

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I, Klinikum Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Professor Dr. Gerhard Steinbeck**

Angefertigt unter der Leitung von PD Dr. Christian Kupatt, Medizinische Klinik I,  
Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München

Eingereicht über Professor Dr. Rüdiger Wanke  
Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Kardioprotektion nach Ischämie/Reperfusion durch embryonale  
endotheliale Progenitorzellen: Ergebnisse aus einem präklinischen  
Schweinemodell**

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

von  
Rabea Hinkel  
aus Dillenburg

München 2009

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Wanke

Korreferent/en Univ.-Prof. Dr. Stangassinger  
Univ.-Prof. Dr. Wolf  
Univ.-Prof. Dr. Pfister  
Priv.-Doz. Dr. Reese

Tag der Promotion: 6. Februar 2009

Die vorliegende Arbeit ist nach § 6 Abs. 2 Promotionsordnung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München vom 15.01.2007 als kumulative Dissertation gestaltet worden. Die im Abschnitt 4 dargestellten Ergebnisse sind in dem englischsprachigen peer-reviewed Journal "*Circulation*" publiziert worden.

# Meiner Familie

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	Seite 5
2. Literaturübersicht	Seite 7
3. Fragestellung	Seite 16
4. Eigene Arbeit / Veröffentlichung	Seite 17
5. Diskussion	Seite 40
6. Zusammenfassung	Seite 53
7. Summary	Seite 55
8. Literaturverzeichnis	Seite 57
9. Abkürzungsverzeichnis	Seite 67
10. Danksagung	Seite 69

### **Einleitung**

Der akute Myokardinfarkt stellt in den Industrienationen eine der häufigsten aller Todesursachen dar. Die Therapie der Wahl ist die Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes mittels perkutaner transluminaler Koronar-Angioplastie oder Thrombolyse, um eine Wiederdurchblutung des ischämischen Myokards zu erreichen. Diese Therapiestrategien sind essentiell für die Vermeidung einer Myokardnekrose. Abhängig von der Dauer der Ischämie und der reperfusionsbedingten Zellschädigung kann mit diesen Therapiestrategien die Entstehung einer Infarkt Narbe nicht immer vermieden werden. Insbesondere die Zeit, die bis zur Wiedereröffnung des Infarktgefäßes vergeht, entscheidet über den Verlust von vitalem Myokardgewebe.

Die aus Ischämie und Reperfusion resultierende Gewebeschädigung setzt sich demnach aus zwei unterscheidbaren Komponenten zusammen. Zum ersten trägt der letale Kardiomyozytenschaden zum Endresultat entscheidend bei, der durch die Sauerstoff- und Substratdeprivation in der Ischämie bedingt ist. Zum zweiten ist der Reperfusionsschaden relevant, der durch das Wiedereröffnen des Gefäßes verursacht wird.

Der Reperfusionsschaden wird ausgelöst durch eine rapide pH-Wert Änderung, die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies, Mikrozirkulationsstörungen, gesteigerte Inflammation und Apoptose. Da der Reperfusionsschaden erst mit Eröffnen des Gefäßes auftritt, kann dieser durch Applikation geeigneter Substanzen zu Beginn der Reperfusion vermindert werden. Die Wirksamkeit therapeutischer Ansätze, die auf den Reperfusionsschaden abzielen, sinkt allerdings mit steigender Ischämiezeit, da in diesem Fall der Anteil des ischämisch bedingten Zelltodes ansteigt. (siehe Abbildung 1)

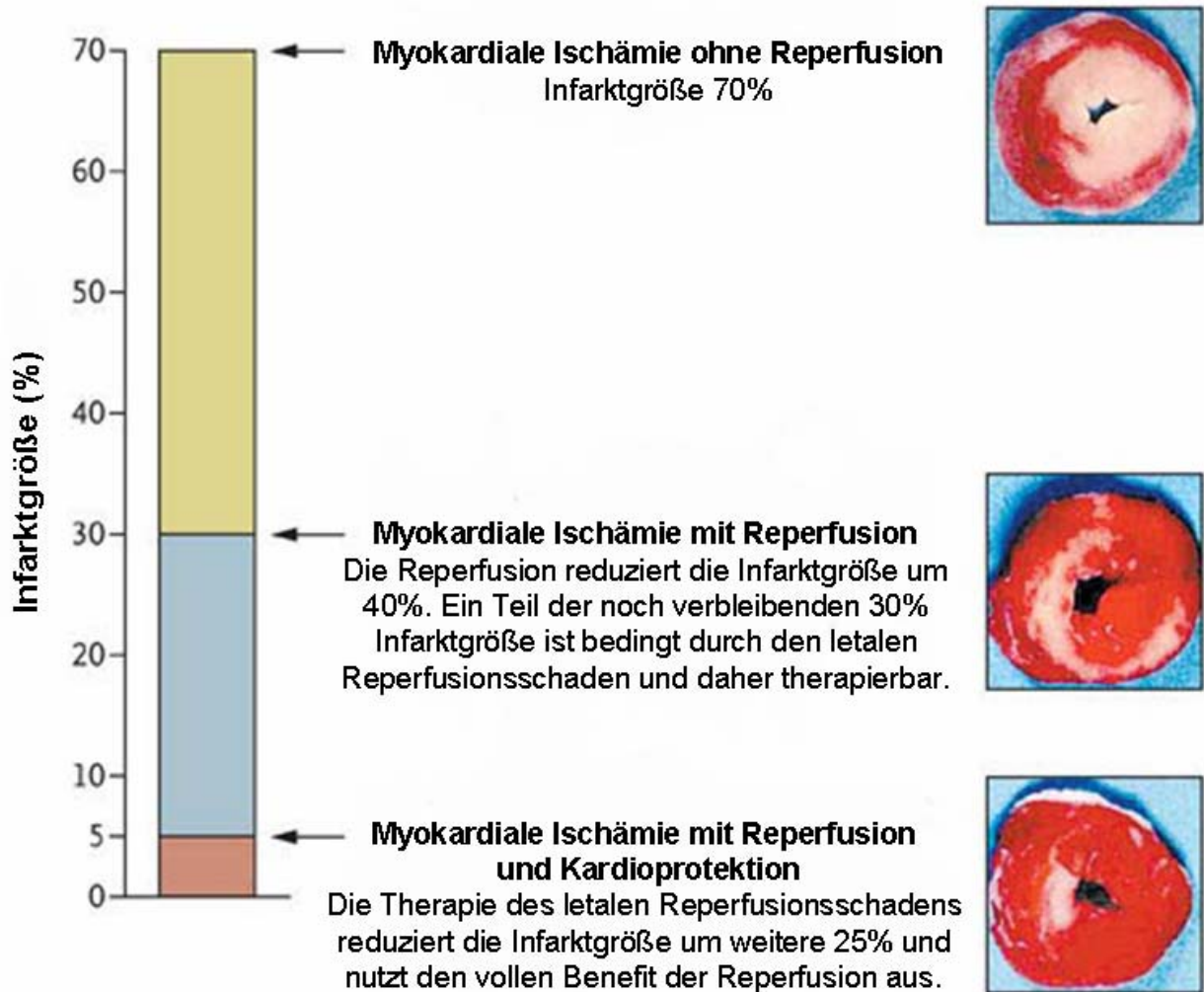


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Infarktgrößenreduktion. Eine Reduktion der Infarktgröße um ca. 40% ist durch eine erfolgreiche Reperfusion zu erreichen. Der dann noch verbleibende Infarkt setzt sich aus in der Ischämie irreversibel geschädigten Myozyten und dem Reperfusionsschaden zusammen. Durch die Verabreichung kardioprotektiver Substanzen mit Beginn der Reperfusion kann die Infarktgröße weiter dezimiert werden (modifiziert nach Yellon & Hausenloy 2007).

### Literaturübersicht

#### Ischämie/Reperfusionsschaden

Wiewohl die Reperfusion verschlossener Koronararterien sich als klinische Therapie mit nachweislicher Reduktion von Mortalität und Morbidität (White & Chew 2008) durchgesetzt hat, ist die Herzdurchblutung und –funktion postischämisch gegenüber der präischämischen Ausgangssituation verringert. Experimentell wurden über die vergangenen Jahrzehnte Herzrhythmus- und Mikrozirkulations-Störungen, reversible Funktionsstörungen (myocardial stunning) und irreversible Funktionsstörungen (durch größere Infarktareale bedingt) beobachtet (Jennings et al. 1960, Piper et al. 1998, Yellon & Hausenloy 2007).

Auch nach erfolgreicher Reperfusion kommt es zu einem weiteren Absterben von noch vitalen Kardiomyozyten im primär ischämischen Gebiet, dem so genannten letalen Reperfusionsschaden (Review bei Yellon & Baxter 1999). Die experimentelle Beobachtung, dass bei zeitgerechter und zielgerichteter Therapie die Infarktgröße reduziert werden kann, weist auf den Reperfusions- und nicht den Ischämie-bedingten im Prinzip therapierbaren Anteil der verbleibenden Parenchymschädigung hin (Piper et al. 1998, Yellon & Baxter 1999, Kupatt et al. 2003, Kupatt et al. 2004b, Kupatt et al. 2005a). Als im Prinzip reversibler Anteil an der myokardialen Dysfunktion ist das „myocardial stunning“ bekannt, das eine Funktionsstörung trotz wiederhergestellter Durchblutung darstellt. Die verminderte Kontraktilität des noch vitalen Gewebes erholt sich meist nach einigen Tagen bis Wochen wieder (Review bei Bolli & Marban 1999). Neben dem „myocardial stunning“ kann es vor allem in der Frühphase der Reperfusion zu Arrhythmien kommen, die durch Ionenverschiebungen in der Ischämie (Kalzium-Überladung) bedingt sind (Braunwald & Kloner 1982, Bolli & Marban 1999, Ferdinandy et al. 2007). Eine weitere Folge der Ischämie und Reperfusion ist das so genannte „no-reflow Phänomen“, das eine trotz makroangiographisch wiedereröffnetem Gefäß sistierende Perfusion bezeichnet. Diesem Phänomen liegt eine Störung der Durchblutung in der Mikrozirkulation zugrunde, die durch die Adhäsion von Thrombozyten und Neutrophilen an dem aktivierten Endothel sowie dem Anschwellen der Endothelzellen und Myozyten bedingt ist (Review bei Ito 2006 und Vinten-Johansen 2004).



Auf zellulärer Ebene wird die Schädigung, die in der Reperfusion eintritt, durch die plötzliche Ankunft von oxygeniertem Blut in ein auf Hypoxie adaptiertes Gewebe ausgelöst. Die Reoxygenation von Zellen und Mitochondrien führt über inhomogen aktivierte Enzyme der mitochondrialen Atmungskette zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^-$ ). Diese Moleküle reagieren, vor allem wenn die intrazellulären Radikalfänger wie Glutathion und Thioredoxin aufgebraucht sind, mit einer Vielzahl von intrazellulären Enzymen, deren Aktivität vermindert wird. Weiterhin zerstören ROS Membranstrukturen, zum Beispiel des sarkoplasmatischen Retikulums oder der Mitochondrien, die disintegrieren können. Schließlich wird durch Wegfangen von vaskulären reaktiven Autacoiden wie Stickoxid deren Bioverfügbarkeit verringert (Review bei Zweier & Talukder 2006).

Der Einstrom von Blut in ein Gebiet mit Azidose führt zu einem rapiden Wiederherstellen des physiologischen pH-Wertes, gefolgt von einer erhöhten Aktivität des Natrium-Protonen-Austauschers und des Natrium-Bikarbonat-Transporters (Avkiran & Marber 2002, Lemasters et al. 1996). Die Reperfusion führt durch Ioneneinstrom und fehlende Aktivität der Ionenpumpen zu einer erhöhten Kalziumkonzentration mit der Folge einer Hyperkontraktur und Zellsterben (Klein et al. 1989).

Neben diesen sehr früh in der Reperfusion stattfindenden Schädigungen der Myozyten induzieren Ischämie und Reperfusion eine gesteigerte Inflammation in dem ischämischen Gebiet. Rekrutierte neutrophile Leukozyten verursachen dadurch eine verminderte Perfusion in diesem Gebiet. Sie setzen wiederum selbst Zytokine und reaktive Sauerstoffspezies frei und verstärken damit den Reperfusionsschaden.

