich zum Ausgangswert noch um 5 % vermindert ist (OTT et al., 2005).

Diese nahezu identischen Ergebnisse für den EF-Wert weisen darauf hin, dass die virale Transduktion keinen Einfluss auf die Funktion der EPC hat. Die Steigerung der linksventrikulären Funktion durch EPC-pLXSN wird somit vermutlich durch die gleichen Mechanismen wie bei der Transplantation von EPC vermittelt.

In der Literatur wird die verstärkte Neovaskularisation nach MI durch Applikation von EPC als Grund für die Steigerung der linksventrikulären Funktion nach MI angesehen (KAWAMOTO et al., 2001; MUROHARA, 2001; OTT et al., 2005).

Untersuchungen zur Gefäßdichte im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass diese im Infarktgebiet durch EPC-pLXSN erhöht war. Folglich können auch EPC-pLXSN zur Neovaskularisation beitragen. Dies wiederum könnte eine Steigerung der linksventrikulären Funktion bewirken.

Andere Autoren vermuten, dass EPC zu Kardiomyozyten transdifferenzieren oder mit diesen fusionieren. Dadurch könnten Kardiomyozyten generiert und die linksventrikuläre Funktion verbessert werden. Die Transdifferenzierung bzw. Fusion von EPC wird in der Literatur

allerdings kontrovers diskutiert, da eindeutige Nachweismethoden fehlen (siehe Kapitel 2.3.5).

### **Die Überexpression von IGF-II in EPC bewirkt eine frühere und stärkere Verbesserung der linksventrikulären Funktion als EPC-pLXSN**

Durch die Überexpression von IGF-II in EPC war die linksventrikuläre Funktion 7 Tage nach Ischämie/Reperfusion signifikant besser als durch EPC-pLXSN. 7 Tage nach der Ischämie und Reperfusion war die EF lediglich um 2,5 % niedriger als der physiologische Ausgangswert. Obwohl bis zum 14. Tag nach MI keine weitere Verbesserung stattgefunden hat, war die linksventrikuläre Funktion durch die Überexpression von IGF-II in EPC zu diesem Zeitpunkt signifikant besser als nach Transplantation von EPC-pLXSN. Die Überexpression von IGF-II scheint eine frühe protektive Wirkung auszuüben. IGF-II vermittelt über den Insulin- und IGF-I-Rezeptor metabolische Effekte. Hierzu gehört auch ein gesteigerter Glukosetransport in die Zelle (ROGLER et al., 1994; REN et al., 1999). VOGT et al. (1997) führen als Grund für den kardioprotektiven Effekt diese metabolischen Eigenschaften des IGF-II an und bezeichnen IGF-II als „des Herzens eigenes Insulin“.

Die kardiale Funktion ist abhängig von einem adäquaten Angebot hoch energetischer Phosphatverbindungen (v. a. ATP). Unter aeroben Bedingungen werden aus 1 mol Glukose 36 mol ATP gewonnen. Einer Ischämie folgt eine Hypoxie des Gewebes, so dass der aerobe Metabolismus der Kardiomyozyten in einen anaeroben übergeht. Unter anaeroben Bedingungen entstehen aus 1 mol Glukose nur noch 2 mol ATP. Nach kurzer Zeit ist der Glukosevorrat der Zelle und damit die ATP Produktion erschöpft. ATP ist aber essentiell für die Kontraktion von Kardiomyozyten (GARRATT und MORGEN, 1990; LÖFFLER, 1999). Durch einen erhöhten Glukosetransport in die Zelle durch IGF-II könnte die kontraktile Funktion aufrechterhalten und somit die linksventrikuläre Funktion verbessert worden sein.

Eine weitere Ursache für die Einschränkung der myokardialen Funktion nach einer Myokardischämie ist eine vorübergehende Myokardbetäubung. Dieses myokardiale Stunning, eine postischämische Dysfunktion, tritt bereits nach einer 5minütigen Okklusion auf und bleibt für Stunden erhalten. Die Dysfunktion ist sowohl eine Folge der Ischämie als auch der Reperfusion (BOLLI und MARBAN, 1999). Kurze wiederholte myokardiale Ischämie/Reperfusionen führen zu einer signifikant erhöhten Expression der IGF-II m-RNA. Mit nur kurzer zeitlicher Verzögerung wird auch das IGF-II Protein überexprimiert (endogenes IGF-II). Eine intramyokardiale Infusion von exogenem IGF-II vor der

Ischämie/Reperfusion verstärkt die Protektion des Myokards (KLUGE et al., 1995; VOGT et al., 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden EPC, die IGF-II überexprimieren, in der frühen Phase der Reperfusion injiziert. Es ist vorstellbar, dass IGF-II Kardiomyozyten vor einem myokardialen Stunning bzw. vor dem Übergang zur irreversiblen Myokardschädigung bewahrt haben. Dies könnte ein weiterer Grund für die frühe verbesserte linksventrikuläre Funktion sein.

Weiterhin wird die linksventrikuläre Funktion durch eine verminderte Infarktgröße und eine erhöhte Anzahl proliferierender Zellen verbessert (siehe Kapitel 4.2.3 und 4.2.4).

### 4.2.3 Überexpression von IGF-II in EPC verringert die Infarktgröße

Die Infarktgröße wurde aus vergleichstechnischen Gründen als relative Infarktgröße angegeben. Diese berechnete sich aus dem Verhältnis der Fläche des kollagenen Bindegewebes zur Fläche des gesamten linken Ventrikels.

Transplantierte EPC-pLXSN bewirkten innerhalb der ersten 14 Tage nach MI keine Verminderung der relativen Infarktgröße. Im Gegensatz dazu verringerten EPC-IGF-II die relative Infarktgröße im Vergleich zu EPC-pLXSN um fast 20 % und trugen damit wesentlich zur Steigerung der linksventrikulären Funktion bei. Diese Verbesserung ist auf die lokale Überexpression von IGF-II zurückzuführen.

VOGT et al. (1997) zeigen, dass durch eine Infusion von IGF-II in das Myokard vor MI die Infarktgröße deutlich vermindert wird. Sie führen dies auf eine protektive Wirkung von IGF-II auf die Kardiomyozyten zurück.

Weiterhin wird in der Literatur beschrieben, dass durch IGF ein antiapoptotischer Effekt in vitro und im Ischämiemodell in vivo auf Kardiomyozyten ausgeübt wird (PERUZZI et al., 1999; KOTLYAR et al., 2001; SU et al., 2003). Der verminderte Verlust von Kardiomyozyten durch Hemmung der Apoptose könnte ein weiterer Grund für die verminderte Infarktgröße sein.

Die Auffassung, dass das Herz ein terminal differenziertes Organ ist, unfähig Myozyten zu ersetzen, stand im Mittelpunkt der kardiovaskulären Forschung und therapeutischen Entwicklung in den vergangenen 50 Jahren (ANVERSA et al., 2006). Heutzutage ist die Aktivierung der Zellzyklusmaschinerie, der Karyogenese und Zytokinese in Subpopulationen von Kardiomyozyten dokumentiert (BELTRAMI et al., 2001). Jüngste Veröffentlichungen zeigen, dass das Myokard adulter Säugetiere und Menschen ein Reservoir an kardialen

Stamm- und Progenitorzellen aufweist, welche die Fähigkeit besitzen, den voll ausdifferenzierten kardiomyozytären Phänotyp anzunehmen (LAUGWITZ et al., 2005; TORELLA et al., 2006). LINKE et al. (2005) und URBANEK et al. (2005) gehen davon aus, dass im Herzen residente Stamm- oder Progenitorzellen durch Wachstumsfaktoren aktiviert und zur Proliferation und Differenzierung zu Kardiomyozyten angeregt werden. Die myokardiale Regeneration, gefördert durch die Proliferation residenter Progenitorzellen, könnte zur Verminderung der Infarktgröße und zur Steigerung der linksventrikulären Funktion beitragen.

#### 4.2.4 Überexpression von IGF-II in EPC erhöht die Anzahl proliferierender Zellen im Myokard

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Überexpression von IGF-II in EPC auf die Anzahl proliferierender Zellen im Myokard nach Ischämie/Reperfusion untersucht und mit der Anzahl proliferierender Zellen in der EPC-pLXSN-Gruppe verglichen. Um diese Veränderungen im zeitlichen Verlauf beurteilen zu können, wurden Immunfluoreszenzfärbungen des Proliferationsmarkers Ki67 von Herzpräparaten der EPC-IGF-II-, EPC-pLXSN- und der Kontrollgruppe 3 Tage, 7 Tage und 14 Tage nach MI angefertigt.

#### **In den ersten 3 Tagen nach MI wird die Anzahl proliferierender Zellen durch die Überexpression von IGF-II nicht gesteigert**

Die quantitative Auswertung der Herzpräparate von Tieren – die 72 Stunden nach Ischämie/Reperfusion euthanasiert wurden – zeigte, dass in den 3 Gruppen kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der proliferierenden Zellen bestand.

Für die Anzahl ergaben sich Mittelwerte von über 200 Ki67+ Zellen in der Infarkt-(Kontrolle) und Randzone (EPC-pLXSN). Vermutlich handelte es sich bei den proliferierenden Zellen hauptsächlich um Myofibroblasten und zum Teil um Lymphozyten und Histiozyten.

