

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinikum rechts der Isar

I. Medizinische Klinik und Poliklinik

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A.Schömig)

**Expandierte endotheliale Vorläuferzellen stimulieren die Proliferation von
Gefäßzellen durch die Freisetzung von Mediatoren**

Philipp Klaus Groha

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E.J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. I. V. Ott
2. Univ.-Prof. Dr. K.-L. Laugwitz

Die Dissertation wurde am 10.03.2011 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 07.03.2012 angenommen.

1	EINLEITUNG.....	4
1.1	ISCHÄMISCHE HERZERKRANKUNG	4
1.2	NEOVASKULOGENESE.....	6
1.3	VORLÄUFERZELLEN	7
1.3.1	<i>Zellcharakterisierung</i>	8
1.3.2	<i>Rolle der EPC bei kardiovaskulären Erkrankungen.....</i>	9
1.4	ZYTOKINE	11
1.5	THERAPEUTISCHE ANSÄTZE	15
1.6	ZELLINTERAKTIONEN	18
1.6.1	<i>Transdifferenzierung</i>	18
1.6.2	<i>Fusion.....</i>	20
1.6.3	<i>Nanotubes.....</i>	21
1.6.4	<i>Parakrine Effekte.....</i>	22
2	ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	23
3	MATERIAL UND METHODEN.....	24
3.1	MATERIALEN.....	24
3.1.1	<i>Labormaterialien.....</i>	24
3.1.2	<i>Geräte.....</i>	24
3.1.3	<i>Substanzen.....</i>	25
3.2	METHODEN	27
3.2.1	<i>Zellkultur</i>	27
3.2.2	<i>Fluoreszenzmikroskopie</i>	32
3.2.3	<i>Mikroskopie zur Zellfusion.....</i>	34
3.2.4	<i>Proliferationsessay.....</i>	35
3.2.5	<i>Zytokinmessungen</i>	37
4	ERGEBNISSE.....	38
4.1	KOINKUBATIONSVERSUCHE	38
4.2	PROLIFERATIONSASSAY.....	69
4.3	ZYTOKINE	72
4.4	MIKROSKOPIE LEBENDER ZELLEN, MARKIERT MIT Q-TRACKER.....	79
5	DISKUSSION	81
5.1	PROLIFERATION.....	81
5.2	ZELLINTERAKTION	84
5.3	ZUSAMMENFASSUNG.....	88
5.4	LIMITATIONEN.....	89
6	LITERATURVERZEICHNIS	91

1 Einleitung

Die ischämische Herzerkrankung, bedingt durch Atherosklerose und dadurch verbundene Komplikationen bzw. Erstmanifestationen wie Myokardinfarkt oder Angina pectoris, ist die Haupttodesursachen der westlichen Welt. In einer Vielzahl von experimentellen und therapeutischen Ansätzen wird derzeit und wurde bereits in der Vergangenheit nach der Entstehung, Progredienz und Heilung sowie Prävention von chronischen und akuten Manifestationen einer myokardialen Ischämie und deren Komplikationen gesucht.

Sowohl experimentelle Studien mittels Tierversuch, als auch klinische Anwendungen zeigten eine Verbesserung der Herzfunktion postischämischer Myokardläsion nach therapeutischer Anwendung von Vorläufer- oder Stammzellen.¹ Es liegen verschiedene Hypothesen über den möglichen Wirkmechanismus vor. Diese reichen von einer Transdifferenzierung der Vorläuferzellen^{2, 3} in ausgereifte myokardiale oder endotheliale Zellen, über eine Fusion⁴ bis hin zu parakrinen Effekten wie direkte Zell-Zellverbindungen⁵ oder die Wirkung von freigesetzten Zytokinen⁶. Ebenso konnte eine vermehrte Mobilisation von Stamm- oder Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in der akuten Ischämie beobachtet werden. Bei den mobilisierten Zellen handelt es sich um polymorphnukleäre Granulozyten, T- und B-Lymphozyten, Monozyten und endotheliale Vorläuferzellen (EPC) sowie hämatopoetische und mesenchymale Vorläuferzellen^{1, 7}. Somit wird den endotheliale Vorläuferzellen eine wichtige Rolle in der Entstehung, Progredienz aber auch in der Heilung und Prävention von ischämischen Herzerkrankungen zugeschrieben.

1.1 *Ischämische Herzerkrankung*

Durch eine myokardiale Ischämie wird ein reversibler oder irreversibler Schaden am Myokard durch eine gestoppte oder verminderte Blutzufuhr bewirkt. Die Ursache hierfür ist in den meisten Fällen eine Stenose oder gar ein Verschluss der Koronararterien. Nicht selten ist dies durch atherosklerotische Plaques bedingt.

Atherosklerose an sich ist eine systemische inflammatorische Erkrankung der Gefäßwand⁸. Atherosklerotische Plaques können den Blutfluss zu verschiedenen Organen kritisch reduzieren und somit zu Symptomen wie Angina pectoris, Claudicatio oder Angina abdominalis führen. Weiterhin kann es dadurch bedingt zu

schwerwiegenden Komplikationen wie einem Myokardinfarkt durch Plaqueruptur kommen. Unterschiedliche Risikofaktoren fördern die Entstehung und Progredienz der Erkrankung. So zählen familiäre Disposition, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, arterielle Hypertonie oder Hypercholesterinämie zu prädisponierenden Faktoren.

Zerstörung oder Beschädigung der innersten Schicht der arteriellen Wand, des Endothels, führt zur Entstehung von Atherosklerose und somit zur Bildung von Plaques. Durch eine erhöhte Permeabilität des Endothels für diverse Plasmabestandteile und darunter vor allem Lipoproteine kommt es nach Einwandern von Makrophagen und T-Lymphozyten weiter zu mikroskopisch sichtbaren Auflagerungen, so genannten „Fatty streaks“, in der Intima. Hieraus kann sich dann eine fibröse Plaque entwickeln, bestehend aus Lipiden und nekrotischen Anteilen von Makrophagen. Zusätzlich bildet sich eine Schicht von Fibrozyten und Myozyten. Im weiteren Verlauf kommt es zu weiteren Einwandern von Leukozyten und Monozyten. Viele Mediatoren sind am Prozess der Atherosklerose beteiligt. So können Platelet-derived growth factor (PDGF), Stickoxide, Prostazykline, Angiotensin II und Endothelin zu einer erhöhten Endothelpermeabilität führen. Andere Zytokine wie Interleukin-8 (IL-8), PDGF, basic fibroblast growth factor (bFGF) oder Transforming growth factor (TGF- β) sind an der chemotaktischen Einwanderung von Monozyten beteiligt. Die Bildung von so genannten Schaumzellen aus aktivierten Makrophagen wird durch LDL, Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor (MCSF), Tetrahydrofolat (THF- α) und Interleukin 1 β (IL-1 β) stimuliert.

Solange eine Eigenelastizität der Gefäßwand besteht, kommt es zu einer Ausweitung derselbigen und die Plaque wächst weiter, bis schließlich eine Lumeneinengung des Gefäßes entsteht. Hierbei entstehen Turbulenzen im Blutfluss sowie bedingt sich eine Minderdurchblutung nachgeschalteter Organe und damit auch Ischämien mit entsprechender Symptomatik. Durch Turbulenzen kann es jedoch ebenso zur Entwicklung von Thromben kommen, die als Embolus schließlich ein gesamtes Gefäß verlegen und somit zu einem Infarkt führen können⁹.

Der therapeutische Ansatz des akuten Infarktes mittels perkutaner Angioplastie (PCI) hat in den letzten Jahren deutlich an Bedeutung gewonnen. In der akuten Ischämie kann so eine schnelle Reperfusion des betroffenen Myokards gewährleistet werden. Aber auch in der chronischen Ischämie spielt die konventionelle Revaskularisierung eine wichtige Rolle. Bei vielen Patienten wird mittels PCI oder aortokoronarer Bypass-Chirurgie die myokardiale Funktion verbessert oder Symptome durch eine

gesteigerte Perfusion des Myokards gelindert. Dennoch können 20 bis 37% der Patienten mit ischämischer Herzerkrankung diesen Verfahren nicht zugeführt werden¹⁰. Zusammen mit Patienten, die weiterhin nach erfolgter invasiver Therapie Beschwerden äußern, spricht die American Heart Association hier von 4,7 Millionen Patienten in den USA, die an Symptomen und Folgen einer chronischen Myokardischämie leiden. Stetig werden Fortschritte in der interventionellen sowie pharmakologischen Therapie erreicht. Es bleibt jedoch weiterhin eine große Zahl an Patienten mit einer progredienten Herzinsuffizienz.

Dies zu verhindern oder den Anteil der Patienten zu reduzieren, macht neue Therapieansätze notwendig. So führte das Wissen über den Mechanismus der Neovaskularisation und die Entdeckung von potenten angiogenetischen Wachstumsfaktoren zur Entwicklung einer therapeutischen Angiogenese bei der ischämischen Herzerkrankung. Eine Therapie mittels Wachstumsfaktoren ist entweder durch Gen-Transfer oder Applikation von rekombinanten Proteinen möglich. Als neuer therapeutischer Ansatz wird auch eine Applikation von Progenitorzellen untersucht.

1.2 Neovaskulogenese

Endotheliale Zellen stellen einen wichtigen Bestandteil von Blutgefäßen dar. So nehmen ausgereifte Zellen vor allem aber auch endotheliale Vorläuferzellen (EPC) eine wesentliche Rolle bei der Bildung von neuen Blutgefäßen ein. Dies passiert schon auf embryonaler Ebene. Hier bilden sich aus migrierten mesodermalen Zellen Angioblasten oder EPC. In den embryonalen Blutkuchen sind EPC dann randständig während die hämatopoetischen Stammzellen zentral liegen. Zur Induktion der EPC und damit zur Gefäßbildung scheinen einige Faktoren entscheidende Rollen zu spielen. Hier sind neben Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2) oder Vascular Endothelial Growth Factor 2 (VEGF-2) auch das Oberflächenantigen Flk-1 zu nennen¹¹. In der postnatalen Phase kann die Neovaskulogenese auf zwei unterschiedlichen Wegen stattfinden. Zur Neubildung eines Gefäßes migrieren Endothelzellen nach einem biochemischen Signal zur Bildung eines Mikrotubulus, der sich zu einem Gefäß entwickeln kann. Zuvor erfolgt eine Steigerung der vaskulären Permeabilität mit dem Austritt von Plasmaproteinen ins Gewebe. Aktivierte Endothelzellen können folgen. Dies geschieht immer an bereits bestehenden Gefäßen als Sprossung. Neben ausgereiften Endothelzellen sind auch endotheliale Progenitorzellen

beteiligt¹². Eine Vielzahl von regulatorischen Faktoren ist notwendig und nimmt Einfluss auf die sog. Angiogenese. Bereits identifiziert sind die oben erwähnten Faktoren VEGF und Flk-1 als Oberflächenantigen. Der Prozess der Angiogenese ist wesentlicher Bestandteil bei der Wundheilung sowie Versorgung von geschädigten Gewebe mit Blutfluss. Aber auch im Tumorwachstum spielt sie eine Rolle. Ein weiterer wichtiger Trigger ist Ischämie.

Vaskulogenese dagegen ist die de novo Bildung von Blutgefäßen. Bisweilen wurde dies nur embryonalen Zellen zugeschrieben. Man konnte allerdings auch im adulten Gewebe eine Vaskulogenese zeigen, an der endotheliale Vorläuferzellen beteiligt sind¹³. EPC werden hier bei Ischämie mobilisiert und bilden dann im ischämischen Gewebe ausdifferenzierte Endothelzellen. Hierbei spielen die Faktoren oder Zytokine VEGF, FGF-2 sowie IGF-1 eine regulierende Rolle^{14, 15}.

1.3 Vorläuferzellen

Die wohl einfachste aller Stammzellpopulationen sind embryonale Stammzellen. Diese bilden sich als Zellmasse bereits fünf Tage nach der Fertilisation¹⁶. Sie haben das größte Potential für Entwicklung und Differenzierung und stellen die Grundlage für die Entstehung der drei Keimblätter dar. Bisweilen bestand die Lehrmeinung, dass in der fetalen Phase Stammzellen nur die Potenz besäßen, sich in das jeweilige Gewebe zu differenzieren, in dem sie sich befinden. Über eine transiente Vorläuferzelle entwickelt sich aus der ständigen Stammzelle eine ausdifferenzierte spezifische Zelle des jeweiligen Milieus. So bildet sich aus der knochenmarkständigen Stammzelle eine hämatopoetische Vorläuferzelle, welche sich dann weiter in ausdifferenzierte Blutzellen entwickelt.

Ursprung ist eine pluripotente Stammzelle im Knochenmark. Diese differenziert über eine mesodermale Stammzelle in Hämangioblasten bzw. vaskuläre Stammzellen. Hieraus können sich neben hämatopoetischen Stammzellen auch endotheliale Progenitorzellen als Vorläuferzellen entwickeln. Gelangen diese in den Blutfluss, lassen sie sich als gewebständige Vorläuferzelle nieder und können zur Endothelzelle ausdifferenzieren¹⁷.

1.3.1 Zellcharakterisierung

Therapeutisch kommt eine Vielzahl an Vorläuferzellen zur klinischen Anwendung. Daher sind sie ebenso Gegenstand tierexperimenteller Untersuchungen.

Mesenchymale Stammzellen (MSC) ziehen nicht nur in der Kardiologie oder proangiogenetischen Therapie Aufmerksamkeit auf sich. Sie bilden auch eine breite Basis in der regenerativen Anwendung sowie im „tissue engineering“. Allerdings gibt es noch keinen alleinigen spezifischen Marker dieser Zellen. So werden die multipotenten Stromazellen über verschiedenen Eigenschaften und Oberflächenstrukturen definiert. An der Oberfläche tragen sie folgende Marker: CD44, CD105, CD29, CD61, CD49b, CD166 sowie CD90. Sie zeichnen sich durch Adhärenz in der ex-vivo-Zellkultur aus und differenzieren hier in Adipoblasten, Osteoblasten sowie Chondroblasten. Negativ zeigen sie sich für endotheliale und monozytäre Oberflächenantigene. Die Isolation von MSC kann aus verschiedenen Gewebetypen erfolgen, jedoch finden sich MSC vor allem im Knochenmark¹⁸.

Die zweite große Gruppe bilden zirkulierenden Vorläuferzellen. Es herrscht keine einheitliche Nomenklatur. Eine Definition der einzelnen Zelllinien erfolgt über spezifische Oberflächenstrukturen, spezifische Eigenschaften oder auch über einen spezifischen Kulturansatz der jeweiligen Zellen¹⁹.

Endotheliale Vorläuferzellen entstehen wie bereits erwähnt über wenige Zwischenstufen aus einer pluripotenten Stammzelle des Knochenmarks. In der Peripherie lassen sie sich dann auf unterschiedliche Weise gewinnen und expandieren. Diesem Prozess zwischengeschaltet sind Hämangioblasten.

In der Peripherie lassen sich sogenannte CD34+-Zellen gewinnen. Definiert werden sie vor allem durch das Oberflächenantigen CD34. Weiterhin tragen sie den hämatopoetischen Marker CD133 sowie den leukozytären Marker CD45 auf der Oberfläche. Selbiger lässt sich allerdings nach einer Kultivierung für sieben Tage ex-vivo nicht mehr nachweisen. Hier zeigen sich die Zellen dann positiv für folgende endotheliale Oberflächenantigene: CD31, Tie-2, E-Selektin sowie den VEGF-Rezeptor FIK-1, welchen die Zellen bereits vor Kultivierung tragen¹³. Eine Isolierung erfolgt aus dem Vollblut nach Ficol-Fällung und Isolation mittels magnetischen CD34+-Kügelchen²⁰.

Aus einem Zellpool dieser Zellen, gewonnen zuvor aus Nabelschnurblut oder venösen Blutproben, lassen sich über eine vierwöchige Kultivierung in der Zellkultur mit endotheliale Medium Zellen expandieren, die CD31, von-Willebrand-Faktor

sowie den VEGF-Rezeptor weiterhin tragen, allerdings für CD45 als mononukleärer Marker negativ sind²¹. Diese Zellen besitzen die Eigenschaft im Matrigelassay Tubuli wie bereits ausdifferenzierte Endothelzellen zu bilden. Im Folgenden werden diese Zellen als expandierte EPC beschrieben. Gegenüber ausdifferenzierten Endothelzellen zeigen sie ein deutlich höheres proliferatives Verhalten²². In Vivo konnte gezeigt werden, dass diese Zellen an der Neovaskulogenese teilhaben und damit in der Ischämie einen Beitrag zur Heilung leisten²⁰.

Im Gegensatz dazu stehen mononukleäre EPC. Diese werden wiederum aus einem mononukleären Zellpool isoliert. Die Zellen werden aus Vollblut von erwachsenen Probanden mittels Ficoll-Fällung und Zentrifugation sowie anschließender Kultivierung gewonnen. In endothelialen Medium adhärente Zellen zeigen dann an der Oberfläche CD31 und CD34 als endotheliale Oberflächenantigene sowie die monozytären Marker CD45 und CD14. Weiterhin exprimieren sie VEGF-Rezeptor 2 sowie CD141, CD105, CD146 wie auch CD144 und von-Willebrand-Faktor als endotheliale Strukturen an der Oberfläche. Sie bilden im Matrigelassay allerdings Cluster aus. Lichtmikroskopisch stellen sich diese spindelförmig dar und werden im Folgenden mononukleäre EPC genannt²³. Zusammenfassend besteht der Unterschied der beiden EPC in Ihrer andersartigen Gewinnung (mononukleäre Zellen vs. CD34+ Zellpool) sowie einer kurzen Kulturdauer der mononukleären EPC einerseits und einem Expandieren in Kultur über Wochen der expandierten EPC. Weiterhin besteht ein unterschiedliches Verhalten im Matrigelassay und bei bestimmten Oberflächenstrukturen.

1.3.2 Rolle der EPC bei kardiovaskulären Erkrankungen

Die häufigste Ursache für Erkrankungen des Herzens ist ischämischer Genese. Hier wiederum stellt die Atherosklerose die wichtigste Ursache dar. Wie bereits angesprochen ist die Grundlage der Atherosklerose eine Läsion des Endothels, welches jedoch die Fähigkeit besitzt, sich selbst zu regenerieren. So konnte experimentell gezeigt werden, wenn ein kleiner Teil der Intima entfernt wird, proliferieren Endothelzellen vom Rand der Läsion und wandern ein. Ist das Gewebe gesund und jung, ist der Prozess einwandfrei und die Intimaschicht ist wieder hergestellt. Bei Progredienz von Atherosklerose ist dies nicht mehr gegeben²⁴. Es zeigte sich allerdings, dass der Reparaturprozess nicht nur durch lokale Faktoren, sondern auch durch zirkulierende Zellen bestimmt ist. Zu den Zellen mit dieser

Fähigkeit zählen auch endotheliale Progenitorzellen. EPC können durch unterschiedliche Stimuli aus dem Knochenmark mobilisiert werden. Generell erfolgt wohl eine Mobilisation bei Hypoxämie aus dem Knochenmark²⁵. So lässt sich auch ein vermehrter Anteil an Vorläuferzellen in der akuten Myokardischämie verbunden mit einem erhöhten Gehalt an G-CSF erklären^{26, 27}. Allerdings steigt die Anzahl der zirkulierenden Vorläuferzellen nicht nur in akuten kardialen Erkrankungen, auch bei Patienten mit akutem Apoplex konnte ein erhöhter Gehalt an CD34+ Zellen gemessen werden²⁸. Weiterhin findet man in venösen Thromben auch endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark. Bei GFP-makierten Mäusen zeigt sich ein Anteil an markierten knochenmarksständigen Zellen in venösen Thromben, diesen Zellen können auch Oberflächenmarker wie CD34 oder VEGFR2 zugeschrieben werden²⁹.

Große Studien haben bereits belegt, dass ein verringerter Anteil an zirkulierenden EPC signifikant mit einem erhöhten Risiko verbunden ist, an einer kardiovaskulären Erkrankung zu sterben oder erstmalig zu erkranken.³⁰ Ebenso ist auch eine erhöhte Hospitalisationsrate verbunden mit einem verringerten Anteil an EPC im zirkulierendem Blut. Zusätzlich steigt das eventfreie Überleben ohne kardiovaskuläre Ereignisse mit der gestiegenen Anzahl von EPC³¹. Ebenso konnte eine negative Korrelation der Anzahl der kardiovaskulären Risikofaktoren und der Anzahl der EPC gezeigt werden. So war der Anteil an EPC bei Rauchern oder Patienten mit einer positiven Familienanamnese geringer. Auch die Migration dieser Zellen im Falle eines ischämischen Events dieser Patienten reduziert³². Fortgeschrittenes Alter lässt ebenso Zahl und Funktion (Migration und Proliferation) von EPCs sinken. Somit kann generell der Schluss gezogen werden, dass auch ein verminderter Anteil an EPC einen Risikofaktor darstellt.

Folglich ist damit aber auch ein rein therapeutischer Ansatz mit endothelialen Vorläuferzellen denkbar. Hierbei konnte bereits in einigen Studien in vivo gezeigt werden, dass sich Organfunktionen nach ischämischen Läsionen nach Gabe von Vorläuferzellen sich verbessern lassen (siehe 1.5).

1.4 Zytokine

Zytokine sind regulierende Proteine des menschlichen Organismus. Als Gruppe von Peptiden spielen sie eine regulierende Funktion für das Wachstum und die Differenzierung von Körperzellen. Vor allem auf Proliferation und Differenzierung von bestimmten Zielzellen nehmen sie Einfluss. Einige Zytokine werden dementsprechend als Wachstumsfaktoren bezeichnet, andere spielen eine wichtige Rolle für immunologische Reaktionen und können dafür Mediatoren bezeichnet werden. Man unterscheidet im Wesentlichen fünf Hauptgruppen von Zytokinen: Interferone, Interleukine, koloniestimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren und Chemokine.

Es gibt Zytokine, die in der Proliferation und Interaktion von Endothelzellen eine wesentliche Rolle spielen. So ist bereits im embryonalen Stadium der Einfluss von Wachstumsfaktoren und die Wirkung auf Oberflächenantigene der Stammzellen entscheidend für die Ausbildung von Gefäßen mittels Interaktion der endothelialen Progenitorzellen¹¹. Als zentrale Mediatoren, die bisweilen in der Literatur beleuchtet wurden, sind FGF, VEGF, TNF α , IL-8 und Angiogenin zu sehen.

BFGF (basic fibroblast growth factor)

Der Nomenklaturname für bFGF ist FGF-2. Der Wachstumsfaktor gehört mit einer Länge von 155 Aminosäuren zu einer großen Familie an Proteinen, die das Wachstum und die Differenzierung von mesenchymalen, epithelialen und neuroektodermalen Zelltypen kontrolliert. So findet sich das Protein auch in fast allen Geweben oder Tumoren mit mesodermalen oder neuroektodermalen Ursprung. Endotheliale Zellen produzieren große Mengen an bFGF. Viele Zellen produzieren bFGF nur transient und lagern ihn in der biologisch inaktivierten Form. Vor allem nach Gewebsverletzung und während inflammatorischer Vorgänge, wie auch bei der Wundheilung, wird bFGF freigesetzt. Der Mechanismus hierzu ist noch unbekannt³³. FGF-Rezeptoren sind Tyrosinkinasen. Nach Bindung des Liganden an den Rezeptor findet eine Autophosphorylierung der Rezeptorproteine statt. Die verschiedenen Rezeptoren sind oft gewebsspezifisch exprimiert, so kann eine einzelne Zelle auch mehrere Isoformen tragen. bFGF benötigt als Co-rezeptor Heparansulfate oder dessen Proteoglykane um die volle Aktivität des Rezeptors zu erreichen. So zeigte

sich auch, dass Heparin bFGF vor Inhibierung durch Proteasen schützen kann. Mastzellen enthalten Heparine. Somit kommt der Interaktion von Heparin und bFGF während der Degranulation eine physiologische Bedeutung zu³⁴.

Die Wirkungsweise von bFGF ist sehr breit gestreut. Wie der Name schon suggeriert, stimuliert der Faktor Fibroblasten, Myoblasten, Osteoblasten, neuronale Zellen, Endothelzellen, Keratinozyten und Chondrozyten sowie eine Vielzahl weiterer Zellen in ihrem Wachstum. In Endothelzellen des Kapillarbettes zeigt bFGF eine autokrine Funktion. Die selbststimulierende Wirkung dieser Zellen kann durch HDL oder auch Transferrin unterstützt werden.

bFGF ist neben aFGF durch den Einfluss auf Proliferation und Migration von vaskulären Endothelzellen auch an der Angiogenese beteiligt. Dies geschieht durch die Expression von Plasminogenaktivator und Collagenase. Hierbei beginnt der Einfluss von FGF schon zu Beginn bei der Ausbildung einer Basallamina und zieht sich über den gesamten Prozess der Angiogenese hinweg. bFGF übt Einfluss auf die Ausbildung von Zellinteraktion wie gap junctions ebenso wie die Migration von vaskulären Zellen aus³⁵. Nebenher spielt bFGF allerdings auch eine entscheidende Rolle bei der Regeneration von Gewebe und Wundheilung³⁶.

Hier liegt auch der erste und wichtigste therapeutische Ansatz mit rekombinatem bFGF. So erbrachten erste experimentelle Studien mit einem Einsatz von bFGF in der Wundheilung einen positiven Effekt. Ebenso reduziert die Gabe von bFGF nach akutem Myokardinfarkt im Experiment die Infarktgröße.

VEGF (vascular endothelial growth factor)

VEGF kommt als Wachstumsfaktor in unterschiedlicher Strukturlänge vor. Die Aminosäuresequenzen reichen von 121 bis 206 Stück³⁷.

Der Zielrezeptor von VEGF wird an der Oberfläche von vaskulären Endothelzellen exprimiert. Auch hier ist die Interaktion von extrazellulärständigen Heparinen von VEGF zur effizienten Bindung an den Rezeptor notwendig. Drei Gruppen des Rezeptors sind bekannt: VEGFR1-3^{38, 39}.

VEGF ist ein hochspezifisches Mitogen für vaskuläre Endothelzellen und regt somit vor allem die Proliferation von makrovaskulären Endothelzellen an. Bei anderen Zelltypen vermag der Wachstumsfaktor dies nicht zu bewirken. Weiterhin wird die

Gefäßpermeabilität positiv von VEGF beeinflusst. Es kommt unter Einfluss von VEGF zur Mobilisation von endothelialen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark.

Ein positiver Synergismus der beiden Zytokine VEGF und bFGF konnte im Bezug auf Angiogenese beobachtet werden. Bereits in der embryonalen Phase regt VEGF über den Rezeptor VEGFR-3 die Angiogenese an. Später geschieht dies dann durch die Rezeptoruntergruppen 1 und 2 über die intrazellulären MAP-Kinasen. Eine Migration von Endothelzellen erfolgt über die Bindung an VEGFR-2 und einer Signaltransduktion via TAd intrazellulär³⁸. VEGF induziert in Endothelzellen die Bildung von von-Willebrand-Faktor.

Experimentell konnte in immundefizienten Mäusen mit transplantiertem menschlichen Rhabdomyosarkom ein Tumorwachstum durch die Gabe eines spezifischen VEGF-Antikörpers verhindert werden. Eine Neovaskularisation im Tumor wurde somit verhindert³⁷. Aber nicht nur hier kann ein zukünftiger therapeutischer Ansatz gesehen werden, auch bei der Angiogenese im Infarktgewebe könnte VEGF in Zukunft zum Einsatz kommen.

TNF- α (Tumornekrosefaktor- α)⁴⁰

TNF- α ist ein multifunktionaler Signalstoff (Zytokin) des Immunsystems, welcher an lokalen und systemischen Entzündungen beteiligt ist. TNF- α wird neben Monozyten, Neutrophilen, T-Zellen und NK-Zellen hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet. Aber auch glatte Muskelzellen oder Fibroblasten können TNF- α sezernieren. Die Produktion von TNF- α kann durch verschiedene Interferone, durch IL-2 wie Bradykinin oder Immunkomplexe angeregt werden. Eine Hemmung wird durch IL-6, Vitamin D3 oder Prostaglandin E2 erreicht.

Das Protein besteht aus 157 Aminosäuren. Insgesamt sind zwei Rezeptoren für TNF- α beschrieben: TNF-Rezeptor-Superfamilie 1A, auch als CD120a bezeichnet, sowie TNF-Rezeptor-Superfamilie 1B oder auch CD120b. Diese werden auf allen somatischen Zellen außer auf Erythrozyten exprimiert. Hierbei verfügt CD120a über eine sogenannte death-domain, welche in den Prozess der Apoptose involviert ist.

TNF- α hat physiologisch eine Vielzahl von Wirkungen. Zytolyse oder Zytostase von Tumorzellen in vitro kann durch TNF- α bewirkt werden. Aber auch eine Zerstörung von Zellen durch Zell-Zell-Kontakte von TNF-tragenden Monozyten oder T-Zellen findet statt.

Weiterhin trägt der Faktor einen wesentlichen Beitrag zu Gerinnungsabläufen bei: antikoagulatorische Vorgänge können gehemmt und thrombotische Prozesse (wie Artherosklerose, Thrombosen der Venen, Vaskulitis) gefördert werden. Auch die Adhärenz von Neutrophilen an der Endotheloberfläche wird durch TNF- α gefördert.

Neben thrombotischen Vorgängen wird allerdings auch das Wachstum von Fibroblasten angeregt.

Die wichtigste Rolle kommt TNF- α allerdings im Bereich der Immunoregulation zu. Hier stimuliert er Phagozytose sowie die Synthese von Superoxiddismutase in Makrophagen, regt die Bildung von IL-1 an und ist damit stark an der Antwort des Immunsystems beteiligt.

Interleukin-8 (IL-8)

IL-8 wird vor allem durch stimulierte Monozyten produziert, aber auch Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen können wie viele andere somatische Zellen IL-8 produzieren. In den meisten Zellen wird dies durch IL-1 sowie TNF- α angeregt. Strukturell besteht IL-8 aus 99 Aminosäuren. Der Zielrezeptor von IL-8 gehört zur Gruppe der G-protein-tragenden Rezeptorfamilie⁴¹. IL-8 vermag speziell neutrophile Granulozyten zu aktivieren⁴². Hier löst es über eine intrazelluläre Erhöhung des Calciumgehalts die Freisetzung von Enzymen aus Granula aus. Ebenso übt es eine chemotaktische Wirkung auf alle Immunzellen aus. Dabei wird allerdings eine Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen verhindert. Weiterhin wird durch IL-8 Angiogenese sowie die Wundheilung unterstützt. Das Zytokin vermag auch Progenitorzellen zu mobilisieren.

Angiogenin (ANG)

Angiogenin wird neben Karzinomzellen auch von Fibroblasten produziert. Es stellt den potentesten zirkulierenden Angiogenesefaktor dar⁴³. So konnte experimentell gezeigt werden, dass Angiogenin in Kultur das Wachstum von menschlichen Endothelzellen sowie glatten Muskelzellen der Arterienwand anregen kann⁴⁴. Hier wird auch die Produktion von Prostazyklin gesteigert. Gegenteilig kann es die Proliferation von Lymphozyten hemmen. Eine Down-Regulation von Angiogenin

bewirkt auch eine Hemmung der Zellproliferation, induziert durch Wachstumsfaktoren wie VEGF oder bFGF⁴⁵.

1.5 Therapeutische Ansätze

Der Ansatz einer angiogenetischen Therapie reicht von der Gabe von Wachstumsfaktoren über rekombinante Proteine und Gentransfer bis hin zur Gabe von Vorläuferzellen.