### **Stammzellen**

In der aktuellen Stammzellforschung werden embryonale von adulten Stammzellen unterschieden. Diese beiden Populationen weisen ein unterschiedliches Differenzierungspotential auf. Embryonale Stammzellen haben die Kapazität, sich in Zelltypen aller drei Keimblätter (Ecto-, Meso- und Endoderm) zu differenzieren und können ganze Organe bilden, wohingegen die adulten Stammzellen diese Pluripotenz in der Regel nicht mehr aufweisen. Im kardiovaskulären Bereich werden adulte Stammzellen in drei Subpopulationen eingeteilt: im Knochenmark residierende Stammzellen, zirkulierende Vorläuferzellen (aus dem Knochenmark und anderen

Organen stammend) und gewebständige Stammzellen (Review bei Dimmeler et al. 2008). Die aus dem Knochenmark stammenden Zellen werden in hämatopoetische Stammzellen (HSCs), Seitpopulation (SP) und mesenchymale Stammzellen (MSCs) unterteilt. Zu den MSCs werden die multipotenten adulten Vorläuferzellen (MAPCs) gerechnet (Dimmeler et al. 2008). Zu den zirkulierenden Vorläuferzellen gehören unter anderem die endothelialen Vorläuferzellen. Adulte endotheliale Progenitorzellen (EPCs) zeichnen sich durch ihr Potential aus, neue Blutgefäße zu bilden und die Neovaskularisierung in Ischämiegebieten zu steigern (Asahara et al. 1997, Kawamoto et al. 2001). Sie sind charakterisiert durch die Expression von hämatopoetischen Stammzellmarkern wie CD133, CD34 und dem für Endothelzellen und Monozyten typischen VEGF Rezeptor-2 (flk-1) (Takahashi et al. 1999, Dimmeler et al. 2001, Kawamoto et al. 2001, Peichev et al. 2000). Weitere Populationen von Stammzellen mit therapeutischem Potential stammen aus Gewebe, wie zum Beispiel aus Fettgewebe, oder sind als gewebständige Zellen im Herzen zu finden (Galli et al. 2005, Laugwitz et al. 2005, Messina et al. 2004). In ersten klinischen Studien zur Therapie des Ischämie/Reperfusionsschadens konnte bereits gezeigt werden, dass die Applikation von Vorläuferzellen mehrere Tage nach einem akuten Myokardinfarkt durchführbar und sicher ist (Strauer et al. 2002, Schächinger et al. 2004). In darauffolgenden größeren randomisierten Studien fand sich keine einheitliche Funktionsverbesserung, jedoch war in der Repair-MI Studie (Schächinger et al. 2006) die Auswurfraction nach 4 Monaten in der Zelltherapie-Gruppe signifikant verbessert. Eine kleinere Studie mit ähnlichem Design fand diesen Effekt nicht, verwendete allerdings ein für die EPC-Population ungünstigeres Isolations- und Aufbewahrungsprotokoll (Lunde et al. 2006, Rosenzweig 2006).

Alternativ zu adulten endothelialen Progenitorzellen wurden in der vorliegenden Arbeit embryonale endotheliale Vorläuferzellen verwendet. Diese wurden aus Thrombomodulin-LacZ-transgenen Mäusen isoliert, bei denen eine intensive Blaufärbung auf die Vaskulogenese-Aktivität im Sinne der Induktion des endothelspezifischen Reportergens hinwies. Die blau gefärbten Zellen wurden in eine klonale Zelllinie überführt, die sich durch einen endothelialen Phänotyp (induzierbare eNOS, von Willebrand Faktor-, VE-Cadherin-Expression) nach Stimulation mit TGF $\beta$ , bFGF und cAMP auszeichnet. Darüberhinaus sind die so gewonnenen embryonalen

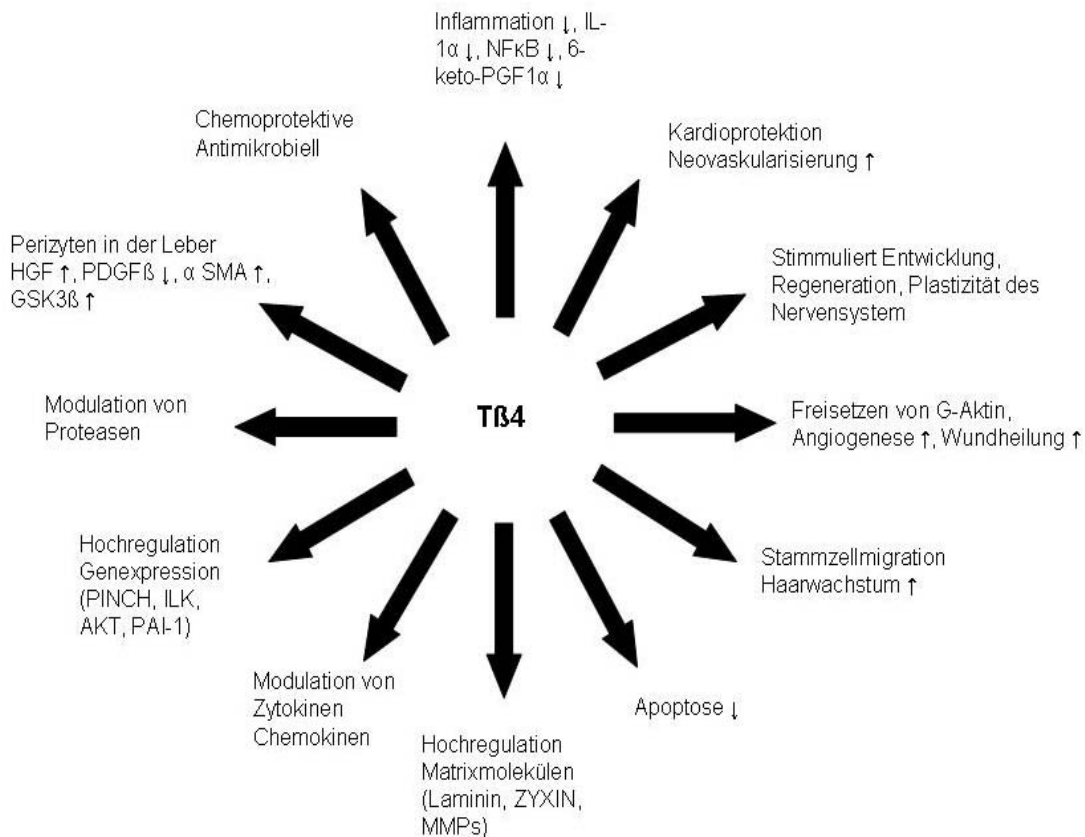
EPCs negativ Oct-4, d. h. sie haben keine pluripotenten Eigenschaften mehr, wie sie bei Stammzellen zu finden sind.  $\beta$ 2-Integrine werden von diesen endothelialen Progenitorzellen nicht exprimiert. Ebenso fehlt die MHC-Klasse I Expression, wodurch ein Schutz gegen unstimulierte NK-Zellen bedingt ist (Hatzopoulos et al. 1998, Wei et al. 2004, Kupatt et al. 2005b). Murine eEPCs wandern selektiv in Ischämiegebiete ein. Dieses „Homing“ wird durch den E-Selektin-Liganden ESL und den P-Selektin-Liganden PSGL-1 mediiert (Vajkoczy et al. 2003, Wei et al. 2004). Die Applikation dieser Zellen nach kardialer Ischämie/Reperfusion reduziert experimentell die Infarktgröße und verbessert die myokardiale Funktion in allogenen und xenogenen Modellen (Kupatt et al. 2005a). Nähere Analysen des kardioprotektiven Mechanismus der eEPCs zeigen, dass es sich hierbei um sezernierte Faktoren handelt, die den Phospho-Inositol-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K-AKT) vermittelten Signalweg aktivieren (Kupatt et al. 2005a).

### **Thymosin $\beta$ 4**

Thymosine wurden erstmals 1966 aus dem Thymus des Kalbes isoliert. Dabei handelte es sich um eine Mischung aus den verschiedenen Thymosinen (Klein et al. 1966, Goldstein et al. 1972). Die Familie der Thymosine umfasst insgesamt mehr als 15 hoch konservierte Moleküle, die in drei Hauptgruppen abhängig von ihrem isoelektrischen Punkt eingeteilt werden. Die  $\alpha$ -Thymosine mit einem isoelektrischen Punkt bei pH-Wert  $<5$ ,  $\beta$ -Thymosine mit einem isoelektrischen Punkt bei pH-Wert zwischen 5 und 7 und die  $\gamma$ -Thymosine mit einem isoelektrischen Punkt bei pH-Wert  $>7$ . Der numerische Zusatz der Thymosinbezeichnung ergibt sich aus deren chronologischer Isolierung (Huff et al. 2001, Hannappel 2007). Die  $\beta$ -Thymosine zeichnen sich durch G-Aktin Bindungseigenschaften aus und kommen in den meisten Spezies vor (Huff et al. 2001). Dabei wird Thymosin  $\beta$ 4 am häufigsten im Gewebe und in zirkulierenden Zellen gefunden, mit Ausnahme von roten Blutzellen (Huff et al. 2001). Bei Thymosin  $\beta$ 4 handelt es sich um ein wasserlösliches, fünf kDa und 43 Aminosäuren großes Protein, welches im Zytosol, im Zellkern und, zumindest bei transfizierten Zellen, auch im Überstand nachweisbar ist (Huff et al. 2001, Huang & Wang 2001, Bock-Marquette et al. 2004). Zusätzlich zu seiner Bindungsaffinität zu G-Aktin kann das Thymosin  $\beta$ 4 auch Komplexe mit dem F-Aktin bilden (Ballweber et al. 2002). Neben der Aktinbindung und

Sequestrierung hat Thymosin  $\beta$ 4 noch weitere biologische Funktionen, die wahrscheinlich von der Lokalisation und dem Zelltypen abhängen (Goldstein et al. 2005).

In Endothelzellen wurde Thymosin  $\beta$ 4 sehr früh als Gen für die Induktion von Endothelzellendifferenzierung gefunden (Grant et al. 1995). Neben der Endothelzellendifferenzierung vermittelt Thymosin  $\beta$ 4 auch Endothelzellmigration, Formation von tubulären Strukturen und hat eine angiogenetische Aktivität in vitro und in vivo. Thymosin  $\beta$ 4 verbessert die Wundheilung über verschiedene Mechanismen: gesteigerte Angiogenese, Migration von Keratinozyten, Kollagen Deposition und Wundkontraktur (Malinda et al. 1997, Goldstein et al. 2005). Darüber hinaus hat Thymosin  $\beta$ 4 eine anti-inflammatorische Wirkung und steigert das Haarwachstum (bei Ratten und Mäusen) (Philp et al. 2004). Thymosin  $\beta$ 4 ist eine pleiotrope Substanz, die in einer Vielzahl von Organen und regenerativen Prozessen eine Rolle spielt und eine große Anzahl an Faktoren reguliert (siehe Abbildung 2).



*Abbildung 2: Thymosin  $\beta$ 4 ist eines der am besten charakterisierten Thymosin Peptide, welches bereits in verschiedenen klinischen Studien erprobt wurde. Neben seiner Rolle als Aktin freisetzendes Molekül in eukaryotischen Zellen beschleunigt es Wundheilung und „Remodeling“ von geschädigtem Gewebe und vermindert die Freisetzung von inflammatorischen Chemokinen und Zytokinen. Es wird in multizentrischen Studien in den Vereinigten Staaten von Amerika und auch in Europa bei Patienten mit Druckgeschwüren, venostatischen Ulcera und Epidermolysis bullosa Erkrankungen eingesetzt. Thymosin  $\beta$ 4 soll in nächsten klinischen Studien bei Patienten mit einer diabetischen Retinopathie, welche sich einer Vitrektomie unterziehen müssen, eingesetzt werden und auch bei Patienten nach akutem Myokardinfarkt (modifiziert nach Goldstein 2007).*

Auch im Herz spielt Thymosin  $\beta$ 4 eine wichtige Rolle. Schon in der embryonalen Entwicklung kommt es zu Gefäßbildungsstörungen, wenn Thymosin  $\beta$ 4 herabreguliert ist. Durch das fehlende Proliferieren und Migrieren der epikardialen endothelialen Vorläuferzellen kommt es zu einer gestörten Gefäßbildung in dem sich entwickelnden Herzen. Neben den Endothelzellen ist auch die Rekrutierung von glatten Muskelzellen gestört, wenn Thymosin  $\beta$ 4 nicht in ausreichendem Maße vorhanden ist. Zusammengefasst ist die koronare Gefäßbildung bei Verlust von Thymosin  $\beta$ 4 gestört (Smart et al. 2007). Auch im adulten Herzen zeigte sich, dass die Applikation von Thymosin  $\beta$ 4 eine protektive Wirkung nach chronischer Ischämie hatte. In einem Mausmodell mit chronischer Ligation eines Koronargefäßes konnte die Infarktgröße nach Gabe von Thymosin  $\beta$ 4 Protein deutlich verringert werden. Zeitgleich konnte die Funktion des Herzens signifikant gesteigert werden. Dieser kardioprotektive Effekt wurde durch ein verbessertes Überleben von Kardiomyozyten und eine gesteigerte Endothelzellmigration erreicht (Bock-Marquette et al. 2004).