Unterstützt wird diese Theorie durch Literaturangaben über das Remodeling im experimentellem MI-Modell: Durch eine Ischämie wird die Konzentration proinflammatorischer Proteine, wie z. B. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 erhöht. Dadurch werden in den ersten Stunden nach MI neutrophile Granulozyten, gefolgt von Lymphozyten und Monozyten in das ischämische Myokard rekrutiert. Die Anzahl neutrophiler Granulozyten erreicht am 2. Tag nach MI ein Maximum und fällt anschließend kontinuierlich ab. Die Anzahl von

Makrophagen und Lymphozyten beginnt am 2. Tag nach MI zu steigen und fällt ab dem 4. bzw. 7. Tag fortschreitend ab. Es wurde gezeigt, dass die Lymphozyten und Makrophagen (Histiozyten) im ischämischen Myokard proliferieren. Ein Großteil der Replikation endothelialer Zellen erfolgt am 4. Tag. Auch die Zahl proliferierender endothelialer Zellen sinkt ab diesem Zeitpunkt kontinuierlich. Myofibroblasten sind zuerst im Randbereich, später auch in der Infarktzone erhöht. Proliferierende Myofibroblasten haben ihr quantitatives Maximum ebenfalls am 4. Tag erreicht und reduzieren sich anschließend langsam (MORALES et al., 2002; YANG et al., 2002; VIRAG und MURRY, 2003).

Dies bestätigt die Theorie, dass es sich bei den proliferierenden Zellen 3 Tage nach Ischämie/Reperfusion v. a. um Myofibroblasten und endotheliale Zellen sowie um Histiozyten handelt.

### **7 Tage nach MI ist die Anzahl proliferierender Zellen durch die Überexpression von IGF-II gesteigert**

Der kontinuierliche Rückgang der inflammatorischen Zellen lässt vermuten, dass die akute Entzündungsreaktion mit merklicher Beseitigung von nekrotischem Gewebe in den ersten 4 Tagen erfolgt und ab dem 4. Tag die Reparatur beginnt. Nach 7 Tagen haben sich die proliferierenden Myofibroblasten um ein Viertel reduziert. Auch die Anzahl proliferierender endothelialer Zellen geht zurück (YANG et al., 2002).

Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte dieser Verlauf in der Kontroll- und EPC-pLXSN-Gruppe beobachtet werden.

Im Gegensatz dazu bewirkte die Überexpression von IGF-II in EPC im Infarktgebiet eine 3fach höhere und im Randgebiet eine 2fach höhere Anzahl proliferierender Zellen. Auch in der EPC-IGF-II-Gruppe wird es sich zum Teil um proliferierende Myofibroblasten und endotheliale Zellen gehandelt haben.

Eine erhöhte Anzahl von Myofibroblasten kann zu einer Verminderung der Infarktgröße beitragen. Myofibroblasten bewirken die Produktion von extrazellulärer Matrix und fibrillärem Kollagen im Granulationsgewebe. Dies stärkt die Stabilität des Infarktareals und die Dilatation des betroffenen Areals wird vermindert. Der Wandstress sinkt, was wiederum die Umbauprozesse günstig beeinflusst (SUN et al., 2002). Zusätzlich zu diesem relativ frühen positiven Effekt auf das Remodeling, bewirken Myofibroblasten im weiteren Verlauf eine Kontraktion der Narbe. Durch diese Effekte kann die Expansion des Infarkts eingedämmt und durch die Kontraktion der Narbe die Infarktgröße gesenkt werden (SUN und WEBER, 2000; VIRAG und MURRY, 2003).

Myofibroblasten tragen somit zur Reparatur des Myokards bei. D. h. sie beeinflussen die Heilung des Gewebes durch Bildung eines Ersatzgewebes (Bindegewebe, Narbengewebe) und durch die Verminderung der Infarktexpansion. Eine Regeneration der Kardiomyozyten erfolgt dadurch nicht.

Bei einer Regeneration werden geschädigte Zellen durch Zellen gleicher Art und derselben Differenzierungsrichtung ersetzt. Dies findet z. B. in den Skelettmuskeln statt. In diesen befindet sich eine sublaminaire Population mononukleärer Zellen, die so genannten Satellitenzellen. Von welchem Zelltyp sie abstammen ist nicht abschließend untersucht. Die residenten Satellitenzellen des Skelettmuskels befinden sich in einem Ruhezustand. Aktiviert werden sie durch Signale, die z. B. durch eine Muskelzellverletzung ausgesandt werden. Diese Aktivierung ist unerlässlich für das postembryonale Wachstum, die Hypertrophie und die Regeneration im postmitotischen Gewebe (CHARGE und RUDNICKI, 2004). Die Aktivierung ist direkt mit einer erhöhten Expression des IGFs assoziiert. In Folge einer Muskelzellverletzung verlassen die Satellitenzellen ihre Ruhestellung und beginnen zu proliferieren (HILL et al., 2003). Zum einen entstehen dabei Satellitenzellen, die den Ruhezustand annehmen und in der Basalmembran der Muskelzellen verbleiben und somit ein Reservoir für den Einsatz bei nachfolgenden Verletzungen bilden. Der größere Anteil der Zellen differenziert nach der Proliferation zu Muskelzellen. Die Zellen fusionieren und bilden neue oder regenerieren beschädigte Myofibrillen. Während der Phase der Regeneration im Muskel ist die Expression von IGF-I und IGF-II in den Muskelzellen und Satellitenzellen hoch reguliert. Durch diesen endogenen Mechanismus wird eine Hypertrophie induziert. Zum einen wird die Proliferation und die Differenzierung von Satellitenzellen und damit die Bildung von Myofibrillen gesteigert. Zum anderen nimmt die Proteinsynthese in bereits bestehenden Myofibrillen zu (ALLEN und BOXHORN, 1989; FLORINI et al., 1996; CHARGE und RUDNICKI, 2004).

Dies zeigt, dass die IGFs durch eine Steigerung der Proliferation von Satellitenzellen wesentlich an der Regeneration des Skelettmuskels beteiligt sind.

Inwieweit die Regeneration von Myokardverletzungen durch eine gesteigerte Proliferation gefördert wird und welche Rolle eine erhöhte IGF-II Konzentration bei der Proliferation von Kardiomyoblasten spielt, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht:

Eine Überexpression von IGF-II steigert die Anzahl proliferierender Zellen im Myokard und vermindert die Infarktgröße signifikant.

In der Literatur wird beschrieben, dass im Myokard ein Reservoir an kardialen Stamm- und Progenitorzellen bzw. an Kardiomyoblasten vorhanden ist, welche die Fähigkeit besitzen, den

## DISKUSSION

---

voll ausdifferenzierten Phänotyp von Kardiomyozyten anzunehmen (LAUGWITZ et al., 2005; TORELLA et al., 2006). Es wird angenommen, dass diese residenten Progenitorzellen durch Wachstumsfaktoren aktiviert und zur Proliferation und Differenzierung angeregt werden (LINKE et al., 2005; URBANEK et al., 2005).

In Folge einer Verletzung der Skelettmuskulatur ist die Expression von IGF-I und IGF-II lokal erhöht. Auch im Myokard steigt infolge einer Läsion die Expression von IGF-II.

Im Skelettmuskel steigert IGF die Proliferation von Satellitenzellen. Übertragen auf das Myokard könnte die Überexpression und die dadurch anhaltend lokale Erhöhung der IGF-II Konzentration die Proliferationsrate von residenten Progenitorzellen steigern.

Die erhöhte IGF-II Konzentration bewirkt eine verstärkte Aktivierung des IGF-IR. Diese Aktivierung vermittelt über die Ras-Kaskade mitotische Signale an Zellen, so dass diese in die G1-Phase des Zellzyklus eintreten. Es kommt u. a. zur Expression von c-fos und Cyclin-D-Protein, welche zur Überwindung des Restriktionspunktes in der G1-Phase zum Übergang in die S-Phase benötigt werden (HERNANDEZ-SANCHEZ et al., 1995; LEROITH et al., 1995; COOLICAN et al., 1997). Die Aktivierung dieser Signalkaskade durch IGF-II könnte die höhere Anzahl proliferierender Zellen erklären.

Die Annahme, dass es sich bei den proliferierenden Zellen um myokardiale Vorläuferzellen handelt, wird durch die Ergebnisse des Proliferations-Assays untermauert. Dabei wurde *in vitro* die Wirkung von IGF-II auf die Proliferationsrate von kardiomyoblastären Zellen (H9C2) untersucht. Exogenes IGF-II steigerte dosisabhängig die Proliferation dieser ventrikulären Zellen. Diese Ergebnisse bestätigen, dass eine lokale dauerhafte Überexpression von IGF-II nach einem Myokardinfarkt die Anzahl proliferierender residenter kardiomyoblastärer Progenitorzellen fördern könnte. Ähnlich wie im Skelettmuskel, könnte endogenes IGF-II auch im Herzmuskel durch die Proliferation und Differenzierung von Progenitorzellen die Neubildung von Herzmuskelzellen begünstigen und somit die kardiale Regeneration fördern. Exogenes IGF-II könnte die Anzahl proliferierender Zellen im Myokard weiter steigern. Somit würde die Überexpression von IGF-II die Regeneration des Myokards fördern, indem es den Effekt von endogenem IGF-II verstärkt.