Angiogenese beinhaltet ein komplexes System aus molekularem Signaling. Eine Vielzahl von Zytokinen ist an dem Prozess beteiligt. Die wichtigsten sind hier wohl bFGF, VEGF sowie Angiopoetin⁴⁶. Auf die strukturellen Eigenschaften sowie die spezifischen Funktionen des jeweiligen Faktors ist bereits zuvor eingegangen worden. Klinisch und experimentell kamen vor allem VEGF und bFGF zum Einsatz.

Es gibt zwei Ansätze, mit entsprechenden Wachstumsfaktoren eine therapeutische Angiogenese zu erreichen: Gentransfer und Proteintherapie.

Tierexperimentell wurde bereits ein Gentransfer von VEGF121 durch Adenoviren vollzogen. Hier zeigte sich nach intramyokardialer Injektion der plasmidtragenden Viren eine Verbesserung der myokardialen Funktion⁴⁷. Auch bei Patienten mit Bypass-Versorgung zeigten klinische Studien, dass nach intramyokardialer Injektion von gentragenden Plasmiden für bFGF oder VEGF via linksanteriorer Thorakotomie Symptome subjektiv deutlich gelindert werden⁴⁸. Nach intracoronarer Injektion von rekombinanten bFGF-Protein im chronisch ischämischen Herz im Tierexperiment verbesserte sich die Herzfunktion⁴⁹.

Der wohl experimentell und auch klinisch am breitesten eingesetzte Ansatz ist die Therapie mit Vorläuferzellen. Zur Anwendung kommen hier EPC, ein unspezifischer Pool an mononukleären Zellen aus dem Knochenmark (BM-MNC) sowie mesenchymale Stammzellen^{16, 50}.

Bereits 1996 konnte intraaortal die Endothelialisierung einer Gefäßprothese im Kaninchenmodell nach Injektion von mononukleären Zellen des Knochenmarks gezeigt werden⁵¹. Diese Zellen können vermehrt Wachstumsfaktoren wie VEGF, bFGF oder Angiopoetin-1 bilden und freisetzen und somit zu einem proangiogenetischen Prozess führen⁵². In weiteren Tierexperimenten stieg die myokardiale Inflammation nach der Therapie mit BM-MNC bei Mäusen nach Koronarligatur und damit verbundener Myokardischämie an⁵³. Neben einer Induktion

der Produktion von bFGF ergaben sich auch signifikant höhere Werte für TNF- α sowie eine Zunahme der Kapillardichte in der Randzone des Infarktes im Vergleich zu Kontrolltieren⁵⁴. Auch der klinische Verlauf behandelter Tiere lieferte neben einer höheren Kapillardichte eine deutliche Verbesserung der echokardiographisch ermittelten ventrikulären Funktion¹². Aktuell werden BM-MNC in großen Doppelblind Studien an Patienten mittels intrakoronarer und intramyokardialer Applikation therapeutisch eingesetzt. So konnte bereits die Abnahme von Symptomen sowie eine geringfügige Verbesserung der myokardialen Pumpfunktion erzielt werden⁵⁵. Auch bei einzelnen Patienten mit hochgradiger peripherer arterieller Verschlusskrankheit nahmen angiographisch arterielle Gefäße nach BM-MNC-Therapie deutlich zu¹⁵.

Eine weitere Vorläuferzelllinie die eingehend zur Regeneration des Herzgewebes untersucht wurde, besteht aus mesenchymale Stammzellen (MSC). Einige Studien beschreiben eine Verbesserung der Herzfunktion nach Gabe von MSC bei akutem Myokardinfarkt. Einer der wichtigsten Mechanismen hierbei stellt die Freisetzung von angiogenetischen Wachstumsfaktoren wie VEGF oder bFGF⁵⁶ und die damit verbundene Gewebereparatur durch Neovaskulogenese dar. Aber auch die Pluripotenz dieser Zellen kommt wohl einer Heilung durch Differenzierung in Endothelzellen sowie glatte Muskelzellen zu Gute⁵⁷. In einigen Tierexperimenten konnte die myokardiale Funktion nach akuter Ischämie mittels Gabe von MSC signifikant verbessert werden⁵⁸. Kleine klinische Studien zeigten zunächst nur Trends zu Gunsten einer Therapie mittels MSC nach akutem Myokardinfarkt⁵⁹.

Als letzte Zelllinie kommen im Blut zirkulierende endotheliale Progenitorzellen zum Einsatz. Wie bereits beschrieben handelt es sich hier um eine heterogene Gruppe von Zellen⁶⁰. Nach Isolation differenzieren diese Zellen in Endothelzellen mit spezifischen Oberflächenmarkern. Experimentell zeigte sich eine angiogenetische Funktion dieser Zellen^{13, 61}. So konnte die linksventrikuläre Funktion nach induziertem Myokardinfarkt bei Nacktratten durch die intramyokardiale Injektion von CD34+ Zellen signifikant gesteigert werden²⁰. Auch in großen randomisierten Doppelblind- Studien wie REPAIR-MI oder REPAIR-CHF zeigte sich eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Funktion bei Patienten mit akuter wie auch chronischer Ischämie des Myokards^{62, 63}.

Weitere Versuche bestehen aus einer Kombination der verschiedenen Ansätze. So ergab sich tierexperimentell, dass die linksventrikuläre Funktion bei Schweinen mit

chronischer Ischämie nochmals verbessert werden kann, werden therapeutisch MSC angewendet, die durch Transfektion vermehrt VEGF exprimieren. Verglichen mit Kontrollgruppen ohne Gabe von MSC bzw. Gabe von MSC ohne Überexpression von VEGF zeigte sich eine statistisch signifikante Verbesserung⁶⁴.

Tabelle: zitierte Arbeiten

Referenz	Mediator/Zelltyp	Empfänger	Akut/chronisch Ischämie	Ergebnis
Vale et al	VEGF 121, Plasmid in Adenoviren	Nacktratte	Akut myokardial	Funktionelle Verbesserung (Echokardiographie)
Losordo et al	VEGF, bFGF, Plasmid in Adenoviren	Mensch (n=5)	Chronisch myokardial	Funktionelle Verbesserung (CCS Angina score, körperliche Belastbarkeit)
Harada et al	bFGF, rekombinantes Protein	Schwein	Chronisch, myokardial	Funktionelle Verbesserung (Blutfluss, Narbenareal)
Noishiki et al	Mononukleäre EPC	Hund	Chronisch, peripher	strukturelle Verbesserung (vermehrte Endothelialisierung)
Nygren et al	Mononukleäre EPC	Maus	Akut myokardial	Vermehrt Inflammation
Sun et al	Mononukleäre EPC	Maus	Akut myokardial	Vermehrt Inflammation
Yokokura et al	Mononukleäre EPC	Ratte	Chronisch myokardial	Funktionelle, Strukturelle Verbesserung (echokardiographisch, histochemisch mehr Endothelialisierung)
Hamano et al	Mononukleäre EPC	Mensch (n=5)	Chronisch myokardial	Funktionelle Verbesserung (Echokardiographie)
Fukuda et al	Mononukleäre EPC	Mensch (Review)	Chronisch myokardial	Strukturelle Verbesserung
Tang et al	MSC, via VEGF und bFGF	Ratte	Akut myokardial	Funktionelle, Strukturelle Verbesserung (Echokardiographie, Kapillarintensität)
Davani	MSC	Ratte	Chronisch myokardial	Strukturelle Verbesserung (Gefäßdicke)
Wang et al	MSC	Ratte	Akut myokardial	Funktionelle Verbesserung (Auswurfraction)

Katrtsis et al	MSC	Mensch (n=11)	Akut, myokardial	Funktionelle Verbesserung (Stressechokardiographie)
Ott et al	CD34+	Nacktratte	Akut myokardial	Funktionelle Verbesserung (Auswurfraction)
Honold et al	EPC	Mensch (n=16)	Chronisch myokardial	Funktionelle Verbesserung (Blutfluss)
Dobert et al	EPC	Mensch (n=26)	Akut myokardial	Funktionelle Verbesserung (Perfussion im PET)
Yi et al	MSC, via VEGF	Schwein	Chronisch myokardial	Funktionelle Verbesserung (Echokardiographie)

1.6 Zellinteraktionen

Es stellt sich die Frage, wie Vorläuferzellen eine Steigerung der bewiesenen myokardialen Leistung bewirken. Geschieht dies durch eine de novo Vaskularisation oder durch die Bildung von neuem Herzgewebe? Eine Vielzahl von einzelnen Interaktionen der Vorläuferzellen am geschädigten oder auch noch vitalen Myokard ist möglich. Wie bereits erwähnt, reichen die Hypothesen der aktuellen Literatur von einer Transdifferenzierung der Vorläuferzellen in Zellen des spezifischen Gewebes vor Ort bis zu weiteren Interaktionen der Vorläuferzellen mit ständigen Zellen am Myokard wie Fusion, Zell-Zell-Kontakte oder Freisetzung von Zytokinen mit entsprechender Wirkung. So sind in der Vergangenheit sowohl neue Konzepte entdeckt worden wie auch alte Erkenntnisse untermauert worden, um Aufschluss über mögliche Kommunikation bzw. Interaktion verschiedener Zellen zu geben. Im Vordergrund sollen nicht Zellverbindungen zur Stabilität eines Gesamtgefüges stehen, sondern Zellkontakte zum Austausch von Stoffen oder Information sowie zur Interaktion zwischen Zellen.

1.6.1 Transdifferenzierung

Es gibt viele Hinweise darauf, dass Vorläuferzellen einen positiven Effekt im ischämischen oder verletzten Gewebe haben. Wie schon angesprochen ist allerdings der Mechanismus hierzu nicht geklärt.

Eine der möglichen Theorien geht von einer Transdifferenzierung der pluripotenten Zellen in das jeweilige geschädigte Gewebe aus⁶⁵. So konnte experimentell gezeigt werden, dass zirkulierende mononukleäre, CD34 sowie AC133 positive, und damit endotheliale, Vorläuferzellen auf mRNA-Ebene für sowohl muskuläre, neuronale aber auch hepatische Strukturproteine exprimieren. In der Arbeit von Ratajczak konnte auf mRNA-Ebene der CXCR4-positiven Zellen eine Expression für Myf-5 und Myo-D als muskuläre Proteine, GFAP und Nestin als neuronale Proteine sowie CK19 und Fetoprotein als hepatische Proteine nachgewiesen werden⁶⁶. Somit lässt sich auf eine mögliche Potenz der, in der Peripherie zirkulierenden, Zellen bei der Regeneration von Gewebe oder Organen mittels Differenzierung in eine spezifische Zelllinie schließen. So gelingt beispielweise der Nachweis eines Promotors von Myosinleichtketten in zuvor markierten mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks von Mäusen, nachdem diese ins Muskelgewebe migrierten⁶⁷. In vitro werden embryonale Endothelzellen der Maus ebenso wie HUVEC nach Koinkubation mit neonatalen Kardiomyozyten der Ratte für fünf Tage positiv für myokardiale Marker wie Troponin I. Nach intramyokardialer Gabe bei postischämischen Mäusen konnte in diesen Zellen Myosin identifiziert werden. Die Zellen bilden weiterhin morphologisch Sarkomere. Eine Identifikation der primär endothelialen Zellen erfolgte in allen Versuchen mittels Transfektion von GFP-Genen. Teilweise konnte auch eine Koexpression von myokardialen und endothelialen Markern in verwendeten HUVEC wie von-Willebrand-Faktor und Myosin nachgewiesen werden⁶⁸. Aber auch endotheliale adulte CD34+-Zellen von Kaukasierern zeigten nach der Koinkubation mit neonatalen Myozyten der Ratte über sechs Tage ein ähnliches Verhalten. So stellten sich die, zuvor mittels DIL-Labeling und Anti-HumanHLA identifizierten, Vorläuferzellen morphologisch wie Kardiomyozyten dar und konnten mittels FACS-Analyse positiv für α -sacromeric actin und immunhistochemisch positiv für Troponin I als myokardiale Marker gefärbt werden. Die Autoren dieser Arbeit stellen die Hypothese der Transdifferenzierung, die nach Zell-Zell-Kontakten der EPC und Myozyten der Ratte induziert wurde, als Ursache hierfür, nachdem dasselbe Phänomen auch nach einer Koinkubation mit parafinfixierten Kardiomyozyten gesehen werden konnte, und somit eine Zellfusion unwahrscheinlich scheint³. Im Gegensatz dazu konnten ähnliche Ergebnisse für hämatopoetische Stammzellen nicht gezeigt werden. Mehrmals fehlte der Nachweis von myokardialen Markern bei GFP-markierten hämatopoetischen Stammzellen, die Mäusen in ischämische

Regionen kardial injiziert wurden. Nach einigen Monaten trugen die markierten Zellen zwar weiterhin hämatopoetische Marker wie CD45 oder Gr-1, der Nachweis von spezifischen Proteinen von Myozyten aber gelang nicht^{69, 70}. Um eine mögliche Transdifferenzierung von knochenmarksständigen Stammzellen zu beobachten, wurde bei Mäusen transgen mittels eines Gens für ein fluoreszierendes Protein (x-Gal) in der Promoterregion für kardiomyozytenspezifische α -Myosin-Schwerketten eine Markierung gesetzt. So dass bei diesen Tieren, sollte eine Zelle α -Myosin exprimieren, eine Fluoreszenz nachzuweisen wäre. Die mittels FACS sortierten BM-MNC der markierten Mäuse wurden bei Wildtyp-Tieren in eine ischämische Region nach Koronarligatur intrakardial injiziert. Nach der Operation zwei Monate später konnte in diesen Tieren keine Fluoreszenz gesehen werden. Somit ergibt sich gemäß Autoren kein Hinweis auf eine mögliche Transdifferenzierung der Vorläuferzellen aus dem Knochenmark der Mäuse⁷¹.

Zum Teil können in den Arbeiten auch mehrere Effekte gesehen werden. In der Kokultur von mesenchymalen Stammzellen (MSC) des Menschen und Flimmerepithelzellen der Bronchien, lassen sich nach geraumer Zeit Hinweise für Transdifferenzierung und Fusion finden. So tragen die, mittels GFP markierten, MSC an ihrer Oberfläche endotheliale Marker wie E-Cadherin, CD24 oder β -Catenin. Ebenso binden sie sich mittels Verbindungen (adherens junctions) in den epithelialen Zellverband ein. Allerdings gelingt in der Arbeit auch der Hinweis auf eine mögliche Fusion. Mittels FACS-Analyse können auch Zellen mit Oberflächenmarker CD24 der epithelialen Zellen sowie GFP-Markierung der MSC und mehr als einem Zellkern nachgewiesen werden⁷².

1.6.2 Fusion

Weitere Zweifel an der Theorie der Transdifferenzierung tauchten auf, als Zellen mit vermeintlichen Ursprungs einer Vorläuferzelle einen erhöhten Gehalt an Erbgut besaßen. So beinhalten endotheliale Vorläuferzellen nach Koinkubation mit Kardiomyozyten neben ihrer GFP-Markierung auf Gen-Ebene und struktureller myozytärer Proteine auch die doppelte Menge an DNA⁷³. Die Verdopplung der Menge an Desoxyribonucleinsäure deutet eher auf Prozesse der Zellfusion hin. Bei weiblichen Mäusen wurde nach der Gabe von Cyclohexan eine Mutation im Gen für Fumarylacetoacetat-Hydrolase (Fah -/-) erreicht, so dass diese Tiere langfristig letal geschädigt wurden. Nach der Gabe von Knochenmarkszellen aus männlichen Tieren

(Fah +/-) sanken die erhöhten Bilirubinwerte der kranken Weibchen und die Tiere erholen sich. Mittels PCR ließen sich in den Hepatozyten in bis zu 40% spezifische Regionen des Y-Chromosoms der Männchen sowie intakte Gene für die Expression von Fumarylacetoacetat-Hydrolase nachweisen. Dies werteten die Autoren als einen weiteren Hinweis für eine Fusion von Vorläuferzellen mit zu regenerierendem Gewebe². Gleiches konnte auch für männliche embryonale Zellen gezeigt werden, die mit adulten Knochenmarkszellen der weiblichen Maus in Kultur gebracht wurden. Hier trugen Zellen mit GFP-Markierung der Knochenmarkszellen sowie morphologischer Struktur der embryonalen Zellen männliche und weibliche Chromosomen bei erhöhtem Gehalt an DNA⁷⁴. Bringt man menschliche CD34+-Zellen gemeinsam mit Kardiomyozyten von Mäusen invitro in Kultur, so zeigt sich in der späteren Fluoreszenzhybrid-Analyse, dass Zellen, die humane Oberflächenantigene und Troponin T als myokardialen Marker tragen, menschliches wie auch tierisches Erbgut beinhalten. Eine Übertragung des experimentellen Ansatzes ins Tierexperiment erbrachte einen Anstieg der Zellen positiv für beide Marker unter Ischämie sowie einen vermehrten Gehalt an inflammatorischen Zytokinen (IL-6 sowie TNF- α). Weiterhin mutmaßen die Autoren, dass eine Fusion der Zellen über Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1 vermittelt wird⁷⁵. Unterstrichen werden diese Ergebnisse durch weitere experimentelle Ansätze. So konnte wiederholt der Beweis geführt werden, dass nach Koinkubation von Vorläuferzellen und differenzierten Zellen, Zellen entstehen, die auf DNA-Ebene Gene beider ursprünglichen Zelltypen besitzen^{4, 53, 76}.

1.6.3 Nanotubes

Die Möglichkeit des Einflusses von Vorläuferzellen auf ausdifferenziertes Gewebe über kleine Tunnelverbindungen der Zellen ist beschrieben. So wurde mehrfach die Existenz von „Nanotubes“ als kleine Tunnel zwischen Zellen gezeigt^{5, 77}. Zunächst zeigt sich mikroskopisch die Ausbildung von Verbindungen mit einem Durchmesser von 50 bis 200nm und bis zu einer Länge entsprechend der Größe der beteiligten Zellen. Nach Depolymerisation des Zellbaustoffes Actin können Nanotubes nicht mehr beobachtet werden. Daher ist von einer Beteiligung dieses zellulären Strukturproteins auszugehen. Im Speziellen kann bei Phaeochromozyten der Austausch von Organellen (Mitochondrien, Lysosomen) mittels Fluoreszenzmarkierung (EGFP auf Gen-Ebene) beobachtet werden⁵. Aber auch bei

experimentellen Ansätzen mit endothelialen Vorläuferzellen und Kardiomyozyten sieht man mikroskopisch die Ausbildung von äquivalenten Strukturen. Tierische Kardiomyozyten wurden mittels einem Gen codierend für die Expression des Fluoreszenzfarbstoffes GFP sowie die humanen Vorläuferzellen mit DIL-Labeling markiert. Nach bereits 24h trugen 3% der jeweiligen Zellarten beide Markierungen in sich.⁷⁷

1.6.4 Parakrine Effekte

Allerdings können nicht auf direktem, extrazellulärem Weg Stoffe und Organellen ausgetauscht werden. Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung zwischen Zellen stellt die Freisetzung von Mediatoren dar. Die Vermittlung von Informationen und Zellabläufen über Zytokine ist bereits in anderen Bereichen der Physiologie durchaus gesichert. In Kulturen aus Kardiomyozyten und humanen Fibroblasten wurden erhöhte Spiegel an Interleukin-6 (IL-6) gemessen. Nach Zugabe eines Antikörpers gegen IL-6 erhielt man ein vermindertes Wachstum beider Zellarten in der Kokultur⁷⁸. Dies lässt eine Zytokin vermittelte Interaktion der beiden Arten von Zellen vermuten. Ebenso ergab sich bereits, dass endotheliale Progenitorzellen vermehrt bestimmte Wachstumsfaktoren in der Zellkultur freisetzen. Im Vergleich mit HUVEC und CD14+-Monozyten sezernieren EPC vermehrt VEGF, SDF-1, IGF-1 und HGF *in vitro*⁷⁹. Die intramyokardiale Gabe von mononukleären, endothelialen Vorläuferzellen liefert neben einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion und einer erhöhten Kapillardichte bei chronisch ischämischen Herzen von Mäusen auch eine vermehrte Expression von VEGF auf Gen-Ebene⁶. In klinischen Beobachtungen besteht ein Zusammenhang von vermehrt zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen und einem erhöhten Plasmaspiegel von Interleukin8 (IL-8) bei Patienten im akuten Myokardinfarkt²⁶. Untermauert wird dieser Zusammenhang durch experimentelle Ansätze. In der Koinkubation von late outgrowth EPC und Endothelzellen der Koronarien ließ sich das Wachstums durch Antikörper gegen IL-8 hemmen⁸⁰. Dies lässt wiederum eine Steigerung der Proliferation von Endothelzellen via IL-8 durch Freisetzung aus endothelialen Vorläuferzellen vermuten.

2 Zielsetzung der Arbeit

Trotz einer Vielzahl von Studien und experimentellen Untersuchungen ist der Mechanismus, der zu einer Verbesserung von Symptomen und einer Steigerung der linksventrikulären Funktion nach Gabe von Vorläuferzellen führt, noch nicht genau bekannt. Ebenso stellt sich die Frage, wie optimal eine breite klinische Anwendung der neuen therapeutischen Methode stattfinden kann. Neben dem möglichen Wirkmechanismus stellt sich auch die Frage nach der optimalen Zellart zum breiten klinischen Einsatz.

In der vorliegenden Arbeit soll die Interaktion zwischen Vorläuferzellen und vaskulären Zellen untersucht werden. Ziel war es, expandierte endotheliale Progenitorzellen, mononukleäre sowie mesenchymale Stammzellen oder CD34+ - Zellen auf ihr Verhalten in einer Kokultur mit glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten zu untersuchen. Aus den Ergebnissen sollte ein Hinweis auf einen möglichen Mechanismus der Interaktion der Zellen und Beeinflussung in ihrem Proliferationsverhalten gezogen werden.

Da sich in der Literatur der Hinweis auf eine Beeinflussung des Zellwachstums durch gebildete Mediatoren häuft, wurden weiterhin quantitative in der Kokultur freigesetzte Zytokine (FGF, VEGF, TNF α , IL8, Angiogenin) untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Labormaterialien

- Falcon/Biocoat 2-Well CultureSlide, Human Fibronectin (Becton Dickinson Labware, Bedford, USA)
- Falcon/Biocoat 6-Well Plates, Human Fibronectin (Becton Dickinson Labware, Bedford, USA)
- Falcon/Biocoat 96 Well Platte, Human Fibronectin (Becton Dickinson Labware, Bedford, USA)
- 6 well Platte, Human Fibronectin (Becton Dickinson Labware, Bedford, USA)
- Parafilm (American National Can Company, Chicago, USA)
- 50ml Falcon tubes (Becton Dickinson Labware, Bedford, USA)
- T25 flasks (Becton Dickinson Labware, Bedford, USA)
- Pipetten (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Neubauerkammer (la fontaine)

3.1.2 Geräte

- Brutschrank: CO₂-Auto-Zero (Haereus GmbH, Hanau, Deutschland)
- Lichtmikroskop: Akiover 100 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
- Fluoreszenzmikroskop
- AxioCam (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
- Okular (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
- Hoot: Hera Safe (Kendro Laboratory Products Haereus GmbH, Hanau, Deutschland)
- Megafuge 10R (Kendro Haereus GmbH, Hanau, Deutschland)
- Sysmex cell sorter (Sysmex, Mundelein, USA)
- Becherglas
- Schere
- Knopfkanüle (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Drei-Wege-Hahn (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Kabelbinder
- Vortex (Wizard, USA)
- FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, USA)

3.1.3 Substanzen

- PBS, Dubecco's phosphate buffered saline (SIGMA, St. Louis, USA)
- Fibronectin (CellSystems Biotechnologie, St. Katharinen, Deutschland)
- Collagenase (CellSystems Biotechnologie, St. Katharinen, Deutschland)
- Endothelila Cell Growth Medium/ Low Serum (Promocell, Heidelberg, Deutschland)
- Supplement Mix C-39215 (Promocell, Heidelberg, Deutschland)
- SmGM2 Bullet Kit CC-382:

Singlequots CC-4149

CC-4021	5mg/ml Insulin	0,5ml
CC-4068	1µg/ml hFGF-B	1,0ml
CC-4081	50mg/ml GA-1000	0,5ml
CC-4102	FBS (Fetal Bovine Serum)	25ml
CC-4230	0,5µg/ml h-EGF	0,5ml

SmBM Smooth Muscle Cell Basal Medium CC-3181, 500ml
(Clonetics/Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien)

- Fibroblast Growth Medium FGM Bullet Kit CC-3130:
FGM Singlequots CC-4134:

CC-4021	5mg/ml Insulin	0,5ml
CC-4065	1µg/ml hFGF	1,0ml
CC-4081	50mg/ml GA-1000	0,5ml

FGM Fibroblast Basal Medium CC-3131, 500ml (Clonetics/Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien)

- EBM2-Medium (Lonza, Basel, Schweiz)
- Ficoll-Paque TM Plus, Amersham Biosciences
- M199-Medium (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- FCS (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Penicillin/Streptomycin (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- EDTA, (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Alkohol 70%
- MSC-Medium (Lonza, Basel, Schweiz)
- BSA; Rinderserumalbumin (Sifin, Berlin, Deutschland)
- Triton X (Sigma, St. Louis, USA)
- Phalloidin Fitc (Sigma, St. Louis, USA)

- Trypsin (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Qtracker 655 Kit, qtracker 565 Kit (Quantum Dot Corp., Hayward, USA)
- Reagent Pack

CC-5002	Trypsin neutralizing solution	100ml
CC-5012	Trypsin/EDTA	100ml
CC-5034	Hepes buffered saline solution	100ml

(Bio Whittaker/ Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien)
- CM-DIL, Cell-Tracker, C-7000 (Molecular Probes, Eugene, USA)
- AK Humane Fibroblasten
Dako Cytomation; Monoclonal Mouse Anti-Human Fibroblast Clone 5B5, Code M 0877 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark)
- AK Anti α -Smooth Muscle Actin/FITC
SIGMA, Anti α -Smooth Muscle Actin, Clone 1A4 FITC Conjugate, Product F 3777 (SIGMA, St. Louis, USA)
- AK Anti-CD31/FITC (Biozol, Eching, Deutschland)
- Beats
- HF-Puffer (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Methanol
- FCR-Block
- Roche: Cell Proliferation ELISA BrdU # 1 647229
- DAPI Nucleic Acid Stain, D-1306 (Molecular Probes, Eugen, USA)
- BD Cytometric Bead Array (CBA), Human Angiogenesis Kit (BD Biosciences, San Jose, USA)
- Zellkulturen:
 - HUVEC: PromoCell, Heidelberg, Deutschland
 - SMC: CellSystems GmbH, Troisdorf, Deutschland
 - Fibroblasten: CellSystems GmbH, Troisdorf, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Basis des experimentellen Ansatzes ist ein Zellkulturmodell. Hierzu wurde eine Koinkubation von entsprechenden Vorläuferzelllinien und vaskulären Zellen gewählt. Als Vorläuferzellen wurden sogenannte expandierte EPC, mononukleäre EPC, mesenchymale Stammzellen und CD34+-Zellen verwendet. Es erfolgte eine standardisierte Koinkubation mit repräsentativen vaskulären Zellen : human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), human fibroblasts (HuFi) sowie smooth muscle cells (SMC) (Charakteristik der Zellen siehe unten) mit den jeweiligen Vorläuferzellen. Ergänzend wurde eine Koinkubation mit ausdifferenzierten endothelialen Zellen (HUVEC) und den jeweiligen vaskulären Zellen durchgeführt.

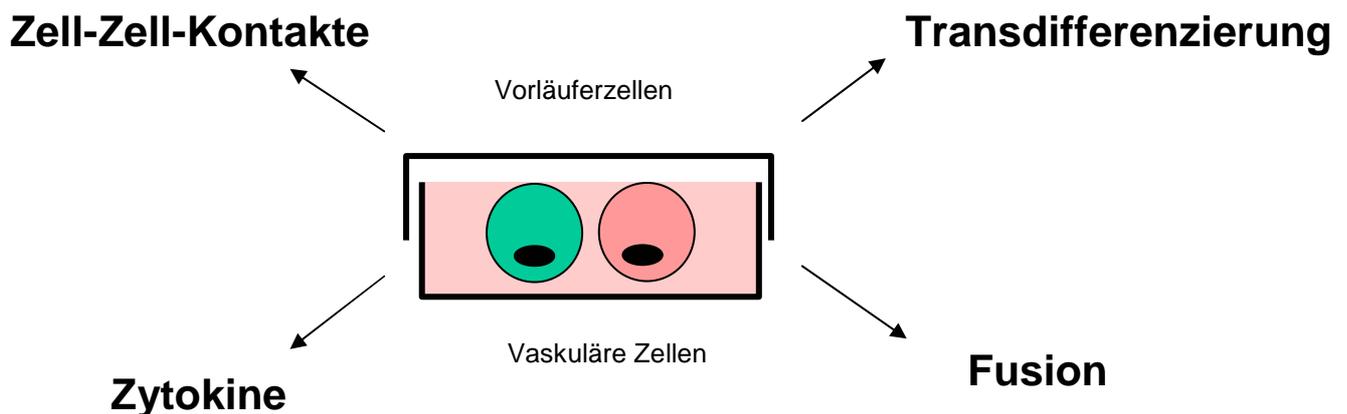


Abbildung 1: Ausgehend von einem Koinkubationsmodell wurden mögliche Interaktionen der Zellen betrachtet.

Die Inkubation der Zellen erfolgte nach standardisiertem Muster. Als Medium für die Kultivierung wurde das der jeweiligen vaskulären Zelllinie gewählt. So wurde bei SMC SmGM2, bei HuFi FGM und bei HUVEC EBM2 als Kulturmedium verwendet.

Eine vorgegebene Menge an vaskulären Zellen wurde mit einer festgesetzten Menge an Vorläufer- und Referenzzellen koinkubiert (siehe Versuchsanordnung).

Ergänzend wurden die Überstände aus der Koinkubation auf deren Gehalt an spezifischen Zytokinen untersucht. Ebenso konnten diese Medien einem Proliferationsassay zugeführt werden, um möglich proliferationssteigernde Eigenschaften beobachten zu können.

Im folgenden sollen zunächst die verwendeten Zellen und deren Gewinnung beschrieben werden.

3.2.1.1 Verwendete Zellen

HUVEC (human umbilical vein endothelial cell)

Die in den Versuchen verwendeten Zellen wurden bei der Firma Promocell® käuflich erworben. Sie wurden durch Präparation aus frischem Nabelschnurvenengewebe gewonnen. Gezüchtet wurden die Zellen in 500ml „Endothelial Cell Growth Medium: Low Serum“ inkl. „Supplement Mix“ und 50ml sterilem FCS der Firma. Die in den Versuchen verwendeten Zellen stammten aus den Passagen 4 bis 10.

HuFi (Human fibroblast)

Die verwendeten Fibroblasten stammten von neugeborenen, männlichen Kaukasiern. Der Bezug erfolgte über die Firma CellSystems®. Das Zuchtmedium beinhaltete 0,5ml hFGF, 0,5ml Insulin, 0,5ml GA-1000 und 500ml FBM „Fibroblast Basal Medium“. Alle Substanzen stammten aus dem „Fibroblast Growth Medium Bullet Kit“ der Firma Clonetics/Cambrex Bio Science®. In den Versuchen wurden Zellen der Passagen 4 bis 11 verwendet.