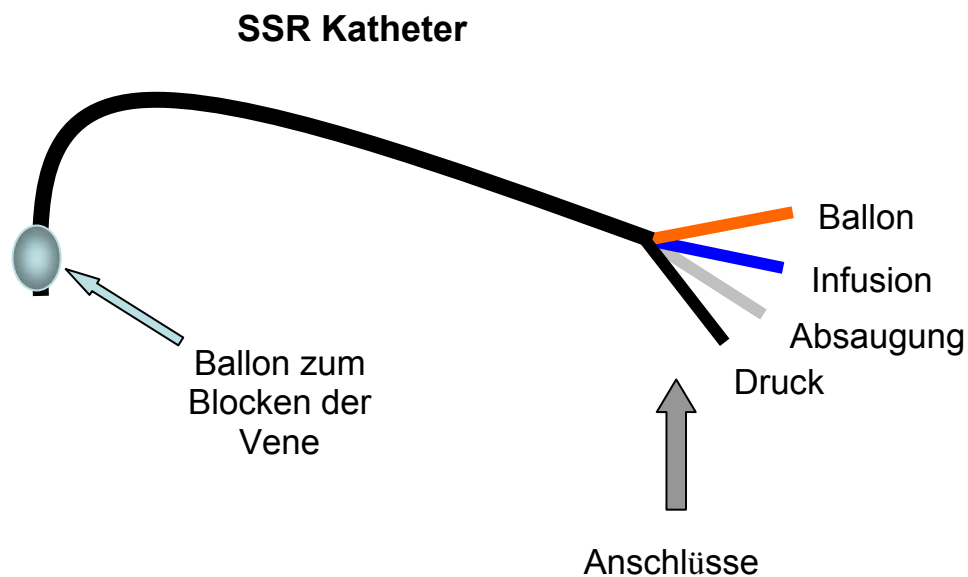
### **Selektive druck-regulierte Retroinfusion**

Neben der Wahl des Therapeutikums zur Behandlung des Ischämie/Reperfusionsschadens ist es wichtig sicher zu stellen, dass es auch zu einer adäquaten Anreicherung im Zielgebiet kommt. Man unterscheidet grundsätzlich zwei

verschiedene Applikationsarten: Die systemische und die regionale (chirurgisch und katheter-basiert) Applikation. Die regionale Applikation wird wiederum in eine antegrade Applikation, eine retrograde Applikation und eine intramyokardiale Direktinjektion unterschieden.

Die systemische intravenöse Applikation ist die einfachste Applikationsart, da hierzu lediglich ein peripherer venöser Zugang nötig ist, über den die Substanz verabreicht werden kann. Für die regionalen Applikationen jedoch muss ein Zugang zum Herzen gewählt werden. Hierbei kommt zum einen die direkte intramyokardiale Injektion in Frage. Diese kann zum einen mittels eines Katheters von dem linken Ventrikellumen aus durchgeführt werden (perkutan) (Perin et al. 2003). Alternativ wird ein chirurgischer Zugang zum Herzen gewählt (Thorakotomie). Da der chirurgische Zugang sehr invasiv und aufwändig ist, wird dieser in der Regel nur bei Patienten angewendet, die sich einer Operation am offenen Herzen unterziehen müssen (Bypass-Operation), oder in experimentellen Ansätzen (Hendriks et al. 2006, Wang et al. 2008). Die antegrade Verabreichung von Substanzen erfolgt über einen perkutanen Zugang der Arteria Femoralis. Über diese wird ein Katheter bis in die Zielarterie vorgeführt. Die Applikation kann nun direkt über den Katheter durchgeführt werden, oder dieser Katheter wird als Führung für einen Ballon mit Applikationslumen verwendet. Vorteil der Ballon vermittelten Applikation ist, dass durch den Ballon der Zufluss zum Gefäß reduziert werden kann, so dass die zu verabreichende Substanz eine etwas längere Verweildauer hat.

Eine regionale Applikation über die Begleitvene des Zielgefäßes kann über ein spezielles System, die selektive druck-regulierte Retroinfusion (SSR) erfolgen (Boekstegers et al. 1998). Hierzu wird ein spezieller vier lumiger Katheter in die anteriore intraventrikuläre Herzvene (AIV) verbracht. Die Applikation erfolgt über eine druckgesteuerte Flussumkehr in der Vene (siehe Abbildung 3 und 4). Dabei sollte der erreichte Druck in der Vene 20 mm Hg über dem Verschlussdruck des Gefäßes liegen, um einer Schädigung des Endothels der Vene und somit auch des umliegenden Gewebes vorzubeugen. Bei Erreichen des Zieldruckes wird der Zufluss aus dem Hochdruckreservoir mittels eines Ventils unterbrochen. Die Applikation erfolgt generell EKG oder Druckkurven gesteuert und kann vom Intervall variiert werden, so dass die Kontaktzeit und auch die Druckanstiegs-Geschwindigkeit variabel sind.



*Abbildung 3: Schematische Darstellung des Retroinfusionskatheters. Dieser spezielle Katheter besteht aus vier Lumina und einem Ballon an der Katheterspitze. Der Ballon dient zur Blockade des Abflusses aus der Vene. Die vier Lumina unterteilen sich in einen Anschluss für den Ballon, einen für einen Druckmesser, ein Lumen für die Infusion und eines für eine Absaugung.*

In einer präklinischen und klinischen Studie wurde bereits gezeigt, dass während eines akuten Koronararterienverschlusses das ischämische Herzmuskelgewebe retrograd über die Koronarvene mit arteriellem Blut versorgt werden kann (Boekstegers et al. 1994, Boekstegers et al. 1998). Sicherheit und Effektivität dieses Verfahrens wurde an inzwischen über 300 behandelten Patienten nachgewiesen (Boekstegers et al. 1998). Im chronischen Ischämiemodell am Schwein konnte gezeigt werden, dass mit der Retroinfusion eine effektive und selektive Applikation von Medikamenten (GSH und Cariporide), angiogenetischen Wachstumsfaktoren (FGF-2) sowie Reporter genen (Adenoviren und Liposomen) oder Zellapplikation möglich ist (Boekstegers et al. 2000, Kupatt et al. 2004a/b, Kupatt et al. 2005a).

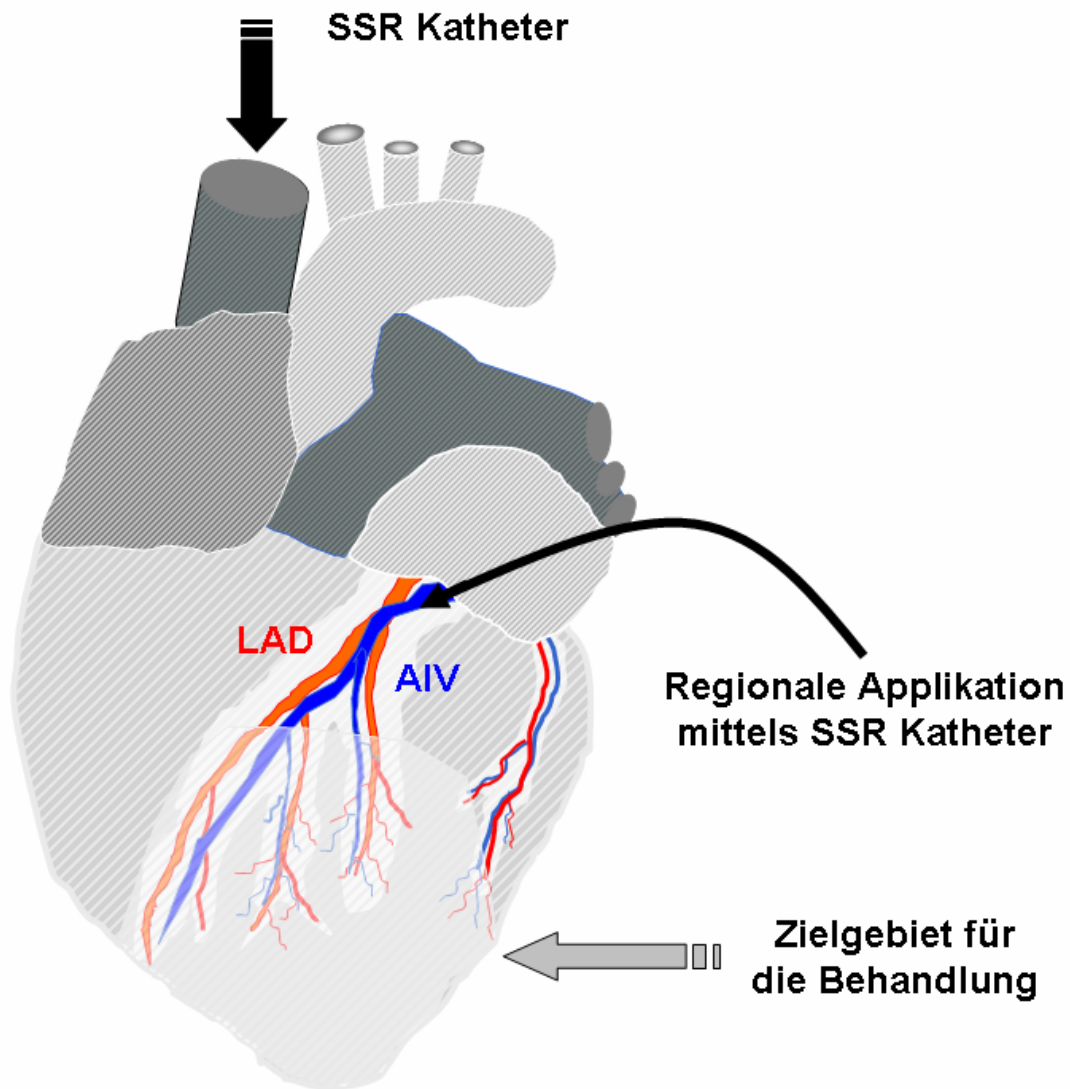


Abbildung 4: Schematische Darstellung der regionalen Applikation mittels Retroinfusionskatheter. Der Spezialkatheter wird durch die Vena Cava in den gemeinsamen Venensinus eingebracht, dann wird der Katheter selektiv in die anteriore Herzvene vorgeschoben. Dort wird der Abfluss mittels Ballon blockiert, so dass die Applikation entgegen der eigentlichen Flussrichtung durchgeführt werden kann. Dadurch kann das von der linken anterioren Herzerarterie (LAD) versorgte Gebiet über die Vene retrograd perfundiert werden (grau schraffierte Fläche).



In beiden Protokollen konnte darüber hinaus eine signifikant höhere Effektivität im Vergleich zum antegraden Applikationsweg in die Koronararterie gezeigt werden. Des Weiteren war die retrograde Applikation auch der Direktinjektion überlegen, unabhängig von epikardialer oder endokardialer Injektion (Raake et al. 2004). Durch die selektive druckregulierte Retroinfusion kommt es zu einer homogenen Verteilung mit einem epikardialen Schwerpunkt (Raake et al. 2008). Diese Befunde belegen, dass mit der Retroinfusion ein klinisch einsetzbares Applikationsverfahren zur Verfügung steht, mit dem pharmakologische Substanzen, Genvektoren und auch Zellen effektiv, mit einer homogenen räumlichen Verteilung, in das myokardiale Zielareal eingebracht werden können.

### **Fragestellung**

In vorliegender Studie haben wir embryonale endotheliale Progenitorzellen eingesetzt, um deren therapeutisches Potential im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens zu untersuchen. Dabei wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- 1) Welche Bedeutung hat das Thymosin  $\beta$ 4 der embryonalen endothelialen Progenitorzellen für deren kardioprotektiven Effekt?
- 2) In wie weit wirkt die regionale Applikation von Thymosin  $\beta$ 4 Protein nach Ischämie/Reperfusion kardioprotektiv?
- 3) Welche der Zellkompartimente, die durch den Ischämie-Reperfusionsschaden geschädigt werden, werden durch die therapeutische Intervention mittels embryonalen endothelialen Progenitorzellen oder Thymosin  $\beta$ 4 günstig beeinflusst?

## ***Thymosin $\beta$ 4 Is an Essential Paracrine Factor of Embryonic Endothelial Progenitor Cell–Mediated Cardioprotection***

Rabea Hinkel, DVM; Chiraz El-Aouni, PhD; Tonia Olson, DVM; Jan Horstkotte, MD; Stefan Mayer; Sebastian Müller; Michael Willhauck, MD; Christine Spitzweg, MD; Franz-Josef Gildehaus, PhD; Wolfgang Münzing, PhD; Ewald Hannappel, PhD; Ildiko Bock-Marquette, PhD; J. Michael DiMaio, MD; Antonis K. Hatzopoulos, PhD; Peter Boekstegers, MD<sup>\*</sup>; Christian Kupatt, MD<sup>\*</sup>

From Medizinische Klinik I (R.H., C.E.-A., T.O., J.H., S. Mayer, S. Müller, P.B., C.K.), Internal Medicine II (M.W., C.S., E.H.), and Department of Nuclear Medicine (F.G., W.M.), University Clinic Grosshadern, Munich, Germany; Institute for Biochemistry (M.W., C.S., E.H.), Friedrich-Alexander University Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany; Department of Cardiovascular and Thoracic Surgery (I.B.-M., J.M.D.), University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas; and Department of Medicine, Division of Cardiovascular Medicine and Department of Cell and Developmental Biology (A.K.H.), Vanderbilt University, Nashville, Tenn.