Eine Steigerung der myokardialen Regeneration durch die Überexpression von IGF-II könnte die signifikante Verminderung der Infarktgröße und die Verbesserung der linksventrikulären Funktion in der EPC-IGF-II-Gruppe erklären.

### **14 Tage nach MI wird die Anzahl proliferierender Zellen sowohl durch EPC-pLXSN als auch durch EPC-IGF-II gesteigert**

Die Auswertungen der Ki67+ Zellen nach 14 Tagen zeigten, dass die Zahl proliferierender Zellen in der Kontrollgruppe sowohl im Infarktgebiet als auch im Randgebiet weiter abfiel und im Vergleich zur EPC-pLXSN-Gruppe signifikant niedriger war. Die erhöhte Anzahl von Ki67+ Zellen könnte daraus resultieren, dass die humanen EPC proliferieren. Hinweise darauf ergeben sich aus Untersuchungen zur Gefäßdichte im Rahmen dieser Arbeit. Die Gefäßdichte war 14 Tage nach Ischämie/Reperfusion in der EPC-pLXSN-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle erhöht.

In der Literatur wird beschrieben, dass intramyokardial transplantierte humane EPC am Ischämie/Reperusionsmodell in Ratten proliferieren und gefäß-ähnliche Strukturen bilden (OTT et al., 2005).

Es ist wahrscheinlich, dass auch EPC-pLXSN in die Gefäßwand inkorporieren, proliferieren und somit die Entstehung neuer Gefäße fördern. Humane EPC könnten weiterhin eine Wirkung auf lokale Zellen der Ratte ausüben, so dass diese stimuliert werden und zur Gefäßbildung beitragen.

14 Tage nach MI bestand kaum ein quantitativer Unterschied in der Anzahl proliferierender Zellen der EPC-pLXSN- und der EPC-IGF-II-Gruppe. In der EPC-IGF-II-Gruppe handelte es sich bei den proliferierenden Zellen nicht um endotheliale Zellen, da die Gefäßdichte – im Gegensatz zur EPC-pLXSN-Gruppe – hier bis zum 14. Tag nach MI nicht erhöht wurde.

Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei den proliferierenden Zellen um myoblastäre Progenitorzellen handelt. Die Überexpression von IGF-II in EPC könnte somit die myokardiale Regeneration steigern. Auch die Ergebnisse der immunhistologischen Desmin-Färbung unterstützen dies.

Desmin ist ein Intermediärfilament, das Myofilamente miteinander verbindet und deshalb die Integrität und Kontraktion von Muskelzellen bewirkt. Desmin wird in Kardiomyozyten, aber auch in glatten Muskelzellen exprimiert (FISHER et al., 2005). Somit stellt Desmin keinen spezifischen Marker für Kardiomyozyten dar und kann nur als ein Hinweis auf eine erhöhte Muskelzellzahl gesehen werden. Auch Myofibroblasten besitzen – durch ihre kontraktile Bestandteile – Proteine, die auch von glatten Muskelzellen exprimiert werden. Aus diesem Grund kann es sich bei Desmin+ Zellen auch um Myofibroblasten handeln (HINZ et al., 2002).

Die erhöhte Anzahl von Desmin+ Filamenten in der EPC-IGF-II-Gruppe weist darauf hin, dass die Überexpression von IGF-II nicht nur einen positiven Effekt auf die Anzahl der Muskelzellen, sondern auch auf deren Integrität und damit auf die Kontraktionsfähigkeit hat. Diese erhöhte Anzahl verbundener Muskelzellen könnte durch die Generierung und Integration von Kardiomyozyten aus residenten Progenitorzellen entstehen.

### 4.2.5 Dosis- und Zeitabhängigkeit der Effekte von IGF-II

Die *in vitro* Ergebnisse des Proliferations-Assays zeigen, dass die Anzahl proliferierender ventrikulärer Zellen mit zunehmender IGF-II Konzentration steigt. Auch in der Literatur wird beschrieben, dass die Anzahl proliferierender kardiomyozytärer Zellen dosisabhängig ist (MCDEVITT et al., 2005). Um die Anzahl der proliferierenden Zellen zu steigern, muss folglich eine Mindestkonzentration von IGF-II vorliegen. Dies könnte erklären, warum 3 Tage nach der Ischämie/Reperfusion durch die Überexpression von IGF-II in EPC noch kein Anstieg der Anzahl proliferierender Zellen offensichtlich wird. Zudem kann *in vivo* die Konzentration von verfügbarem IGF-II durch Bindung an die im Myokard vorhandene IGFBP und IGF-II-Rezeptoren vermindert werden. Bis zum 7. Tag scheint sich eine ausreichend hohe Konzentration durch die Überexpression von IGF-II in EPC gebildet zu haben, so dass eine erhöhte Anzahl proliferierender Zellen gefunden werden konnte.

MCDEVITT et al. (2005) beschreiben für die *in vitro* Kultivierung von kardiomyozytären Zellen, dass die durch IGF-II gesteigerte Anzahl der proliferierenden Zellen mit dem Voranschreiten der Zelldifferenzierung sinkt.

COOLICAN et al. (1997) sind der Ansicht, dass die Induktion der Proliferation eine initiale Antwort von Zellen auf die Aktivierung des IGF-IR durch seine Liganden ist. In einer zweiten Phase erfolgt die Differenzierung der Zellen. Dabei kommt es zur Unterbrechung des Proliferations-Signalwegs. Welche externen Stimuli *in vivo* zu dieser Unterbrechung führen ist unklar.

Die Differenzierung von residenten Progenitorzellen könnte sich der Proliferation dieser Zellen anschließen, was den Abfall der Ki67+ Zellen nach 14 Tagen erklären würde.

### 4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die hier vorgestellten Untersuchungen belegen, dass retroviral transduzierte humane endotheliale Progenitorzellen IGF-II überexprimieren. Die intramyokardiale Transplantation von EPC-IGF-II nach Ischämie/Reperfusion führt im Vergleich zu EPC-pLXSN zu einer früheren und höheren Steigerung der linksventrikulären Funktion. Durch die Überexpression von IGF-II in EPC wird die Infarktgröße vermindert. IGF-II steigert die Anzahl proliferierender ventrikulärer Kardiomyoblasten *in vitro*. *In vivo* bewirkt die Überexpression von IGF-II einen Anstieg proliferierender Zellen im Myokard. IGF-II stimuliert vermutlich residente Progenitorzellen, die daraufhin proliferieren und eine myokardiale Regeneration bewirken. Einer myokardialen Ischämie folgt eine erhöhte Expression von IGF (endogenes IGF), welches eine endogene Protektion und Reparatur bewirken kann. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die myokardiale Heilung durch endogenes IGF-II durch die Überexpression von (exogenem) IGF-II in EPC gesteigert werden könnte.

Die Implantation transduzierter EPC-IGF-II könnte somit ein therapeutisches Prinzip zur muskulären Regeneration bei myokardialer Ischämie darstellen. Autologe CD34+ Zellen können mit hämatologischen Standardverfahren aus dem Blut von Patienten gewonnen und transduziert werden. Somit wäre die therapeutische Anwendung von EPC-IGF-II beim Menschen möglich.

Bis zum 14. Tag nach Ischämie und Reperfusion bewirkten EPC-IGF-II jedoch keine Steigerung der Gefäßdichte. Ob ein späterer Anstieg der Gefäßdichte erfolgt, oder ob durch die Überexpression von IGF-II die angiogenetische Wirkung der EPC gehemmt wird, muss in weiteren Studien untersucht werden. Weiterhin ist zu untersuchen, ob proliferierende residente Progenitorzellen zu Kardiomyozyten differenzieren und ins Myokard integrieren. Inwieweit durch die Überexpression von IGF-II die Apoptose gehemmt wird und welche Rolle dies bei der Protektion des Myokards und der linksventrikulären Funktion spielt, sollte ebenfalls beachtet werden. Durch die retrovirale Transduktion wurde die Gensequenz von humanem IGF-II in das Genom der EPC eingebaut, so dass eine Expression von humanem IGF-II in den Ratten erfolgte. Welche Auswirkungen spezies-spezifische Unterschiede haben, wurde in dieser Studie nicht untersucht und könnte ein Thema nachfolgender Studien darstellen.

### 5 ZUSAMMENFASSUNG

Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren (IGF) vermitteln nicht nur metabolische Effekte, sondern regulieren zusätzlich Zellwachstum, -differenzierung und -apoptose. Unter diesen Faktoren ist der IGF-II von besonderem Interesse, aufgrund der von ihm ausgelösten mitogenen Wirkung. Da endotheliale Progenitorzellen (EPC) die myokardiale Funktion nach akutem Myokardinfarkt verbessern, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob eine Überexpression von IGF-II in den EPC zu einer weiteren Verbesserung der linksventrikulären Funktion nach akutem Myokardinfarkt führt.