SMC (Smooth muscle cells)

Diese Zellen wurden ursprünglich einem 21-jährigen Mann entnommen, der Bezug erfolgte über die Firma CellSystems®. Medium zur Kultivierung der Zellen bestand aus dem „SmGM2 Bullet Kit“ der Firma Clonetics/Cambrex Bio Science®, zusammengesetzt aus 500ml „Smooth Muscle Basal Cell Medium“, 0,5ml Insulin sowie 1ml h-FGF-B, 0,5ml GA-10000, 5ml hEGF und 25ml sterilem FBS („Fetal Bovine Serum“). In den Versuchen kamen Zellen der Passagen 4 bis 10 zur Anwendung.

Mononukleäre Vorläuferzellen (mononukleäre EPC)

Von kaukasischen Probanden wurde nach schriftlicher Einverständnis für die Blutentnahme Blut in CPDA-Röhrchen abgenommen. In vier 50ml Falcon tubes wurde 25ml Ficoll-Lösung vorgelegt und mit jeweils 25ml CPDA-Blut überschichtet. Die Falcons wurden mit 1900 Umdrehungen/min ohne Bremse bei Raumtemperatur 20min zentrifugiert.

Die Zellphase wurde vorsichtig abpipettiert, in ein neues 50ml Falcon tube überführt, mit PBS auf 50ml aufgefüllt und erneut bei 1700 Umdrehungen/min 10min bei Raumtemperatur mit Bremse zentrifugiert.

Die Zell-Pellets wurden in M199 (mit 20% FCS, 5ml Penicillin/Streptomycin auf 500ml Medium) aufgefüllt und erneut bei 1700 Umdrehungen/min 10min bei Raumtemperatur mit Bremse zentrifugiert.

Die Zell-Pellets wurden in ca. 1ml M199 (mit 20% FCS, 5ml Penicillin/Streptomycin auf 500ml Medium) resuspendiert, erneut vereint und am Sysmex gezählt.

13×10^6 Zellen wurden in 4-5ml M199 (mit 20% FCS, 5ml Penicillin/Streptomycin auf 500ml Medium) in T25-flasks (T25 flasks waren mit Fibronectin gecoatet: pro flask: 3ml $10 \mu\text{g FN/ml}$ in PBS, 30min bei 37°C inkubiert, 1 x mit PBS gespült) auslegt.

Nach 48h Inkubation im Brutschrank wurden die Überstände abgenommen und 10min bei Raumtemperatur mit 1700 Umdrehungen/min zentrifugiert. Die Zell-Pellets wurden in 3ml M199 resuspendiert und am Sysmex ausgezählt.

Erneut wurden 13×10^6 Zellen in 4-5ml M199 in Fibronectin gecoateten T25 flasks auslegt.

Ein Mediumwechsel (M199) wurde alle 48h durchgeführt. Nach 6 Tagen wuchs ein Maximum an mononukleären EPC-Zellen.

Die Zellen wurden mit 0,05M EDTA abgelöst und geerntet, eine Waschung und Resuspension erfolgte erneut mit M199.

MSC (mesenchymale Stammzellen)

Zur Isolation der Zellen wurde die Nabelschnur eines Neugeborenen Kaukasiers in 70%-Alkohol für 2min eingelegt und anschließend in ein Becherglas mit PBS gegeben. Die Zellen wurden uns freundlicherweise von PD Dr. rer. nat. R. Oostendrop zur Verfügung gestellt. Anschließend wurde die Nabelschnur an beiden Enden abgeklemmt, und an der jeweiligen Stelle vor der Klemme durchgeschnitten. Eine Knopfkanüle wurde in die Vene der Nabelschnur an beiden Enden eingeführt

und mit einem Kabelbinder von außen befestigt. Hieran wiederum wurden Drei-Wege-Hähne befestigt. Die Nabelschnur wurde zweimal mit 20ml PBS mittels Spritze durch die Knopfkanüle gespült. Anschließend erfolgte eine Spülung mit 20ml HF-Puffer und eine 20ml Spritze mit Luft. Schließlich wurde Collagenase (20mg/ml) 1:20 verdünnt in die Vene gefüllt. Die Nabelschnur wurde mit verschlossenen Enden in Alufolie 20min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte eine zweimalige Spülung mittels HF-Puffer 20ml sowie eine 20ml Spritze mit Luft. Es wurde erneut Collagenase wie oben in die Nabelschnur gefüllt, ebenso folgte eine anschließende Inkubation für 60min im Brutschrank. Danach wurde die Nabelschnur mit 20ml HF-Puffer gespült, die Zellsuspension wurde bei 1400 Umdrehungen /min 5min zentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde in MSC-Medium aufgenommen, und die Zellen konnten ausgelegt bzw. gezählt werden.

CD34+ Zellen

Es wurde eine Zellsuspension mittels Ficoll-Fällung analog zur Gewinnung der mononukleären EPC gewonnen.

Die Suspension wurde bei 1400 Umdrehungen/min für 5min zentrifugiert. Der Pufferüberstand wurde abgenommen und das Pellet mit 300µl HF-Puffer aufgemischt. Dazu wurden je 100µl FCR-Block und Beats hinzu gegeben. Die Falcons wurden 30min unter stetigem Rollen gekühlt, dann auf 30ml mit HF-Puffer aufgefüllt und bei 1600 Umdrehungen/min 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und das Zell-Pellet in 2ml HF-Puffer aufgenommen. Danach wurde die Suspension gut gemischt.

Die Suspension wurde in die Magnetsäule gegeben. Die am Ende der Säule aufgefangene Zellsuspension bestand aus CD34+- Zellen. In einem neuen Tube wurden anschließend die CD34+- Zellen mit 3ml HF-Puffer ausgespült. Der Vorgang wurde mit den CD34+- Zellen wiederholt. Die Suspension aus dem zweiten Vorgang wurde bei 1600 Umdrehungen/min für 5min zentrifugiert. Der Überstand konnte abgenommen und das Zell-Pellet in EBM2 Medium aufgenommen werden.

Expandierte endotheliale Vorläuferzellen (expandierte EPC)

Die Anfangsschritte waren analog zur Gewinnung von CD34+ Zellen. Der Überstand aus letzter Zentrifugation wurde abgenommen, das Zell-Pellet mit 3ml EBM2-Medium aufgenommen und auf Falcon/Biocoat 6-Well Plates mit Human Fibronectin ausgelegt. Nach 21 Tagen konnte der konfluenten Zellrasen mit 0,05M EDTA geerntet werden.

3.2.1.2 Koinkubation

In Falcon/Biocoat 2-Well Culture Slides, gecoated mit Human Fibronectin wurden wie folgt eine definierte Anzahl an vaskulären Zellen (HUVEC, SMC oder HuFi) gemäß Tabelle in dem jeweiligen Medium zahlenmäßig vorgelegt. Als Medium wurde jeweils das Medium der vaskulären Zelllinie verwendet. So wurden die endothelialen HUVEC in EBM2-Medium, muskuläre SMC in SBM-Medium und Bindegewebszellen HuFi in FBM2-Medium ausgelegt. Dann wurde das jeweilige Medium zur Deckung des Zellrasens aufgebracht (ca. 200µl).

HUVEC 5000 Zellen EBM2-Medium	SMC 1500 Zellen SBM-Medium	HuFi 1000 Zellen FBM2-Medium
----------------------------------	-------------------------------	---------------------------------

Vorläuferzellen, die zuvor mit DIL-Labeling gefärbt worden waren (siehe hierzu 3.2.2), wurden anschließend in variierenden Mengen von 5000, 10000 oder 20000 Zellen in einzelne Culture Slides hinzugegeben. Diese Culture Slides dienen später als Objektträger für die dann fixierten und gefärbten Zellen der Koinkubation.

Die Zellen wurden in einem Zeitraum von sieben bis zehn Tagen im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgt alle 48h.

mononukleäre EPC	expandierte EPC	MSC	CD 34+	HUVEC
In jeweils variierenden Mengen zu je 5000; 10000, 20000 Zellen Koinkubiert mit je				
HUVEC 5000 Zellen in EBM2-Medium	SMC 1500 Zellen in SBM-Medium	HuFi 1000 Zellen in FBM2-Medium		
Anschließend gefärbt mit				
AK Anti-CD31/FITC	AK Anti α -Smooth Muscle Actin/FITC	AK Phalloidin-fitc AK Humane Fibroblasten		

Nach entstandenem konfluenten Zellrasen oder spätestens nach zehn Tagen wurden die koinkubierten Zellen fixiert und entsprechend der vaskulären Zelllinie mit einem spezifischen Fluoreszenzmarker (siehe unten) und einer Dapi-Kernfärbung eingefärbt. Als Fluoreszenzmarker wurde jeweils eine FITC-konjugierte (FITC: grüner Fluoreszenzfarbstoff) Antikörperfärbung gemäß der initial ausgelegten Zelllinie verwendet. So wurden Zellen aus den Koinkubationsversuchen mit HUVECs mit einer Färbung gegen das Oberflächenantigen CD31 behandelt. Bei eingesetzten SMC erfolgte eine Färbung gegen das intrazelluläre α -smooth muscle actin. Ein spezifischer Antikörper gegen Fibroblasten oder eine Antikörperfärbung gegen Phalloidin kamen bei inkubierten HuFi zum Einsatz.

Es erfolgte anschließend eine Auswertung am Fluoreszenzmikroskop. Bei einer 20fachen Vergrößerung wurde die Gesamtzahl der sichtbaren Zellen anhand der Dapi-Kernfärbung sowie die Anzahl an Zellen, die DIL-Labeling und die spezifische Antikörperfärbung für die, zuvor ausgelegte vaskuläre, Zelllinie trugen, ausgezählt. Diese AUzählung erfolgte an mindestens vier Fotos je Inkubationsansatz.

3.2.2 Fluoreszenzmikroskopie

Färbungen

DIL-Labeling

Das DIL-Labeling diente als roter Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung von Vorläuferzellen in den Koinkubationsversuchen. Eine Markierung erfolgte vor der Koinkubation. Dazu wurden die jeweiligen Zellen in 10ml PBS in einem Falcon Tube aufgenommen. Es wurde 15 μ l Stock DIL hinzugegeben. Die Zellen wurden bei 37°C für 5min inkubiert, anschließend bei 4°C für 15min. Die Suspension wurde bei 1000 Umdrehungen/min zentrifugiert und nach der Abnahme des Überstandes anschließend mit 10ml PBS gewaschen. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation. Im Anschluss selbiger wurde erneut mit PBS gewaschen. Die Zellen konnten schließlich in einer Neugebauerkammer gezählt werden.

AK Humane Fibroblasten

Dieser monoklonale Mausantikörper reagiert spezifisch mit prolyl-4-hydroxylase, einem Enzym der Kollagensynthese⁸¹.

Das Medium wurde von den Zellen abgehoben, anschließend wurde eine Waschung der Zellen auf dem Deckgläschen mit PBS durchgeführt. Die Gläschen wurden mit eisigen Methanol bedeckt und bei -20°C 10min inkubiert.

Anschließend wurde der Methanol abgehoben und erneut mit PBS gewaschen. Schließlich wurde 0,5% BSA aufgegeben und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Das BSA wurde erneut abgehoben und wiederum wurden die Zellen mit PBS gewaschen. 25 μl AK Fibroblasten mit einer Verdünnung von 1:40 wurden auf Parafilm aufgebracht. Das Deckgläschen wurde auf den Parafilm aufgelegt und bei Raumtemperatur für 1h inkubiert. Schließlich wurde das Deckgläschen erneut mit PBS gewaschen und auf einen Parafilm mit 25 μl AK Mousse-FITC mit einer Verdünnung von 1:25 aufgebracht. Es erfolgte eine Inkubation von 1h bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde wiederum mit PBS gewaschen, gefolgt von einer 6s andauernden Färbung mit Dapi (Verdünnung 1:3000 ca. 25 μl pro Glas) und hieran anschließender Waschung mit PBS. Die Deckgläschen wurden im Dunkeln luftgetrocknet und dann in Mounting Medium auf einen Objektträger aufgelegt.

AK Anti α -Smooth Muscle Actin/FITC

Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde von den koinkubierten Zellen das Medium abgenommen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, anschließend mit eisigen Methanol bedeckt und bei -20°C für 10min inkubiert. Schließlich wurde der Methanol abgenommen und abermals mit PBS die Zellen gewaschen. Schließlich wurde AK Anti α -Smooth Muscle Actin/FITC 1:200 verdünnt darauf gegeben und in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 3h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Im letzten Schritt wurden die Zellen noch mittels Dapi 1:3000 für 6s kerngefärbt und anschließend mit PBS gewaschen. Es erfolgte abschließend eine Lufttrocknung.

AK Anti-CD31/FITC

Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde das Medium von den koinkubierten Zellen abgenommen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 600µl AK CD 31/FITC 1:10 verdünnt auf die Zellen aufgegeben und bei 37°C für 1h inkubiert, schließlich mit PBS gewaschen und für 15min mit PFA 1% fixiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Im letzten Schritt wurden die Zellen noch mittels Dapi 1:3000 für 6s kerngefärbt und anschließend mit PBS gewaschen. Es erfolgte abschließend auch hier eine Lufttrocknung.

Phalloidin/FITC

Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde von den koinkubierten Zellen das Medium abgenommen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 1% PFA für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Waschung mit PBS und die Inkubation mit 0,2% Triton X 100 bei Raumtemperatur für 5min. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS zweimalig sowie mit BSA einmalig gewaschen. Weiterhin erfolgte die Zugabe von AK Phalloidin/FITC 1:200 verdünnt. Die Zellen wurden damit für 40min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgreicher Färbung erfolgte eine Waschung und schließlich eine Kernfärbung noch mittels Dapi 1:3000 für 6s kerngefärbt und anschließend mit PBS gewaschen. Es erfolgte abschließend eine Lufttrocknung.

3.2.3 Mikroskopie zur Zellfusion

QTracker, Live-Cell-Labeling

Qtracker Kit Reagenz bringt fluoreszierende Nanokristalle mittels targeting peptide in das Zytoplasma von lebenden Zellen ein. Intrazellulär liefert Qtracker eine stabile Fluoreszenz über einige Generationen ohne Transfektion in andere Zellen einer Population. Aktuell stehen Nanokristalle drei unterschiedlicher maximale Absorbtionsspektren (565, 655 und 705 nm Wellenlänge) zur Verfügung, so dass Markierungen mit drei unterschiedlichen fluoreszierenden Farben durchgeführt werden können.

Es wurden in einer Kammer einer Falcon 6-wellplatte, die mit Human Fibronectin ge-coated war, je 100000 Zellen expandierte EPC und HuFi ausgelegt und in FBM-

Medium 24h bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden sie mit dem jeweiligen Qtracker Reagenz eingefärbt. HuFi mit Q 565 und expandierte EPC mit Q 655.

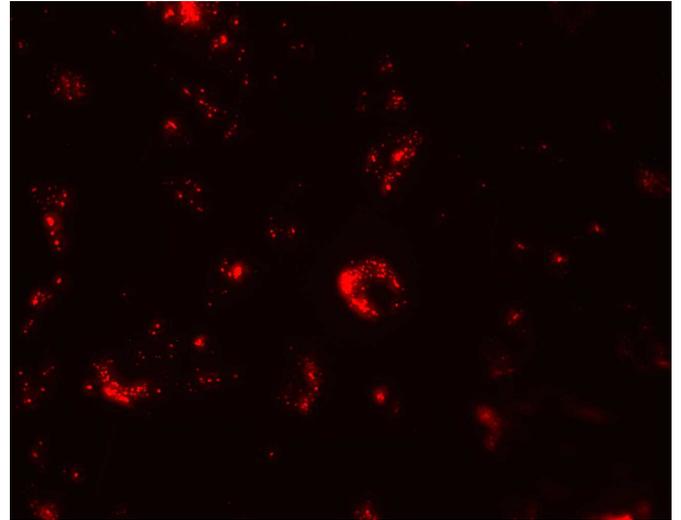
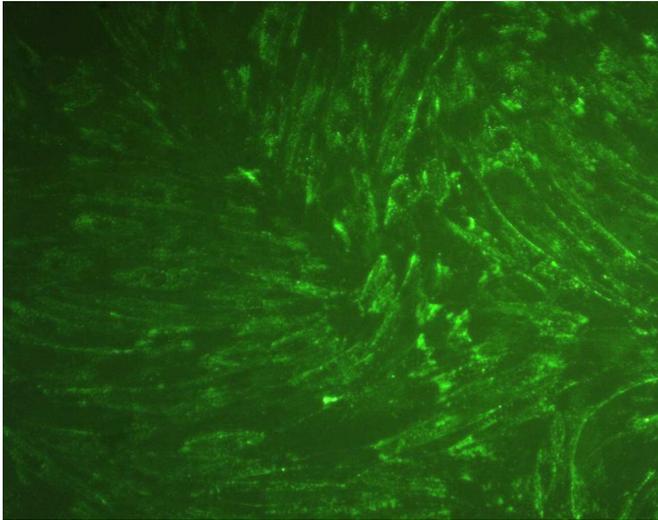


Abbildung 2 links stellen sich HuFi mit intrazellulärem Q565 und rechts late outgrowth EPC mit Q655 dar.

Hierzu wurde je 1µl der entsprechenden Qtracker Reagent A und B in ein Falcon Tube gegeben und mit 198µl FBM-Medium aufgefüllt und anschließend im Vortex gemischt. Das Gemisch wurde zu den jeweiligen Zellen beigefügt und diese für 1h bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit FBM-Medium nach Abnahme des Überstandes gewaschen. Schließlich wurden die Zellen mit Trypsin abgenommen und in FBM-Medium suspendiert. Je 100000 Zellen der beiden Linien wurden nun in einem frischen well für 24h mit FBM-Medium inkubiert. Nach 24h und nach 48h Inkubationszeit wurden unter dem Mikroskop Aufnahmen mit Phase und Fluoreszenz angefertigt und ausgewertet.

3.2.4 Proliferationsassay

Für den Proliferationsassay wurde Cell Proliferation ELISA BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine) der Firma Roche Diagnostics verwendet.

Es wurden Zellen gemäß den Koinkubationsversuchen ausgelegt. Als konstante Menge an Vorläuferzellen wurden 10 000 Zellen gewählt. Die Zellzahl der vaskulären Zellen entsprach derer in den Koinkubationsversuchen, ebenso wurde das Medium gemäß der vaskulären Zelllinie gewählt.

So ergab sich schematisch folgende Versuchsaufstellung:

mononukleäre EPC	expandierte EPC	MSC	CD 34+	HUVEC
Koinkubiert mit je				
HUVEC 5000 Zellen EBM2-Medium		SMC 1500 Zellen SBM-Medium		HuFi 1000 Zellen FBM2-Medium

Ausgelegt wurden die Zellen jeweils in Falcon 6-wellplatte coated mit Human Fibronectin. Es erfolgte ein Mediumwechsel nach 48h. Nach weiteren 48h wurde das Medium von den Zellen abgenommen und zweimal mit 1600 Umdrehungen/min bei Raumtemperatur für 5min zentrifugiert.

Auf einer 96-wellplatte (Fibronectin gecoated: alle wells mit Fibronectin von einer Konzentration mit 10µg/ml bei 37°C für 1h inkubieren und anschließend mit PBS einmalig spülen) wurden 4000 Huvecs in 200µl Medium pro well ausgelegt und für 24h bei 37°C bebrütet. Die 6-wellplatten wurden verworfen oder weiterhin in den Koinkubationsauszählungen verwendet.

Anschließend wurde das Medium abgenommen und durch 200µl Medium aus dem Koinkubationsansätzen bzw. als Basalmedium EBM2 zugegeben. Jeweils vergleichend zur Messung wurden unbeimpfte wells als Vergleich mit EBM2 ohne Zellen befüllt.

Nach 1h in Kultur wurde BrdU-puls zugegeben (im Verhältnis 1:10, sprich 2 µl pro well), mit anschließender erneuter Inkubation für 24h.

Die Überstände wurden abgenommen und 200µl Fix Denat in jedes well gegeben und bei Raumtemperatur für 3 min inkubiert. Das Fix Denat wurde abgeschüttet und pro well 100µl anti-BrdU-POD working solution zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 90 min bei Raumtemperatur. Auch dies wurde anschließend abgeschüttet. Die Platte wurde dreimalig mit gelieferter washing solution gewasche, pro well 100µl substrat solution zugegeben und 30min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden mit dem Elisa-reader bei einer Absorbance von 370nm/492nm gemessen.

Die Differenz zum jeweiligen ungeimpften well war Ausdruck der Proliferation gemäß Absorbance. Je mehr Licht absorbiert wurde, umso mehr Zellen waren gewachsen.

Es erfolgte eine prozentuale Umrechnung, da die Ergebnisse von Assay zu Assay stark variieren. Innerhalb eines Assays war allerdings der gleiche Trend erkennbar.

3.2.5 Zytokinmessungen

Die Durchflusszytometrie (FACS) erlaubt eine Unterscheidung von Partikeln anhand von Größe und Farbgebung. Multiplexing nennt sich die Analyse von mehreren Stoffen in einer Probe. Der CBA-KIT (Cytometric Bead Array) markiert eine Reihe von Stoffen mit diskreter Fluoreszenz. Kombiniert man CBA und FACS, so erhält man eine wirksame Multiplexing-Methode.

Im verwendeten Angiogenese-Kit befanden sich mit PE markierte Antikörper gegen TNF- α , Interleukin 8, VEGF, bFGF und Angiogenin. Um eine messbare Größe zu erreichen, wurden zusätzlich sog. capture beads den Analysaten zugeführt, die an ihrer Oberfläche ebenso Antikörper gegen die Zytokine tragen. Durch eine Bindung an sie wurde eine messbare Größe erreicht.

Zunächst wurden Standardlösungen zur Eichung des FACS-Gerätes laut BD-Anweisung angesetzt.

Anschließend wurde der beadmix angesetzt, hier wurden für jedes zu testende Analysat 5 μ l Aliquot jedes capture beads in ein Falcon gebracht und am Vortex vermischt.

Die Überstände aus dem Koinkubationsversuchen nach 96 Stunden, wobei ein Mediumwechsel nach 48 Stunden stattgefunden hatte, wurden in einem Falcontube für 5-10s und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Je 25 μ l wurden in FACS-Tubes pipettiert und 25 μ l Beadmix zugegeben. Die Suspension wurde für 1,5h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Dann wurden 500 μ l Washbuffer zugegeben und erneut bei Raumtemperatur 5min bei 1200 Umdrehungen/min zentrifugiert. Die Überstände wurden bis auf ca. 100 μ l abgenommen. Es wurden 25 μ l PE Detection Reagent zugegeben und 1,5h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500 μ l Washbuffer. Danach wurde erneut bei Raumtemperatur 5min bei 1200 Umdrehungen zentrifugiert. Die Überstände wurden abgesaugt, ca. 150 μ l Washbuffer zugeben und der FACS-Messung zugeführt.

Hier erfolgte zuvor eine Eichung mittels Standardproben und der Positivkontrollen.

4 Ergebnisse

Zielsetzung der Arbeit war es, mögliche Interaktionen oder Mechanismen von Vorläuferzellen mit vaskulären Zellen zu untersuchen.

4.1 Koinkubationsversuche

Wie bereits erwähnt, wurde hierzu ein Koinkubationsmodell gewählt. Als Ausdruck einer vermehrten Proliferation, verringerten Apoptose oder vermehrten Zellinteraktion durch die Einwirkung der Vorläuferzellen wären im Modell eine vermehrte Gesamtzahl an Zellen in der jeweiligen Kultur nach einem bestimmten Zeitraum zu sehen. Durch mögliche Fusions-, Austausch- oder auch Transdifferenzierungsvorgänge wäre eine vermehrte Anzahl an Zellen zu sehen, die spezifische Strukturen der vaskulären Zellen, dargestellt durch spezifische Antikörperfärbungen, sowie Marker der Vorläuferzellen, das anfänglich eingebrachte DIL-Labeling, doppelt-positiv zeigen.

So wurden bei den Auswertungen der einzelnen Versuche die Zahl der gesamten Zellen sowie die Zahl der sogenannten doppelt-positiven Zellen, sprich Zellen mit DIL-Labeling und spezifischen Antigenstrukturen, ausgewertet. Hiermit kann über die erfasste Anzahl der Zellen in der gesamten Kultur eine Aussage über eine vermehrte Proliferation oder verringerte Apoptose der Zellen durch die Koinkubation getroffen werden. Durch Zählung der doppelt-positiven Zellen sollen Hinweise auf eine mögliche Interaktion wie Fusions-, Austausch- oder auch Transdifferenzierungsvorgänge gefunden werden.

Wie schon oben beschrieben wurden die Vorläuferzellen in verschiedenen Mengen (5000, 10000 sowie 20000 Zellen) ausgelegt, um einen möglichen Dosiseffekt zu sehen.

CD 34+ Zellen

In den ersten Graphiken sind die Ergebnisse der Koinkubationsversuche von HUVEC, HuFi, SMC mit CD 34+ Zellen zu sehen.

Jeweils aufgezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM der Versuche nach Koinkubation in einem Zeitraum von sieben bis zehn d. Es sind mindestens drei Versuchsansätze

und deren Ergebnisse in die Auswertung eingeflossen. Dargestellt ist die gezählte Zellzahl aller Zellen nach Koinkubation in Abhängigkeit der aufgebrauchten CD34+- Zellen, sowie der Anteil der doppelt-positiven Zellen in Abhängigkeit der Anzahl der CD34+- Zellen zu Beginn der Koinkubation.

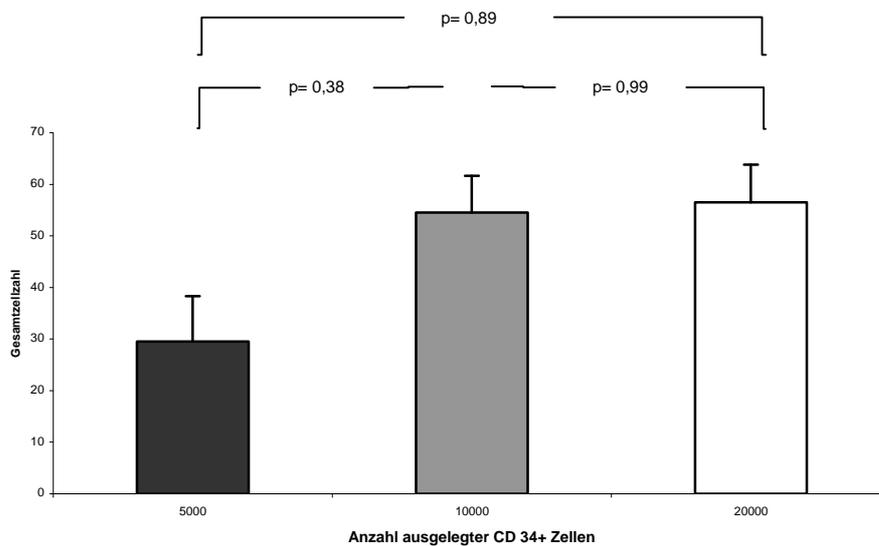


Abbildung 3: Gesamtzahl der Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation von 5000 HUVEC mit CD34+ Zellen abhängig von der Anzahl der ausgelegte CD34+ Zellen

Es zeigt sich ein Dosiseffekt der aufgebrauchten CD 34+- Zellen. So steigt mit Verdoppelung der aufgebrauchten CD34+- Zellen von 5000 auf 10000 Stück eine Zunahme der Gesamtzellzahl um 86% von 29 auf 54 pro Gesichtsfeld im Mittel ($p=0,38$). Eine weitere Verdoppelung auf 20000 Zellen bringt keine weitere Steigerung. Allerdings sind die Ergebnisse nicht signifikant unterschiedlich. In den Versuchen wurde lediglich die Anzahl der aufgebrauchten CD34+- Zellen verändert, HUVEC wurden konstant in einer Menge von 5000 verwendet.

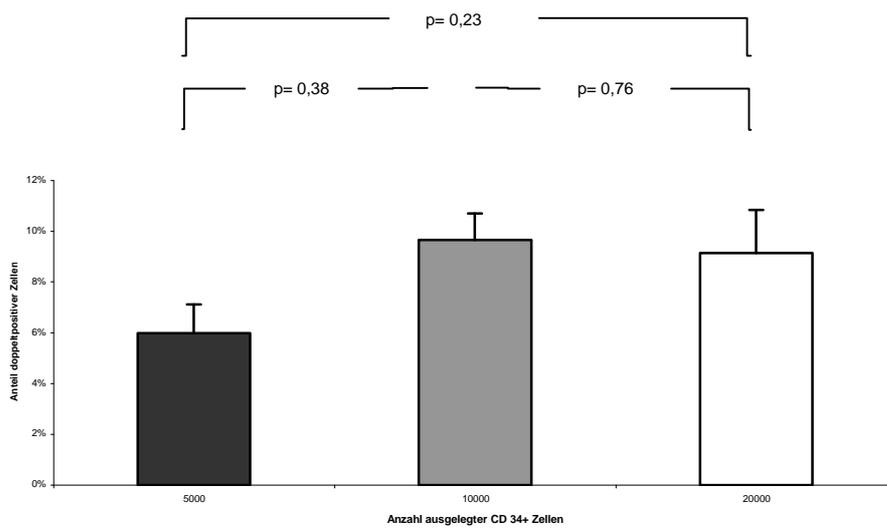
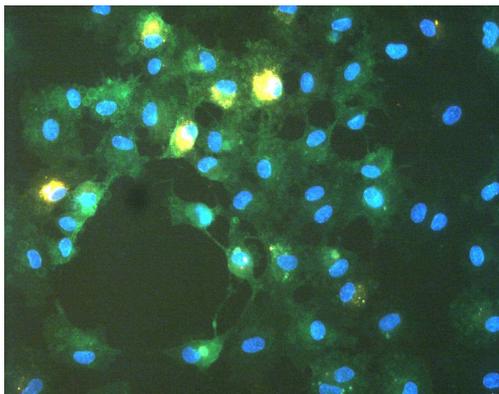
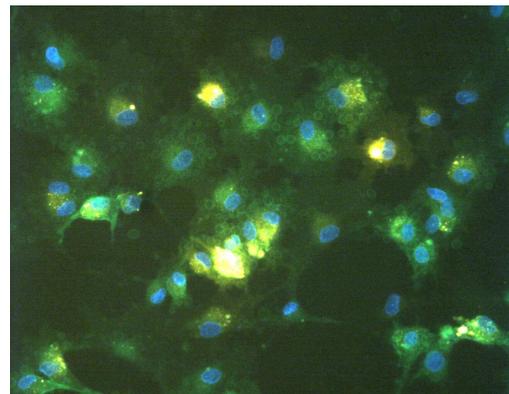


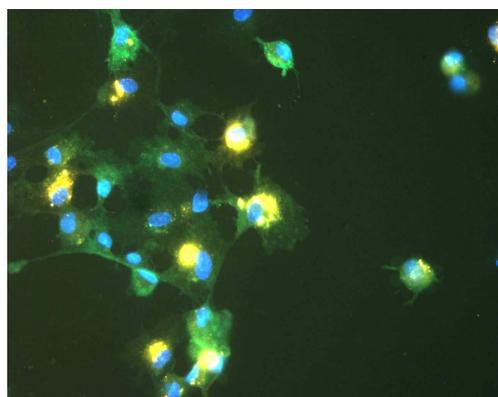
Abbildung 4: Anteil der doppelpositiven (CD31+ /DIL) Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation Huvec mit CD34+- Zellen abhängig von der Anzahl der ausgelegte CD34+- Zellen



5000 ausgelegte CD34+- Zellen



10000 ausgelegte CD34+- Zellen



20000 ausgelegte CD34+- Zellen

Abbildung 5: Fotos der Koinkubationsversuche Huvecs inkubiert mit CD 34+- Zellen, blau stellt sich die Dapi-Kernfärbung dar, grün der fitc-konjugierte Antikörper gegen CD31. Zellen mit DIL-Labeling strahlen durch die Überlagerung orange

Bei Betrachtung des Anteils der doppelt-positiven Zellen, das heißt in diesem Fall, Zellen die für CD31 positiv gefärbt wurden, und das rote DIL-Labeling der CD 34+- Zellen zeigen, sieht man einen Dosisseffekt nur noch bei einer Steigerung von 5000 auf 10000 Zellen auf einen Anteil von 13,6% der Zellen. Obwohl auch hier keine signifikanten Unterschiede zu sehen sind, ist dies ein Hinweis eine Vermehrung der endothelialen Zellen durch Koinkubation mit CD34+- Zellen.