Correspondence to Christian Kupatt, University of Munich, Medizinische Klinik I, Klinikum Großhadern, Universität München, Marchioninistrasse 15, München, Germany D-81377. E-mail christian.kupatt@med.uni-muenchen.de

Received August 2, 2007; accepted February 21, 2008.

Published in Circulation 2008;117:2232-2240

## Abstract

**Background—** Prolonged myocardial ischemia results in cardiomyocyte loss despite successful revascularization. We have reported that retrograde application of embryonic endothelial progenitor cells (eEPCs) provides rapid paracrine protection against ischemia-reperfusion injury. Here, we investigated the role of thymosin  $\beta$ 4 (T $\beta$ 4) as a mediator of eEPC-mediated cardioprotection.

**Methods and Results—** In vitro, neonatal rat cardiomyocytes were subjected to hypoxia-reoxygenation in the absence or presence of eEPCs with or without T $\beta$ 4 short hairpin RNA (shRNA) transfection. In vivo, pigs (n=9 per group) underwent percutaneous left anterior descending artery occlusion for 60 minutes on day 1. After 55 minutes of ischemia, control eEPCs ( $5 \times 10^6$  cells) or cells transfected with T $\beta$ 4 shRNA when indicated or 15 mg T $\beta$ 4 alone were retroinfused into the anterior interventricular vein. Segmental endocardial shortening in the infarct zone at 150-bpm atrial pacing, infarct size (triphenyl tetrazolium chloride viability and methylene blue exclusion), and inflammatory cell influx (myeloperoxidase activity) were determined 24 hours later. Survival of neonatal rat cardiomyocytes increased from  $32 \pm 4\%$  to  $90 \pm 2\%$  after eEPC application, an effect sensitive to shRNA transfection compared with T $\beta$ 4 ( $45 \pm 7\%$ ). In vivo, infarct size decreased with eEPC application ( $38 \pm 4\%$  versus  $54 \pm 4\%$  of area at risk;  $P < 0.01$ ), an effect abolished by T $\beta$ 4 shRNA ( $62 \pm 3\%$ ). Segmental subendocardial shortening improved after eEPC treatment ( $22 \pm 3\%$  versus  $-3 \pm 4\%$  of control area) unless T $\beta$ 4 shRNA was transfected ( $-6 \pm 4\%$ ). Retroinfusion of T $\beta$ 4 mimicked eEPC application (infarct size,  $37 \pm 3\%$ ; segmental endocardial shortening,  $34 \pm 7\%$ ). Myeloperoxidase activity ( $3323 \pm 388$  U/mg in controls) was decreased by eEPCs ( $1996 \pm 546$  U/mg) or T $\beta$ 4 alone ( $1455 \pm 197$  U/mg) but not T $\beta$ 4 shRNA-treated eEPCs ( $5449 \pm 829$  U/mg).

**Conclusion—** Our findings show that short-term cardioprotection derived by regional application of eEPCs can be attributed, at least in part, to T $\beta$ 4.

**Key Words:** progenitor cells • ischemia • molecular biology • myocardial infarction • reperfusion

## Introduction

Since the landmark studies of Asahara and coworkers<sup>1</sup> and Rafii et al,<sup>2</sup> the bone marrow has been viewed as a source of circulating endothelial progenitor cells (EPCs), which contribute to endothelialization after vascular injury, angiogenesis in response to ischemia, and reversal of endothelial dysfunction. In addition to the identification of circulating EPCs as prognostic markers in coronary artery disease,<sup>3,4</sup> therapeutic aspects have been investigated in the field of myocardial protection after ischemic events. In contrast to mostly inefficient attempts to enhance mobilization of EPCs from the bone marrow by, for example, granulocyte colony-stimulating factor,<sup>5–8</sup> Ficol gradient–enriched progenitor cells from the bone marrow resident pool were successfully applied in a randomized placebo-controlled study,<sup>9</sup> even though not reproduced in a smaller trial<sup>10</sup> that applied a different cell conservation protocol.<sup>11</sup>

With regard to the mechanism of action of circulatory progenitor cells, paracrine supply of growth and survival factors for vascular<sup>12,13</sup> and parenchymal cells<sup>14,15</sup> has gained recent support. Consistent with this paradigm, embryonic endothelial cells exert postischemic cardioprotection by paracrine factors activating the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT signaling pathway in cardiomyocytes in vitro and in vivo.<sup>16</sup> Screening the transcriptome of the embryonic EPC (eEPC) population by the Affymetrix array technique revealed that among the known PI3K/AKT activating factors, thymosin  $\beta$ 4 (T $\beta$ 4), a short peptide of 43 amino acids, is expressed most abundantly.<sup>17</sup> Because T $\beta$ 4 has recently been reported to exert a profound cardioprotective effect after exogenous application in an acute myocardial infarction model in mice,<sup>18</sup> we hypothesized that this peptide is of relevance for eEPC-derived cardioprotection after ischemia and reperfusion in a preclinical pig model. Therefore, in the present study, we modulated the T $\beta$ 4 production of eEPCs by specific short hairpin RNA (shRNA) transfection or exogenously applied T $\beta$ 4 via retroinfusion and investigated the corresponding postischemic myocardial injury.

## Methods

### Animals

German pigs were purchased from a local farm (Oberschleissheim, Germany). Animal care and all experimental procedures were performed in strict accordance to the German and National Institutes of Health animal legislation guidelines and were approved by the local animal care and use committees.

### Reagents

All chemicals were purchased from Sigma (Deisenhofen, Germany). Contrast agent Solutrast 370 was provided by Byk Gulden (Konstanz, Germany). <sup>125</sup>I and <sup>123</sup>I were from Amersham/GE (Braunschweig, Germany).

### eEPC Studies

Mouse eEPCs were generated by isolating genetically marked cells from a transgene mouse strain carrying a  $\beta$ -galactosidase reporter gene instead of 1 thrombomodulin allele.<sup>19</sup> Cells were selected by reporter gene expression, cultivated on a feeder layer as isolated colonies, and then propagated on gelatin-coated plates.<sup>20</sup> All experiments were performed with cells of an individual colony. shRNAs were obtained with the pSuperior.retro kit from Oligoengine (Seattle, Wash) according to the manufacturer's instructions. Sequences for scrambled shRNA were 5'-TTCTCCGAAC-GTGTCACGT-3' and 5'-ACGTGACACGTTCCGGAGAA-3' and for T $\beta$ 4 were 5'-AGAAGCAA-GCTGGCGAATCGTAA-3' and 5'-TTACGATTGCGCC-AGCTTGCTTCT-3'. Transfection of eEPCs with shRNA was performed with Lipofectamine (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Verification of shRNA efficacy was achieved by real-time polymerase chain reaction.

### RNA Modulation and Detection

Total RNA was extracted from eEPCs, treated with DNaseI (Invitrogen), and converted to cDNA. Real-time polymerase chain reaction was performed with SYBR green dye (iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad, Munich, Germany) and run on the iQ-Cycler (Bio-Rad). Primer pairs for T $\beta$ 4 were 5'-CACGAGCATTGCCTTCTTAT-3' and 5'-TCTCTGCTAGCCA-GACCATC-3'. These were normalized to GAPDH (5'-AATTCAACGGCACAGTCAAG-3' and 5'-ATGGTGGT-GAAGACACCAGT-3').

Polymerase chain reaction–amplified products also were separated electrophoretically on 2% agarose gels to confirm that single bands were amplified (data not shown). shRNAs were obtained using the pSuperior.retro kit from Oligoengine according to the manufacturer's instructions. Sequences for scrambled shRNA were 5'-TTCTCCGAAC-GTGTCACGT-3' and 5'-ACGTGACACGTTCGGAGAA-3' and for T $\beta$ 4 were 5'-AGAAGCAA-GCTGGCGAATCGTAA-3' and 5'-TTACGATTGCGCC-AGCTTGCTTCT-3'.

#### **Cardiomyocyte and Endothelial Cell Culture**

Rat neonatal ventricular cardiomyocytes were prepared as previously described.<sup>16</sup> After plating on 6-well plates, hypoxia was induced for 4 hours, followed by reoxygenation for 1 hour. When indicated, eEPCs were placed in a permeable insert (Biocoat, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) in the well before hypoxia. The T $\beta$ 4 antibody sc-32405 was from Santa Cruz (Heidelberg, Germany). At the end of the experiment, Trypan blue was added for 2 minutes, and 5 microscopic fields were photographed and quantified (Zeiss AxioVision, Göttingen, Germany). Rat neonatal coronary endothelial cells were obtained by collagenase and trypsin digestion of neonatal rat hearts, seeding for 1 hour on collagen-coated dishes, removal of nonadherent cells, and cultivation in DMEM containing 10% FBS. Neonatal coronary endothelial cells were subjected to hypoxia (18 hours) and reoxygenation (4 hours). Thereafter, cells were fixated with paraformaldehyde (4% in PBS) and analyzed with a commercial terminal deoxynucleotidyl transferase–mediated dUTP nick-end labeling staining kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Application of eEPCs with or without T $\beta$ 4 shRNA was performed at the onset of hypoxia.

#### **Leukocyte Adhesion**

To test the influence of eEPCs or T $\beta$ 4 on leukocyte adhesion under flow conditions, we seeded primary endothelial cells on microslides (ibidi, Martinsried, Germany). After incubation with eEPCs (50 000 per slide for 4 hours) or T $\beta$ 4 transfection (24 hours before the experiment with Effectene, Qiagen, Hilden, Germany), microslides were subjected to endothelial activation by interleukin 1 $\beta$  (10 ng/mL). Then, we superfused Dil-labeled monocytic cells (THP-1, a gift from P. Nelson, Munich, Germany) at 4 mL/h for 10

minutes. Slides were then rinsed with PBS for 3 minutes. Finally, adherent cells were quantified in 10 high-power fields per slide under fluorescence microscopy.

#### **Pig Ischemia-Reperfusion Model**

All pig experiments were conducted at the Institute for Surgical Research at the University of Munich. Pigs (n=9 per experimental group) were anesthetized and instrumented as described previously.<sup>16</sup> Briefly, a balloon was placed in the left anterior descending artery (LAD) distal to the bifurcation of the first diagonal branch and inflated with 4 atm (0.41 MPa). Correct localization of the coronary occlusion and patency of the first diagonal branch were ensured by injection of contrast agent. Animals with an obviously abnormal perfusion pattern (area at risk [AAR] <25% of the left ventricle and/or infarct size <20% of AAR) were excluded from further analysis (n=2).

#### **eEPC Application**

As described in detail before,  $5 \times 10^6$  eEPCs or 15 mg T $\beta$ 4 (supplied by I. Bock-Marquette, University of Texas, Dallas) was retroinfused into the anterior interventricular vein, draining the LAD-perfused myocardium, after 55 minutes of ischemia for 10 minutes.<sup>16</sup> In all groups, the percutaneous transluminal coronary angioplasty balloon was deflated after 60 minutes of ischemia, and the onset of reperfusion was documented angiographically.

#### **Hemodynamic and Tissue Measurements**

After 24 hours of reperfusion, sternotomy was performed and ultrasonic crystals were placed in the noninfarcted and infarcted AAR, as well as in the circumflex perfusion area in a standardized manner. Subendocardial segment shortening was performed under resting heart rate and at 120- and 150-bpm atrial pacing (for 1 minute each). After assessment of infarct size (triphenyl tetrazolium chloride viability and methylene blue exclusion), myeloperoxidase assays were performed as previously described.<sup>16</sup>

#### **Radioactive Labeling of eEPCs**

To assess recruitment of native and T $\beta$ 4 shRNA-treated eEPCs to the ischemic region, tracking via a well-described sodium iodide symporter (NIS) was used.<sup>21,22</sup> eEPCs were

stably transfected with an NIS-containing plasmid (pCDNA3-CMV-NIS, provided by Dr S.M. Jhiang, Ohio State University, Columbus) using Lipofectamine. After selection by G418 for 2 weeks, surviving cell clones were isolated and subjected to screening for  $^{125}\text{I}$  uptake activity as described earlier.<sup>23</sup>

In vivo,  $^{123}\text{I}$  (40 MBq) was systemically applied 24 hours after ischemia. Twenty-five minutes later, hearts were excised. The tissue in the LAD and right circumflex region was separated according to an established segmentation pattern<sup>24</sup> and then analyzed for  $^{123}\text{I}$  accumulation by gamma counter analysis.