Humane CD34<sup>+</sup> Zellen wurden aus Nabelschnurblut isoliert und in einem adäquaten Zellmedium kultiviert. Nach wenigen Passagen wurden die EPC ex vivo mit einem retroviralen Vektor, der IGF-II exprimiert (EPC-IGF-II) oder mit einem „leeren“ Vektor (EPC-pLXSN) transduziert und bis zu 46 Verdoppelungen der Population expandiert. Die Expression von IGF-II wurde durch RT-PCR bestätigt. Nach einer Thorakotomie bei athymischen Nacktratten wurde die LAD (left anterior descending artery) für 30 Minuten ligiert und anschließend reperfundiert. EPC, die nur mit einem Vektor transduziert waren, oder die überexprimierenden EPC-IGF-II wurden in der frühen Phase der Reperfusion in die Randzone des Infarkts injiziert. Serielle echokardiographische Untersuchungen wurden danach bis zum 14. Tag durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere euthanasiert. Durch die Transplantation von EPC-pLXSN wurde die linksventrikuläre Funktion 14 Tage nach Myokardinfarkt von  $47,3 \pm 1,8$  % (EF in der Kontrollgruppe, n = 11) auf  $51,4 \pm 0,7$  % (p = 0,05, n = 9) gesteigert. Die Überexpression von IGF-II steigerte die linksventrikuläre Funktion im Vergleich zu EPC-pLXSN weiterhin auf  $53,6 \pm 0,5$  % (p < 0,05, n = 10). In vitro zeigte sich anhand eines BrdU Inkorporations-Assays, dass IGF-II dosisabhängig die Proliferationskapazität von H9C2 Kardiomyoblasten von Ratten verstärkt. Immunhistologische Untersuchungen zur Anzahl proliferierender Zellen im Myokard ergaben ebenfalls, dass die Transplantation von IGF-II überexprimierenden EPC, im Vergleich zur Transplantation von EPC-pLXSN, die Anzahl der Ki67<sup>+</sup> Zellen in der Infarktzone 7 Tage nach Myokardinfarkt erhöhte. Die Infarktgröße war bei Überexpression von IGF-II in EPC um fast 20 % geringer als bei EPC-pLXSN (p < 0,05).

Als Endergebnis lässt sich feststellen, dass die Transplantation von IGF-II überexprimierenden EPC im akuten Myokardinfarkt die linksventrikuläre Funktion verbessert, möglicherweise durch eine Verstärkung der Proliferationskapazität von ortsständigen kardiomyozytären Progenitorzellen.

**6 SUMMARY****Transplantation of human endothelial progenitor cells overexpressing IGF-II in an acute myocardial infarction model in nude rats**

Insulin-like growth factors (IGF) are not only mediators of metabolic actions, but also regulate cell growth, differentiation and apoptosis. IGF-II is of particular interest because of its mitogenic effects.

It is known that endothelial progenitor cells (EPC) improve myocardial function after acute myocardial infarction. The aim of this study was to investigate whether overexpression of IGF-II in EPC further contributes to improvement in left ventricular function after myocardial infarction.

Human CD34+ cells from cord blood were isolated and cultured in adequate cell medium. Early passage EPC were transduced ex vivo by a retroviral vector expression of IGF-II (EPC-IGF-II) or empty vector (EPC-pLXSN) and expanded up to 46 population doublings. Expression levels were confirmed by RT-PCR. Athymic, nude rats were thoracotomized and ligation of the LAD (left anterior descending artery) was performed for 30 minutes before reperfusion was initiated. Vector only transduced EPC or EPC-IGF-II cells were injected immediately after reperfusion in the border of the infarct zone. Serial echocardiographic measurements were performed to analyze left ventricular ejection fraction (EF) up to 2 weeks after myocardial infarction when animals were mercy killed. Transplantation of EPC-derived cells improved left ventricular function after experimental myocardial infarction from  $47,3 \pm 1,8$  % (EF of the control group, n = 11) to  $51,4 \pm 0,7$  % EF 2 weeks after infarction ( $p < 0,05$ , n = 9). Overexpression of IGF-II further improved left ventricular ejection fraction to  $53,6 \pm 0,5$  % EF at 2 weeks as compared to empty vector transduced cells ( $p < 0,05$ , n = 10). In vitro experiments revealed that IGF-II dose-dependently enhanced the proliferation capacity of H9C2 rat cardiomyoblasts measured by a BrdU incorporation assay. Immunohistological analysis of proliferating cells in the myocardium showed an increased number of Ki67+ cells within the infarct zone 7 days after transplantation of IGF-II overexpressing cells as compared to empty vector transduced cells. It was shown that transplantation of IGF-II overexpressing EPC impaired the infarction size by nearly 20 % in comparison to EPC-pLXSN ( $p < 0,05$ ).

Thus, transplantation of IGF-II overexpressing EPC in acute myocardial infarction may improve myocardial function by enhancing the proliferation capacity of resident cardiomyocyteprogenitors.

### 7 LITERATURVERZEICHNIS

- ABBATE A., BIONDI-ZOCCAI G.G., BALDI A., Pathophysiologic role of myocardial apoptosis in post-infarction left ventricular remodeling. *J Cell Physiol* (2002); 193: 145-153
- ALLAN G.J., FLINT D.J., PATEL K., Insulin-like growth factor axis during embryonic development. *Reproduction* (2001); 122: 31-39
- ALLEN R.E., BOXHORN L.K., Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* (1989); 138: 311-315
- ALVAREZ-DOLADO M., PARDAL R., GARCIA-VERDUGO J.M., FIKE J.R., LEE H.O., PFEFFER K., LOIS C., MORRISON S.J., ALVAREZ-BUYLLA A., Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* (2003); 425: 968-973
- ANTMAN E.M., Acute myocardial infarction. In: Braunwald E., Zipes D., Libby P. (Hrsg.): *Heart disease* (6. Auflage), WB Saunders, Philadelphia (2000); 1114-1207
- ANVERSA P., LERI A., KAJSTURA J., Cardiac regeneration. *J Am Coll Cardiol* (2006); 47: 1769-1776
- ANVERSA P., SUSSMAN M.A., BOLLI R., Molecular genetic advances in cardiovascular medicine: focus on the myocyte. *Circulation* (2004); 109: 2832-2838
- ASAHARA T., MASUDA H., TAKAHASHI T., KALKA C., PASTORE C., SILVER M., KEARNE M., MAGNER M., ISNER J.M., Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* (1999); 85: 221-228
- ASSMUS B., SCHACHINGER V., TEUPE C., BRITTEN M., LEHMANN R., DOBERT N., GRUNWALD F., AICHER A., URBICH C., MARTIN H., HOELZER D., DIMMELER S., ZEIHNER A.M., Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* (2002); 106: 3009-3017
- BADORFF C., BRANDES R.P., POPP R., RUPP S., URBICH C., AICHER A., FLEMING I., BUSSE R., ZEIHNER A.M., DIMMELER S., Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* (2003); 107: 1024-1032
- BAILEY A.S., FLEMING W.H., Converging roads: evidence for an adult hemangioblast. *Exp Hematol* (2003); 31: 987-993

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- BALSAM L.B., WAGERS A.J., CHRISTENSEN J.L., KOFIDIS T., WEISSMAN I.L., ROBBINS R.C., Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* (2004); 428: 668-673
- BANERJEE S., SMALLWOOD A., A chromatin model of IGF2/H19 imprinting. *Nat Genet* (1995); 11: 237-238
- BATTLER A., HASDAI D., GOLDBERG I., OHAD D., DI SEGNI E., BOR A., VARDA-BLOOM N., VERED Z., KORNOWSKI R., LAKE M., ET AL., Exogenous insulin-like growth factor II enhances post-infarction regional myocardial function in swine. *Eur Heart J* (1995); 16: 1851-1859
- BELL G.I., GERHARD D.S., FONG N.M., SANCHEZ-PESCADOR R., RALL L.B., Isolation of the human insulin-like growth factor genes: insulin-like growth factor II and insulin genes are contiguous. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1985); 82: 6450-6454
- BELTRAMI A.P., URBANEK K., KAJSTURA J., YAN S.M., FINATO N., BUSSANI R., NADAL-GINARD B., SILVESTRI F., LERI A., BELTRAMI C.A., ANVERSA P., Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* (2001); 344: 1750-1757
- BLENIS J., Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1993); 90: 5889-5892
- BOLLI R., MARBAN E., Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* (1999); 79: 609-634
- BRACHFELD N., OTAKA Y., KLEIN I., KAWADE M., Substrate preference and metabolic activity of the aerobic and the hypoxic turtle heart. *Circ Res* (1972); 31: 453-467
- CAMPBELL P.G., NOVAK J.F., YANOSICK T.B., MCMASTER J.H., Involvement of the plasmin system in dissociation of the insulin-like growth factor-binding protein complex. *Endocrinology* (1992); 130: 1401-1412
- CHARGE S.B., RUDNICKI M.A., Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* (2004); 84: 209-238
- CHIEN K.R., ABRAMS J., SERRONI A., MARTIN J.T., FARBER J.L., Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury. *J Biol Chem* (1978); 253: 4809-4817
- CHIEN K.R., PEAU R.G., FARBER J.L., Ischemic myocardial cell injury. Prevention by chlorpromazine of an accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction. *Am J Pathol* (1979); 97: 505-529

## LITERATURVERZEICHNIS

---

COOLICAN S.A., SAMUEL D.S., EWTON D.Z., MCWADE F.J., FLORINI J.R., The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *J Biol Chem* (1997); 272: 6653-6662