Analog wurden diese Versuche auch mit Fibroblasten HuFi durchgeführt. Die Anzahl der ausgelegten Hufi wurde in jedem Versuch bei 1000 Zellen konstant gehalten. CD34+-Zellen wurden in Mengen von 5000, 10000 oder 20000 Zellen aufgebracht. Eine Auszählung erfolgte nach Zellen gesamt und Anteil der doppelt-positiven (DIL-Labeling und Ak gegen Fibroblasten positiven) Zellen

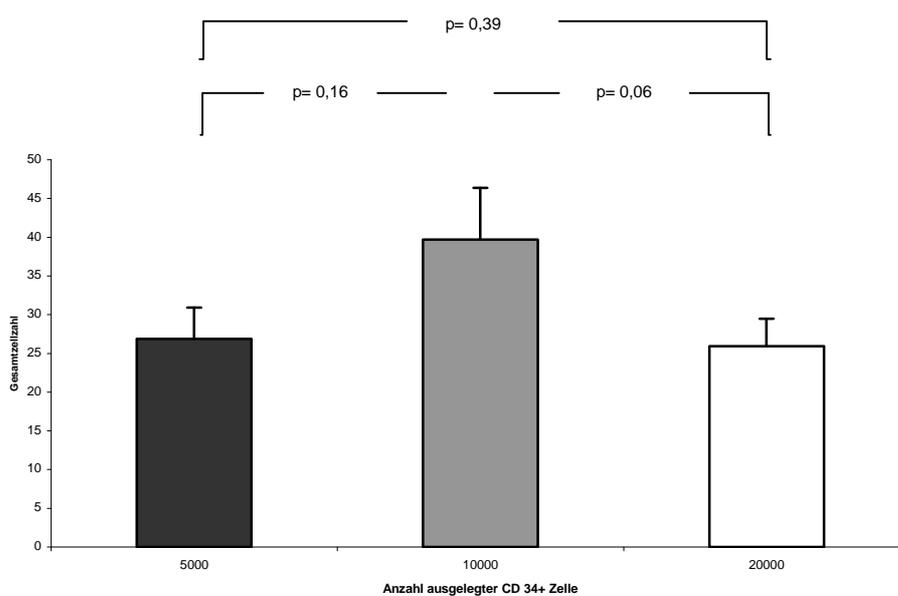


Abbildung 6: Gesamtzahl der Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation von 1000 HuFi mit CD34+- Zellen abhängig von der Anzahl der ausgelegte CD34+- Zellen

Betrachtet man hier die Gesamtzahl der Zellen, so fällt auf, dass durchaus eine nominale, nicht signifikante Steigerung des Wachstums durch die Erhöhung der aufbrachten CD 34+- Zellen auf 1 000 Stück erreicht werden kann. Allerdings ist bei einer weiteren Steigerung der Zellzahl an CD34+- Zellen auf 20000 eher eine Hemmung des Wachstums zu sehen. So befinden sich im Mittel pro Gesichtsfeld 40 Zellen bei den Versuchen mit 10000 Vorläuferzellen im Vergleich zu 25 bei den Versuchen mit 20000 Vorläuferzellen.

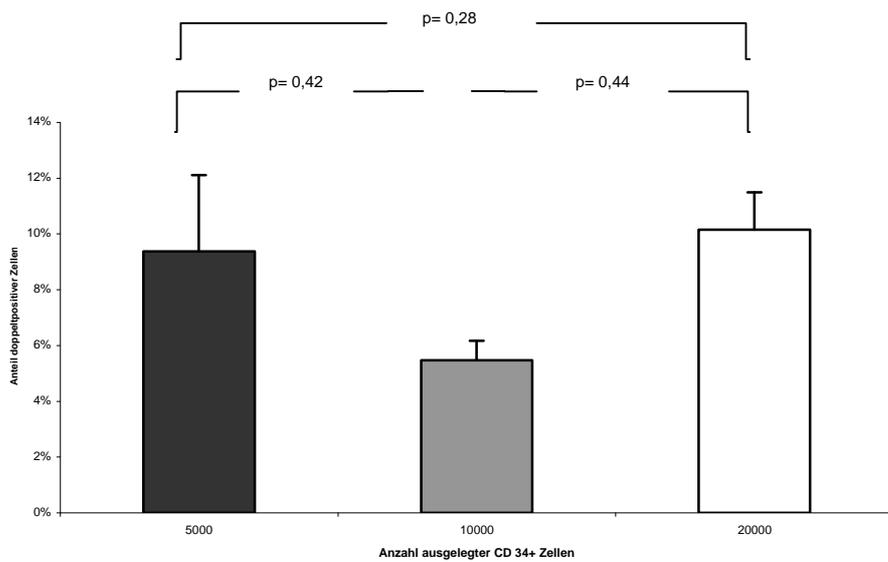
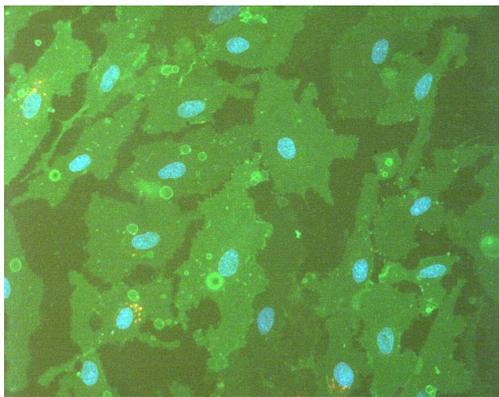
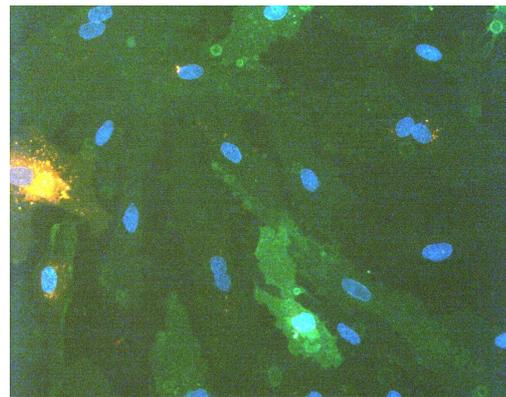


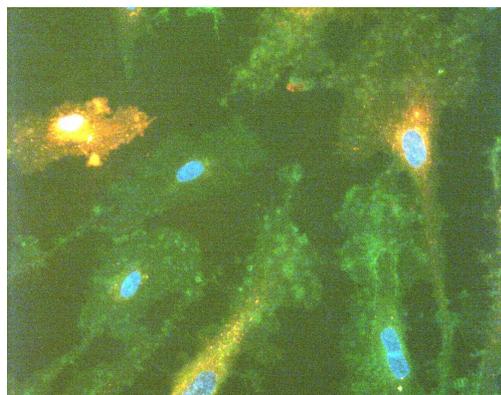
Abbildung 7: Anteil der doppelpositiven (DIL/ AK-Fibroblasten) Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation HuFi mit CD34+- Zellen abhängig von der Anzahl der ausgelegte CD34+- Zellen



5000 ausgelegte CD34+- Zellen



10000 ausgelegte CD34+- Zellen



20000 ausgelegte CD34+- Zellen

Abbildung 8: Fotos der Koinkubationsversuche HuFi inkubiert mit CD 34+-Zellen, blau stellt sich die Dapi-Kernfärbung dar, grün der fitc-konjugierte Antikörper gegen Fibroblasten. Zellen mit DIL-Labeling strahlen durch die Überlagerung orange

Der Anteil der doppelt positiven Zellen, Zellen die sowohl das DIL-Labeling tragen wie positiv für einen Fibroblastenmarker sind, ist in den Versuchen mit 5000 sowie 20000 Zellen annähernd gleich, bei Versuchen mit 10000 Zellen verringert. Betrachtet man die absolut Zahl an doppelt positiven Zellen, so zeigen sich nominal keine Unterschiede. D.h. durch die Koinkubation wird die Proliferation der Fibroblasten nicht beeinflusst. Auch in diesem Ansatz ergeben sich keine Signifikanzen.

Als letzte vaskuläre Zelllinie wurden glatte Muskelzellen (SMC) mit CD 34+- Zellen koinkubiert und nach selben Schema ausgewertet. Es wurden jeweils 1500 SMC zahlenmäßig konstant in allen Versuchsansätzen vorgelegt. Die Anzahl der CD34+- Zellen wurde wiederum nach dem bereits beschriebenen Muster analog verwendet.

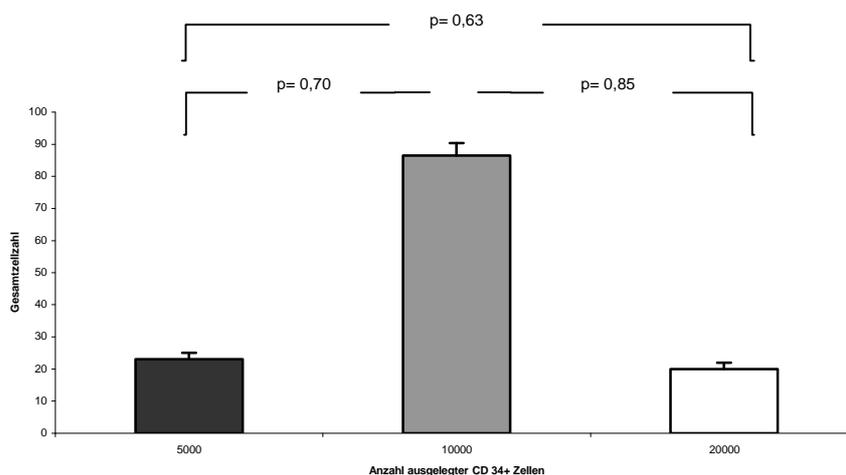


Abbildung 9: Gesamtzahl der Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation von 1500 SMC mit CD34+ Zellen abhängig von der Anzahl der ausgelegte CD34+- Zellen

Wesentlich deutlichere Effekte auf die Proliferation von SMC zeigen sich nach Inkubation mit 10000 Vorläuferzellen. So sieht man im Mittel im Gesichtsfeld 86 Zellen. Durch eine weitere Erhöhung der Zellzahl lässt sich kein weiter steigendes Wachstum erreichen.

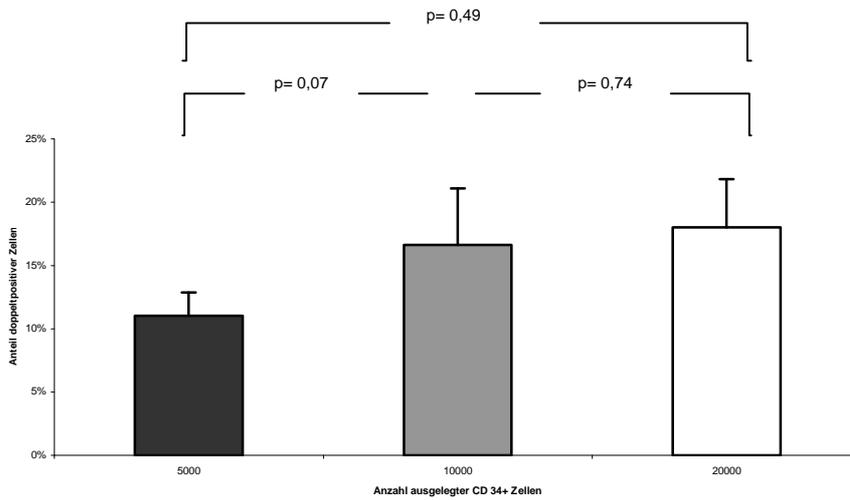
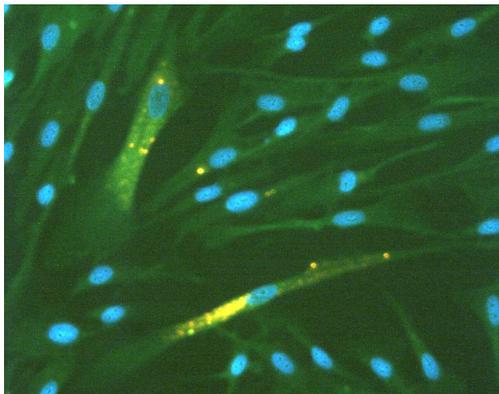
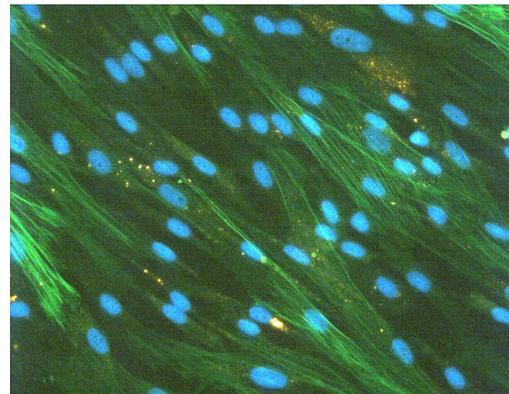


Abbildung 10: Anteil der doppelpositiven (DIL/AK α -smooth actin) Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation SMC mit CD34+- Zellen abhängig von der Anzahl der ausgelegte CD34+- Zellen

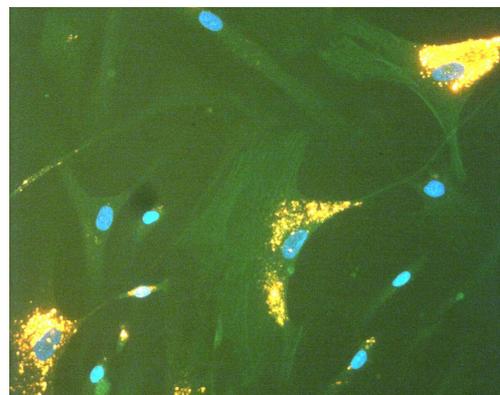
Betrachtet man hier nun die Anzahl an doppelpositiven Zellen, so fällt auf, dass diese durch eine vermehrte Zugabe von Vorläuferzellen auf 10% von 15% gesteigert werden kann. Eine weitere Steigerung der Zellzahl kann keinen Effekt mehr erzielen.



5000 ausgelegte CD34+- Zellen



10000 ausgelegte CD34+- Zellen



20000 ausgelegte CD34+- Zellen

Abbildung 11: Fotos der Koinkubationsversuche SCM inkubiert mit CD 34+, blau stellt sich die Dapi-Kernfärbung dar, grün der fitc-konjugierte Antikörper gegen α -smooth actin. Zellen mit DIL-Labeling strahlen durch die Überlagerung orange

MSC-Zellen

Als weitere Zellreihe wurden mesenchymale Vorläuferzellen mit den jeweiligen vaskulären Zellen inkubiert. Auch hier erfolgte eine Auswertung nach selbigen Muster. Die Anzahl der mesenchymalen Stammzellen wurde jeweils gesteigert und in Mengen von 5000, 10000 oder 20000 Zellen ausgelegt. Die Mengen der vaskulären Zellen waren konstant, analog zu den Versuchen mit CD34+- Zellen: 5000 Huvec, HuFi 1000 oder 1500 SMC.

Werden zunächst die Versuche mit ausgereiften Endothelzellen (HUVEC) betrachtet, so zeigt sich ein leichter peak im Mittel bei Koinkubationen mit 10000 Zellen im Vergleich zu Ansätzen mit 5000 oder 20000 Zellen; so dass in dieser Versuchsreihe kein Effekt auf die Gesamtzellzahl beobachtet werden kann.

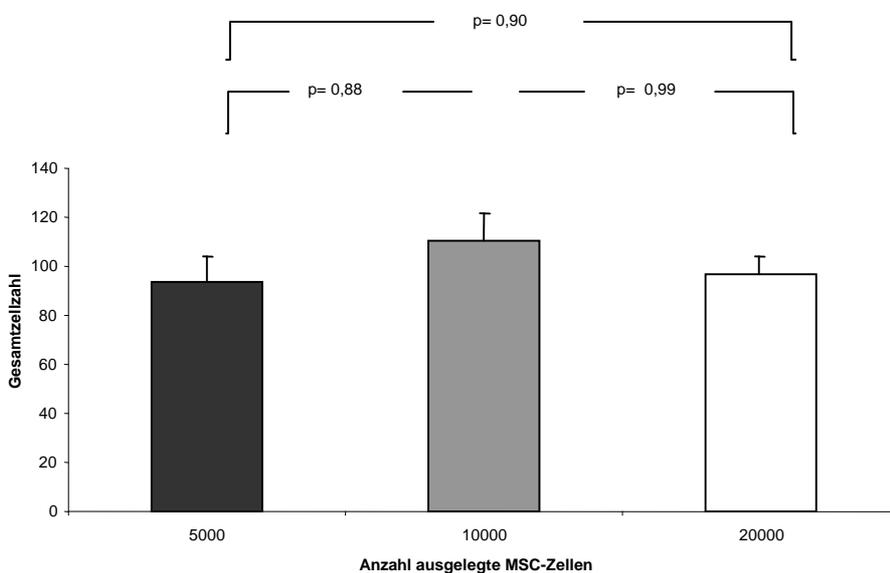


Abbildung 12: Gesamtzahl der Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation mit 5000 HUVEC mit MSC Zellen abhängig von der Anzahl der ausgelegte MSC Zellen

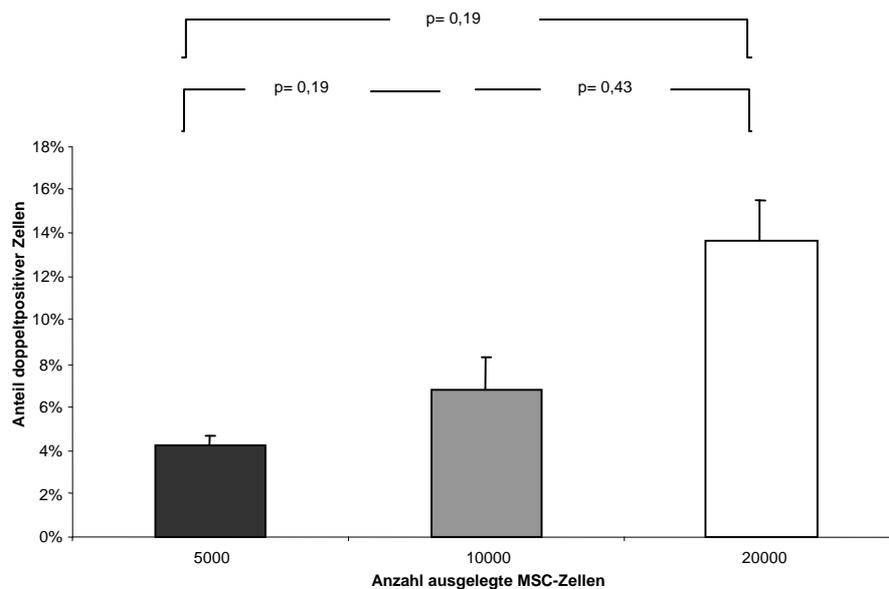
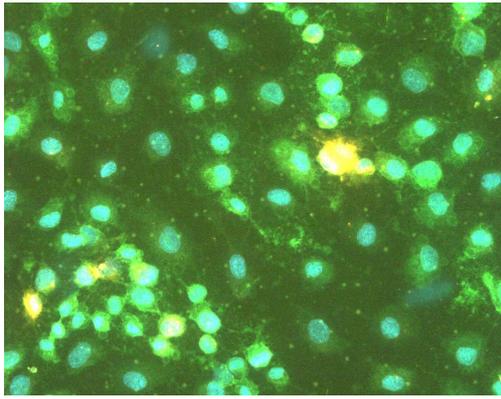
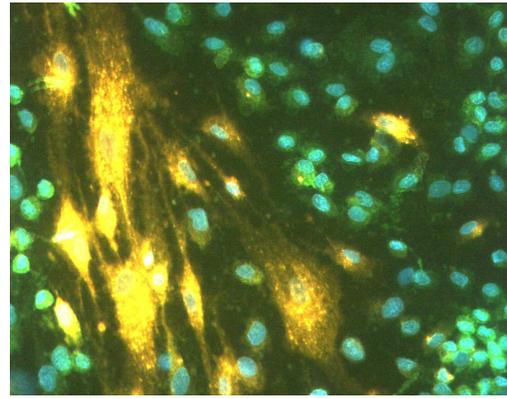


Abbildung 13: Anteil der doppelpositiven (DIL/CD31+) Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation Huvec mit MSC Zellen abhängig von der Anzahl der ausgelegte MSC Zellen

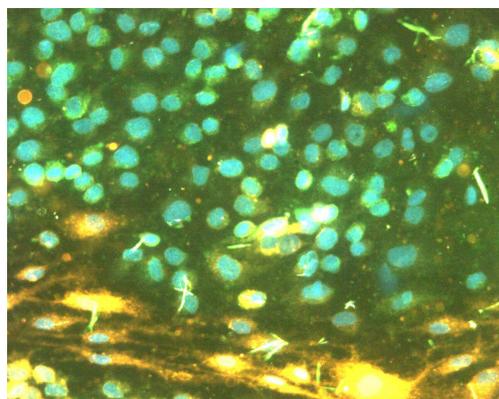
Im Gegensatz dazu zeigt die Betrachtung von doppel-positiven Zellen eine Steigerung des Anteils der Dil+/CD31+- Zellen. Man beobachtet also bei Koinkubation von Huvecs mit MSC-Zellen eine Steigerung der doppel-positiven Zellen, umso mehr Vorläuferzellen mit inkubiert werden. Es besteht also eine nominale aber nicht signifikante Auswirkung auf die Proliferation der endothelialen Zellen durch die MSC. Da diese nur einen kleinen Prozentsatz aller Zellen ausmachen, beobachtet man diesen Effekt nicht bei der Analyse der Gesamtzellzahl (Abb. 12).



5000 ausgelegte MSC



10000 ausgelegte MSC



20000 ausgelegte MSC Zellen

Abbildung 14: Fotos der Koinkubationsversuche HUVEC inkubiert mit MSC, blau stellt sich die Dapi-Kernfärbung da, grün der fitc-konjugierte Antikörper gegen CD31. Zellen mit DIL-Labeling strahlen durch die Überlagerung orange

Im Folgenden sind Ergebnisse aus den Koinkubationsversuchen von mesenchymalen Stammzellen (MSC) und Fibroblasten (HuFi) dargestellt. Es wurde die Anzahl der verwendeten MSC wieder in mehreren Versuchsreihen gesteigert. Analog zu den bereits beschriebenen Versuchen erfolgte die Steigerung von 5000 auf 10000 und schließlich auf 20000 Zellen. Die Anzahl der ausgelegten HuFi war gleich bei 1000 in jedem Versuchsansatz.

Auch hier zeigt sich, dass das Wachstum der Zellen im Gesamten nicht wesentlich durch eine Erhöhung der Zahl an Vorläuferzellen gesteigert werden kann. Die Gesamtzellzahl pro Gesichtsfeld ist in allen der Versuchsreihen nahezu im Mittel gleich.

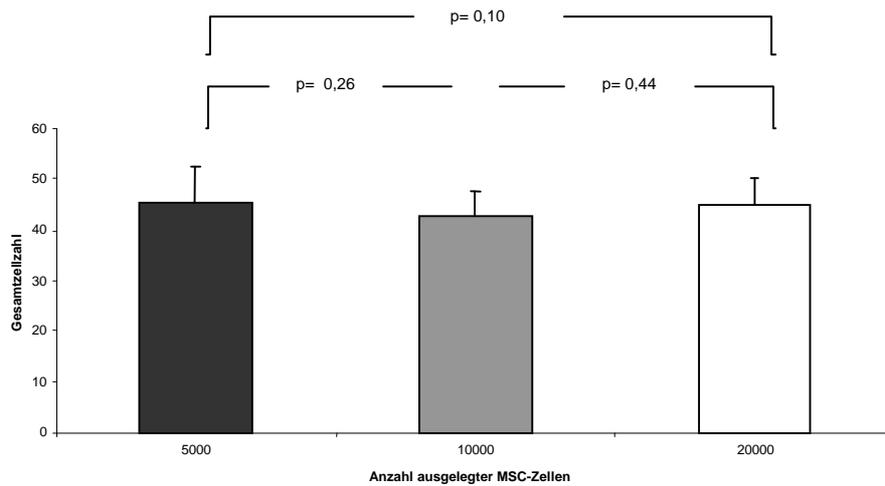


Abbildung 15: Gesamtzahl der Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation mit 1000 HuFi mit CD34+ Zellen abhängig von der Anzahl der ausgelegte MSC Zellen

Analog zu den Versuchen mit endothelialen Zellen (HUVEC) sieht man auch hier einen deutlich höheren Anteil von doppeltpositiven Zellen bei einer Koinkubation mit 20000 MSC von im Mittel 27%, fast doppelt so viel wie den Ansätzen mit 10000 oder 5000 ausgelegten MSC, in Bezug auf diese beiden Ansätze besteht auch ein signifikanter Unterschied, vergleicht man die Anteile an doppelt-positiven Zellen in den jeweiligen Ansätzen.

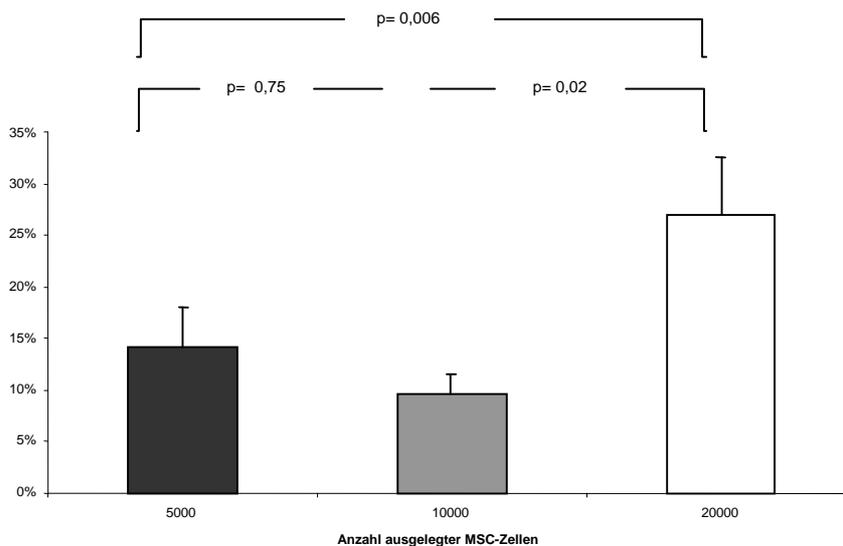
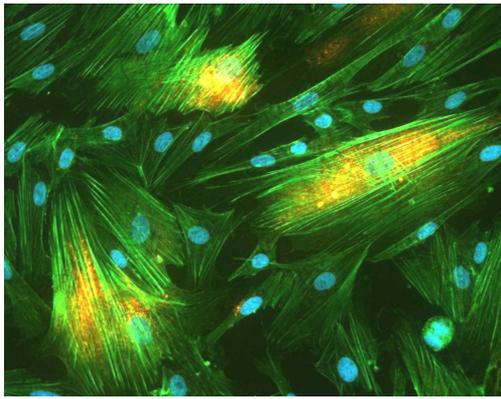
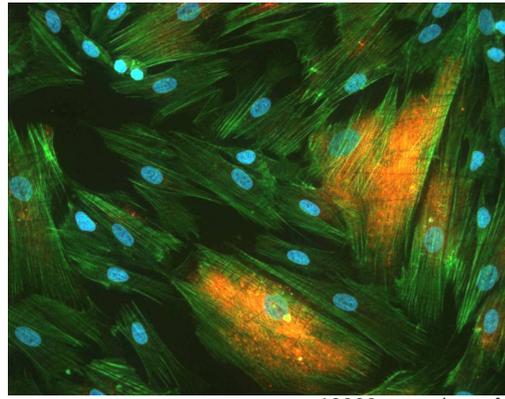


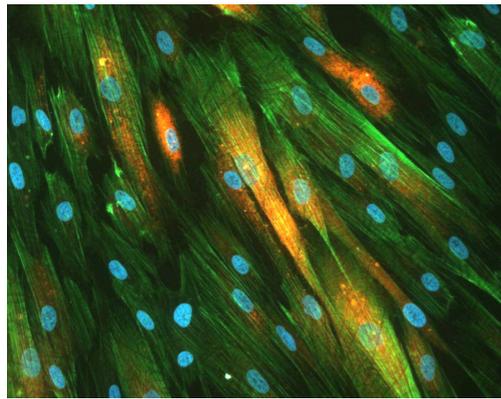
Abbildung 16: Anteil der doppeltpositiven (DIL/AK-Fibroblasten) Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation HuFi mit MSC abhängig von der Anzahl der ausgelegte MSC



5000 ausgelegte MSC



10000 ausgelegte MSC



20000 ausgelegte MSC

Abbildung 17: Fotos der Koinkubationsversuche HuFi inkubiert mit MSC, blau stellt sich die Dapi-Kernfärbung dar, grün der fitc-konjugierte Antikörper gegen Phalloidin. Zellen mit DIL-Labeling strahlen durch die Überlagerung orange

Auch glatte Muskelzellen (SMC) wurden mit mesenchymalen Stammzellen (MSC) koinkubiert.

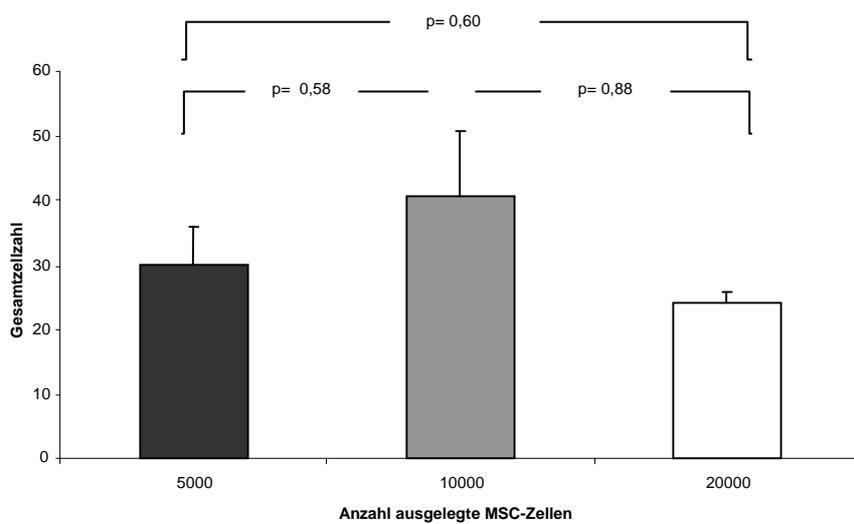


Abbildung 18: Gesamtzahl der Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation mit 1500 SMC mit MSC abhängig von der Anzahl der ausgelegten MSC.