### **High-Performance Liquid Chromatography Analysis**

The concentration of T $\beta$ 4 was determined as described.<sup>25,26</sup> Briefly, cells were disrupted by adding perchloric acid to the cell suspension to a final concentration of 0.4 mol/L. After incubating for 30 minutes on ice, the mixture was centrifuged for 5 minutes at 20 000g. The supernatant solution was adjusted to pH 4 with NaOH, and an aliquot of the sample was analyzed by reverse-phase high-performance liquid chromatography.<sup>27</sup>

### **Statistical Analysis**

The results are given as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was done with 1-way ANOVA (SPSS 13.0, SPSS Inc, Chicago, Ill) and, where appropriate, 2-way ANOVA (Figures 2C and 4C) or 2-way ANOVA with repeated measures on 1 factor (Figures 3D, 3E, 6C, and 6D) (SigmaStat, Systat Software Inc, Chicago, Ill). Whenever a significant effect was obtained with ANOVA, we used multiple-comparison tests between groups with the Student-Newman-Keul procedure. Comparisons of 2 groups were performed by 2-sided independent *t* tests.

## **Results**

To evaluate the role of T $\beta$ 4 in vivo, transient downregulation of its RNA was attempted by shRNA transfection. As depicted in Figure 1A and 1B, this approach yielded a downregulation by 77% of the T $\beta$ 4 mRNA. In accordance, the content of T $\beta$ 4 per cell decreased from 400 to 150 fg after T $\beta$ 4 shRNA transfection (data not shown). In vitro, T $\beta$ 4-specific shRNA transfection or an antibody directed against T $\beta$ 4 decreased the



survival of eEPC-treated cardiomyocytes to the extent of untreated control cells (Figure 1C and 1D). Vice versa, U293 cells, which do not contain T $\beta$ 4, had no beneficial effect on cardiomyocyte survival unless T $\beta$ 4 was transfected (Figure 1D). Endothelial apoptosis after hypoxia and reoxygenation was inhibited by eEPCs unless T $\beta$ 4 was knocked down (Figure 1E). Again, U293 cell cocultivation did not alter endothelial apoptosis unless T $\beta$ 4 was transfected.

Encouraged by the notion of a T $\beta$ 4-mediated protection of cardiomyocytes and endothelial cells in vitro, we conducted in vivo experiments of ischemia and reperfusion (see Methods). To exclude an impact of T $\beta$ 4 shRNA on the adhesion capability of eEPCs in the postischemic myocardium, we used an NIS-expressing eEPC population (Figure 2A and 2B) that was transfected with T $\beta$ 4 or control shRNA (see Methods). By virtue of the selectivity of the NIS, <sup>123</sup>I is taken up exclusively by the thyroid gland and NIS-transfected cells.<sup>22</sup> Scintigraphic analysis of the LAD- and right circumflex-related perfusion area at 24 hours revealed a selective recruitment to the LAD perfused myocardium without a difference caused by T $\beta$ 4 shRNA transfection (Figure 2C).

Applying eEPCs pretreated with T $\beta$ 4 shRNA, however, was found to reduce the benefit of smaller infarct sizes accomplished by untreated, or control, shRNA-transfected eEPCs (Figure 3A through 3C). The impact of T $\beta$ 4 shRNA treatment on eEPC retroinfusion consistently translated into a decrease in regional myocardial function as assessed by subendocardial segment shortening (Figure 3D). Moreover, a strong trend toward a gain in dP/dtmax, a marker of global systolic left ventricular function,<sup>28</sup> which was accomplished by eEPC treatment ( $P=0.052$ ), was absent in the case of T $\beta$ 4 shRNA-transfected eEPCs (Figure 3E).

One important prognostic parameter of myocardial ischemia-reperfusion injury is postischemic inflammation. In vitro, eEPCs were capable of reducing the amount of adhesive inflammatory cells on an activated endothelial layer under flow conditions (Figure 4A and 4B). In vivo, leukocyte influx into the infarcted region, assessed by myeloperoxidase activity, was limited after application of eEPCs as opposed to T $\beta$ 4 shRNA eEPCs (Figure 4C).

To further assess the cardioprotective capability of T $\beta$ 4, we considered 2 options: application of T $\beta$ 4 cDNA in a liposomal formulation, which has been successfully applied before,<sup>29,30</sup> or application of a recombinant protein. Because from a clinical perspective the gene transfer approach implies the disadvantage of treatment 2 days before the ischemic event, we decided to use recombinant T $\beta$ 4. In vitro, T $\beta$ 4 protein was able to protect posthypoxic, reoxygenated myocytes and endothelial cells (Figure 5A and 5B). Moreover, leukocyte adhesion was reduced by T $\beta$ 4 in vitro (Figure 5C) and in vivo (Figure 5D). Finally, T $\beta$ 4 retroinfusion at the end of the ischemic interval displayed cardioprotection similar to eEPC retroinfusion; infarct size was reduced to 37 $\pm$ 3% (Figure 6A and 6B), whereas segmental subendocardial shortening increased (from –4 $\pm$ 3% to 26 $\pm$ 5% of the nonischemic region at 150 bpm; Figure 6C). Consistently, global systolic function (dP/dtmax) was found to be increased at rapid pacing (Figure 6D).

Taken together, these results show that T $\beta$ 4, which has cardioprotective properties during hypoxia and reoxygenation in vitro, limits the extent of ischemia-reperfusion injury in vivo if present in large amounts in eEPCs or if applied solely as protein. Consistently, a reduction in T $\beta$ 4 expression by shRNA diminishes the cardioprotection achieved by an eEPC population, indicating that T $\beta$ 4 is an essential factor in the acute, eEPC-mediated cardioprotection in vitro and in vivo.

## Discussion

In the present study, we investigated the mechanism of cardioprotection observed after transplantation of eEPCs.<sup>17</sup> Given the recent finding that the PI3K/AKT signaling pathway is critically involved in eEPC-mediated limitation of ischemia-reperfusion injury, we screened the eEPC transcriptome for genes encoding secreted proteins capable of activating this pathway.<sup>17</sup> We found that T $\beta$ 4, one of the most highly expressed AKT-activating factors in our eEPC population, is indeed essential for cardiomyocyte protection in vitro. In particular, T $\beta$ 4 downregulation by shRNA or an anti-T $\beta$ 4 antibody blocked the eEPC-mediated increase in cardiomyocyte survival (Figure 1). Moreover, endothelial apoptosis and adhesion of inflammatory cells were blunted by eEPCs unless T $\beta$ 4 was knocked down (Figures 1E, 4A, and 4B). In vivo, the decrease in infarct size

and postischemic inflammation and the increase in left ventricular function achieved by eEPC retroinfusion were blocked by T $\beta$ 4 shRNA pretreatment of the eEPCs (Figures 3 and 4C). Confirming the relevance of eEPC-borne T $\beta$ 4, exogenous application of the polypeptide in vivo mimicked the cardioprotection achieved by eEPCs (Figures 5 and 6).

Because T $\beta$ 4 interacts with G-actin and enhances the migratory capacity of differentiated endothelial cells<sup>31</sup> and epicardial vascular progenitor cells in the developing heart,<sup>32</sup> we addressed the possibility of an impaired eEPC recruitment of T $\beta$ 4 knockdown cells in a subset of experiments. A population of eEPCs expressing NIS, which is otherwise confined to the thyroid gland,<sup>22</sup> was analyzed for recruitment to the heart by measurement of <sup>123</sup>I accumulation. Using this scintigraphic approach, we could rule out an impairment of eEPC recruitment as a potential mechanism for the loss of eEPC-mediated cardioprotection after T $\beta$ 4 knockdown (Figure 2).

The beneficial effect of eEPCs may be achieved by 2 distinct principles: by providing building blocks for novel tissue, ie, vasculature or cardiomyocytes, or by providing paracrine factors as software for cell survival and healing.<sup>33</sup> The eEPC population did not display hallmarks of transdifferentiation, ie, Oct-4 expression or GATA-4 activation, in vitro (data not shown). Moreover, the number of recovered eEPCs declined and was undetectable at day 14 after application in a model of chronic hind-limb ischemia, although a proangiogenic effect persisted at later time points. Therefore, the supply of software by eEPCs aimed at resolving acute and chronic ischemic syndromes appears more likely. This possibility has previously been related to the PI3K/AKT pathway,<sup>16</sup> which is potentially activated by a variety of eEPC-borne candidate factors.<sup>17</sup> Among PI3K/AKT activators, the highly expressed T $\beta$ 4 emerged as a likely candidate because of its functional profile. Other proangiogenic factors such vascular endothelial growth factor-A, platelet-derived growth factor-BB, and insulin-like growth factor-1 are expressed at much lower levels. Moreover, the highly expressed wnt agonists wnt7b and wnt11, activating PI3K/AKT signaling, are not known for cardioprotection (as opposed to the wnt antagonist FrzA<sup>34</sup>). Other PI3K/AKT activators such as macrophage migration inhibitory factor<sup>35</sup> would counteract the antiinflammatory effect observed in our study (Figure 4).

On the other hand, T $\beta$ 4 reduced infarct size in a chronic murine LAD occlusion model, requiring PI3K/AKT signaling.<sup>18</sup> Moreover, T $\beta$ 4 is capable of mediating angiogenesis in a long-term time course.<sup>32,36</sup>

The short-term protection of reperfused myocardium, which was targeted in the present study, may involve several distinct capabilities of T $\beta$ 4. In vitro T $\beta$ 4 incubation blocks cardiomyocyte death after hypoxia and reoxygenation, comparable to the paracrine effect of eEPCs, unless T $\beta$ 4 is largely diminished by shRNA transfection (Figures 1D and 5A). Moreover, T $\beta$ 4 is capable of reducing endothelial apoptosis after the hypoxia-reoxygenation protocol, again similar to the T $\beta$ 4-containing eEPCs (Figure 1E, Figure 5B). In previous studies, we found that protection of endothelial cells, eg, by endothelial nitric oxide synthase or vascular endothelial growth factor cDNA transfection,<sup>29</sup> sufficed to reduce infarct size in our model.

Notably, in all of these studies in the pig ischemia-reperfusion model, a reduction in postischemic inflammation was observed. A reduced polymorphonuclear neutrophil influx also has been found after preconditioning and postconditioning<sup>37</sup> and erythropoietin.<sup>38</sup> On the other hand, a direct antiinflammatory effect of T $\beta$ 4 has been described earlier.<sup>39</sup> In the present study, we confirm that T $\beta$ 4 decreased the adhesion of inflammatory cells in vitro and in vivo (Figure 5C and 5D).

Is T $\beta$ 4 a major player in adult EPC-mediated cardioprotection? Although adult porcine EPCs also contain about half of the T $\beta$ 4 content of embryonic eEPCs (data not shown), we refrained from applying adult EPCs at the end of ischemia because of the potentially harmful effects of contaminating inflammatory cells on microvasculatory function and inflammation. Consistent with this notion, a clinical trial using bone marrow–derived EPCs after >24 hours of reperfusion failed to document a cardioprotective effect,<sup>40</sup> as opposed to the successful Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction (REPAIR-AMI) study, which applied circulating EPCs after 4 days of reperfusion.<sup>9</sup> However, we caution against extrapolation of our data to other sources of EPCs, which may differ with respect to adhesion, migration, and paracrine effector profiles.

Taken together, these results show that T $\beta$ 4 reveals a pleiotropic pattern of cardioprotection, including activation of cardiomyocyte survival pathways, inhibition of endothelial apoptosis, and limitation of inflammatory cell recruitment. These mechanisms have been activated by eEPCs containing T $\beta$ 4 and by application of synthetic T $\beta$ 4. The therapeutic potential of early T $\beta$ 4 protein application might be of relevance in the setting of ischemia-reperfusion in patients because no side effects limiting its applicability in this scenario are known yet.