CROZATIER B., ASHRAF M., FRANKLIN D., ROSS J., JR., Sarcomere length in experimental myocardial infarction: evidence for sarcomere overstretch in dyskinetic ventricular regions. *J Mol Cell Cardiol* (1977); 9: 785-797

DAVANI S., DESCHASEAUX F., CHALMERS D., TIBERGHIE P., KANTELIP J.P., Can stem cells mend a broken heart? *Cardiovasc Res* (2005); 65: 305-316

DECHIARA T.M., EFSTRATIADIS A., ROBERTSON E.J., A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* (1990); 345: 78-80

DECKER R.S., COOK M.G., BEHNKE-BARCLAY M., DECKER M.L., Some growth factors stimulate cultured adult rabbit ventricular myocyte hypertrophy in the absence of mechanical loading. *Circ Res* (1995); 77: 544-555

DOWELL J.D., FIELD L.J., PASUMARTHI K.B., Cell cycle regulation to repair the infarcted myocardium. *Heart Fail Rev* (2003); 8: 293-303

EGGERMANN J., KLICHE S., JARMY G., HOFFMANN K., MAYR-BEYRLE U., DEBATIN K.M., WALTENBERGER J., BELTINGER C., Endothelial progenitor cell culture and differentiation in vitro: a methodological comparison using human umbilical cord blood. *Cardiovasc Res* (2003); 58: 478-486

EISENBERG C.A., BURCH J.B., EISENBERG L.M., Bone marrow cells transdifferentiate to cardiomyocytes when introduced into the embryonic heart. *Stem Cells* (2006); 24: 1236-1245

ENGELMANN G.L., BOEHM K.D., HASKELL J.F., KHAIRALLAH P.A., ILAN J., Insulin-like growth factors and neonatal cardiomyocyte development: ventricular gene expression and membrane receptor variations in normotensive and hypertensive rats. *Mol Cell Endocrinol* (1989); 63: 1-14

EWTON D.Z., ROOF S.L., MAGRI K.A., MCWADE F.J., FLORINI J.R., IGF-II is more active than IGF-I in stimulating L6A1 myogenesis: greater mitogenic actions of IGF-I delay differentiation. *J Cell Physiol* (1994); 161: 277-284

FABIATO A., Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* (1983); 245: C1-14

FELDSER D., AGANI F., IYER N.V., PAK B., FERREIRA G., SEMENZA G.L., Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* (1999); 59: 3915-3918

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- FISHER P.W., SALLOUM F., DAS A., HYDER H., KUKREJA R.C., Phosphodiesterase-5 inhibition with sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity. *Circulation* (2005); 111: 1601-1610
- FLORINI J.R., EWTON D.Z., COOLICAN S.A., Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev* (1996); 17: 481-517
- FLORINI J.R., MAGRI K.A., EWTON D.Z., JAMES P.L., GRINDSTAFF K., ROTWEIN P.S., "Spontaneous" differentiation of skeletal myoblasts is dependent upon autocrine secretion of insulin-like growth factor-II. *J Biol Chem* (1991); 266: 15917-15923
- FULLER S.J., MYNETT J.R., SUGDEN P.H., Stimulation of cardiac protein synthesis by insulin-like growth factors. *Biochem J* (1992); 282 ( Pt 1): 85-90
- GARBADE J., SCHUBERT A., RASTAN A.J., LENZ D., WALTHER T., GUMMERT J.F., DHEIN S., MOHR F.W., Fusion of bone marrow-derived stem cells with cardiomyocytes in a heterologous in vitro model. *Eur J Cardiothorac Surg* (2005); 28: 685-691
- GARRATT K.N., MORGEN J.P., Coronary circulation. In: Giuliani E.R, Fuster V., Gersh B.J., McGoon M.D., McGoon D.C. (Hrsg.): *Cardiology Fundamentals and Practice Vol. 2* (2. Auflage), Mosby Year Book, St. Louis (1990); 1150-1156
- GELATO M.C., RUTHERFORD C., STARK R.I., DANIEL S.S., The insulin-like growth factor II/mannose-6-phosphate receptor is present in fetal and maternal sheep serum. *Endocrinology* (1989); 124: 2935-2943
- GIANNITSIS E., KRAUTZIG S., KUROWSKI V., RENZ-POLSTER H., SCHWABE K., STIERLE U., Herz. In: Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J. (Hrsg.): *Basislehrbuch Innere Medizin* (3. Auflage), Urban & Fischer, München, (2004) 28-100
- GRUH I., BEILNER J., BLOMER U., SCHMIEDL A., SCHMIDT-RICHTER I., KRUSE M.L., HAVERICH A., MARTIN U., No evidence of transdifferentiation of human endothelial progenitor cells into cardiomyocytes after coculture with neonatal rat cardiomyocytes. *Circulation* (2006); 113: 1326-1334
- HAN R.N., POST M., TANSWELL A.K., LYE S.J., Insulin-like growth factor-I receptor-mediated vasculogenesis/angiogenesis in human lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2003); 28: 159-169
- HAUNSTETTER A., IZUMO S., Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res* (1998); 82: 1111-1129
- HERNANDEZ-SANCHEZ C., BLAKESLEY V., KALEBIC T., HELMAN L., LEROITH D., The role of the tyrosine kinase domain of the insulin-like growth factor-I receptor in intracellular signaling, cellular proliferation, and tumorigenesis. *J Biol Chem* (1995); 270: 29176-29181

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- HEROLD G., MELLWIG K.P., SCHMIDT H.K., Kardiologie. In: Herold G.(Hrsg.): Innere Medizin (5. Auflage), Köln (2005); 119-268
- HERR F., LIANG O.D., HERRERO J., LANG U., PREISSNER K.T., HAN V.K., ZYGMUNT M., Possible angiogenic roles of insulin-like growth factor II and its receptors in uterine vascular adaptation to pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* (2003); 88: 4811-4817
- HILL M., WERNIG A., GOLDSPINK G., Muscle satellite (stem) cell activation during local tissue injury and repair. *J Anat* (2003); 203: 89-99
- HINZ B., GABBIANI G., CHAPONNIER C., The NH<sub>2</sub>-terminal peptide of alpha-smooth muscle actin inhibits force generation by the myofibroblast in vitro and in vivo. *J Cell Biol* (2002); 157: 657-663
- HOLTHUIZEN P.E., CLEUTJENS C.B., VEENSTRA G.J., VAN DER LEE F.M., KOONEN-REEMST A.M., SUSSENBACH J.S., Differential expression of the human, mouse and rat IGF-II genes. *Regul Pept* (1993); 48: 77-89
- HUANG C.Y., HAO L.Y., BUETOW D.E., Insulin-like growth factor-II induces hypertrophy of adult cardiomyocytes via two alternative pathways. *Cell Biol Int* (2002); 26: 737-739
- HUNTER T., PINES J., Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* (1994); 79: 573-582
- HWA V., OH Y., ROSENFELD R.G., The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* (1999); 20: 761-787
- INGRAM D.A., MEAD L.E., MOORE D.B., WOODARD W., FENOGLIO A., YODER M.C., Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood* (2005); 105: 2783-2786
- INGRAM D.A., MEAD L.E., TANAKA H., MEADE V., FENOGLIO A., MORTELL K., POLLOK K., FERKOWICZ M.J., GILLEY D., YODER M.C., Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* (2004); 104: 2752-2760
- JENNINGS R.B., GANOTE C.E., Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circ Res* (1974); 35 Suppl 3: 156-172
- JENNINGS R.B., REIMER K.A., Lethal myocardial ischemic injury. *Am J Pathol* (1981); 102: 241-255
- JOHNS T.N., OLSON B.J., Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg* (1954); 140: 675-682

## LITERATURVERZEICHNIS

---

JONES J.I., CLEMMONS D.R., Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* (1995); 16: 3-34

KAWAMOTO A., GWON H.C., IWAGURO H., YAMAGUCHI J.I., UCHIDA S., MASUDA H., SILVER M., MA H., KEARNEY M., ISNER J.M., ASAHARA T., Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* (2001); 103: 634-637

KHANDWALA H.M., MCCUTCHEON I.E., FLYVBJERG A., FRIEND K.E., The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev* (2000); 21: 215-244

KIM H.S., NAGALLA S.R., OH Y., WILSON E., ROBERTS C.T., JR., ROSENFELD R.G., Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997); 94: 12981-12986

KIM Y.H., Intramyocardial transplantation of circulating CD34+ cells: source of stem cells for myocardial regeneration. *J Korean Med Sci* (2003); 18: 797-803

KLUGE A., ZIMMERMANN R., MUNKEL B., VERDOUW P.D., SCHAPER J., SCHAPER W., Insulin-like growth factor II is an experimental stress inducible gene in a porcine model of brief coronary occlusions. *Cardiovasc Res* (1995); 29: 708-716

KOBAYASHI K., NEELY J.R., Control of maximum rates of glycolysis in rat cardiac muscle. *Circ Res* (1979); 44: 166-175

KOBAYASHI T., MATSUMOTO T., KAMATA K., The PI3-K/Akt pathway: roles related to alterations in vasomotor responses in diabetic models. *J Smooth Muscle Res* (2005); 41: 283-302