Die Anzahl der MSC wurde wiederum von 5000 über 10000 auf 20000 Zellen variiert, wobei die Anzahl der ausgelegten SMC konstant bei 1500 in allen Versuchsansätzen war.

Betrachtet man die Ergebnisse, sieht man im Gegenteil zu den vorherig beschriebenen Versuchsreihen mit HuFi und HUVEC, bei einer Koinkubation von MSC und SMC eine Steigerung der Gesamtzellzahl bei Inkubationversuchen von 30 bei Versuchen mit 5000 MSC auf 41 Zellen im Gesichtsfeld mit 10000 MSC. Eine weitere Steigerung durch vermehrte Zugabe von Vorläuferzellen lässt sich nicht bewirken, gegenteilig fällt hier das Zellwachstum wieder ab.

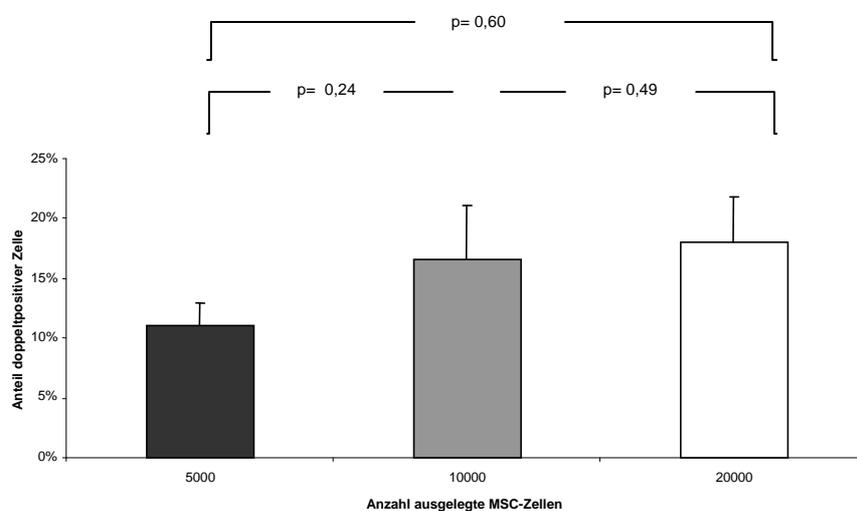
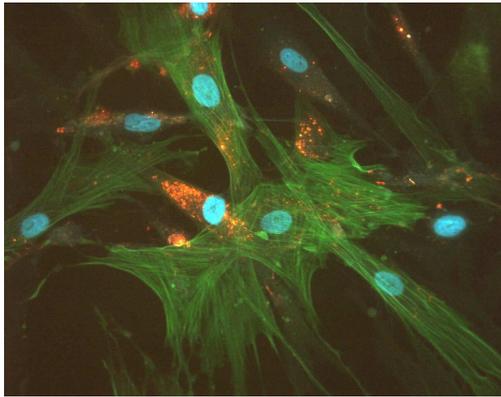
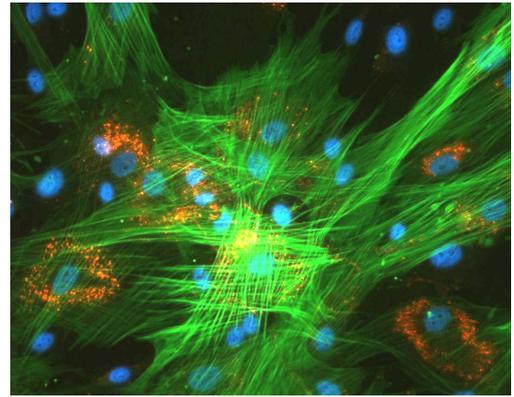


Abbildung 19: Anteil der doppelpositiven (DIL/AK α -smooth actin) Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation SMC mit MSC abhängig von der Anzahl der ausgelegten MSC

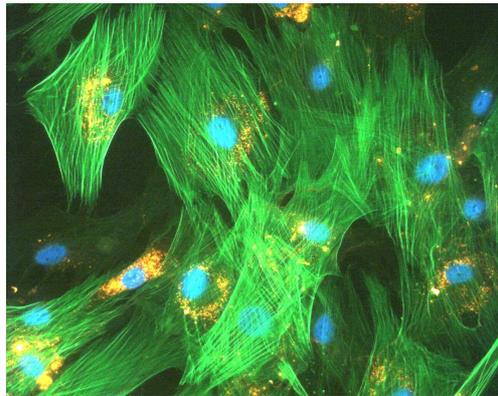
Auch der Anteil der doppel-positiven Zellen zeigt ein anderes Verhalten wie bei Koinkubationsversuchen der beiden anderen vaskulären Zellen mit MSC. So ist eine Steigerung des Anteils von 11% auf 16% bei einer Verdoppelung der MSC-Menge von 5000 auf 10000 zu sehen. Eine weiter signifikante Steigerung ist durch die Erhöhung der Menge an mesenchymalen Zellen nicht zu bewirken. Bei Fibroblasten und Endothelzellen war jeweils mit einer ausgelegten Menge von 20000 MSC der höchste Anteil an doppel-positiven Zellen zu beobachten gewesen.



5000 ausgelegte MSC



10000 ausgelegte MSC



20000 ausgelegte MSC

Abbildung 20: Fotos der Koinkubationsversuche SCM inkubiert mit MSC, blau stellt sich die Dapi-Kernfärbung dar, grün der fitc-konjugierte Antikörper gegen α -smooth actin. Zellen mit DIL-Labeling strahlen durch die Überlagerung orange

Mononukleäre EPC

Vergleichend wurden die Versuchsansätze auch mit mononukleäre EPC durchgeführt, einer endothelialen Zelllinie expandiert aus einem mononukleären Zellpool. Zunächst sind die Ergebnisse der Koinkubationsansätze mit HUVEC als ausdifferenzierte Zelllinie gezeigt. Wie der Grafik zu entnehmen ist, wurde die Anzahl der ausgelegten Vorläuferzellen wieder verändert während die ausgelegten HUVEC zahlenmäßig konstant bei 5000 blieben.

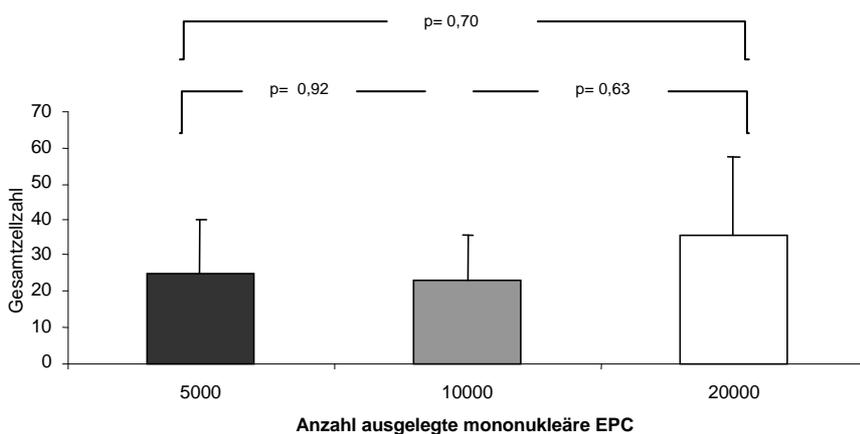


Abbildung 21: Gesamtzahl der Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation mit 5000 HUVEC mit mononukleären EPC abhängig von der Anzahl der ausgelegten Vorläuferzellen

Hier zeigt sich eine minimale Zunahme der Gesamtzellen im Gesichtsfeld durch eine Erhöhung der ausgelegten Vorläuferzellen auf 20000 Zellen je well. Die Anzahl kann von 25 Zellen im Gesichtsfeld bei 5000 mononukleären EPC auf 36 Zellen bei 20000 mononukleären EPC gesteigert werden. Durch eine Erhöhung auf 10000 Vorläuferzellen wird kein Effekt erreicht. Die Varianz der einzelnen Werte aus den Versuchen ist allerdings sehr breit. Zusammenfassend lässt sich allerdings signifikant kein eindeutiger proliferativer Effekt nachweisen.

Betrachtet man die Anzahl der doppelt-positiven Zellen. So sind die Werte für 10000 sowie 20000 angesetzte mononukleären EPC annähernd gleich bei im Mittel 29% mit allerdings ebenso großer Varianz. Bei 5000 Zellen im Ansatz liegt der Anteil bei 22%.

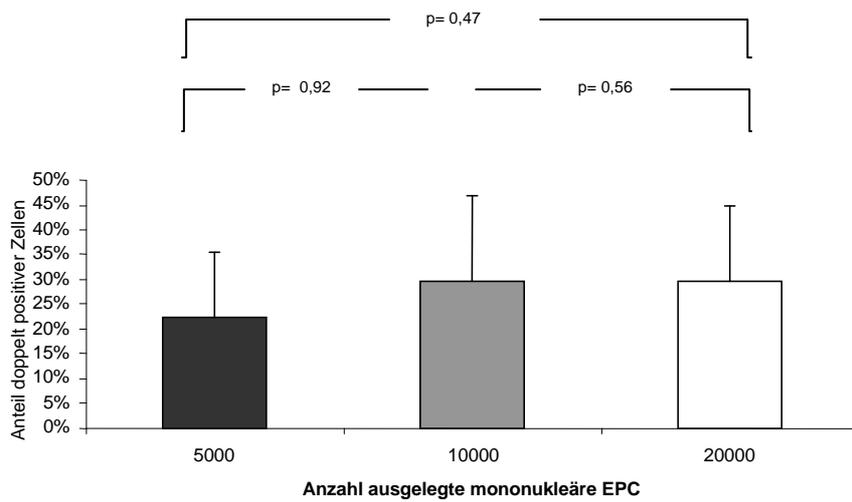
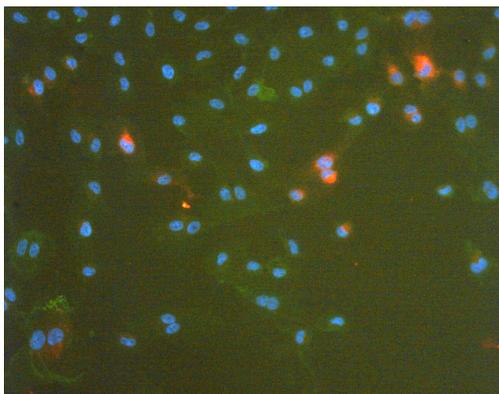
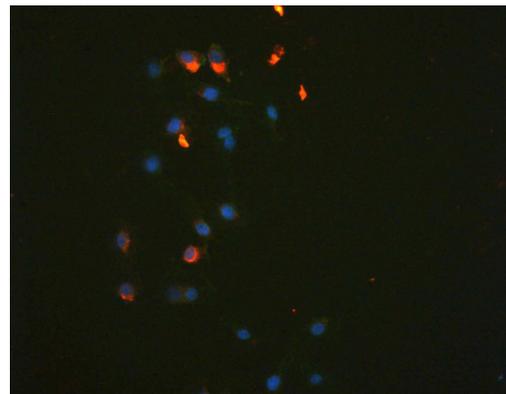


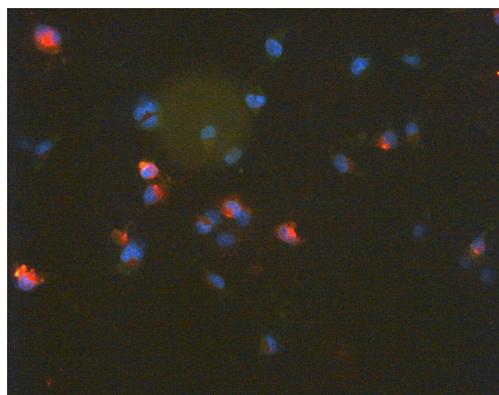
Abbildung 22: Anteil der doppelt-positiven (DIL/CD31+)Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation von HUVEC mit mononukleären EPC abhängig von der Anzahl der ausgelegten mononukleären EPC.



5000 ausgelegte EPC



10000 ausgelegte EPC



20000 ausgelegte EPC

Abbildung 23: Fotos der Koinkubationsversuche HUVEC inkubiert mit mononukleären EPC, blau stellt sich die Dapi-Kernfärbung dar, grün der fitc-konjugierte Antikörper gegen CD31. Zellen mit DIL-Labeling strahlen durch die Überlagerung orange

Im entsprechenden Ansatz wurden mononukleäre EPC auch mit Fibroblasten (HuFi) koinkubiert. Die Menge an ausgelegten Fibroblasten war wie in allen anderen Versuchsansätzen konstant gleich bei 1000 Zellen pro well. Die Anzahl der hinzugefügten Vorläuferzellen variierte wieder von 5000 über 10000 zu 20000 Zellen. Die Varianz der Werte ist ebenso wie im Vorhergehenden breit gestreut. Auch zeigt sich die größte Gesamtzahl an Zellen im Gesichtsfeld des Mikroskops bei 20000 mit inkubierten Vorläuferzellen. Der Unterschied zu den Ansätzen mit 10000 fällt allerdings mit 16 zu 18 Zellen im Vergleich nicht so deutlich aus. Dazu hebt sich das Ergebnis der Versuchsansätze mit 5000 mononukleären EPC mit 9 Zellen im Gesichtsfeld ab. Die Ansätze mit 20000 zeigen im Mittel signifikant ($p=0,01$) mehr Proliferation.

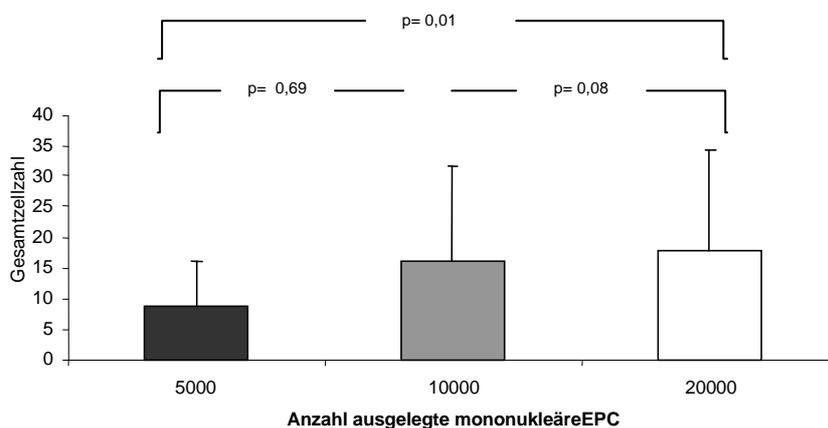


Abbildung 24: Gesamtzellzahl pro Gesichtsfeld bei Koinkubation von 1000 HuFi mit mononukleären EPC abhängig von der Anzahl der ausgelegten EPC

Der Anteil an doppelt-positiven Zellen, Zellen die das DIL-Labeling zeigen als auch positiv mit dem fitc-konjugierten Antikörper gegen Kollagenase der Fibroblasten sind, ist in den Versuchen mit 20000 ausgelegten Vorläuferzellen bei 99%. Hingegen fällt der Anteil bei ausgelegten 10000 mononukleären EPC von 5000 deutlich von 63% auf 23% ab. Dies stellt allerdings jeweils keinen signifikanten Unterschied dar. Betrachtet man hier allerdings die absoluten Zellzahlen mit doppelter Färbung, so sind diese in den Ansätzen mit 5000 und 10000 Zellen annähernd gleich.

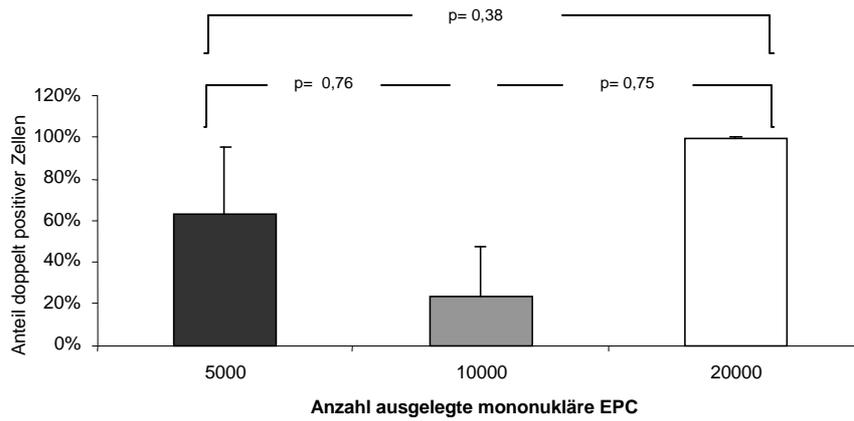
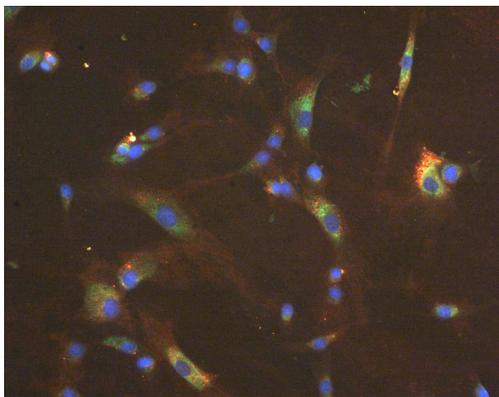
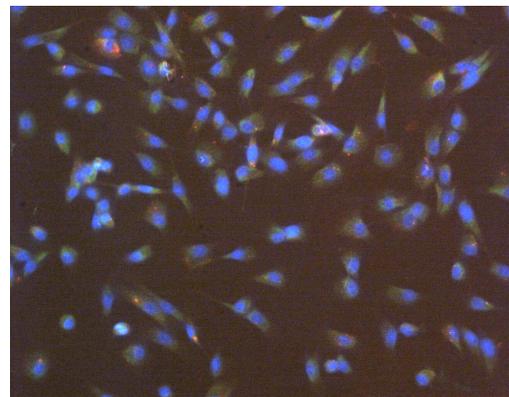


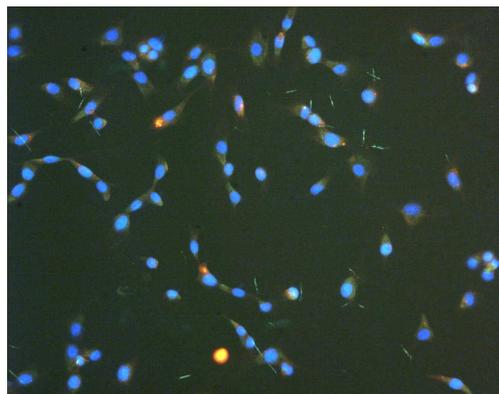
Abbildung 25: Anteil der doppelt-positiven (DIL/AK-Fibroblasten) Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation HuFi mit mononukleären EPC abhängig von der Anzahl der ausgelegten EPC.



5000 ausgelegte EPC



10000 ausgelegte EPC



20000 ausgelegte EPC

Abbildung 26: Fotos der Koinkubationsversuche HuFi inkubiert mit mononukleären EPC, blau stellt sich die Dapi-Kernfärbung dar, grün der fitc-konjugierte Antikörper gegen Fibroblasten. Zellen mit DIL-Labeling strahlen durch die Überlagerung orange

Als letztes sind die Ergebnisse von SMC koinkubiert mit mononukleären EPC gezeigt. Die vorgelegte Anzahl der SMC ist wiederum konstant bei 1500 geblieben bei sonst variiertes Anzahl der Vorläuferzellen.

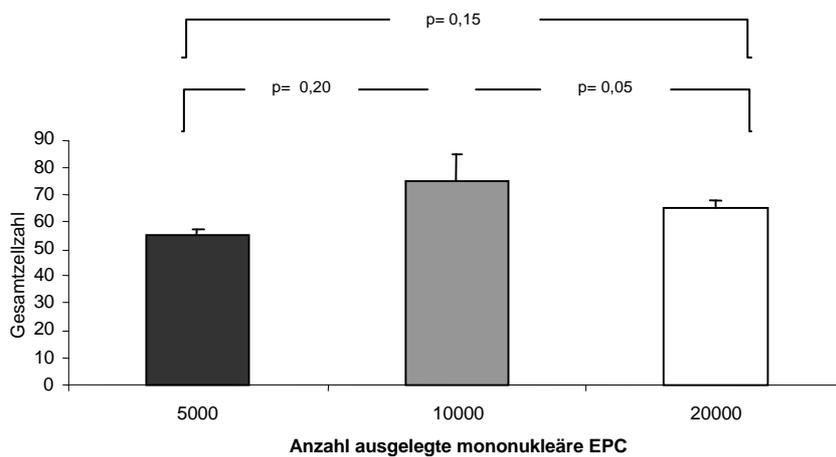


Abbildung 27: Gesamtzahl der Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation von 1500 SMC mit mononukleären EPC abhängig von der Anzahl der ausgelegten EPC

Betrachtet man hier die Gesamtzahl der Zellen pro Gesichtsfeld, so sieht man im Vergleich zu den Versuchen mit HuFi oder HUVEC eine deutlich geringere Streuung der einzelnen Versuchswerte. Das deutlichste Zellwachstum ist in den Versuchen mit 10000 angesetzten Vorläuferzellen mit einer Anzahl von 74 Zellen im Mittel zu sehen. Sowohl bei 20000 angesetzten mononukleären EPC mit einer Zellzahl von 65 wie auch bei 5000 mit einer Zellzahl von 53 sind geringere Werte zu beobachten. Im Vergleich zu 20000 sogar signifikant mehr bei 10000 Zellen.

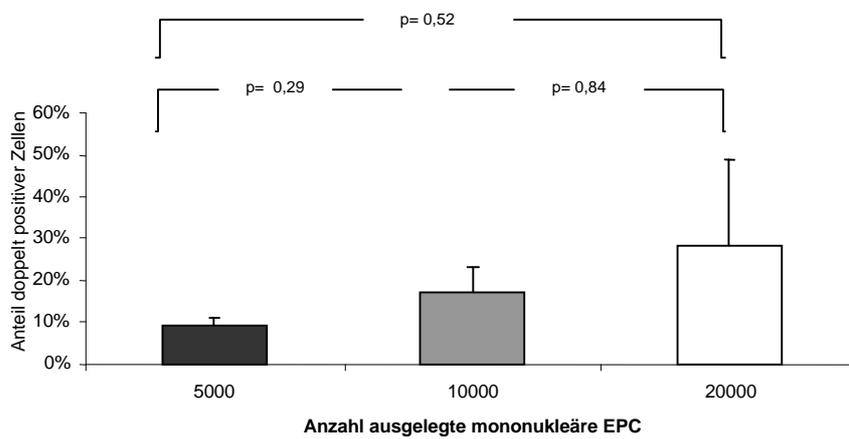
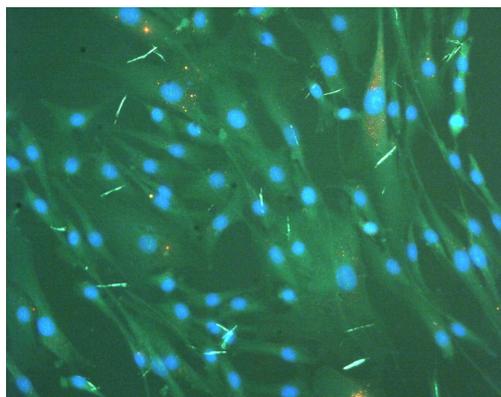
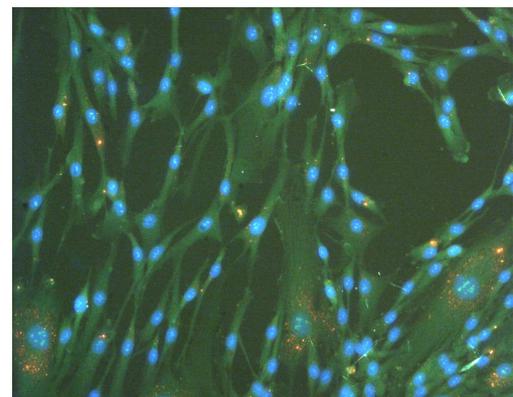


Abbildung 28: Anteil der doppelt-positiven (DIL/ α -smooth actin)Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation SMC mit mononukleären EPC abhängig von der Anzahl der ausgelegten EPC.

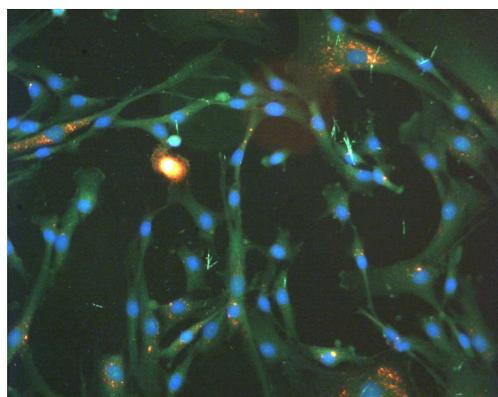
Betrachtet man die doppeltpositiven Zellen, so lässt sich eine deutliche dosisabhängige Steigerung darstellen. Bei der geringsten Zahl an ausgelegten Vorläuferzellen tragen 9% im Mittel der Zellen das DIL-Labeling und lassen sich für α -smooth actin positiv färben. Gesteigert kann dies über 17% bei 10000 ausgelegten Vorläuferzellen bis auf 28% bei 20000 Zellen werden.



5000 ausgelegte EPC



10000 ausgelegte EPC



20000 ausgelegte EPC

Abbildung 29: Fotos der Koinkubationsversuche SCM inkubiert mit mononukleären EPC, blau stellt sich die Dapi-Kernfärbung da, grün der fitc-konjugierte Antikörper gegen α -smooth actin. Zellen mit DIL-Labeling strahlen durch die Überlagerung orange

Expandierte EPC

Zuletzt werden die Ergebnisse der Koinkubationsversuche der vaskulären Zellen mit expandierten EPC aufgezeigt. Auch hier blieb die Menge an vaskulären Zellen über die Versuche gemäß Versuchsdurchführung wieder konstant. Die Menge an Vorläuferzellen wurde variiert. Allerdings wurden in dieser Versuchsreihe die Inkubationen nur mit jeweils 10000 oder 20000 Zellen angesetzt.

Betrachtet man die Ergebnisse der Koinkubationsversuche mit HUVEC und expandierten EPC, so fällt durchweg eine hohe Anzahl der Zellen gesamt gesehen im Gesichtsfeld auf. In den Versuchen mit 10000 ausgelegten Vorläuferzellen beträgt die Gesamtzellzahl im Gesichtsfeld von 136 im Mittel. Eine Steigerung der Zahl ist durch die Zugabe von 20000 Zellen nicht zu erreichen. Hier fällt der Mittelwert sogar auf 110 Zellen pro Gesichtsfeld nach der Koinkubation.

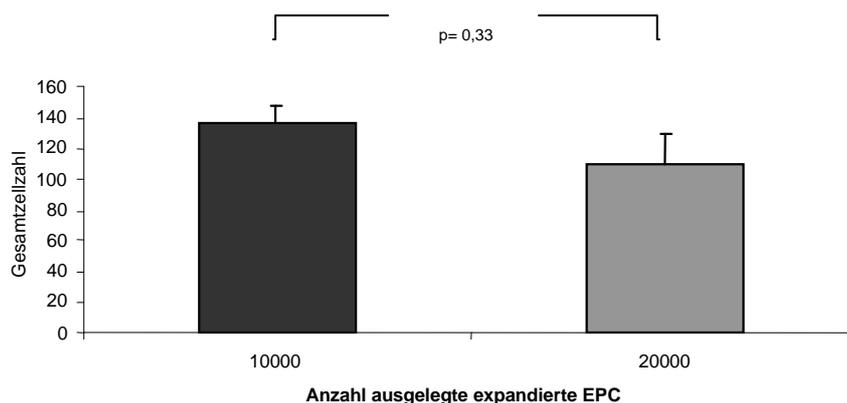


Abbildung 30: Gesamtzahl der Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation von 5000 HUVEC mit expandierten EPC abhängig von der Anzahl der ausgelegten Vorläuferzellen

Betrachtet man die doppelt-positiven Zellen, so zeigt sich hier abhängig von der Dosis kein Unterschied bei 7% bzw. 8%. So sind in beiden Ansätzen anteilig im Mittel dieselbe Anzahl an Zellen zu sehen, die DIL-Labeling intrazellulär der Vorläuferzellen sowie CD31 an ihrer Oberfläche tragen.

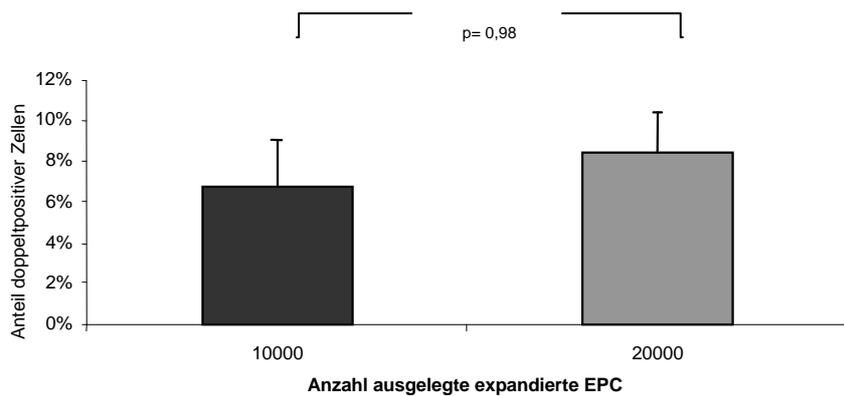
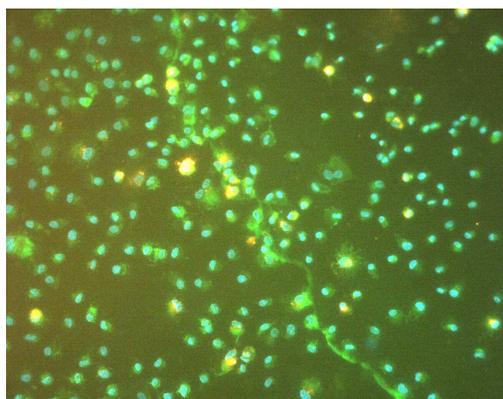
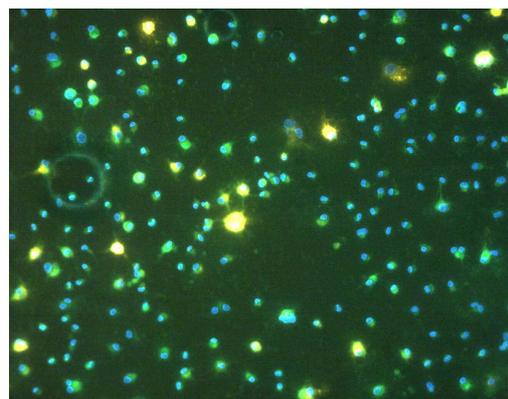


Abbildung 31: Anteil der doppelpositiven (DIL/CD31+) Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation HUVEC mit expandierten EPC abhängig von der Anzahl der ausgelegten expandierten EPC.



10000 ausgelegte EPC



20000 ausgelegte EPC

Abbildung 32: Fotos der Koinkubationsversuche HUVEC inkubiert mit expandierten EPC, blau stellt sich die Dapi-Kernfärbung dar, grün der fitc-konjugierte Antikörper gegen CD31. Zellen mit DIL-Labeling strahlen durch die Überlagerung orange

Im Folgenden sind die Ergebnisse aus den Koinkubationsversuchen von Fibroblasten (HuFi) und expandierten EPC dargestellt. Die Anzahl der endothelialen Vorläuferzellen wurde wiederum in den Versuchsansätzen gesteigert (10000 oder 20000 Zellen) bei sonst konstant ausgelegter Anzahl an Fibroblasten: 1000 pro well. Betrachtet man hier die Gesamtanzahl von Zellen pro Gesichtsfeld nach der entsprechenden Koinkubationszeit, so fällt erneut eine hohe Streuung der Einzelergebnisse auf. Im Mittel steigt die Zahl der Zellen mit Verdoppelung der ausgelegten Vorläuferzellen von 94 auf 104 sichtbare Zellen, jedoch bedeutet dies keine signifikanten Unterschied.