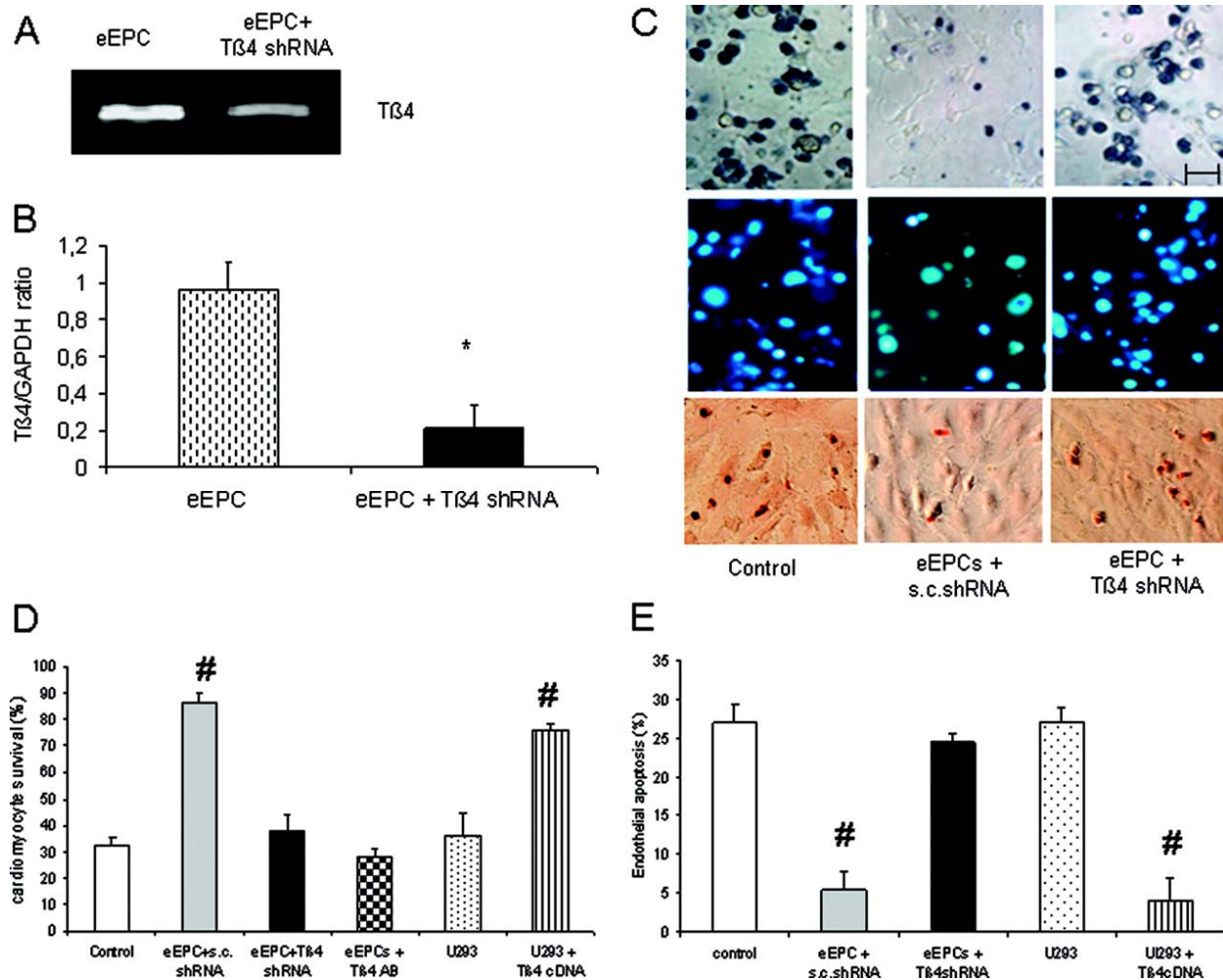
- (1) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der ZR, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-7.
- (2) Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998;92:362-7.
- (3) Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001;89:E1-E7.
- (4) Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Bohm M, Nickenig G. Circulating Endothelial Progenitor Cells and Cardiovascular Outcomes. *The New England Journal of Medicine* 2005;353:999-1007.
- (5) Ince H, Petzsch M, Kleine HD, Schmidt H, Rehders T, Korber T, Schumichen C, Freund M, Nienaber CA. Preservation From Left Ventricular Remodeling by Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Use of Granulocyte-Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINE-AMI). *Circ* 2005;112:3097-106.
- (6) Gyongyosi M, Khorsand A, Zamini S, Sperker W, Strehblow C, Kastrup J, Jorgensen E, Hesse B, Tagil K, Botker HE, Ruzylo W, Teresinska A, Dudek D, Hubalewska A, Ruck A, Nielsen SS, Graf S, Mundigler G, Novak J, Sochor H, Maurer G, Glogar D, Sylven C. NOGA-guided analysis of regional myocardial perfusion abnormalities treated with intramyocardial injections of plasmid encoding vascular endothelial growth factor A-165 in patients with chronic myocardial ischemia: subanalysis of the EUROINJECT-ONE multicenter double-blind randomized study. *Circ* 2005;112:1157-1165.
- (7) Zohlnhofer D, Ott I, Mehilli J, Schomig K, Michalk F, Ibrahim T, Meisetschlager G, von WJ, Bollwein H, Seyfarth M, Dirschinger J, Schmitt C, Schwaiger M, Kastrati A, Schomig A. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006;295:1003-10.
- (8) Engelmann MG, Theiss HD, Hennig-Theiss C, Huber A, Wintersperger BJ, Werle-Ruedinger AE, Schoenberg SO, Steinbeck G, Franz WM. Autologous Bone Marrow Stem Cell Mobilization Induced by Granulocyte Colony-Stimulating Factor After Subacute ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Undergoing Late Revascularization: Final Results From the G-CSF-STEMI (Granulocyte Colony-Stimulating Factor ST-Segment Elevation Myocardial Infarction) Trial. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1712-21.
- (9) Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Assmus B, Tonn T,

- Dimmeler S, Zeiher AM. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355:1210-21.
- (10) Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebekk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Groggaard HK, Bjornerheim R, Brekke M, Muller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang K. Intracoronary Injection of Mononuclear Bone Marrow Cells in Acute Myocardial Infarction. *The New England Journal of Medicine* 2006;355:1199-209.
- (11) Seeger FH, Tonn T, Krzossok N, Zeiher AM, Dimmeler S. Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2007;28:766-72.
- (12) Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circ* 2004;109:1543-9.
- (13) Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Yung S, Chimenti S, Landsman L, Abramovitch R, Keshet E. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 2006;124:175-89.
- (14) Urbich C, Aicher A, Heeschen C, Dernbach E, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol* 2005;39:733-42.
- (15) Wang X, Hu Q, Nakamura Y, Lee J, Zhang G, From AH, Zhang J. The role of the sca-1<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup> cardiac progenitor cell population in postinfarction left ventricular remodeling. *Stem Cells* 2006;24:1779-88.
- (16) Kupatt C, Hinkel R, Lamparter M, von Bruhl ML, Pohl T, Horstkotte J, Beck H, Muller S, Delker S, Gildehaus FJ, Buning H, Hatzopoulos AK, Boekstegers P. Retroinfusion of Embryonic Endothelial Progenitor Cells Attenuates Ischemia-Reperfusion Injury in Pigs: Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Kinase. *Circ* 2005;112:1117.
- (17) Kupatt C, Horstkotte J, Vlastos GA, Pfosser A, Lebherz C, Semisch M, Thalgott M, Buttner K, Browarzyk C, Mages J, Hoffmann R, Deten A, Lamparter M, Muller F, Beck H, Buning H, Boekstegers P, Hatzopoulos AK. Embryonic endothelial progenitor cells expressing a broad range of proangiogenic and remodeling factors enhance vascularization and tissue recovery in acute and chronic ischemia. *FASEB J* 2005;19:1576-8.
- (18) Bock-Marquette I, Saxena A, White MD, Michael DiMaio J, Srivastava D. Thymosin [beta]<sub>4</sub> activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature* 2004;432:466-72.

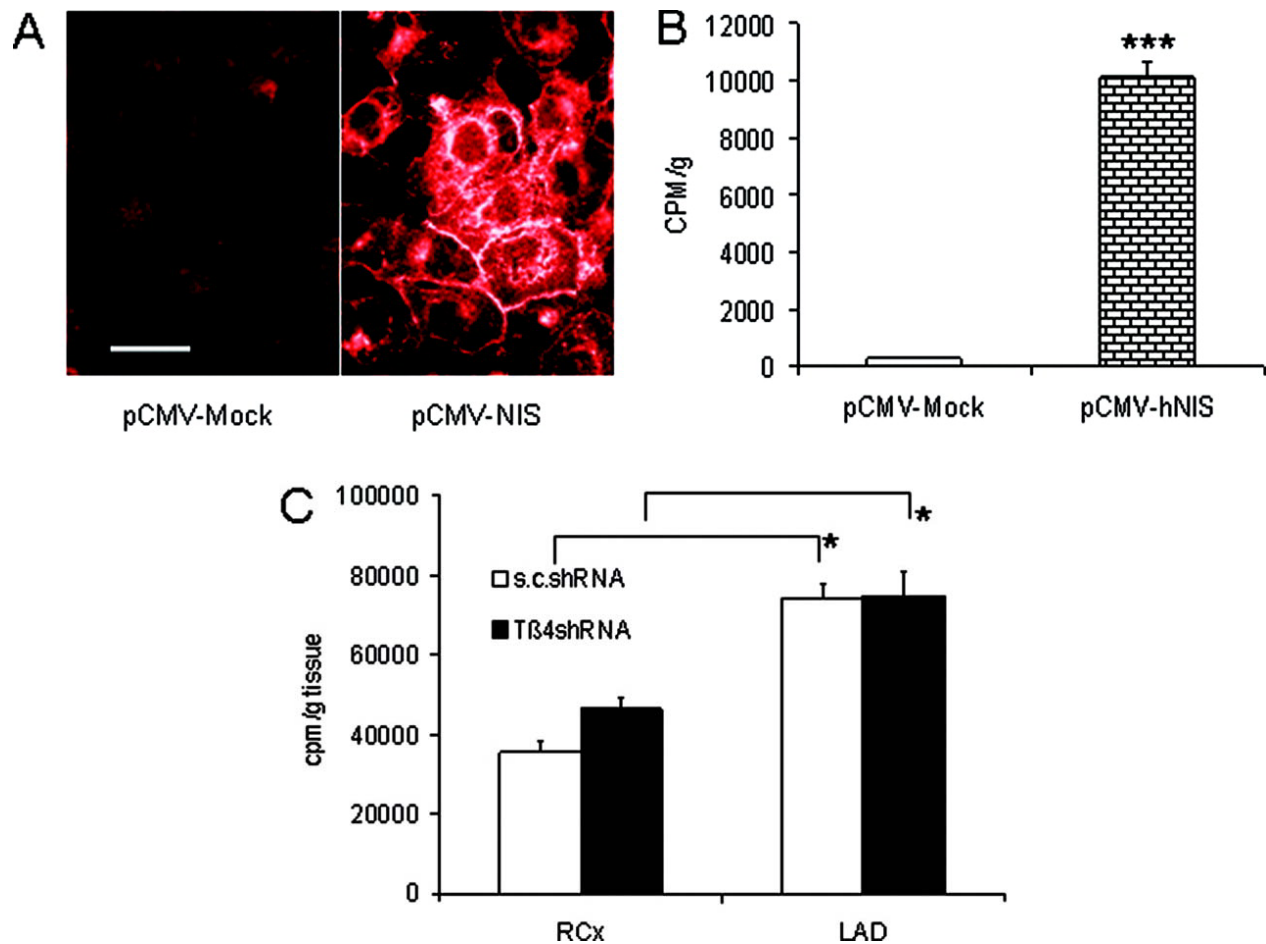
- (19) Weiler-Guettler H, Aird WC, Rayburn H, Husain M, Rosenberg RD. Developmentally regulated gene expression of thrombomodulin in postimplantation mouse embryos. *Development* 1996;122:2271-81.
- (20) Hatzopoulos AK, Folkman J, Vasile E, Eiselen GK, Rosenberg RD. Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from mouse embryos. *Development* 1998;125:1457-68.
- (21) Spitzweg C, Morris JC. The sodium iodide symporter: its pathophysiological and therapeutic implications. *Clinical Endocrinology* 2002;57:559-74.
- (22) Miyagawa M, Beyer M, Wagner B, Anton M, Spitzweg C, Gansbacher B, Schwaiger M, Bengel FM. Cardiac reporter gene imaging using the human sodium/iodide symporter gene. *Cardiovasc Res* 2005;65:195-202.
- (23) Weiss SJ, Philp NJ, Grollman EF. Iodide transport in a continuous line of cultured cells from rat thyroid. *Endocrinology* 1984;114:1090-8.
- (24) Raake P, von Degenfeld G, Hinkel R, Vachenauer R, Sandner T, Beller S, Andrees M, Kupatt C, Schuler G, Boekstegers P. Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins: comparison with surgical and percutaneous intramyocardial gene delivery. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1124-9.
- (25) Hannappel E. One-step procedure for the determination of thymosin beta 4 in small tissue samples and its separation from other thymosin beta 4-like peptides by high-pressure liquid chromatography. *Anal Biochem* 1986;156:390-6.
- (26) Hannappel E. beta-Thymosins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007;1112:21-37.
- (27) Huff T, Muller CSG, Hannappel E. Thymosin beta4 Is Not Always the Main beta-Thymosin in Mammalian Platelets. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007;1112:451-7.
- (28) Dell'Italia LJ, Evanochko WT, Blackwell GG, Pearce DJ, Pohost GM. Relationship between shortening load, contractility, and myocardial energetics in intact dog. *Am J Physiol* 1993;264:H2180-H2187.
- (29) Kupatt C, Hinkel R, Vachenauer R, Horstkotte J, Raake P, Sandner T, Kreuzpointner R, Muller F, Dimmeler S, Feron O, Boekstegers P. VEGF165 transfection decreases postischemic NF-kappa B-dependent myocardial reperfusion injury in vivo: role of eNOS phosphorylation. *FASEB J* 2003;17:705-7.
- (30) Kupatt C, Dessy C, Hinkel R, Raake P, Daneau G, Bouzin C, Boekstegers P, Feron O. Heat shock protein 90 transfection reduces ischemia-reperfusion-induced myocardial dysfunction via reciprocal endothelial NO synthase serine 1177 phosphorylation and threonine 495 dephosphorylation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1435-41.