KOCHER A.A., SCHUSTER M.D., SZABOLCS M.J., TAKUMA S., BURKHOF D., WANG J., HOMMA S., EDWARDS N.M., ITESCU S., Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* (2001); 7: 430-436

KOFIDIS T., DE BRUIN J.L., YAMANE T., BALSAM L.B., LEBL D.R., SWIJNENBURG R.J., TANAKA M., WEISSMAN I.L., ROBBINS R.C., Insulin-like growth factor promotes engraftment, differentiation, and functional improvement after transfer of embryonic stem cells for myocardial restoration. *Stem Cells* (2004); 22: 1239-1245

KOTLYAR A.A., VERED Z., GOLDBERG I., CHOURAQUI P., NAS D., FRIDMAN E., CHEN-LEVY Z., FYTLOVICH S., SANGIORGI G., SPAGNOLI L.G., ORLANDI A., SAVION N., EL DAR M., SCHEINOWITZ M., Insulin-like growth factor I and II preserve myocardial structure in postinfarct swine. *Heart* (2001); 86: 693-700

## LITERATURVERZEICHNIS

---

KOYANAGI M., BRANDES R.P., HAENDELER J., ZEIHNER A.M., DIMMELER S., Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? *Circ Res* (2005); 96: 1039-1041

LAUGWITZ K.L., MORETTI A., LAM J., GRUBER P., CHEN Y., WOODARD S., LIN L.Z., CAI C.L., LU M.M., RETH M., PLATOSHYN O., YUAN J.X., EVANS S., CHIEN K.R., Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* (2005); 433: 647-653

LAWLOR M.A., ROTWEIN P., Coordinate control of muscle cell survival by distinct insulin-like growth factor activated signaling pathways. *J Cell Biol* (2000); 151: 1131-1140

LEE K.W., LADINSKY H., STUCKEY J.H., Decreased Ca<sup>2+</sup> uptake by sarcoplasmic reticulum after coronary artery occlusion for 60 and 90 minutes. *Circ Res* (1967); 21: 439-444

LEE O.H., BAE S.K., BAE M.H., LEE Y.M., MOON E.J., CHA H.J., KWON Y.G., KIM K.W., Identification of angiogenic properties of insulin-like growth factor II in in vitro angiogenesis models. *Br J Cancer* (2000); 82: 385-391

LEROITH D., Insulin-like growth factor I receptor signaling--overlapping or redundant pathways? *Endocrinology* (2000); 141: 1287-1288

LEROITH D., WERNER H., BEITNER-JOHNSON D., ROBERTS C.T., JR., Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* (1995); 16: 143-163

LIEDTKE A.J., Alterations of carbohydrate and lipid metabolism in the acutely ischemic heart. *Prog Cardiovasc Dis* (1981); 23: 321-336

LINKE A., MULLER P., NURZYNSKA D., CASARSA C., TORELLA D., NASCIMBENE A., CASTALDO C., CASCAPERA S., BOHM M., QUAINI F., URBANEK K., LERI A., HINTZE T.H., KAJSTURA J., ANVERSA P., Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005); 102: 8966-8971

LÖFFLER G., Kohlenhydrate. In: Löffler G.(Hrsg.): *Basiswissen Biochemie* (3. Auflage), Springer, Berlin (1999); 87-149

MANABE I., SHINDO T., NAGAI R., Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res* (2002); 91: 1103-1113

MATHUR A., MARTIN J.F., Stem cells and repair of the heart. *Lancet* (2004); 364: 183-192

MCDEVITT T.C., LAFLAMME M.A., MURRY C.E., Proliferation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells is mediated via the IGF/PI 3-kinase/Akt signaling pathway. *J Mol Cell Cardiol* (2005); 39: 865-873

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- MEDINA D.L., SANTISTEBAN P., Thyrotropin-dependent proliferation of in vitro rat thyroid cell systems. *Eur J Endocrinol* (2000); 143: 161-178
- MORALES C., GONZALEZ G.E., RODRIGUEZ M., BERTOLASI C.A., GELPI R.J., Histopathologic time course of myocardial infarct in rabbit hearts. *Cardiovasc Pathol* (2002); 11: 339-345
- MULLER P., BELTRAMI A.P., CEsSELLI D., PFEIFFER P., KAZAKOV A., BOHM M., Myocardial regeneration by endogenous adult progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol* (2005); 39: 377-387
- MUROHARA T., Therapeutic vasculogenesis using human cord blood-derived endothelial progenitors. *Trends Cardiovasc Med* (2001); 11: 303-307
- MURRY C.E., SOONPAA M.H., REINECKE H., NAKAJIMA H., NAKAJIMA H.O., RUBART M., PASUMARTHI K.B., VIRAG J.I., BARTELMEZ S.H., POPPA V., BRADFORD G., DOWELL J.D., WILLIAMS D.A., FIELD L.J., Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* (2004); 428: 664-668
- NAKAE J., KIDO Y., ACCILI D., Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocr Rev* (2001); 22: 818-835
- NAKAMARU Y., SCHWARTZ A., Possible control of intracellular calcium metabolism by [H<sup>+</sup>]: sarcoplasmic reticulum of skeletal and cardiac muscle. *Biochem Biophys Res Commun* (1970); 41: 830-836
- NIAN M., LEE P., KHAPER N., LIU P., Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* (2004); 94: 1543-1553
- NISSLEY P., KIESS W., Reciprocal modulation of binding of lysosomal enzymes and insulin-like growth factor-II (IGF-II) to the mannose 6-phosphate/IGF-II receptor. *Adv Exp Med Biol* (1991); 293: 311-324
- NYGREN J.M., JOVINGE S., BREITBACH M., SAWEN P., ROLL W., HESCHELER J., TANEERA J., FLEISCHMANN B.K., JACOBSEN S.E., Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* (2004); 10: 494-501
- O'DELL S.D., DAY I.N., Insulin-like growth factor II (IGF-II). *Int J Biochem Cell Biol* (1998); 30: 767-771
- ORLIC D., KAJSTURA J., CHIMENTI S., LIMANA F., JAKONIUK I., QUAINI F., NADAL-GINARD B., BODINE D.M., LERI A., ANVERSA P., Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001); 98: 10344-10349

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- OTAEGI G., YUSTA-BOYO M.J., VERGANO-VERA E., MENDEZ-GOMEZ H.R., CARRERA A.C., ABAD J.L., GONZALEZ M., DE LA ROSA E.J., VICARIO-ABEJON C., DE PABLO F., Modulation of the PI 3-kinase-Akt signalling pathway by IGF-I and PTEN regulates the differentiation of neural stem/precursor cells. *J Cell Sci* (2006); 119: 2739-2748
- OTT I., KELLER U., KNOEDLER M., GOTZE K.S., DOSS K., FISCHER P., URLBAUER K., DEBUS G., VON BUBNOFF N., RUDELIUS M., SCHOMIG A., PESCHEL C., OOSTENDORP R.A., Endothelial-like cells expanded from CD34+ blood cells improve left ventricular function after experimental myocardial infarction. *Faseb J* (2005); 19: 992-994
- PAGE E., MCCALLISTER L.P., Quantitative electron microscopic description of heart muscle cells. Application to normal, hypertrophied and thyroxin-stimulated hearts. *Am J Cardiol* (1973); 31: 172-181
- PERUZZI F., PRISCO M., DEWS M., SALOMONI P., GRASSILLI E., ROMANO G., CALABRETTA B., BASERGA R., Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor 1 receptor in protection from apoptosis. *Mol Cell Biol* (1999); 19: 7203-7215
- PINES J., RIEDER C.L., Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat Cell Biol* (2001); 3: E3-6
- PLANAS-SILVA M.D., WEINBERG R.A., The restriction point and control of cell proliferation. *Curr Opin Cell Biol* (1997); 9: 768-772
- PRUETT W., YUAN Y., ROSE E., BATZER A.G., HARADA N., SKOLNIK E.Y., Association between GRB2/Sos and insulin receptor substrate 1 is not sufficient for activation of extracellular signal-regulated kinases by interleukin-4: implications for Ras activation by insulin. *Mol Cell Biol* (1995); 15: 1778-1785
- REN J., SAMSON W.K., SOWERS J.R., Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease. *J Mol Cell Cardiol* (1999); 31: 2049-2061
- RINDERKNECHT E., HUMBEL R.E., The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* (1978a); 253: 2769-2776
- RINDERKNECHT E., HUMBEL R.E., Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett* (1978b); 89: 283-286
- ROGLER C.E., YANG D., ROSSETTI L., DONOHOE J., ALT E., CHANG C.J., ROSENFELD R., NEELY K., HINTZ R., Altered body composition and increased frequency of diverse malignancies in insulin-like growth factor-II transgenic mice. *J Biol Chem* (1994); 269: 13779-13784
- ROSEN C.J., Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding proteins: clinical implications. *Clin Chem* (1999); 45: 1384-1390