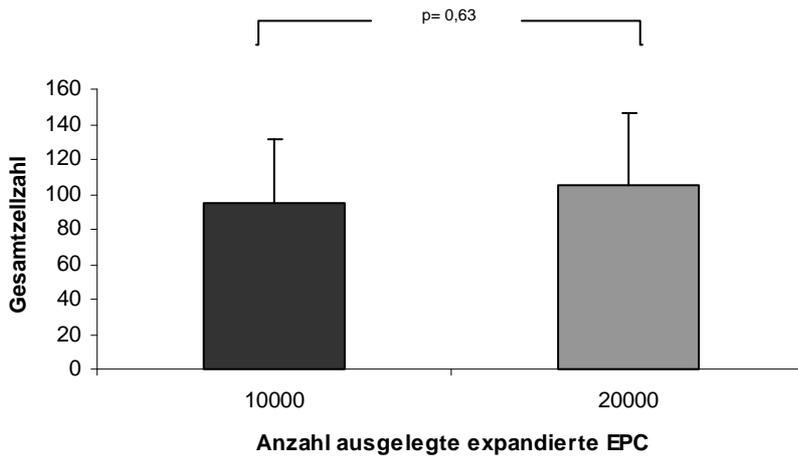


Abbildung 33: Gesamtzellzahl pro Gesichtsfeld bei Koinkubation von 1000 HuFi mit expandierten EPC abhängig von der Anzahl der ausgelegten EPC

Der Anteil der doppelt-positiven Zellen unterscheidet sich nur gering, nicht signifikant von 3,7% auf 5,4%. Hier ist keine breite Streuung der Einzelergebnisse erkennbar. Eine Steigerung des Anteils der doppelt markierten Zellen ist ebenso, wie bei den zuvor betrachteten HUVEC, durch eine erhöhte Anzahl an EPC im Versuchsansatz nicht zu erreichen.

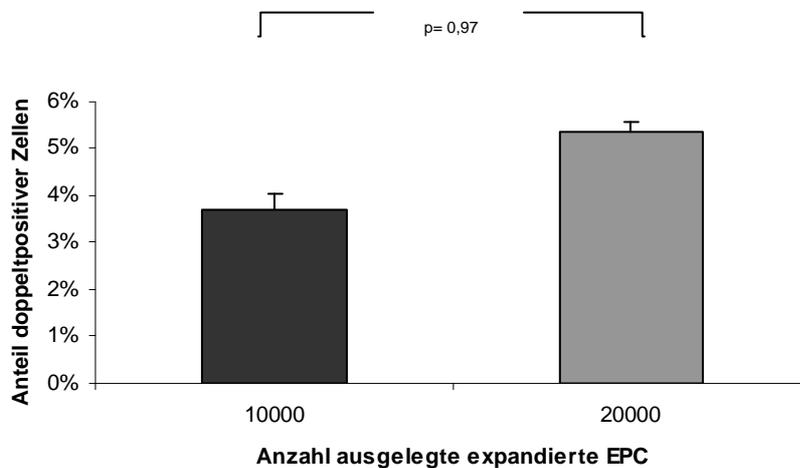
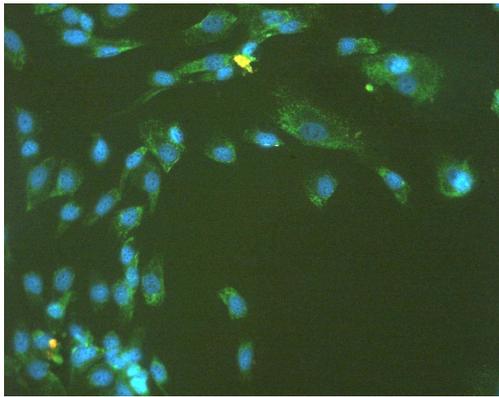
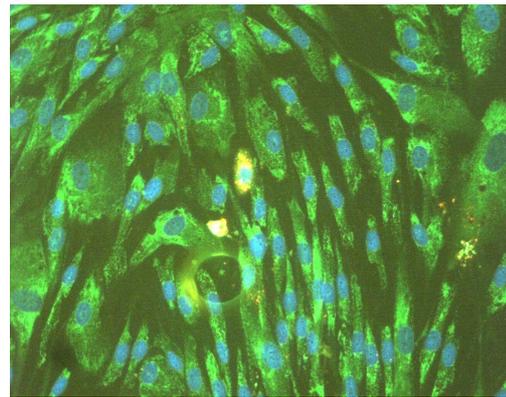


Abbildung 34: Anteil der doppelpositiven (DIL/AK Fibroblasten) Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation HuFi mit expandierten EPC abhängig von der Anzahl der ausgelegten EPC



10000 ausgelegte EPC



20000 ausgelegte EPC

Abbildung 35: Fotos der Koinkubationsversuche HuFi inkubiert mit expandierten EPC, blau stellt sich die Dapi-Kernfärbung dar, grün der fitc-konjugierte Antikörper gegen Fibroblasten. Zellen mit DIL-Labeling strahlen durch die Überlagerung orange

Abschließend werden noch die Ergebnisse der Koinkubation von glatten Muskelzellen und expandierten EPC gezeigt. Die Anzahl der verwendeten SMC war in allen Versuchsansätzen konstant bei 1500 Zellen. Die endothelialen Vorläuferzellen wurden zahlenmäßig wieder gesteigert.

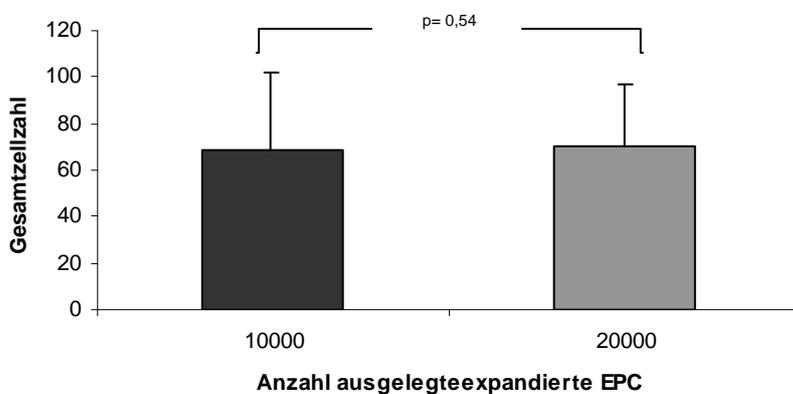


Abbildung 36: Gesamtzahl der Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation von 1500 SMC mit expandierten EPC Zellen abhängig von der Anzahl der aus gelegten EPC.

Hier zeigte sich erneut eine große Streuung der Einzelergebnisse aus den Versuchsansätzen bezogen auf die Gesamtanzahl der Zellen pro Gesichtsfeld, identifiziert an der DAPI-Kernfärbung. Im Mittel zeigt sich allerdings kein dosisabhängiger Effekt. So ergaben sich für die Ansätze mit 10000 Vorläuferzellen 68 Zellen pro Gesichtsfeld und bei 20 00 ausgelegten expandierten EPC 70 Zellen.

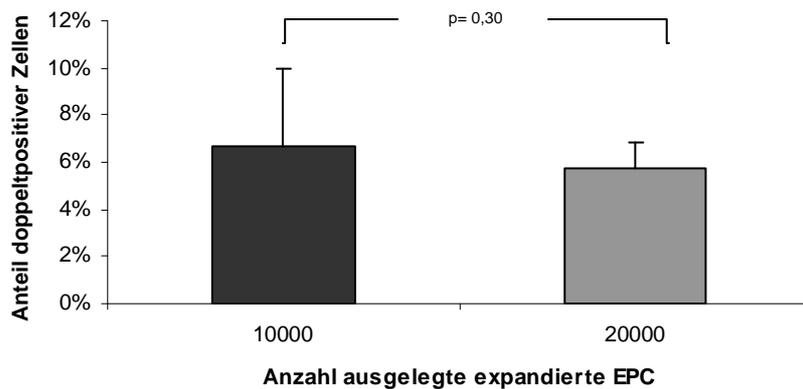
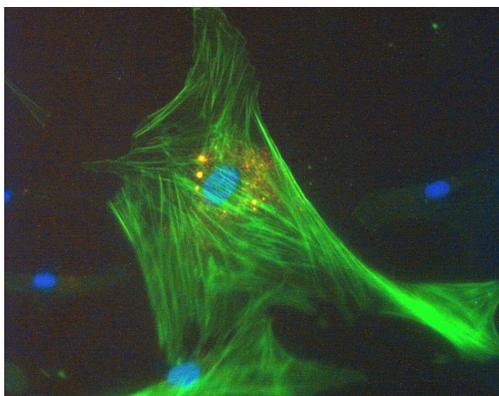
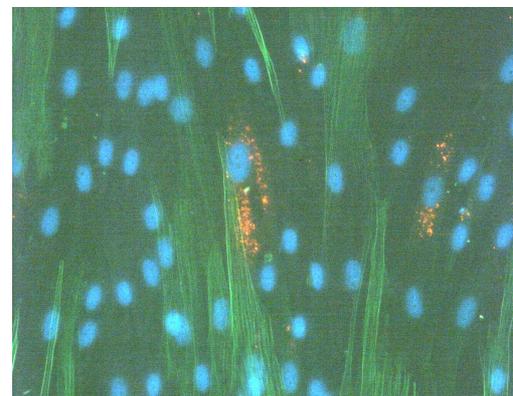


Abbildung 37: Anteil der doppelpositiven (DIL/ α -smooth actin) Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation SMC mit expandierten EPC abhängig von der Anzahl der ausgelegten EPC

Betrachtet man den Anteil an Zellen, die DIL-Labeling und α -smooth-actin in sich tragen, also doppel-positiv sind, so gibt es auch hier im Mittel keinen Unterschied der unterschiedlichen Mengen an ausgelegten Vorläuferzellen bei 7% oder 6%.



10000 ausgelegte EPC



20000 ausgelegte EPC

Abbildung 38: Fotos der Koinkubationsversuche SCM inkubiert mit expandierten EPC, blau stellt sich die Dapi-Kernfärbung dar, grün der fitc-konjugierte Antikörper gegen α -smooth actin. Zellen mit DIL-Labeling strahlen durch die Überlagerung orange

HUVEC

Als Referenz zu den Koinkubationen der vaskulären Zellen mit den jeweiligen Vorläuferzellen wurde jeweils ein Koinkubationsansatz mit ausdifferenzierten HUVEC durchgeführt. Die Ergebnisse der Auszählung der Zellen pro Gesichtsfeld sind im Folgenden dargestellt. Analog zu den vorhergehenden Versuchen wurden vaskuläre Zellen wie SMC, HuFi oder HUVEC in einer konstanten Anzahl ausgelegt. Gemeinsam wurden diese dann mit einer bestimmten Anzahl an HUVEC für einen Zeitraum von 7d koinkubiert. Hierbei wurde die Anzahl der HUVEC allerdings von 5000 über 10000 bis auf 20000 Zellen variiert.

Zunächst sind graphisch die Auszählungen der Zellen gesamt pro Gesichtsfeld aus den Ansätzen einer Inkubation mit 5000 HUVEC-Zellen und der jeweiligen zusätzlichen Menge an weiteren HUVEC abgebildet.

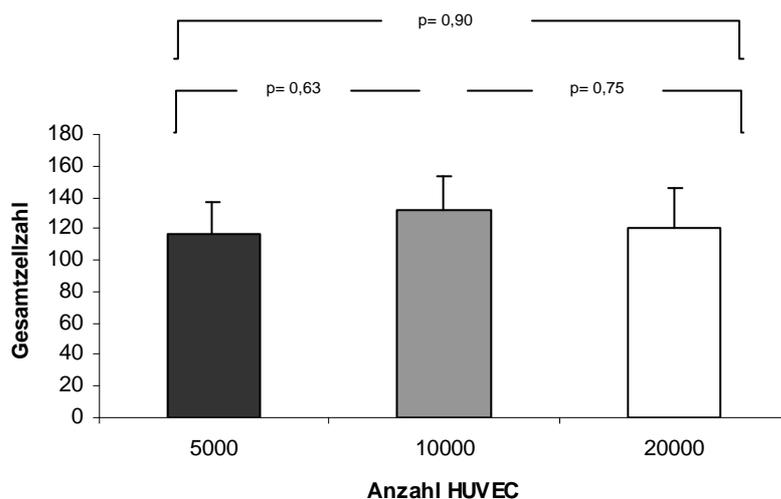


Abbildung 39: Gesamtzellzahl pro Gesichtsfeld bei Koinkubation von 5000 HUVEC mit HUVEC abhängig von der Anzahl der ausgelegten HUVEC

Hier zeigt sich keine deutliche Zunahme des Wachstums abhängig von der vermehrten Zugabe von weiteren HUVEC-Zellen. Die Anzahl an Zellen, die pro Gesichtsfeld gesehen werden ist in allen Versuchen im Mittel gleich.

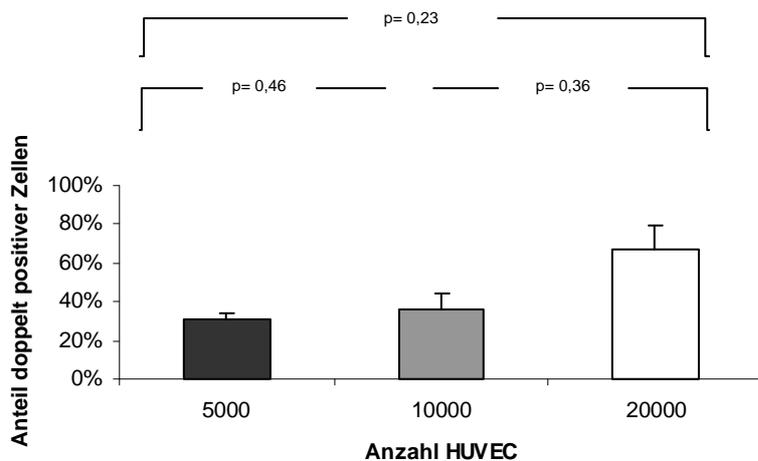


Abbildung 40: Anteil der doppelt-positiven (DIL/CD31+) Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation HUVEC mit HUVEC abhängig von der Anzahl der ausgelegten HUVEC.

Betrachtet man Zellen, die das DIL-Labeling in sich tragen, so zeigt sich ein vermehrter Anteil der markierten HUVEC mit steigender Anzahl an aufgebrauchten HUVEC im Kulturansatz. Jedoch sind die Unterschiede nicht signifikant.

Neben den endothelialen ausdifferenzierten HUVEC wurden auch Fibroblasten HuFi mit DIL-markierten HUVECS in Kultur gebracht. Die Anzahl der HUVEC wurde erneut gesteigert, während HuFi in einer konstanten Zahl von 1000 verwendet wurden.

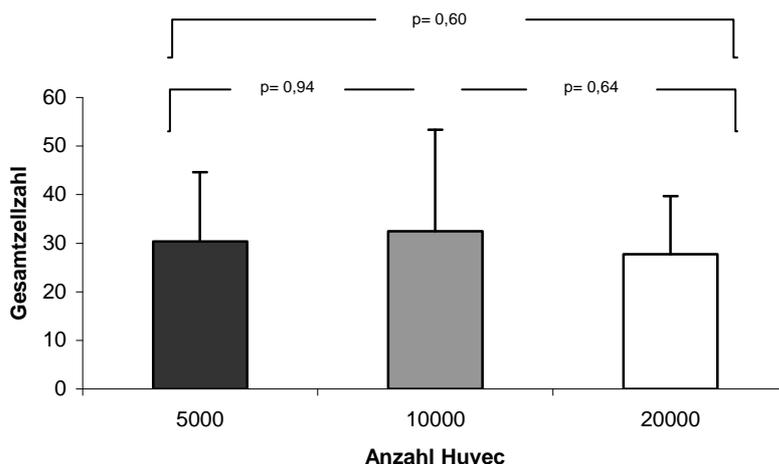


Abbildung 41: Gesamtzellzahl pro Gesichtsfeld bei Koinkubation von 1000 HuFi mit HUVEC abhängig von der Anzahl der ausgelegten HUVEC

Hier stellt sich eher eine Hemmung des Zellwachstums unabhängig von der Menge an HUVEC dar, die in Kultur gebracht wurden. Im Mittel zählt man 30 Zellen pro Gesichtsfeld, verglichen mit einer Kultur aus reinen HUVEC und im Mittel mehr als 120 Zellen pro Gesichtsfeld deutlich weniger.

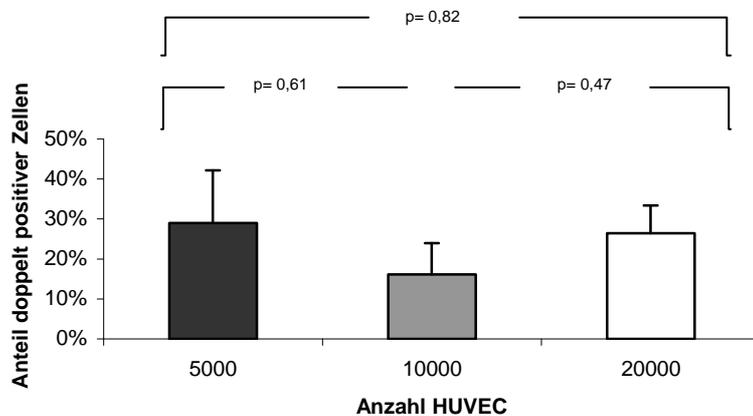


Abbildung 42: Anteil der doppelt-positiven (DIL / AK Fibroblasten) Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation HuFi mit HUVEC abhängig von der Anzahl der ausgelegten HUVEC.

Die Menge an Zellen, die das DIL-Labeling in sich tragen sowie positiv für die spezifische Antigenfärbung der Fibroblasten sind, ist nicht abhängig von der Menge der anfänglich kultivierten markierten HUVEC.

Als letzte vaskuläre Zelllinie wurden glatte Muskelzellen (SMC) mit ausdifferenzierten Endothelzellen (HUVEC) in Kultur gebracht. Auch hier wurde wieder die Anzahl der SMC bei einer Zellzahl von 500 in den Ansätzen konstant belassen, wobei die HUVEC in einer veränderten Menge koinkubiert wurden.

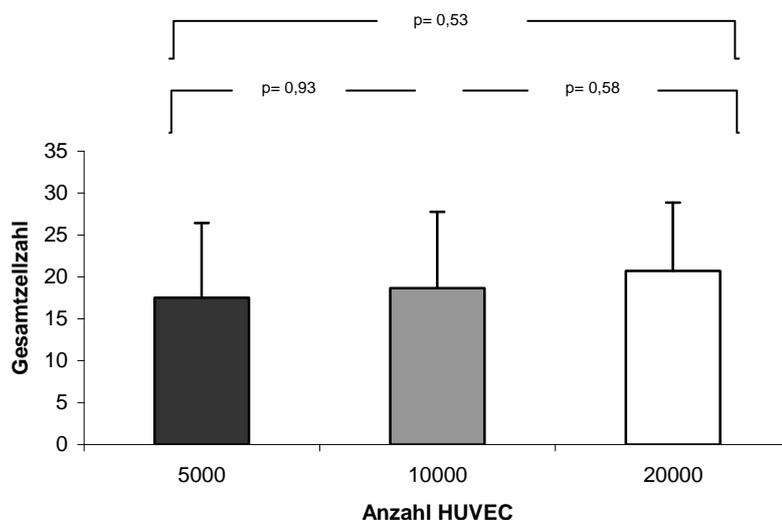


Abbildung 43: Gesamtzahl der Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation von 1500 SMC mit HUVEC abhängig von der Anzahl der ausgelegten HUVEC.

Hier ergibt sich analog zum Ansatz mit HuFi eine Hemmung des Zellwachstums auf im Mittel unter 20 Zellen pro Gesichtsfeld in allen Versuchsansätzen. Die gezählte Anzahl an Zellen gesamt nach Koinkubation ist nicht abhängig von der Steigerung der aufgebrauchten HUVEC.

Auch die Anzahl der doppelt-positiven Zellen hält sich konstant auf einem Wert im Mittel um 40% in allen drei Versuchsansätzen.

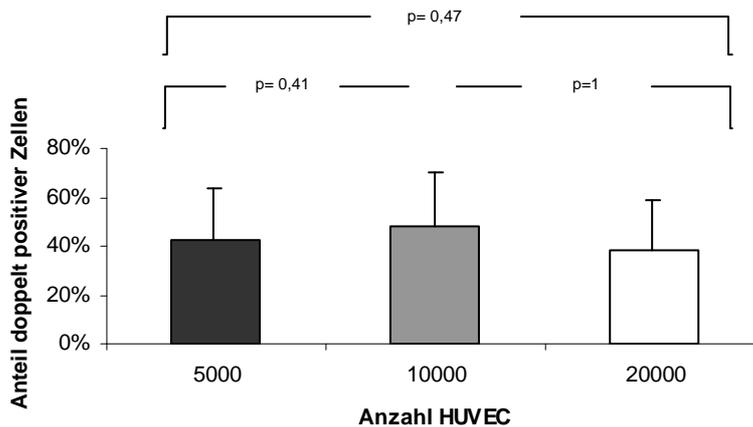


Abbildung 44: Anteil der doppelt-positiven (DIL/ α -smooth actin) Zellen pro Gesichtsfeld bei Koinkubation SMC mit HUVEC abhängig von der Anzahl der ausgelegten HUVEC.

Es zeigte sich also lediglich bei der Koinkubation von mononukleären EPC und Fibroblasten ein dosisabhängiger Effekt mit einer Steigerung der Gesamtzellzahl bei 20000 im Vergleich zu 10000 Zellen. Bei den übrigen Koinkubationsversuchen zeigten sich vergleichbare Ergebnisse bei Koinkubation mit 5000, 10000 oder 20000 Zellen. Um den Effekt einer Koinkubation per se zu analysieren, wurden alle Koinkubationsergebnisse zusammengefasst. Diese Ergebnisse zeigt Abbildung 45. Eine Steigerung der Zellzahl nach Koinkubation mit glatten Muskelzellen zeigte sich durch mononukleäre EPC und expandierte EPC, nicht jedoch durch HUVEC, CD34+-Zellen oder MSC. Positive Effekte auf die Gesamtzellzahl nach Koinkubation mit HUVEC ergaben sich durch expandierte EPC und MSC. Unterschiedliche Progenitorzellen zeigen also unterschiedliche Effekte auf vaskuläre Zellen unter Koinkubationsbedingungen. Interessanterweise waren expandierte EPC die einzigen Zellen, die die Zellzahl nach Koinkubation mit zwei verschiedenen vaskulären Zellen (HUVEC und SMC) steigerten. Sie könnten also geeignet sein, auch die Gefäßneubildung *in vivo* zu fördern. Die Vermehrung der Zellzahl kann durch Steigerung der Proliferationsrate, Hemmung von Apoptose oder vermehrte Zellinteraktion bedingt sein. Transdifferenzierungs-, oder Fusionsprozesse

erscheinen eher unwahrscheinlich, da in den Doppelfärbungen eine Steigerung der doppelt-positiven Zellen nur nach Koinkubation von MSC mit Fibroblasten zu beobachten war.

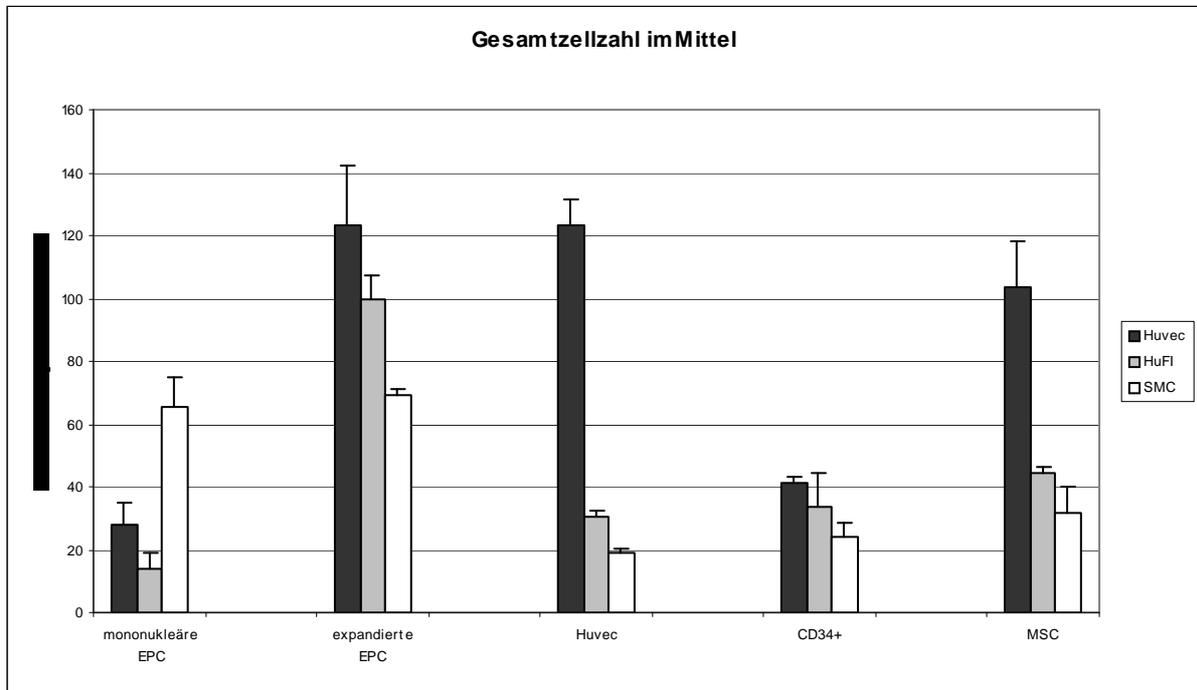


Abbildung 45: Gesamtzellzahl im Mittel aller Koinkubationsversuche

Um mögliche Mechanismen der Steigerung der Gesamtzellzahl aufzuzeigen, werden in den folgenden Abschnitt die Wirkungen der Überstände nach Koinkubation auf das Proliferationsverhalten von HUVEC untersucht und die Überstände mit und ohne Koinkubation auf proangiogenetische Mediatoren hin untersucht.

4.2 Proliferationsassay

Um die jeweilige wachstumssteigernde Wirkung der, bei einer Koinkubation eingesetzten, Mediatoren zu beurteilen, wurde ein Proliferationsassay verwendet. Das hier verwendete Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein chemisches Analogon des Nucleosids Thymidin bzw. Desoxyuridin. BrdU kann von der Zelle aufgenommen werden nach Phosphorylierung anstelle des Nucleotids Desoxythymidintriphosphat während der S-Phase des Zellzyklus in die neu synthetisierte DNA eingebaut werden. Photometrisch kann dann die Menge an aufgenommenen BrdU bestimmt werden. Je mehr BrdU eingebaut worden ist, umso weniger Licht wird absorbiert, und umso mehr Proliferation hat stattgefunden.

Es wurden jeweils HUVEC im Proliferationsassay mit Überständen aus den Koinkubationsversuchen (Versuchsdurchführung siehe oben) untersucht. Um die einzelnen Versuchsergebnisse zu objektivieren und starke Schwankungen vernachlässigen zu können, wurde in der jeweiligen Messreihe als Referenz die Aufnahme von BrdU bzw. Absorption von Licht durch HUVEC in entsprechendem Medium verwendet. Hierzu verglichen wurde die Aufnahme von BrdU durch HUVEC, welche im Assay mit Überständen aus den Koinkubationsversuchen angesetzt wurden. Somit ist das Ergebnis in einer prozentualen Änderung von Proliferation ermittelt durch unterschiedliche Absorption von Licht angegeben.

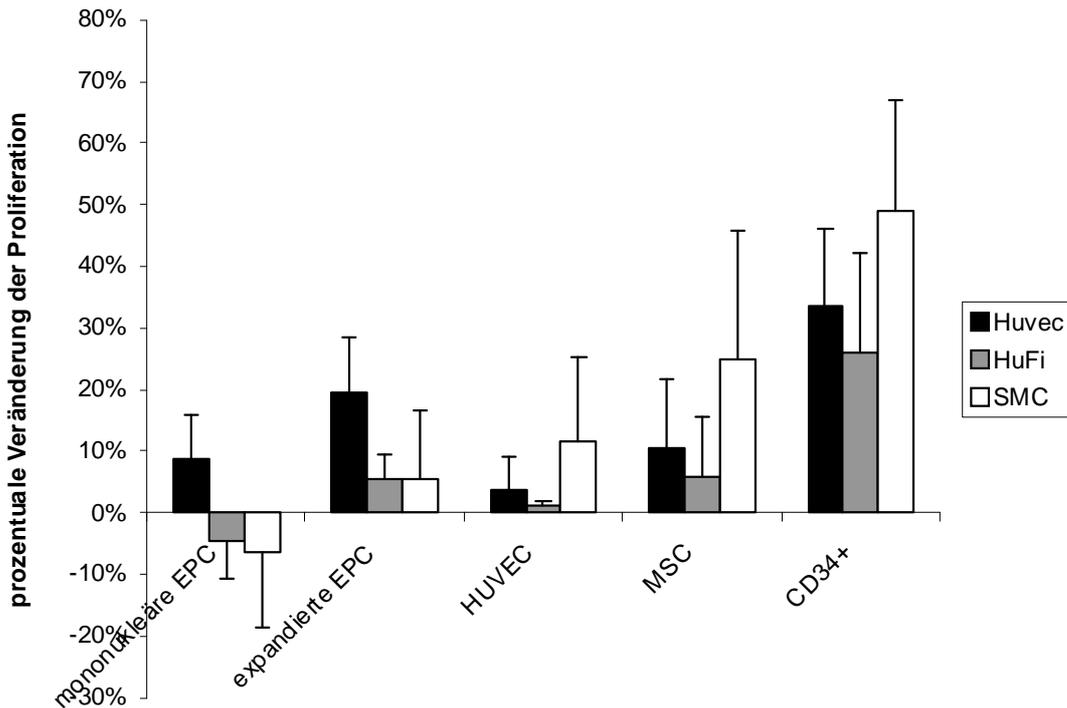


Abbildung 46: Prozentual erhöhter Uptake von BrdU bei Anwendung von Medien aus den Koinkubationsversuchen verglichen mit jeweils unkonditioniertem Medium

In der Abbildung 46 ist die vermehrte Proliferation berechnet aus der spektroskopischen Lichtabsorption in den jeweiligen BrdU-Assays mit Überständen aus den Koinkubationsversuchen in Relation zur Proliferation von HUVEC im entsprechendem Medium dargestellt. Der Prozentwert gibt die Veränderung des Zellwachstums durch den konditionierten Überstand an.