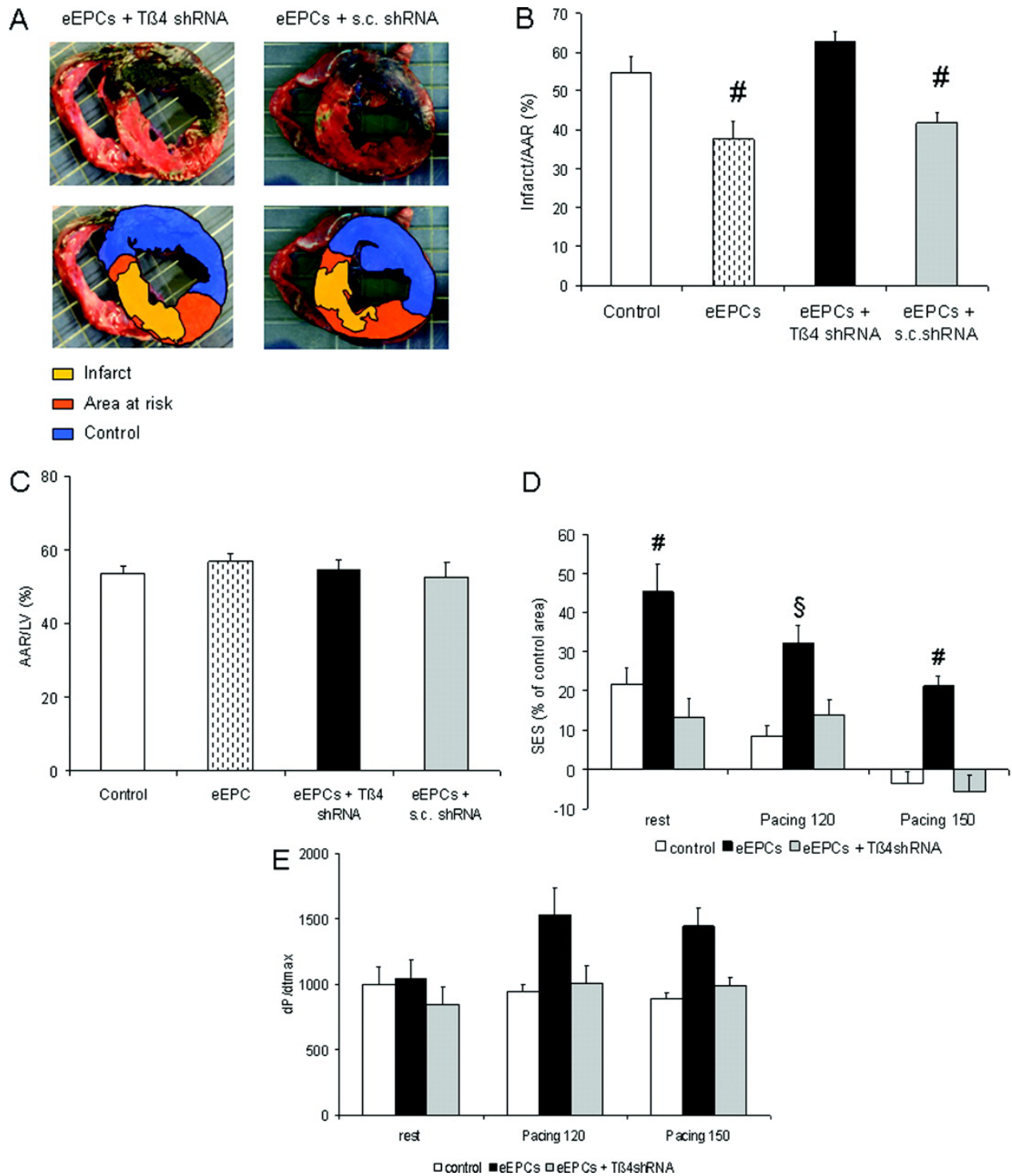
- (31) Malinda KM, Goldstein AL, Kleinman HK. Thymosin beta 4 stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J* 1997;11:474-81.
- (32) Smart N, Risebro CA, Melville AAD, Moses K, Schwartz RJ, Chien KR, Riley PR. Thymosin beta4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization. *Nature* 2007;445:177-82.
- (33) Heil M, Ziegelhoeffer T, Mees B, Schaper W. A different outlook on the role of bone marrow stem cells in vascular growth: bone marrow delivers software not hardware. *Circ Res* 2004;94:573-4.
- (34) Barandon L, Couffinhal T, Ezan J, Dufourcq P, Costet P, Alzieu P, Leroux L, Moreau C, Dare D, Duplaa C. Reduction of infarct size and prevention of cardiac rupture in transgenic mice overexpressing FrzA. *Circ* 2003;108:2282-9.
- (35) Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zerneck A, Koenen RR, Dewor M, Georgiev I, Schober A, Leng L, Kooistra T, Fingerle-Rowson G, Ghezzi P, Kleemann R, McColl SR, Bucala R, Hickey MJ, Weber C. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med* 2007;13:587-96.
- (36) Philp D, Huff T, Gho YS, Hannappel E, Kleinman HK. The actin binding site on thymosin beta4 promotes angiogenesis. *FASEB J* 2003;17:2103-5.
- (37) Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H579-H588.
- (38) Rui T, Feng Q, Lei M, Peng T, Zhang J, Xu M, Dale Abel E, Xenocostas A, Kvietys PR. Erythropoietin prevents the acute myocardial inflammatory response induced by ischemia/reperfusion via induction of AP-1. *Cardiovasc Res* 2005;65:719-27.
- (39) Badamchian M, Fagarasan MO, Danner RL, Suffredini AF, Damavandy H, Goldstein AL. Thymosin [beta]4 reduces lethality and down-regulates inflammatory mediators in endotoxin-induced septic shock. *International Immunopharmacology* 2003;3:1225-33.
- (40) Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van CJ, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, Van de WF. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2006;367:113-21.



**Figure 1.** Effect of Tβ4 shRNA on eEPC-mediated cardiomyocyte and endothelial cell survival after hypoxia-reoxygenation. Example (A) and quantification (B) of the reduction of Tβ4 by shRNA. C, Examples of neonatal cardiomyocyte survival (Trypan blue exclusion, top) after 4 hours of hypoxia and 1 hour of reoxygenation with or without coapplication of eEPCs transfected by scrambled (s.c.) or Tβ4 shRNA (bar=20 μm). D, eEPCs but not U293 cells displayed cardiomyocyte protection. The effect of eEPCs was blunted by Tβ4 shRNA or Tβ4 antibody application, whereas U293 cells provided cardioprotection after Tβ4 transfection. E, Neonatal endothelial cells underwent apoptosis after 18 hours of hypoxia and 4 hours of reoxygenation unless eEPCs or Tβ4-transfected U293 cells were applied. \* $P < 0.05$  vs eEPC; # $P < 0.05$  vs control, eEPCs plus Tβ4 shRNA, and U293 cells (n=4 independent experiments).

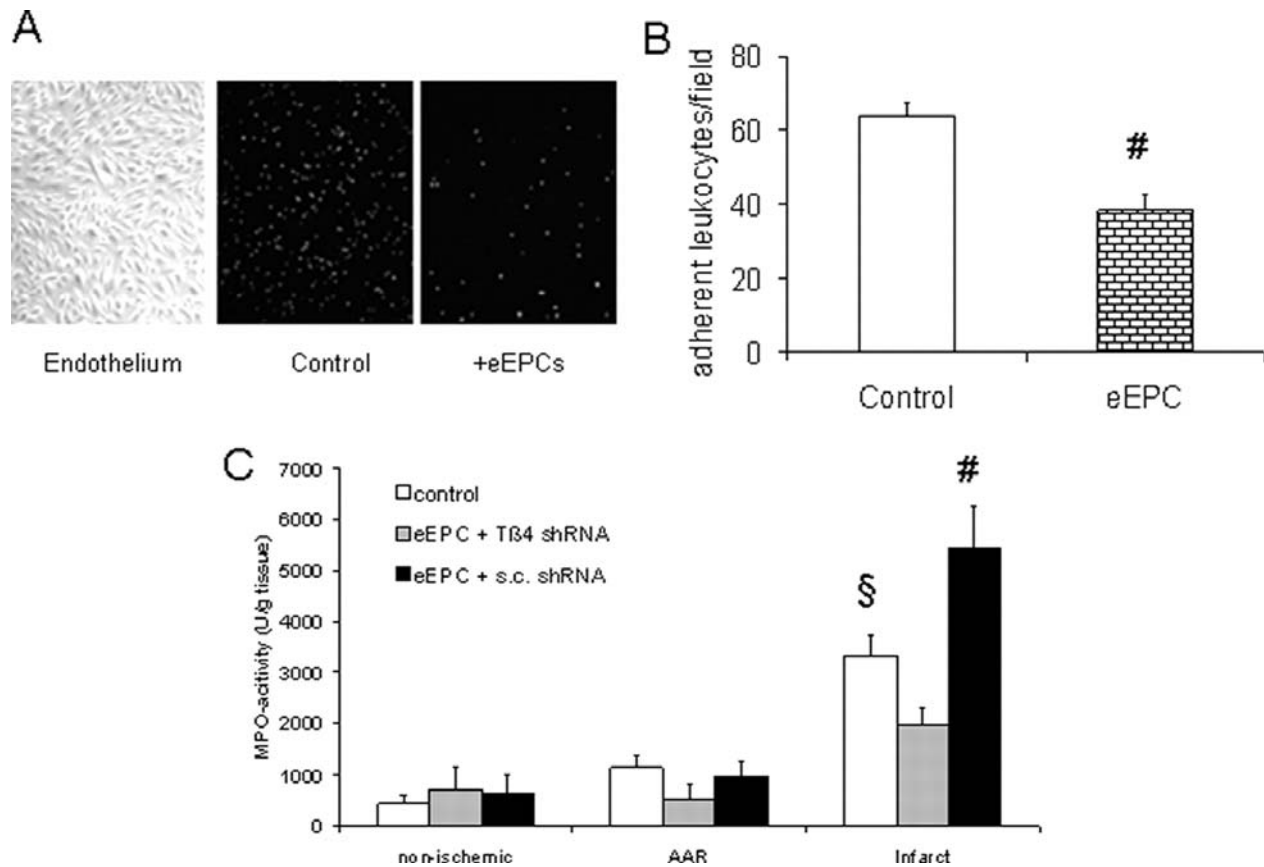


**Figure 2.** Effect of T $\beta$ 4 shRNA on eEPC adhesion. A, Fluorescence microscopy of NIS expression (mock-transfected cells [left] vs NIS-transfected cells [right]; white bar=10  $\mu$ m). B,  $^{125}\text{I}$  uptake of untransfected and NIS-transfected eEPCs in vitro. C, Uptake of  $^{123}\text{I}$  24 hours after ischemia-reperfusion and retroinfusion of  $5 \times 10^6$  eEPCs with or without T $\beta$ 4 shRNA transfection. \* $P < 0.05$  vs right circumflex (RCx) perfused tissue; \*\*\* $P < 0.0001$  vs mock transfection.