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- SARASTE A., PULKKI K., KALLAJOKI M., HEIKKILA P., LAINE P., MATTILA S., NIEMINEN M.S., PARVINEN M., VOIPIO-PULKKI L.M., Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation. *Eur J Clin Invest* (1999); 29: 380-386
- SCHIRMACHER P., HELD W.A., YANG D., CHISARI F.V., RUSTUM Y., ROGLER C.E., Reactivation of insulin-like growth factor II during hepatocarcinogenesis in transgenic mice suggests a role in malignant growth. *Cancer Res* (1992); 52: 2549-2556
- SCHLUTER K.D., PIPER H.M., Regulation of growth in the adult cardiomyocytes. *Faseb J* (1999); 13 Suppl: S17-22
- SCHOEN F.J., The heart. In: Cotran F.S., Kumar V., Collins T. (Hrsg.): *Pathologic basis of disease* (6. Auflage), WB Saunders, Philadelphia (1999); 543-599
- SELL C., DUMENIL G., DEVEAUD C., MIURA M., COPPOLA D., DEANGELIS T., RUBIN R., EFSTRATIADIS A., BASERGA R., Effect of a null mutation of the insulin-like growth factor I receptor gene on growth and transformation of mouse embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol* (1994); 14: 3604-3612
- SHERLEY J.L., Asymmetric cell kinetics genes: the key to expansion of adult stem cells in culture. *Stem Cells* (2002); 20: 561-572
- SKLAR M.M., KIESS W., THOMAS C.L., NISSLEY S.P., Developmental expression of the tissue insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor in the rat. Measurement by quantitative immunoblotting. *J Biol Chem* (1989); 264: 16733-16738
- STEWART C.E., ROTWEIN P., Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev* (1996a); 76: 1005-1026
- STEWART C.E., ROTWEIN P., Insulin-like growth factor-II is an autocrine survival factor differentiating myoblasts. *J Biol Chem* (1996b); 271: 11330-11338
- SU E.J., CIOFFI C.L., STEFANSSON S., MITTEREDER N., GARAY M., HRENIUK D., LIAU G., Gene therapy vector-mediated expression of insulin-like growth factors protects cardiomyocytes from apoptosis and enhances neovascularization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2003); 284: H1429-1440
- SUN Y., KIANI M.F., POSTLETHWAITE A.E., WEBER K.T., Infarct scar as living tissue. *Basic Res Cardiol* (2002); 97: 343-347
- SUN Y., WEBER K.T., Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res* (2000); 46: 250-256
- SUSSENBACH J.S., STEENBERGH P.H., HOLTHUIZEN P., Structure and expression of the human insulin-like growth factor genes. *Growth Regul* (1992); 2: 1-9

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- TADA M., BAILIN G., BARANY K., BARANY M., Proteolytic fragmentation of bovine heart heavy meromyosin. *Biochemistry* (1969); 8: 4842-4850
- TAKANO H., HASEGAWA H., NAGAI T., KOMURO I., Implication of cardiac remodeling in heart failure: mechanisms and therapeutic strategies. *Intern Med* (2003); 42: 465-469
- TAKEMURA G., FUJIWARA H., Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction. *Pharmacol Ther* (2004); 104: 1-16
- TAKEMURA G., FUJIWARA H., Morphological aspects of apoptosis in heart diseases. *J Cell Mol Med* (2006); 10: 56-75
- TEERINK H., KASPERAITIS M.A., DE MOOR C.H., VOORMA H.O., THOMAS A.A., Translation initiation on the insulin-like growth factor II leader 1 is developmentally regulated. *Biochem J* (1994); 303 ( Pt 2): 547-553
- TERADA N., HAMAZAKI T., OKA M., HOKI M., MASTALERZ D.M., NAKANO Y., MEYER E.M., MOREL L., PETERSEN B.E., SCOTT E.W., Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* (2002); 416: 542-545
- TORELLA D., ELLISON G.M., MENDEZ-FERRER S., IBANEZ B., NADAL-GINARD B., Resident human cardiac stem cells: role in cardiac cellular homeostasis and potential for myocardial regeneration. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* (2006); 3 Suppl 1: S8-13
- URBANEK K., ROTA M., CASCAPERA S., BEARZI C., NASCIMBENE A., DE ANGELIS A., HOSODA T., CHIMENTI S., BAKER M., LIMANA F., NURZYNSKA D., TORELLA D., ROTATORI F., RASTALDO R., MUSSO E., QUAINI F., LERI A., KAJSTURA J., ANVERSA P., Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival. *Circ Res* (2005); 97: 663-673
- VALENZANO K.J., HEATH-MONNIG E., TOLLEFSEN S.E., LAKE M., LOBEL P., Biophysical and biological properties of naturally occurring high molecular weight insulin-like growth factor II variants. *J Biol Chem* (1997); 272: 4804-4813
- VALENZANO K.J., REMMLER J., LOBEL P., Soluble insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor carries multiple high molecular weight forms of insulin-like growth factor II in fetal bovine serum. *J Biol Chem* (1995); 270: 16441-16448
- VARGAS S.O., SAMPSON B.A., SCHOEN F.J., Pathologic detection of early myocardial infarction: a critical review of the evolution and usefulness of modern techniques. *Mod Pathol* (1999); 12: 635-645
- VETTER U., KUPFERSCHMID C., LANG D., PENTZ S., Insulin-like growth factors and insulin increase the contractility of neonatal rat cardiocytes in vitro. *Basic Res Cardiol* (1988); 83: 647-654

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- VIRAG J.I., MURRY C.E., Myofibroblast and endothelial cell proliferation during murine myocardial infarct repair. *Am J Pathol* (2003); 163: 2433-2440
- VOGT A.M., HTUN P., KLUGE A., ZIMMERMANN R., SCHAPER W., Insulin-like growth factor-II delays myocardial infarction in experimental coronary artery occlusion. *Cardiovasc Res* (1997); 33: 469-477
- VROBEL T.R., JORGENSEN C.R., BACHE R.J., Myocardial lactate and adenosine metabolite production as indicators of exercise-induced myocardial ischemia in the dog. *Circulation* (1982); 66: 554-561
- WHALEN D.A., JR., HAMILTON D.G., GANOTE C.E., JENNINGS R.B., Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells. I. Effects on cell volume regulation. *Am J Pathol* (1974); 74: 381-397
- WOLF E., KRAMER R., BLUM W.F., FOLL J., BREM G., Consequences of postnatally elevated insulin-like growth factor-II in transgenic mice: endocrine changes and effects on body and organ growth. *Endocrinology* (1994); 135: 1877-1886
- WU Y., YAKAR S., ZHAO L., HENNIGHAUSEN L., LEROITH D., Circulating insulin-like growth factor-I levels regulate colon cancer growth and metastasis. *Cancer Res* (2002); 62: 1030-1035
- YANG F., LIU Y.H., YANG X.P., XU J., KAPKE A., CARRETERO O.A., Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice. *Exp Physiol* (2002); 87: 547-555
- YAU T.M., KIM C., LI G., ZHANG Y., WEISEL R.D., LI R.K., Maximizing ventricular function with multimodal cell-based gene therapy. *Circulation* (2005); 112: I123-128
- YEH E.T., ZHANG S., WU H.D., KORBLING M., WILLERSON J.T., ESTROV Z., Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation* (2003); 108: 2070-2073
- ZHANG S., WANG D., ESTROV Z., RAJ S., WILLERSON J.T., YEH E.T., Both cell fusion and transdifferentiation account for the transformation of human peripheral blood CD34-positive cells into cardiomyocytes in vivo. *Circulation* (2004); 110: 3803-3807
- ZUMKELLER W., IGFs and IGF-BPs: surrogate markers for diagnosis and surveillance of tumour growth? *Mol Pathol* (2001); 54: 285-288

**8 TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1. Zelluläre Wirkung von IGF in vitro .....	31
Tabelle 2. Wirkung von IGF im Myokardinfarktmodell.....	36
Tabelle 3. Transdifferenzierung/Fusion von aus dem Knochenmark stammender Zellen.....	43
Tabelle 4. Arbeitsschritte zur Isolierung der Gesamt-RNA .....	51
Tabelle 5. Einstellung des Thermocyclers zur Durchführung der PCR.....	53
Tabelle 6. Versuchsplan zum 14 Tage Versuch.....	56
Tabelle 7. Versuchsplan zum 7 Tage Versuch.....	57
Tabelle 8. Versuchsplan zum 3 Tage Versuch.....	58
Tabelle 9. Perioperative Komplikationen: Definition des Komplikationsgrades .....	62
Tabelle 10. Perioperative Komplikationen: Überwachung und Maßnahmen.....	63
Tabelle 11. Marker und auszuwertende Bereiche der immunhistologischen Färbungen und der Immunfluoreszenzfärbung.....	67
Tabelle 12. Immunhistochemische Detektionsmethoden.....	69
Tabelle 13. Materialien zur immunhistologischen $\alpha$ -smc-Aktin-Färbung .....	70
Tabelle 14. Materialien zur immunhistologischen Desmin-Färbung.....	71
Tabelle 15. Materialien zur Immunfluoreszenzfärbung (Ki67) .....	72
Tabelle 16. Perioperative Komplikationen der Versuchstiergruppen 1 - 3 .....	76
Tabelle 17. Postoperative Komplikationen der Versuchstiergruppen 1 - 3.....	77
Tabelle 18. Gegenüberstellung der linksventrikulären Auswurfraction (EF) der Kontroll- und der EPC-pLXSN-Gruppe .....	79
Tabelle 19. Gegenüberstellung der linksventrikulären Auswurfraction (EF) der pLXSN- und der EPC-IGF-II-Gruppe .....	79
Tabelle 20. Gegenüberstellung der Ergebnisse histomorphometrischer und immunhistologischer Untersuchungen der Kontroll- und der EPC-pLXSN-Gruppe .....	83
Tabelle 21. Gegenüberstellung der Ergebnisse histomorphometrischer und immunhistologischer Untersuchungen der EPC-pLXSN- und der EPC-IGF-II-Gruppe..	83
Tabelle 22. Gegenüberstellung der Anzahl proliferierender Zellen 3 Tage, 7 Tage und 14 Tage nach Ischämie/Reperfusion in der Kontrollgruppe und der EPC-pLXSN-Gruppe .....	87
Tabelle 23. Gegenüberstellung der Anzahl proliferierender Zellen 3 Tage, 7 Tage und 14 Tage nach Ischämie/Reperfusion in der EPC-pLXSN-Gruppe und der EPC-IGF-II -Gruppe...	87
Tabelle 24. Ergebnisse des Proliferations-Assays.....	91