So zeigt sich eine vermehrte Aufnahme von BrdU der HUVEC und somit eine vermehrte Proliferation nach Stimulation mit Überständen aus Koinkubationsversuchen mit expandierten EPC/HUVEC ($p < 0.001$) sowie CD34+/HUVEC, CD34+/HuFi und CD34+/SMC ($p < 0.05$). Überstände aus den Versuchen mit mononukleären EPC hingegen hemmen zum Teil die Proliferation von HUVEC. So sind eine verringerte Proliferation durch Überstände von SMC wie auch HuFi mit mononukleären EPC zu sehen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass durch Koinkubation von expandierten EPC mit HUVEC mitogene Substanzen freigesetzt werden, die eine Steigerung der Proliferationsrate von HUVEC bewirken. Auch eine Koinkubation von CD34+- Zellen mit HUVEC, SMC oder HuFi induziert die Freisetzung mitogener Mediatoren, obwohl die Gesamtzellzahl dabei am niedrigsten war. Dies könnte auf eine verringerte

Adhäsivität der noch unreifen CD34+- Zellen an die vaskulären Zellen zurückzuführen sein. In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, welche proangiogenen Substanzen von den expandierten EPC freigesetzt werden und damit die Proliferation der HUVEC steigern.

4.3 Zytokine

Mittels Cytometric Bead Array (CBA) wurden aus den Überständen unterschiedlicher Inkubationen proangiogene Zytokine über eine Analyse im FACS identifiziert.

Es wurden jeweils 10000 HUVEC, mononukleäre EPC sowie expandierte EPC für vier Tage in einer 6-well Platte ausgelegt. Es erfolgte wie schon beschrieben ein Mediumwechsel von EBM2 nach 48 Stunden. Nach 96 Stunden wurden die Überstände abgenommen und der Zytokingehalt ermittelt.

Im zweiten Ansatz erfolgte eine Koinkubation von 1500 HUVEC mit jeweils 10000 Zellen mononukleärer oder expandierter EPC wie beschrieben über 96 Stunden mit Mediumwechsel nach 48 Stunden und einer Analyse der Überstände nach den gesamten vier Tagen.

Die Überstände wurden auf Interleukin-8, Angiogenin, bFGF, VEGF sowie TNF- α quantitativ untersucht. Es wurden jeweils die Mittelwerte aus drei Versuchsansätzen berechnet.

Zunächst sind die Werte für Interleukin- 8 (IL-8) in pg/ml nach 96 Stunden alleiniger Inkubation der Zellen gezeigt. Hier zeigt sich eine signifikant höhere Menge des Zytokins in den Überständen der expandierten EPC gegenüber Analysaten aus Ansätzen mit ausdifferenzierten HUVEC oder den mononukleären EPC (Abb. 47).

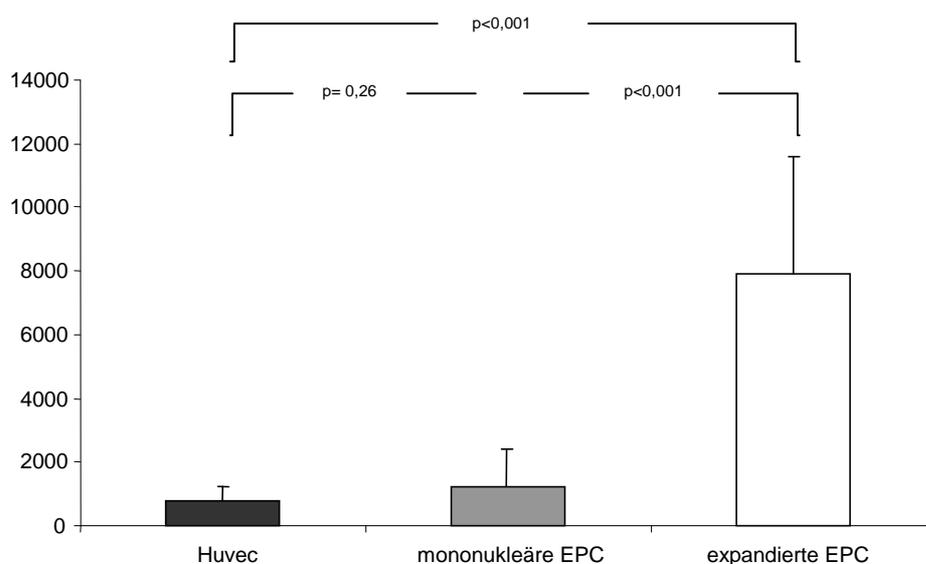


Abbildung 47: Gehalt (pg/ml) an IL-8 in Medien bei Monokultur

Nach Koinkubation der Vorläuferzellen mit der ausdifferenzierten endothelialen Zelllinie zeigt sich eine signifikant vermehrte Freisetzung von IL-8 nur nach Koinkubation mit expandierten EPC nicht aber nach Koinkubation mit mononukleären EPC. Die beiden Versuchsansätze vergleichend ergibt sich allerdings ein deutlich höherer Wert für das Interleukin in der alleinigen Kultur gegenüber der Koinkubation (Abb. 48). Die endogene IL-8-Bildung ist in expandierten EPC erhöht und wird durch Koinkubation mit HUVEC verringert. Dadurch könnte ein anti-inflammatorischer Effekt entstehen, der durch eine verringerte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zustande kommt.

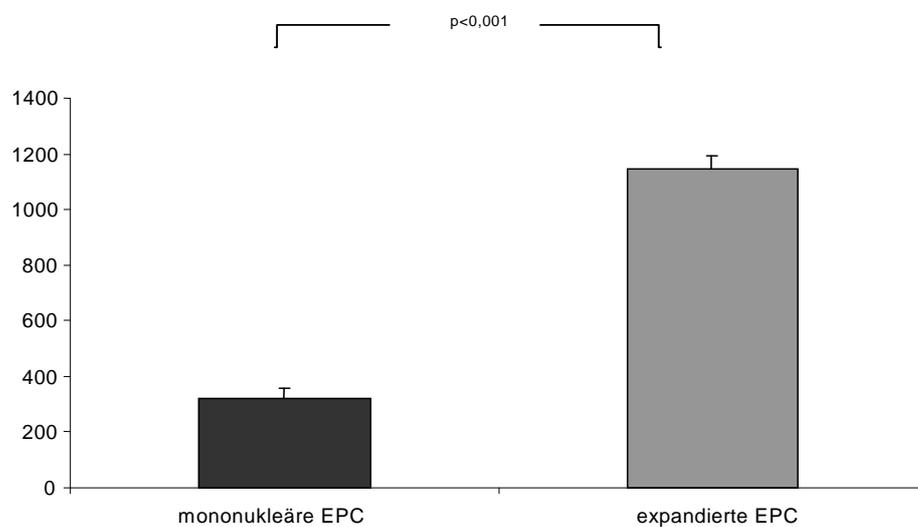


Abbildung 48: Gehalt (pg/ml) an IL-8 in Medien bei KoKultur mit HUVEC

Als zweiter proangiogenetischer Faktor wurde das Angiogenin untersucht. Hier zeigen sich die höchste Freisetzung in der Monokultur bei HUVEC. Vergleicht man die Vorläuferzellen, so zeigen die expandierten EPC mehr Angiogenin in der Analyse als die mononukleären EPC in der Monokultur (Abb. 49).

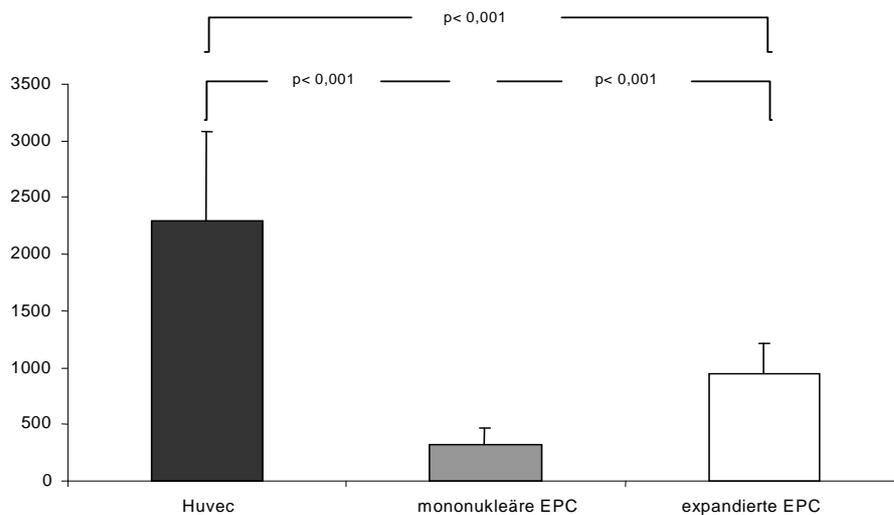


Abbildung 49: Gehalt (pg/ml) an Angiogenin in Medien bei Monokultur

In der Auswertung der Koinkubation mit HUVEC fällt wiederum auf, dass hier deutlich weniger Angiogenin gemessen wird als in der solitären Kultivierung (Abb. 50). Auch hier erbringen die expandierten EPC einen höheren Anteil des Zytokins, allerdings liegt der Unterschied im Mittel bei 5pg/ml. Expandierte EPC exprimieren also konstitutiv Angiogenein, das durch eine Koinkuabtion verringert freigesetzt wird.

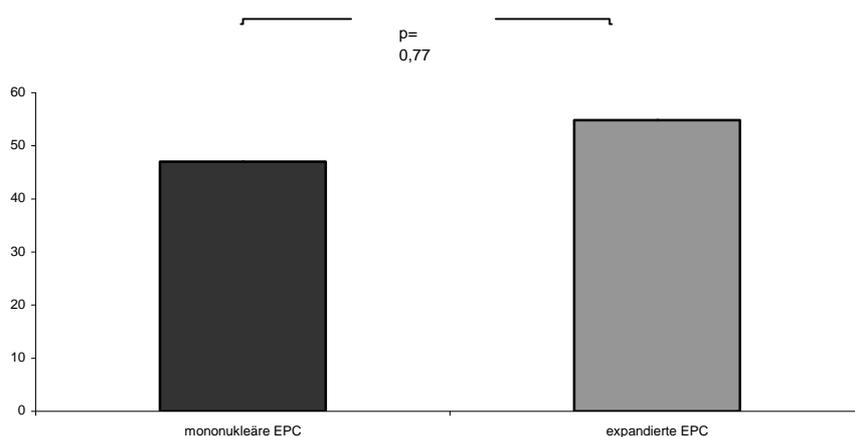


Abbildung 50: Gehalt (pg/ml) an ANG in Medien bei Kokultur mit HUVEC

Bei Betrachtung der Ergebnisse der Analyse der Überstände aus der Kultivierung der Zelllinien in Monokultur stellen sich keine wesentlichen Unterschiede für den Gehalt an TNF- α dar (Abb. 51). Lediglich expandierte EPC bilden signifikant weniger TNF- α als mononucleäre EPC: Die Unterschiede des Gehalts an TNF- α nach einer

Koinkubation der ausgereiften endothelialen HUVEC mit den Vorläuferzellen liegen zwar im einstelligen Bereich, es zeigt sich jedoch zeigt bei expandierten EPC ein signifikant höherer Wert (Abb. 52). Insgesamt ist die Expression von TNF- α jedoch sehr gering.

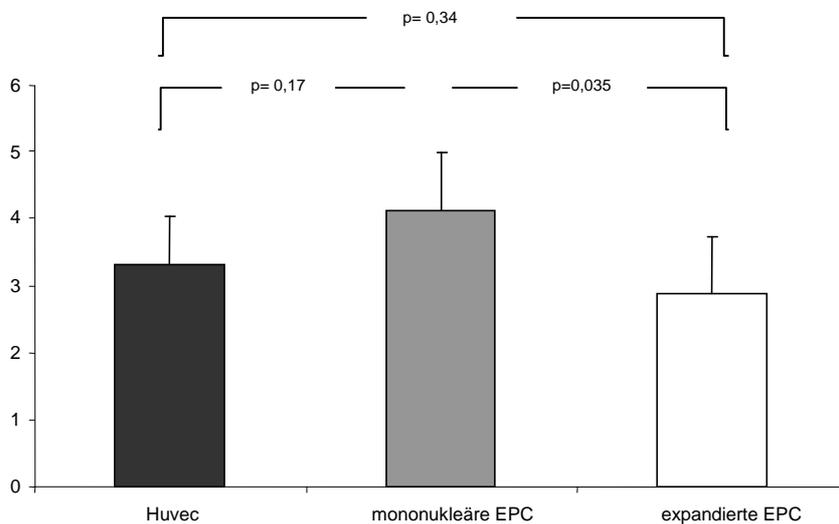


Abbildung 51: Gehalt (pg/ml) an TNF- α in Medien bei Monokultur

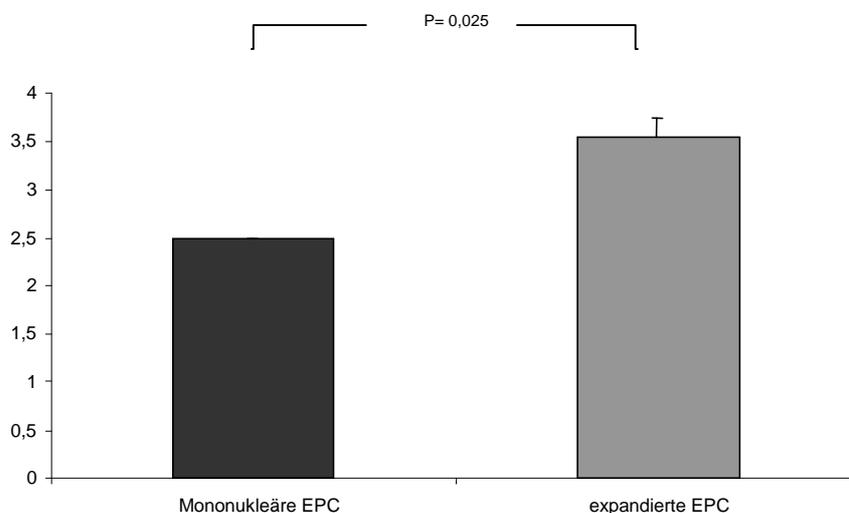


Abbildung 52: Gehalt (pg/ml) an TNF- α in Medien bei Kokultur mit HUVEC

In der Auswertung der Konzentration von VEGF in den Überständen aus den solitären Kulturen von HUVEC, mononukleären EPC sowie expandierten EPC ergibt sich eine leichte Erhöhung an TNF- α bei den Überständen der Inkubation der expandierten EPC (Abb. 53). Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.

Für Koinkubation mit HUVEC zeigt sich in beiden Ansätzen der Koinkubation mit den Vorläuferzelllinien eine ca. 30-fach erhöhte VEGF-Freisetzung gegenüber der

Monokultur. Es ergibt sich zwischen beiden Ansätzen der Koinkubation von mononukleären bzw. expandierten EPC mit HUVEC jedoch kein Unterschied (Abb. 54). Die Steigerung der VEGF-Freisetzung durch die Interaktion der EPC mit den HUVEC könnte sich positiv auf die Gefäßneubildung auswirken.

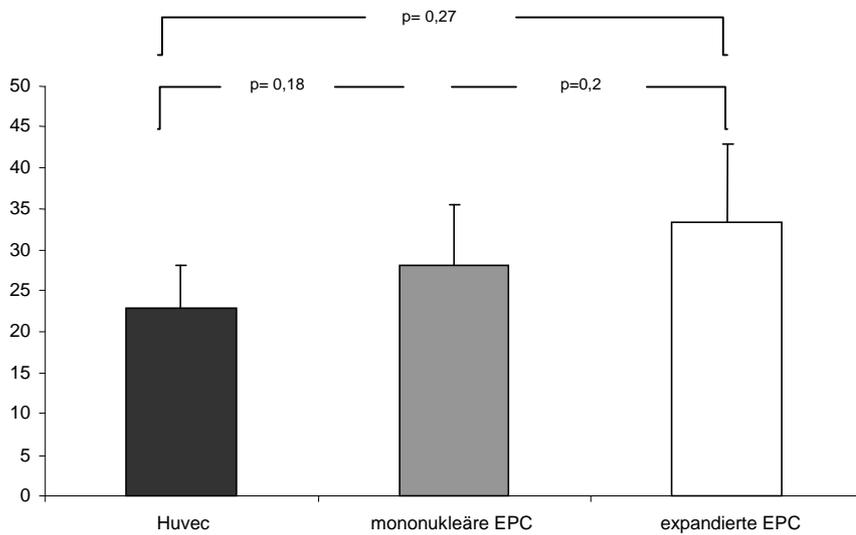


Abbildung 53: Gehalt (pg/ml) an VEGF in Medien bei Monokultur

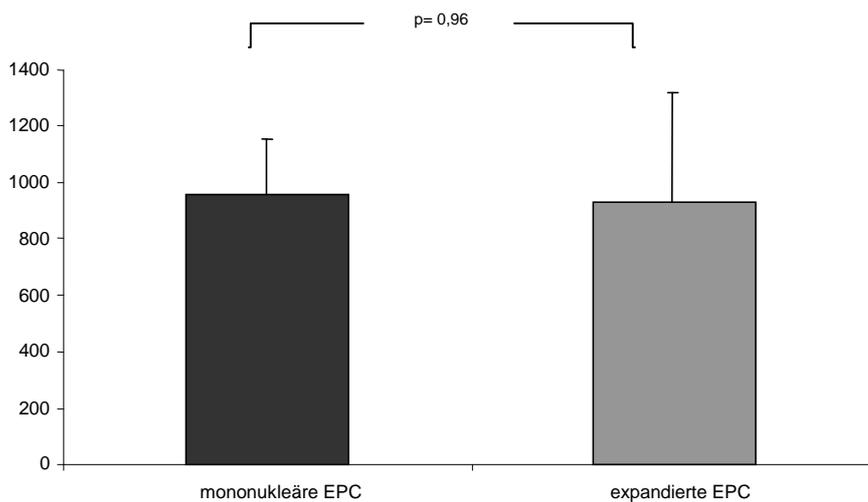


Abbildung 54: Gehalt (pg/ml) an VEGF in Medien bei Kokultur mit HUVEC

Als letzter chemotaktischer Stoff wurde der Gehalt des Wachstumsfaktors bFGF quantitativ untersucht.

Hier kann ein signifikant höherer Anteil von bFGF in den Überständen aus der Inkubation der Zelllinien in Monokultur bei expandierten EPC gemessen werden verglichen mit den beiden anderen Zellarten (Abb. 55). Auch HUVEC bilden gegenüber mononukleären EPC signifikant mehr bFGF.

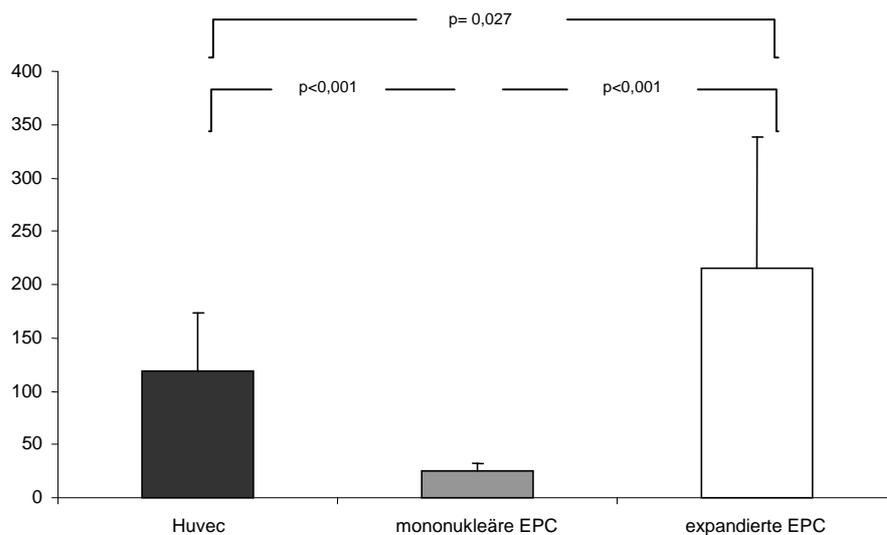


Abbildung 55: Gehalt (pg/ml) an bFGF in Medien bei Monokultur

Vergleicht man die Ergebnisse der Analyse von Medien, die aus Koinkubationsansätzen von ausdifferenzierten HUVEC mit den jeweiligen Vorläuferzellen stammen, so ergibt sich ein deutlich höherer Gehalt an bFGF in allen Kokulturen im Vergleich zur Monokultur. Überstände aus Ansätzen mit expandierten EPC zeigen im Trend höhere Werte für den Wachstumsfaktor gegenüber einer Koinkubation mit mononukleären EPC und HUVEC (Abb. 56). Expandierte EPC führen also konstitutiv zu einer vermehrten Freisetzung von FGF. Durch Koinkubation mit HUVEC wird sowohl bei expandierten EPs als auch bei mononukleären EPC die Freisetzung um das 5- bis 10-fache gesteigert.

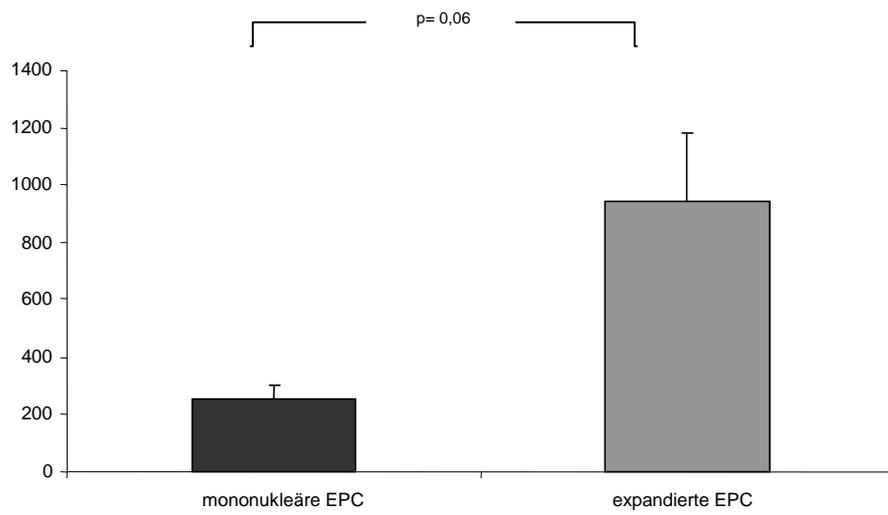


Abbildung 56: Gehalt (pg/ml) an bFGF in Medien bei Kokultur mit HUVEC

4.4 Mikroskopie lebender Zellen, markiert mit Q-Tracker

Um mögliche Fusionsvorgänge oder Zell-Zell-Kontakte in den ersten Stunden einer Koinkubation besser untersuchen und verstehen zu können, wurde eine Methode des live-cell-labelings zusätzlich im Koinkubationsmodell etabliert.

Wie oben schon beschrieben wurden hier jeweils HuFi als ausdifferenzierte Zelllinie sowie expandiert EPC als Vorläuferzelllinie mit einem fluoreszierenden Nanokristall gefärbt und anschließend für 48h koinkubiert. Eine zwischenzeitliche Auswertung der Zellen erfolgte nach 24h unter dem Mikroskop.

Es ist im Folgenden der Anteil der Zellen dargestellt, die beide Fluoreszenzfarbstoffe Qtracker 565 sowie Qtracker 655 tragen, jeweils nach 24 Stunden sowie 48 Stunden Koinkubation. Die Zellstruktur an sich konnte mittels lichtmikroskopischer Aufnahme identifiziert werden. Gezählt wurde der jeweilige Anteil an Zellen, die eine grüne wie rote Fluoreszenz trugen.

doppelt pos. Zellen [%]

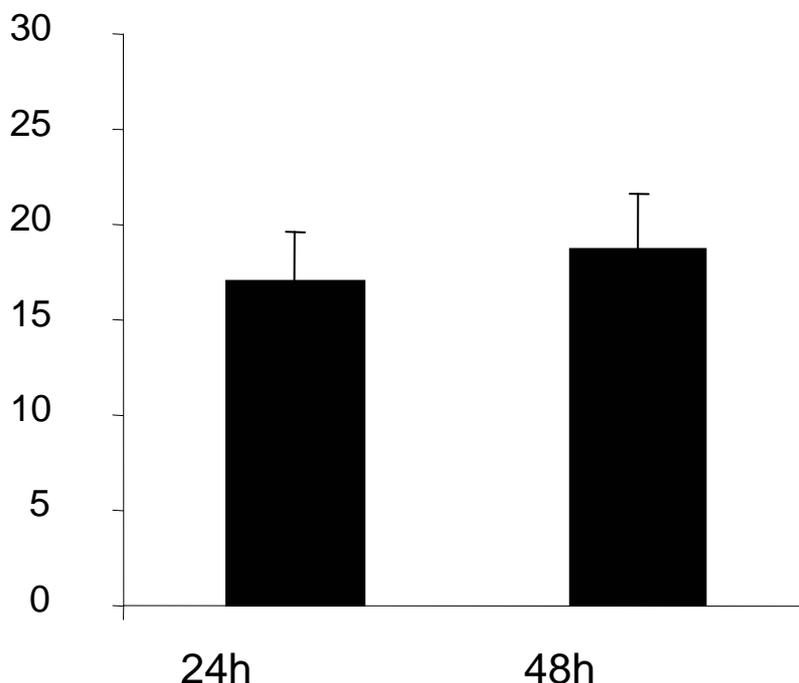


Abbildung 57: Anteil an doppelt positiven Zellen nach einer Inkubationszeit von 24h und 48h bei Koinkubation von HuFi und expandierten EPC

Hier zeigt sich kein weiterer Anstieg der sog. doppelt-positiven Zellen mehr nach einer Koinkubation von 48 Stunden im Vergleich zu 24 Stunden.

Dies bedeutet, dass schon innerhalb der ersten 24h Prozesse stattfinden, die einen Austausch der beiden Farbstoffe bedingen. Bei Fusionsprozessen hätte man einen weiteren Anstieg der Zahl an Zellen erwartet, die beide Farbstoffe in sich tragen. Somit deuten die Ergebnisse auf einen frühen Austausch der Farbstoffe zwischen den Zellen hin.

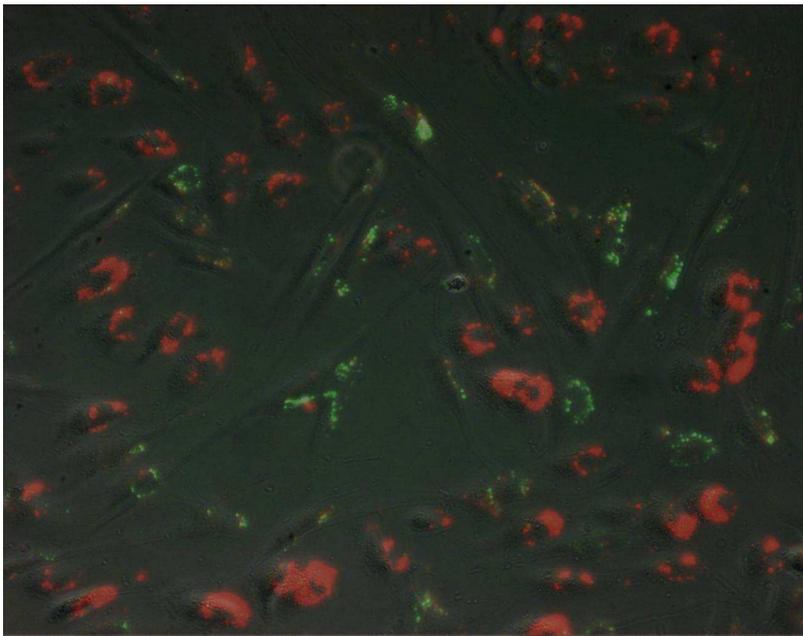


Abbildung 58: Koinkubation von HuFi und expandierten EPC mit jeweiliger Markierung der Zellen durch Qtracker

5 Diskussion

In einer Vielzahl experimenteller und klinischer Studien wurde der therapeutische Nutzen von unterschiedlichsten Vorläuferzellen untersucht. Mittlerweile gibt es deutliche Hinweise, dass durch die Anwendung von Vorläuferzellen die Funktion und Integrität eines geschädigten Gewebes verbessert oder gar repariert werden kann. Weiterhin ungeklärt ist der genaue Mechanismus, über den eine solche Wirkung zustande kommt. Eine Reihe unterschiedlicher Zelltypen kommt bereits therapeutisch in der klinischen Anwendung im individuellen Therapieversuch zum Einsatz, doch besteht bis heute kein Wissen darüber, welche Zellen in Zukunft auf breiter Basis eingesetzt werden können.

5.1 Proliferation

In bisherigen experimentellen Arbeiten zeigte sich eine gesteigerte Proliferation in Kokulturen aus ausdifferenzierten Zellen und Vorläuferzellen. So zeigten Kardiomyozyten und Fibroblasten kardialen Ursprungs in Koinkubation eine gesteigerte Proliferation⁷⁸. In diesen Versuchsansätzen wurde eine erhöhte Konzentration von Interleukin-6 gemessen, so dass die Autoren parakrine Effekte für das verbesserte proliferative Verhalten der Zellen verantwortlich machen. Durch eine Koinkubation von ausdifferenzierten Endothelzellen humaner Koronararterien mit mononukleären Vorläuferzellen lässt sich im Vergleich zur alleinigen Kultur ebenso ein gesteigertes Zellwachstum erreichen⁸⁰. Hier führen die Autoren erhöhte Messwerte für Interleukin-8 als einen zytokinvermittelten Mechanismus des gesteigerten Zellwachstums an.

In unseren Versuchen wurde ein mögliches proliferationssteigerndes Verhalten der Vorläuferzellen auf zwei unterschiedlichen Wegen untersucht. Einerseits wurde die Gesamtzahl an Zellen nach einer Koinkubation von vaskulären Zellen (HUVEC, HuFi, SMC) und Vorläuferzellen getestet. Als Referenz diente eine Koinkubation mit ausdifferenzierten HUVEC. Eine erhöhte Gesamtzellzahl pro Gesichtsfeld kann Ausdruck für eine vermehrte Proliferation, eine verringerte Apoptose oder vermehrte Zellinteraktionen unter Einfluss der Koinkubation sein. Im Folgenden zeigte sich eine signifikante Steigerung der Gesamtzellzahl bei Koinkubation von mononukleären EPC mit SMC, von expandierten EPC mit SMC und HUVEC sowie von MSC mit

HUVEC (Tab. 2). Dabei waren schon 5.000 Progenitorzellen pro Ansatz ausreichend und eine weitere Steigerung der Zellzahl auf 10.000 hatte keinen Einfluß auf die Gesamtzellzahl.

Die mononukleären EPC hemmen sogar ein gesteigertes Zellwachstum bei endothelialen HUVECs und HuFi.

Gesamtzellzahl	Mononukleäre EPC	Expandierte EPC	CD34+	MSC
SMC	+	+	-	-
HUVEC	-	+	-	+
HuFi	-	-	-	-

Tab.2: Einfluß verschiedener Progenitorzellen auf die Gesamtzellzahl nach Koinkubation mit SMC, HUVEC oder HuFi.

Somit lässt sich folgern, dass durch die Koinkubation mit expandierten EPC bei SMC und HUVEC die Gesamtzellzahl als Ausdruck für eine vermehrte Proliferation oder verminderte Apoptose dieser Zellen gesteigert werden kann.

Durch eine Zunahme der doppelt-positiven Zellen in den Auszählungen der Inkubationsansätze könnte man auf eine mögliche Transdifferenzierung der aufgebrauchten Vorläuferzelllinie schließen.

Die folgende Tabelle zeigt eine signifikante Steigerung der Anzahl an doppelt-positiven Zellen nach Koinkubation von MSC mit HuFi. Eine Transdifferenzierung nur von MSC in Fibroblasten könnte dem zu Grunde liegen. Eine Transdifferenzierung der anderen Progenitorzellen in entsprechende vaskuläre Zellen ist erscheint aufgrund dieser Beobachtungen unwahrscheinlich.

Doppelt- positive	Mononukleäre EPC	Expandierte EPC	CD34+	MSC
SMC	-	-	-	-
HUVEC	-	-	-	-
HuFi	-	-	-	+

Tab. 3: Einfluß verschiedener Progenitorzellen auf die doppelt-positiven Zellen nach Koinkubation mit SMC, HUVEC oder HuFi.

Aus diesen Beobachtungen lässt sich folgern, dass eine gesteigerte Proliferation oder aber eine verminderte Apoptose von Zellen in einer Koinkubation v.a. durch Effekte auf die vaskulären Zellen (SMC HUVEC oder HuFi) erreicht wird. Eine Transdifferenzierung oder ein vermehrtes Wachstum der aufgebrauchten Vorläuferzellen scheint damit nicht wahrscheinlich.

Aus diesem Grund wurde in weiteren Untersuchungen ein möglicher Einfluss der Vorläuferzellen durch parakrine Effekte betrachtet. Dazu wurden die Überstände aus den Koinkubationen einem Proliferationsassay zugeführt, der das Wachstum von HUVEC bestimmt.

Geht man von parakrinen Effekten auf die Proliferation aus, so müsste sich eine Steigerung des zellulären Wachstum allein durch das konditionierte Medium nach der Koinkubation zeigen. Es zeigte sich tatsächlich eine deutliche Steigerung des Wachstums mit Medien aus Koinkubation von expandierten EPC mit HUVEC und von CD34+- Zellen mit HUVEC, SMC oder HuFi. Bei Koinkubation der vaskulären Zellen mit mononukleären EPC oder MSC wurden jedoch keine mitogenen Effekte auf HUVEC beobachtet. Es verringert sich sogar die Proliferation nach Koinkubation von mononukleären EPC mit SMC oder HuFi.

In der Tabelle 4 ist dieses Ergebnis nochmals zusammengefasst.

BrdU	Mononukleäre EPC	Expandierte EPC	CD34+	MSC
SMC	-	-	+	-
HUVEC	-	+	+	-
HuFi	-	-	+	-

Tab. 4: Einfluß konditionierter Medien nach Koinkubation von Progenitorzellen (EPC, CD34+, MSC) und vaskulären Zellen (SMC, HUVEC, HuFi) auf die Proliferation von HUVEC

Vergleicht man nun diese Daten mit der jeweiligen Gesamtzellzahl pro Gesichtsfeld aus den Koinkubationsversuchen, die bei Zunahme ja eine vermehrte Proliferation bedeuten, so decken sich die Ergebnisse nur teilweise. Expandierte EPC vermögen das Zellwachstum in der Koinkubation mit SMC und auch HUVEC deutlich zu steigern. Im Fall der Koinkubation mit HUVEC scheinen mitogene Faktoren freigesetzt zu werden und zur Steigerung der Zellzahl beizutragen. Bei der Steigerung der Gesamtzellzahl nach Inkubation von expandierten EPC mit SMC scheinen andere Mechanismen eine Rolle zu spielen. Konditionierte Überstände aus

Ansätzen mit CD34+- Zellen erreichen zwar eine Steigerung der Proliferation im BrdU- Assay, zählt man die Zellen im Koinkubationsansatz aus, so ergibt sich jedoch keine Steigerung der Zellzahl. Inwieweit Zellinteraktionen dabei eine Rolle spielen, ist noch nicht klar.

Somit lässt sich vermuten, dass nicht nur eine parakrine Interaktion allein für eine proliferative Wirkung der Vorläuferzellen verantwortlich ist, wohl aber eine entscheidende Rolle bei Zellinteraktionen von ausdifferenzierten Zellen und Vorläuferzellen spielt. Hierbei lässt sich abschließend ebenso feststellen, dass expandierte EPC in Koinkubation mit HUVEC eine deutliche Steigerung der Zellproliferation bewirken.

5.2 Zellinteraktion

Eine Vielzahl von Arbeitsgruppen versuchte experimentell zu zeigen, welchen Weg die Interaktion von Vorläuferzellen mit gewebständigen Zellen nimmt.

Die Vermutung einer möglichen Transdifferenzierung liegt dabei nahe. Werden Vorläuferzellen mittels einem spezifischen Farbstoff markiert und dann gemeinsam mit ausdifferenzierten Zellen in Kultur gebracht, so zeigen sich nach einer gewissen Dauer der Kultur Zellen, die sowohl das Labeling der Vorläuferzellen als auch spezifische Oberflächenstrukturen der bereits ausdifferenzierten Zellen tragen.

Die Markierung der Vorläufer- oder Stammzellen erfolgte z.B. mittels eines Gens, das für eine Fluoreszenzfarbstoff (GFP)⁶⁹ codiert, oder mittels aufgenommenen DIL-Labeling³.

Auch in den durchgeführten Versuchen zeigten sich nach einer Kulturdauer von mehr als vier Tagen Zellen, die das DIL-Labeling der untersuchten Vorläuferzellen trugen und in der fitc-konjugierten Antikörperfärbung gegen Oberflächenstrukturen oder spezifische Proteine von glatten Muskelzellen, Endothelzellen oder Fibroblasten positiv reagierten. Wurden Vorläuferzellen niedriger Differenzierung in der Koinkubation wie CD34+, MSC oder mononukleären EPC verwendet, so zeigte sich ein höherer Anteil an sog. doppelt-positiven Zellen verglichen mit der weiter differenzierten Vorläuferzelllinie von expandierten EPC allerdings keine Steigerung verglichen mit einer Koinkubation von SMC, HuFi oder HUVEC mit DIL-makierten, ausdifferenzierten HUVEC. Dies stellt eine mögliche Transdifferenzierung zwar nicht

völlig in Abrede, lässt diese jedoch als Hauptinteraktion von Zellen in Koinkubation mit Effekten auf Proliferation oder Apoptose eher unwahrscheinlich erscheinen.

Wie bereits angesprochen zeichnen sich auch in der Literatur Zweifel gegen diese Theorie ab, betrachtet man die Menge an Erbgut, die sich in Zellen mit Labeling der Stammzellen und Markern der ausdifferenzierten Zellen befindet⁷³. Betrachtet man das Erbgut weiter, so fällt auf, dass diese Zellen oftmals sowohl Erbgut der Vorläuferzellen als auch ausdifferenzierte Zellen tragen. Dies deutet wiederum auf mögliche Fusionsvorgänge zwischen den Zellen hin^{4, 53, 76}.

Um weiteren Aufschluss über den vorliegenden Mechanismus zu erhalten, wurde ein Versuchsansatz der Koinkubation unter Berücksichtigung des zeitlichen Ablaufs gewählt. Durch die Markierung von expandierten EPC und Fibroblasten mit einem life-cell-labeling konnten die Zellen während der Koinkubation auf das Vorliegen beider Marker untersucht werden. Der Anteil der doppelt markierten Zellen, gemessen nach den ersten 24h Inkubation, zeigt nach 48h Inkubationszeit keinen nominalen Anstieg mehr. Bei einer möglichen Transdifferenzierung wäre von einem längeren Prozess auszugehen, somit unterstreichen diese Ergebnisse auch die Annahme von Fusionsprozessen.

Der Austausch von Stoffen von Zelle zu Zelle ist hier jedoch auch über Zellverbindungen wie Nanotubes möglich, was eine Erklärung für das Auftreten von Zellen mit doppelter Markierung nach kurzer Inkubationszeit sein kann^{5, 77}.

Die Literatur beschreibt darüber hinaus auch die Möglichkeit der Wirkung über einen parakrinen Weg durch die Vorläuferzellen. Bei Patienten mit vermehrter Ausschwemmung von AC133+ endothelialen Vorläuferzellen fand sich ein erhöhter Gehalt an IL-8 im Serum²⁶. Wurde dieses Zytokin in der Koinkubation von HUVEC und mononukleären EPC geblockt, so wurde ein zuvor proliferatives Verhalten der Zellen gehemmt⁸⁰. Auch zeigte sich eine vermehrte Expression des Wachstumsfaktors bFGF nach der intramyokardialen Injektion von BM-MNC in Mäusen⁵⁴. Experimentelle Studien zeigten bereits, dass durch Vorläuferzellen vermehrt Wachstumsfaktoren wie VEGF, bFGF oder Angiopoetin-1 gebildet und freigesetzt werden⁵².

Dies wird durch die Ergebnisse der eigenen Versuche teilweise unterstrichen. So findet sich in der alleinigen Kultur von expandierten EPC ein vermehrter Gehalt an bFGF und IL-8 im Medium nach 96 Stunden im Vergleich zu ausdifferenzierten HUVEC oder mononukleäre EPC. Die Zytokine Angiogenin oder VEGF werden nicht

oder nur gering vermehrt gemessen verglichen zu Medien der ausdifferenzierten HUVEC. Betrachtet man jedoch konditionierte Überstände, d.h. Medien die nach einer Koinkubation von HUVEC mit expandierten oder mononukleären EPC über einen Zeitraum von 96 Stunden durchgeführt wurden, so findet sich hier ein vermehrter Gehalt an Angiogenin, bFGF sowie IL-8 nach einer Koinkubation mit expandierten EPC. In denselben Versuchsansätzen wird auch die größte Zellzahl pro Gesichtsfeld erreicht.

Betrachtet man nun alle Versuchsergebnisse und zusätzlich die aktuelle Literatur, so liegt der Gedanke nahe, dass die Wirkung von angewendeten Vorläuferzellen nicht allein durch einen Mechanismus erzielt werden kann. Vielmehr ist von einem multifaktoriellen Modell auszugehen. Wie bereits mehrfach angesprochen kommen Transdifferenzierung, Zellinteraktionen wie Fusion oder Nanotubes sowie parakrine Effekte über Zytokine in Frage.

Prozesse der Transdifferenzierung sind durch die kurze Dauer der beobachtenden Ergebnisse höchst unwahrscheinlich. So hatte sich in der Mikroskopie lebender Zellen nach 24h kein weiterer Anteil an Zellen mit doppelter Markierung gezeigt. Vielmehr lässt sich in der Literatur ein erhöhter Anteil an Erbgut, in den Untersuchungen ist dies vor allem mRNA, nach Koinkubation finden. In den eigenen Beobachtungen ergibt sich weiterhin, dass sämtliche Zellen nach Koinkubation mit DIL-Labeling auch für die jeweilige fitc-konjugierte Antikörperfärbung positiv waren. Geht man von der Theorie der Transdifferenzierung aus, so müsste bei diesen Beobachtungen jede einzelne Vorläuferzelle in eine vaskuläre Zelle, also HUVEC SMC oder HuFi, differenziert sein. Die Vermutung liegt nahe, dass dies nicht der Fall sein würde. Eine Zelle, die alleine für das DIL-Labeling der Vorläuferzellen positiv war, war nicht zu beobachten.

Ein möglicher Austausch von Stoffen des Intrazellulärtraumes unter den Zellen kann durch Zellverbindungen wie die, bereits in der Literatur mikroskopisch beobachteten, Nanotubes erklärt werden. Somit ist auch ein Austausch des DIL-Labelings unter den Zellen zu sehen. Mögliche Fusionsvorgänge könnten vermehrte RNA oder DNA in Zellen erklären. Der Austausch von Zellorganellen über Nanotubes ist nicht beobachtet worden. Wiederum in der Mikroskopie der lebenden Zellen mit QTracker-Markierung gibt es auch hierfür Hinweise. Schon nach wenigen Stunden lassen sich Zellen mit beiden Markern mikroskopisch erkennen. Erklärbar wäre dies beispielweise durch Austausch der Kristalle über Fusion oder fusionsähnliche

Vorgänge. Phagozytose wird als möglicher Austauschweg vom Hersteller ausgeschlossen.

Zuletzt scheint sich auch der Einfluss über einen parakrinen Weg möglich zu sein. Zu beobachten ist eine Proliferationssteigerung durch die Kultur von ausdifferenzierten Zellen in konditionierten Medien. Durch den Einfluss von Vorläuferzellen entsteht im Medium ein Milieu an Stoffen, die das Wachstum, ausgedrückt durch den BrdU-Uptake, von HUVEC deutlich steigern gegenüber einer Verwendung von frischem, unkonditioniertem Medium für Endothelzellen. Unterstrichen wird dies durch Messungen der Zytokine in Koinkubationsansätzen mit Kulturen der Vorläuferzellen und den jeweiligen vaskulären Zelllinie. So ergibt sich in den eigenen Versuchen vor allem ein erhöhter Gehalt des Wachstumsfaktors bFGF sowie des Zytokins Interleukin-8. In der Literatur wird vielfach der vaskuläre Wachstumsfaktor VEGF für die proliferative Wirkung von Vorläuferzellen diskutiert und beschrieben. In den eigenen Versuchen konnte dies nicht bestätigt werden. Hier zeigen sich keine eindeutig erhöhten Werte für VEGF in den konditionierten Medien.

Somit kann zusammenfassend gesagt werden, dass es auf mehreren Ebenen Zellinteraktionen bei der Inkubation von Vorläuferzellen mit ausdifferenzierten Zellen gibt. Es kann ein gewisser Stoffaustausch über Fusionsprozesse stattfinden. Eine starke proliferative Wirkung allerdings wird durch freigesetzte Zytokine ausgelöst. Hier spielen neben VEGF vor allem Interleukin-8 und bFGF eine entscheidende Rolle.

Für die breite klinische Anwendung als Therapie ist auch deren ubiquitäre Verfügbarkeit von Bedeutung. Vor allem für Patienten mit chronischer Myokardischämie stellt der therapeutische Ansatz mit Vorläuferzellen zur Angiogenese im geschädigten Herz eine zukunftssträchtige Anwendung dar. Somit ist eine Zellart zu finden, die breit verfügbar ist und gute therapeutische Erfolge liefert. Die deutlichste proliferativste und antiapoptotische Wirkung zeigten in den durchgeführten Versuchen expandierte EPC. Diese Zellen können aus dem Vollblut des Patienten mit anschließender Kultivierung für vier Wochen gewonnen werden. Somit ist eine ubiquitäre Verfügbarkeit sichergestellt. Ein Zurückgreifen auf Vorläuferzellen aus der menschlichen Nabelschnur ist nicht notwendig. Durch die gute Kultivierbarkeit sind außerdem große Zellzahlen erreichbar, um den therapeutischen Effekt zu steigern. Die Gefahr einer möglichen neoplastischen

Reaktion ist bei körpereigenen und höher differenzierten Zellen ebenfalls geringer als bei potenteren Zellen eines möglichen Spenders.

Somit stellen expandierte EPC über die Wirkung von parakrinen Effekten und Zell-Zell-Kontakten eine mögliche breite Grundlage für eine Therapie der chronischen Myokardischämie durch Induktion der Angiogenese und des Wachstums der bereits ständigen Zellen dar.

5.3 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Effekt einer Koinkubation von vaskulären Zellen (Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten) mit Progenitorzellen (mononukleäre EPC, expandierte EPCs, CD34+- Zellen, mesenchymale Progenitorzellen) auf die Zelldichte und die Freisetzung mitogener Mediatoren untersucht. Nach Koinkubation von expandierten EPC und MSC mit HUVEC wurde eine Steigerung der Gesamtzellzahl beobachtet. Ebenso induzierte die Koinkubation von mononukleären oder expandierten EPC mit SMC die Gesamtzellzahl. Zur Analyse von Transdifferenzierungsvorgängen wurden die Progenitorzellen mit Dil markiert und SMC mit FITC SMC Aktin, EPC mit FITC CD31 und HuFi mit FITC Propyl-4-Hydroxylase angefärbt. Das Vorliegen doppelt- positiver Zellen könnte einerseits für eine Transdifferenzierung oder für Fusionsprozesse sprechen. Diese Mechanismen spielten jedoch keine Rolle, da eine erhöhte Anzahl der doppelt-positiven Zellen nur nach Koinkubation mit MSC und Fibroblasten zu beobachten war. Vorstellbar wäre eine Transdifferenzierung der MSC.

Um zu untersuchen, inwieweit die Zellzahlsteigerung auf einer Stimulation der Proliferation beruht, wurde die BrdU-Inkorporation in HUVEC nach Inkubation mit den Überständen der Koinkubationsexperimente durchgeführt. Es zeigte sich eine mitogene Wirkung der Überstände nach Koinkubation von expandierten EPC mit HUVEC. Ebenso zeigten die Überstände nach Koinkubation mit CD34+- Zellen eine Proliferationssteigerung. Die Steigerung der Zellzahl nach Inkubation von expandierten EPC wird also zumindest teilweise durch die Freisetzung von mitogenen Mediatoren vermittelt.

Inwieweit durch Koinkubation von mononukleären oder expandierten EPC proagnogenetische Mediatoren freigesetzt werden, untersuchten wir durch Messung von IL-8, Angiogenin, TNF- α , VEGF und bFGF in den Überständen. Die Messungen

wurden nach Monokultur der mononukleären EPC, expandierten EPCs oder HUVEC sowie nach Kokultur von mononukleären oder expandierten EPC mit HUVEC durchgeführt. In der Monokultur zeigte sich eine vermehrte Freisetzung von IL-8, Angiogenin und bFGF von expandierten EPC im Vergleich zu mononukleären EPC. Unter Kokulturbedingungen beobachteten wir eine signifikante Steigerung der VEGF und bFGF- Freisetzung beider EPC- Typen, sowie eine Hemmung der Freisetzung von IL-8 und Angiogenin. Die beobachtete Steigerung der Zellzahl und der Proliferation könnte durch diese Mediatoren teilweise vermittelt werden.

Die Freisetzung mitogener Substanzen, von bFGF sowie VEGF von expandierten EPC in Kokultur mit endothelialen Zellen, könnte sich therapeutisch günstig für eine Steigerung der Gefäßneubildung auswirken.

5.4 Limitationen

Es bieten sich bei der Betrachtung der Ergebnisse und Versuchsmethoden Limitationen der durchgeführten experimentellen Ansätze.

Zunächst ist von einer möglichen unzureichenden Differenzierung der Zellen durch die jeweilige Färbung zu sprechen. So steht ein möglicher Austausch der einzelnen fluoreszierenden Marker zur Diskussion. Laut Hersteller wird Qtracker nach einer Aufnahme gemäß Protokoll nicht von Zelle zu Zelle ausgetauscht, gleiches kann aber für das DIL-Labeling nicht gefunden werden. Ebenso zeigten sich in den Koinkubationversuchen alle Zellen mit DIL-Labeling nach Koinkubation auch positiv für die fitc-konjugierte Färbung. Hier könnte eine unspezifische Färbung der Grund sein. Gerade beim Einsatz des Fibroblastenmarkers bzw. der Phalloidin-Färbung ist an eine mögliche Färbung von unspezifischen Strukturen und damit falsch-positiven Ergebnisse zu denken.

Ein Einfluss der unterschiedlichen verwendeten Zellkulturmedien ist ebenso denkbar. So wurde immer das jeweilige Medium der vaskulären Zelllinie und nicht das für die Vorläuferzelle angedachte Medium in der Koinkubation verwendet.

Zur besseren Abschätzung des Einflusses einer Koinkubation im Vergleich zur alleinigen Inkubation wäre im weiteren Ansatz eine Erweiterung der Daten um Gesamtzellzahl und BrdU-Uptake mit Kultur der jeweiligen Vorläuferzellen in der singulären Inkubation zu denken.

Auch könnten antiapoptotische Wirkungen der Koinkubation ein mögliches proliferatives Verhalten vortäuschen.

Mögliche Differenzierungsvorgänge scheinen zwar dank der erlangten Ergebnisse eher unwahrscheinlich, wurden allerdings in keinem eigenen Versuchsansatz untersucht. Geht man von einem multifaktoriellen Modell aus, könnte der Anteil von Transdifferenzierung somit unbeachtet bleiben.

6 Literaturverzeichnis

44. Acharya KR, Shapiro R, Allen SC, Riordan JF, Vallee BL. Crystal structure of human angiogenin reveals the structural basis for its functional divergence from ribonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(8):2915-9.
45. Arakawa M, Someno T, Kawada M, Ikeda D. A new terrein glucoside, a novel inhibitor of angiogenin secretion in tumor angiogenesis. *J Antibiot (Tokyo)* 2008;61(7):442-8.
11. Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287(3):C572-9.
13. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner J. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275(5302):964-7.
3. Badorff C, Brandes R P, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, Fleming I, Busse R, Zeiher A M, Dimmeler S. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 2003;107(7):1024-32.
69. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004;428(6983):668-73.
10. Boodhwani M, Sodha NR, Laham RJ, Sellke FW. The future of therapeutic myocardial angiogenesis. *Shock* 2006;26(4):332-41.
1. Caplice NM, Gersh BJ. Stem cells to repair the heart: a clinical perspective. *Circ Res* 2003;92(1):6-8.
68. Condorelli G, De Angelis L, Latronico M, Sirabella D, Coletta M, Galli R, Balconi G, Follenzi A, Frati G, Cusella De Angelis M G, Gioglio L, Amuchastegui S, Adorini L, Naldini L, Vescovi A, Dejana E, Cossu G. Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(19):10733-8.
57. Davani S, Marandin A, Mersin N, Royer B, Kantelip B, Herve P, Etievent J P, Kantelip J P. Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. *Circulation* 2003;108 Suppl 1:II253-8.

63. Dobert N, Dobert N, Britten M, Assmus B, Berner U, Menzel C, Lehmann R, Hamscho N, Schachinger V, Dimmeler S, Zeiher A M, Grunwald F. Transplantation of progenitor cells after reperfused acute myocardial infarction: evaluation of perfusion and myocardial viability with FDG-PET and thallium SPECT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004;31(8):1146-51.
18. Dvorakova J, Hrubá A, Velebný V, Kubala L. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell population entrapped in bone marrow collection sets. *Cell Biol Int* 2008;32(9):1116-25.
14. Emanuelli C, Madeddu P. Angiogenesis gene therapy to rescue ischaemic tissues: achievements and future directions. *Br J Pharmacol* 2001;133(7):951-8.
30. Fadini GP, Agostini C, Sartore S, Avogaro A. Endothelial progenitor cells in the natural history of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2007.
67. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279(5356):1528-30.
50. Forrester JS, Price MJ, Makkar RR. Stem cell repair of infarcted myocardium: an overview for clinicians. *Circulation* 2003;108(9):1139-45.
34. Forsten KE, Courant NA, Nugent MA. Endothelial proteoglycans inhibit bFGF binding and mitogenesis. *J Cell Physiol* 1997;172(2):209-20.
78. Fredj S, Bescond J, Louault C, Delwail A, Lecron JC, Potreau D. Role of interleukin-6 in cardiomyocyte/cardiac fibroblast interactions during myocyte hypertrophy and fibroblast proliferation. *J Cell Physiol* 2005;204(2):428-36.
15. Fukuda S, Yoshii S, Kaga S, Matsumoto M, Kugiyama K, Maulik N. Angiogenic strategy for human ischemic heart disease: brief overview. *Mol Cell Biochem* 2004;264(1-2):143-9.
65. Graf T. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood* 2002;99(9):3089-101.
55. Hamano K, Nishida M, Hirata K, Mikamo A, Li T S, Harada M, Miura T, Matsuzaki M, Esato K. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results. *Jpn Circ J* 2001;65(9):845-7.
41. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. :Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol* 1994;56(5):559-64.

49. Harada K, Grossman W, Friedman M, Edelman E R, Prasad P V, Keighley C S, Manning W J, Sellke F W, Simons M. Basic fibroblast growth factor improves myocardial function in chronically ischemic porcine hearts. *J Clin Invest* 1994;94(2):623-30.
80. He T, Peterson TE, Katusic ZS. Paracrine mitogenic effect of human endothelial progenitor cells: role of interleukin-8. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289(2):H968-72.
24. Hirsch EZ. Reendothelialization and maintenance of endothelial integration in longitudinal denuded tracks in the thoracic aorta of rats. *Atherosclerosis* 1983;46:287-307.
62. Honold J, Lehmann R, Heeschen C, Walter D H, Assmus B, Sasaki K, Martin H, Haendeler J, Zeiher A M, Dimmeler S. Effects of granulocyte colony stimulating factor on functional activities of endothelial progenitor cells in patients with chronic ischemic heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(10):2238-43
81. Hultgard-Ekwall AK, Couloigner V, Rubin K, Rask-Andersen H. Network organization of interstitial connective tissue cells in the human endolymphatic duct. *J Histochem Cytochem* 2003;51(11):1491-500.
61. Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* 2005;106(5):1525-31.
22. Ingram DA, Mead LE, Moore DB, Woodard W, Fenoglio A, Yoder MC. Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood* 2005;105(7):2783-6.
23. Ingram DA, 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(9):2752-60.
52. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, Masaki H, Mori Y, Iba O, Tateishi E, Kosaki A, Shintani S, Murohara T, Imaizumi T, Iwasaka T. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 2001;104(9):1046-52.
35. Kapur NK, Rade JJ. Fibroblast growth factor 4 gene therapy for chronic ischemic heart disease. *Trends Cardiovasc Med* 2008;18(4):133-41.

59. Katritsis DG, Sotiropoulou PA, Karvouni E. Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheter Cardiovasc Interv* 2005;65(3):321-9.
77. Koyanagi M, Brandes RP, Haendeler J, Zeiher AM, 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(10):1039-41.
8. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-74.
48. Losordo DW, Vale PR, Isner JM. Gene therapy for myocardial angiogenesis. *Am Heart J* 1999;138(2 Pt 2):S132-41.
29. Modarai B, Burnand KG, Sawyer B, Smith A. Endothelial progenitor cells are recruited into resolving venous thrombi. *Circulation* 2005;111(20):2645-53.
71. Murry CE, 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(6983):664-8.
51. Noishiki Y, Tomizawa Y, Yamane Y, Matsumoto A. Autocrine angiogenic vascular prosthesis with bone marrow transplantation. *Nat Med* 1996;2(1):90-3.
53. Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, et al 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(5):494-501.
25. O'Neill T Jt, Wamhoff BR, Owens GK, Skalak TC. Mobilization of bone marrow-derived cells enhances the angiogenic response to hypoxia without transdifferentiation into endothelial cells. *Circ Res* 2005;97(10):1027-35.
16. Orlic D, Hill JM, Arai AE. Stem cells for myocardial regeneration. *Circ Res* 2002;91(12):1092-102.
43. Osorio DS, Antunes A, Ramos MJ. Structural and functional implications of positive selection at the primate angiogenin gene. *BMC Evol Biol* 2007;7:167.
20. Ott I, Keller U, Knoedler M, Gotze K S, Doss K, Fischer P, Urbauer 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(8):992-4.
60. Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest* 2000;105(1):17-9.

33. Rapraeger AC, Krufka A, Olwin BB. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* 1991;252(5013):1705-8.
66. Ratajczak MZ, Kucia M, Reza R, Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia* 2004;18(1):29-40.
21. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414(6859):105-11.
37. Roskoski R, Jr. VEGF receptor protein-tyrosine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;375(3):287-91.
9. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362(6423):801-9.
5. Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* 2004;303(5660):1007-10.
36. Schmidt A, Skaletz-Rorowski A, Breithardt G, Buddecke E. Growth status-dependent changes of bFGF compartmentalization and heparan sulfate structure in arterial smooth muscle cells. *Eur J Cell Biol* 1995;67(2):130-5.
26. Schomig K, Busch G, Steppich B, Sepp D, Kaufmann J, Stein A, Schomig A, Ott I. Interleukin-8 is associated with circulating CD133+ progenitor cells in acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006;27(9):1032-7.
39. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2006;39(5):469-78.
38. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis* 2006;9(4):225-30; discussion 31.
72. Spees JL, Olson S D, Ylostalo J, Lynch P J, Smith J, Perry A, Peister A, Wang M Y, Prockop D J. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(5):2397-402.
54. Sun J, Li S H, Liu S M, Wu J, Weisel R D, Zhuo Y F, Yau T M, Li R K, Fazel S S. Improvement in cardiac function after bone marrow cell therapy is associated with an increase in myocardial inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296(1):H43-50.

19. Szmitko PE, Fedak PW, Weisel RD, Stewart DJ, Kutryk MJ, Verma S. Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart. *Circulation* 2003;107(24):3093-100.
56. Tang YL, Zhao Q, Qin X, Shen L, Cheng L, Ge J, Phillips M I. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *Ann Thorac Surg* 2005;80(1):229-36; discussion 36-7.
74. 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(6880):542-5.
40. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2008;117(2):244-79.
6. Tse HF, Siu C W, Zhu S G, Songyan L, Zhang Q Y, Lai W H, Kwong Y L, Nicholls J, Lau C P. Paracrine effects of direct intramyocardial implantation of bone marrow derived cells to enhance neovascularization in chronic ischaemic myocardium. *Eur J Heart Fail* 2007;9(8):747-53.
79. Urbich C, Aicher A, Heeschen C, Dernbach E, Hofmann W K, Zeiher A M, Dimmeler S. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol* 2005;39(5):733-42.
7. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 2004;95(4):343-53.
47. Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, Esakof DD, Isner JM. Images in Cardiovascular Medicine: Percutaneous myocardial gene transfer of phVEGF-2. *Circulation* 1999;100(24):2462-3.
32. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher A M, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001;89(1):E1-7.
2. Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003;422(6934):901-4.
70. Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002;297(5590):2256-9.

58. Wang YQ, Wang M, Zhang P, Song J J, Li Y P, Hou S H, Huang C X. Effect of transplanted mesenchymal stem cells from rats of different ages on the improvement of heart function after acute myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)* 2008;121(22):2290-8.
31. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Bohm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005;353(10):999-1007.
28. Wojakowski W, Kucia M, Kazmierski M, Ratajczak MZ, Tendera M. Circulating stem/progenitor cells in stable ischemic heart disease and acute coronary syndromes - relevant reparatory mechanism? *Heart* 2007.
73. Wurmser AE, Gage FH. Stem cells: cell fusion causes confusion. *Nature* 2002;416(6880):485-7.
76. Wurmser AE, Nakashima K, Summers R G, Toni N, D'Amour K A, Lie D C, Gage F H. Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature* 2004;430(6997):350-6.
46. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000;407(6801):242-8.
64. Yi F, Guo W Y, Lu A L, Wang H C, Li H, Li W J, Liu B, Zhang D X, Luan R H, Cheng H X, Li F, Qin T, Zhao Z J, Gao F, Jia G L. Vascular endothelial growth factor expressing mesenchymal stem cells improves cardiac function in chronic myocardial infarction in pigs. *Chin Med J (Engl)* 2006;119(19):1664-8.
4. Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002;416(6880):545-8.
12. Yokokura Y, Hayashida N, Okazaki T, Nakamura E, Tayama E, Akashi H, Aoyagi S. Influence of angiogenesis by implantation of bone marrow mononuclear cells in the rat ischemic heart. *Kurume Med J* 2007;54(3-4):77-84.
17. Young PP, Vaughan DE, Hatzopoulos AK. Biologic properties of endothelial progenitor cells and their potential for cell therapy. *Prog Cardiovasc Dis* 2007;49(6):421-9.
75. Zhang S. Fusion of human Hematopoietic Progenitor Cells and Murine Cardiomyocytes is mediated by $\alpha 4\beta 1$ Integrin/Vascular cell adhesion Molecule-1 interaction. *Circulation Research* 2007;100:693-702.
27. Zohlnhoefer D. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction. *JAMA* 2006;295:1003-10.

42. Zwahlen R, Walz A, Rot A. In vitro and in vivo activity and pathophysiology of human interleukin-8 and related peptides. *Int Rev Exp Pathol* 1993;34 Pt B:27-42.