**9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1. Komponenten der IGF-Familie und Insulin .....18

Abbildung 2. Schematische Darstellung der intrazellulären Signalwege des IGF-IR .....24

Abbildung 3. Interaktion von IGF-II mit Rezeptoren .....27

Abbildung 4. Zeiteinteilung des 14 Tage Versuchs .....56

Abbildung 5. Zeiteinteilung des 7 Tage Versuchs .....57

Abbildung 6. Zeiteinteilung des 3 Tage Versuchs .....58

Abbildung 7. Blick auf den linken Ventrikel nach Thorakotomie und Eröffnung des  
Herzbeutels .....61

Abbildung 8. Echokardiographische Darstellung des linken Ventrikels.....64

Abbildung 9. Explantiertes Rattenherz.....65

Abbildung 10. Laufmuster der Gelelektrophorese .....75

Abbildung 11. Linksventrikuläre Auswurfraction (EF) der Versuchstiergruppen.....80

Abbildung 12. Relative Infarktgröße: Prozentuales Verhältnis von infarziertem zu intaktem  
Myokard des linken Ventrikels 14 Tage nach MI .....82

Abbildung 13. Rattenmyokard, EvG-Färbung .....82

Abbildung 14. Gefäßdichte 14 Tage nach Myokardinfarkt .....84

Abbildung 15. Anzahl proliferierender Zellen 3 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt  
.....88

Abbildung 16. Ki67+ Zellen 3 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt .....88

Abbildung 17. Anzahl proliferierender Zellen 7 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt  
.....89

Abbildung 18. Ki67+ Zellen 7 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt .....89

Abbildung 19. Anzahl proliferierender Zellen 14 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt  
.....90

Abbildung 20. Ki67+ Zellen 14 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt .....90

Abbildung 21. Proliferations-ELISA: BrdU Inkorporation in H9C2 Zellen .....92

## 10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
µl	Microliter
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AcetylCoA	Acetylcoenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Antigen
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
β-ME	β-Mercaptoethanol
bp	Basenpaar
BrdU	5-Brom-2'-deoxyuridin
°C	Grad Celsius
CAK	CDK Activator
CD34+	CD34 positive Zellen
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
c-fos	Transkriptionsfaktor
c-jun	Transkriptionsfaktor
CKI	CDK inhibitor
cm	Zentimeter
c-myc	Transkriptionsfaktor
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DAPI	4', 6 diamino-2-phenylindole
DMEM	Dulbeccos modified Eagle Medium
DNA	deoxyribonucleic acid

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

dNTP	desoxynucleosidtriphosphate
dUTP	deoxyuridinetriphosphate
EBM-2	Endothial Basal Medium-2
EC	Endothelzelle
EDD	eddiastolischer Diameter
EDV	enddiastolisches Volumen
E2F	zellulärer Transkriptionsfaktor
EF	ejection fraction
EGM-2	endothelial cell medium-2
eIF4E	elongations factor 4E
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
env	envelop
EPC	endothelial progenitor cells
EPC-pLXSN	endothelial progenitor cells retroviral transduziert mit Vektor pLXSN
EPC-IGF-II	endothelial progenitor cells retroviral transduziert mit Vektor pLXSN-IGF-II
ERK	extrazellulär-signalvermittelnde Proteinkinase
ESD	endsystolischer Diameter
ESV	enddiastolisches Volumen
et al.	et alii, und Mitarbeiter
EvG-Färbung	Elastica-van-Gieson-Färbung
FAD	Flavinadeninnucleotid
FCS	fetal calf serum
FELSA	Federation of European Laboratory Animal Science Association
FGF	fibroblast growth factor
FGF-2	basic fibroblast growth factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
S	fractional shortening
g	Gramm
gag	group-specific-antigen
G0-Phase	Ruhephase
G1-Phase	Gab 1-Phase
G2-Phase	Gab 2-Phase
H <sub>2</sub> O	Wasser
HF	Hydrogenfluorid

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

HSC	Hämatopoetische Stammzelle
huEPC	humane endothelial progenitor cells
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
GDP	Guanosindiphosphat
Grb2	growth factor receptor bound-2-protein
GTP	Guanosintriphosphat
HGF	hepatocyte growth factor
IGF-I	Insulin-like growth factor-I
IGF-IR	Insulin-like growth factor-I-Rezeptor
IGF-II	Insulin-like growth factor-II
IGF-IIR	Insulin-like growth factor -II-Rezeptor
IGFBP	Insulin-like growth factor binding protein
IHK	ischämische Herzkrankheit
i. m.	intramuskulär
inkl.	inklusive
IL	Interleukin
IMDM	Iscove`s modified Dulbecco`s Media
IR	Insulinrezeptor
IRS-1	Insulin-Rezeptorsubstrat-1
i. v.	intravenös
Kat.Nr.	Katalognummer
kDA	KiloDalton
KG	Körpergewicht
KHK	koronare Herzkrankheit
Ki67	Proliferationsmarker
l	Liter
LAD	left anterior descending artery
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LSAB	labelled (Strept-) Avidin-Biotin
LTRs	long term repeats
M.	musculus
MACS	magnetic activated cell separation
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCS	multiple cloning site

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

mg	Milligramm
MI	Myokardinfarkt
min	Minute
Mio.	Millionen
Mm.	musculi
mM	Millimol
MMP	Matrix-Metalloproteinase
M-Phase	Mitosephase
m-RNA	messenger ribonucleic acid
MW	Mittelwert
MyoFB	Myofibroblasten
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
ng	Nanogramm
nM	Nanomol
n.s.	nicht signifikant
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	optical density
OP	Operation
P70 <sup>S6k</sup>	p70 ribosomal protein S6 kinase
p85	regulatorische Untereinheit der Phosphoinositol-3-Kinase
PBS	phosphat buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pH	negativer Logarithmus Wasserstoffionenkonzentration
PI3-K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
pol	polymerase
p. os	per os
p-Wert	propability, Irrtumswahrscheinlichkeit
RNU	thymusaplastisch
s. c.	subkutan
SCF	recombinant human stem cell factor
SCGFβ	stem cell growth factorβ

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

sek.	Sekunden
SEM	Standardfehler
Shc	scr homology domain containing protein
smc	smooth muscle cell
Sos	Son of sevenless
SPF	spezifisch pathogenfrei
S-Phase	Synthesephase
Tab.	Tabelle
TGF	transforming growth factor
TIMPS	tissue inhibitors of matrix metalloproteinases
TNF- $\alpha$	tumor-necrosis-factor- $\alpha$
U	Umdrehungen
UV	Ultraviolette
V	Volt
VE-Cadherin	vascular/endothelial Cadherin
VEGF	vascular endothelial growth factor
vs.	versus
Well-Platte	Loch-Platte

### 11 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. vet. habil. W. Schmahl danke ich herzlich für die Ermöglichung und die Übernahme der Arbeit an die tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Bei Herrn Prof. Dr. med. W. Gänsbacher, Direktor des Institutes für experimentelle Chirurgie der Technischen Universität München, möchte ich mich für die Arbeitsmöglichkeit bedanken.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Frau PD Dr. med. I. Ott für die sehr gute und freundliche Betreuung. Vor allem möchte ich ihr für die Vermittlung tiefgründiger Fachkenntnisse und die Korrektur des Manuskripts danken.

Bei Herrn Dr. phil. Robert Oostendorp bedanke ich mich für die Bereitstellung der transduzierten Zellen.

Der Hanns-Seidel-Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung in der Promotionszeit sowie für die sehr interessanten Vorträge und Diskussionen.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau C. Bauer für ihre freundschaftliche Unterstützung bedanken.

Ganz herzlich danke ich C. Schroller, Dr. K. Doss und E. Weidl für die erweiterten Fachabende und ihre Unterstützung für das Gelingen dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie, v. a. bei Barbara und Christian bedanken.

Mein allerherzlichster Dank gilt Rainer Hach. Ich danke ihm vor allem für seine unglaubliche Geduld, seine stete Hilfsbereitschaft und die ein oder andere kritische Anmerkung beim Korrekturlesen.