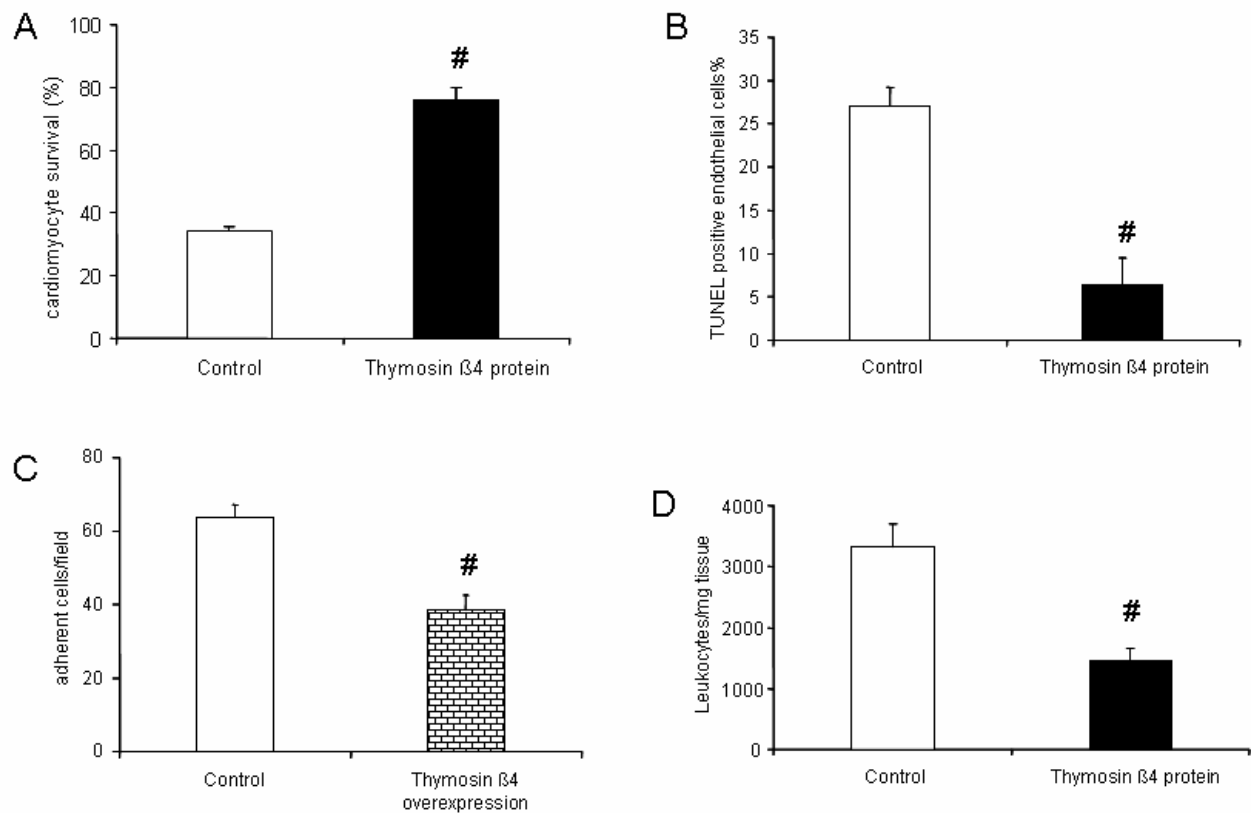


**Figure 3.** Effect of Tβ4 shRNA on eEPC-mediated cardioprotection in vivo. A, Example of infarct size (percentage of AAR) 24 hours after ischemia and retroinfusion of  $5 \times 10^6$  eEPCs with Tβ4 shRNA. B, Quantification revealed a significant decrease in infarct size after eEPC retroinfusion with or without scrambled (s.c.) shRNA (n=9 per group;

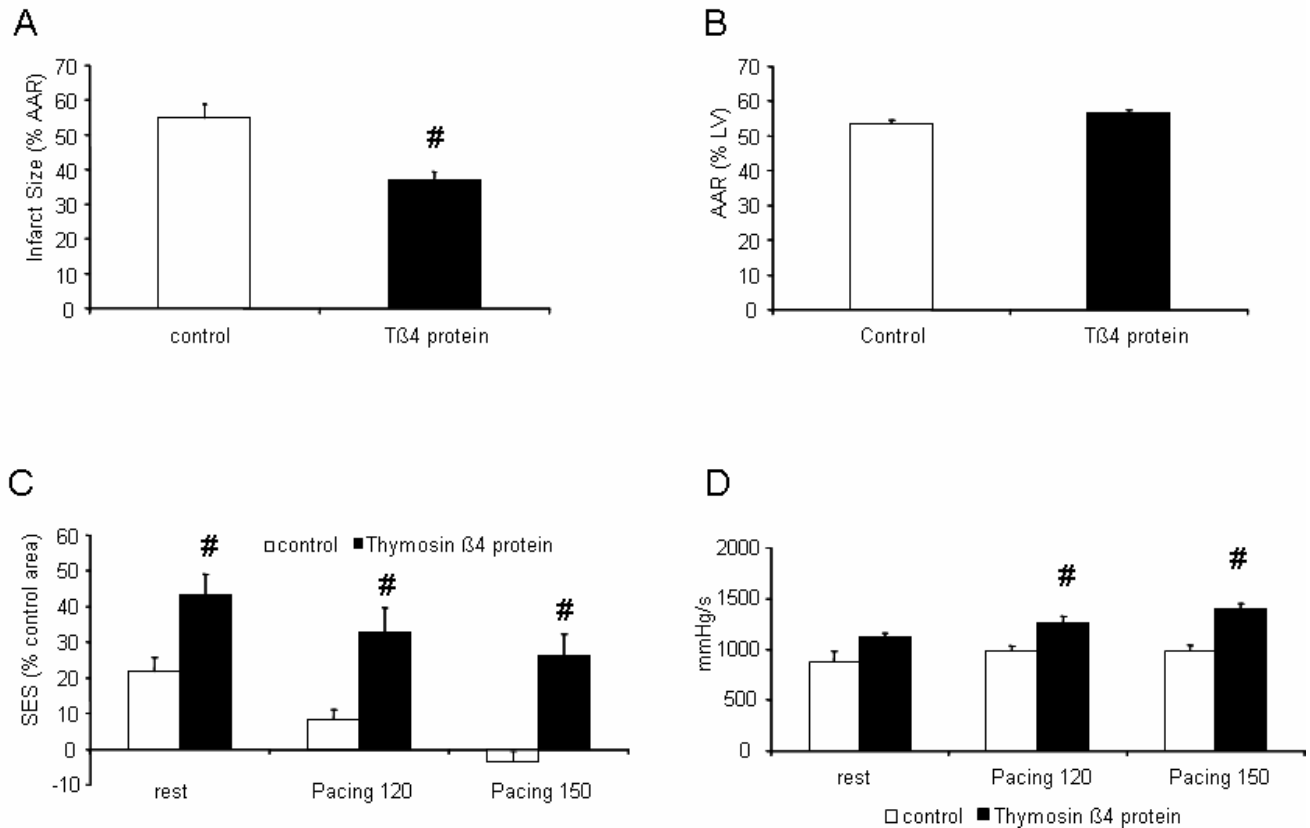
# $P < 0.01$  vs control). C, AAR/left ventricle (LV) did not differ significantly between groups. D, Subendocardial segment shortening (SES) in the apical LAD perfused region (percentage of the nonischemic right circumflex region) at rest and at 120- and 150-bpm atrial pacing ( $n=9$  per group; § $P < 0.05$  vs control; # $P < 0.05$  vs control and eEPC plus T $\beta$ 4 shRNA). E, Contraction velocity (dP/dt<sub>max</sub>) at the given heart rates ( $P=0.052$ , 2-way ANOVA).



**Figure 4.** T $\beta$ 4 moderates postischemic inflammation. A, Example of neonatal endothelial cells grown on microslides with or without eEPC preincubation (1 hour) and superfused with fluorescing monocytic THP-1 cells (see Methods). B, Quantitative adhesion of THP1 cells on activated endothelium without or with eEPC coincubation ( $n=3$ ; # $P < 0.05$  vs control). C, Myeloperoxidase (MPO) activity in nonischemic, AAR (noninfarcted), and infarcted regions after retroinfusion of eEPCs transfected with T $\beta$ 4 or scrambled (s.c.) shRNA ( $n=6$ ; § $P < 0.05$  vs nonischemic control; # $P < 0.05$  vs nonischemic eEPCs plus control shRNA).



**Figure 5.** Effect of T $\beta$ 4 protein on cardiomyocyte and endothelial survival and inflammation. A, T $\beta$ 4 enhances posthypoxic cardiomyocyte survival and reduces endothelial cell apoptosis (B). Leukocyte adhesion was reduced after transient T $\beta$ 4 overexpression in vitro (C) and after T $\beta$ 4 protein retroinfusion in vivo (D).  $n=3$  per group ( $n=5$  per group in D). TUNEL indicates terminal deoxynucleotidyl transferase–mediated dUTP nick-end labeling staining. # $P < 0.05$  vs control.



**Figure 6.** Tβ4 protein exerts cardioprotection in vivo. A, Retroinfusion of 15 mg recombinant Tβ4 reduces infarct size in a series of AAR sizes (B) similar to controls. C, Moreover, Tβ4 increases subendocardial segment shortening at rest and at atrial pacing (120 and 150 bpm) and (D) enhances dP/dtmax at rapid atrial pacing (# $P < 0.05$  vs control; n=9). LV indicates left ventricle; SES, subendocardial segment shortening.

### **CLINICAL PERSPECTIVE**

Myocardial organ detriment and dysfunction are common during a prolonged period of ischemia, although subsequent reperfusion as standard therapy is established. Among the pleiotropic causes of ischemia-reperfusion injury, loss of cardiomyocytes, microcirculatory disturbances preventing perfusion, and an overwhelming inflammatory reaction have been observed frequently. Novel therapeutic approaches, including application of progenitor cells, have provided new avenues to this decade-old problem. In the present study, we provide preclinical evidence that a particular source of embryonic endothelial progenitor cells is capable of cardioprotection against acute ischemia-reperfusion injury (24 hours). Moreover, we were able to confine the paracrine effect of the progenitor cell population to a single, highly expressed protein, thymosin  $\beta$ 4. Depriving the progenitor cell population of thymosin  $\beta$ 4 abolished cardioprotection, whereas regional application of thymosin  $\beta$ 4 peptide provided cardioprotection similar to the embryonic endothelial progenitor cells. Mechanistically, thymosin  $\beta$ 4 supports cardiomyocyte cell survival, prevents endothelial apoptosis, and limits postischemic inflammation. Because no side effects were observed, thymosin  $\beta$ 4 might represent a novel therapeutic agonist in the scenario of clinical ischemia-reperfusion injury.



### **Diskussion**

In vorangegangenen Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die regionale Applikation von murinen eEPCs in einem porcinen Modell des akuten Myokardinfarktes zu Kardioprotektion führt. Die Analyse der Infarktgröße zeigte eine signifikante Reduktion des Infarktareals nach 7 Tagen. Diese ging einher mit einer deutlich erhöhten Vaskularisierung im Ischämierandgebiet. Auch nach 7 Tagen konnten noch Zellen im Ischämieareal nachgewiesen werden, jedoch in einer geringeren Anzahl als 24 Stunden nach Applikation. Diese xenogenen Zellen konnten mittels Reportergennachweis sowohl in der Gefäßwand als auch im Parenchym identifiziert werden.

Die Analyse der frühen Phase der Reperfusion (nach 24 Stunden) zeigte eine deutliche Reduktion der Infarktgröße nach eEPC Applikation. Diese Reduktion war begleitet von einer verbesserten regionalen Myokardfunktion im ischämischen Areal. In vitro Analysen der Myozytenprotektion in Kulturplatten, in denen durch eine permeable Membran kein direkter Zell-Zell Kontakt aber Austausch löslicher Faktoren möglich war, wiesen auf die parakrine Natur des protektiven Effektes hin. Die Ko-Applikation von Wortmannin (einem unselektiven Phospho-Inositol-3-Kinase Inhibitor) führte zu einer Inhibition der protektiven Effekte der eEPCs in vitro und in vivo. Affimetrix Chip Analysen der embryonalen EPCs zeigten eine deutliche Erhöhung einer Reihe von abhängiger Faktoren, die den PI3-Kinase-AKT-Signalweg aktivieren und kardioprotektiv sind (siehe Abbildung 5). Ein auffallend hoch exprimierter Faktor dieser Klasse ist das Thymosin  $\beta$ 4 (Kupatt et al. 2005b).

In der hier vorliegenden Arbeit haben wir den Einfluss der Thymosin  $\beta$ 4 Expression der eEPCs auf den akuten Ischämie/Reperfusionsschaden untersucht. Die in vitro erreichte Reduktion des Zelltods von Myozyten und Endothelzellen durch Kokultivierung mit eEPCs nach Hypoxie und Reoxygenation war Thymosin  $\beta$ 4 abhängig. Reduziert man die Thymosin  $\beta$ 4 Expression mittels shRNA Transfektion (um ca. 80% des mRNA Gehaltes) in den eEPCs, verlieren die Zellen ihr protektives Potential. Die in vivo Untersuchungen haben gezeigt, dass die Thymosin  $\beta$ 4 Expression der eEPCs essentiell für deren protektive Wirkung ist (Fig. 3-4). Die regionale Applikation von Thymosin  $\beta$ 4 Protein verringerte die Infarktgröße und verbesserte die regionale Myokardfunktion im gleichen Maß, wie es die Retroinfusion von eEPCs bewirkte (Fig. 5-6). Auch die lokale

Inflamationsreaktion des ischämischen Gewebes war durch die Infusion von Thymosin  $\beta$ 4 Protein signifikant verringert.

Der Einfluß der Reperfusion auf das Herzgewebe betrifft sowohl das kardiomyozytäre als auch das vaskuläre Kompartiment zusammen mit einwandernden Leukozyten. Auf diese Kompartimente zielen die Ansätze einer Zelltherapie mit endothelialen Vorläuferzellen / Stammzellen ab (Yip et al. 2008, Wollert 2008, Dimmeler et al. 2008). Allerdings liegt das Zielintervall der Zelltherapie in der subakuten und chronischen Phase der Reperfusion (>3Tage nach Reperfusionbeginn). In diesem Intervall spielen die Prozesse der Neovaskularisierung und der Herzmuskel-Reparatur incl. der Narbenbildung in Nekrose-Arealen eine zentrale Rolle (Itescu et al. 2003). Eine Behandlung des Myokards mit dem Ziel der Verhinderung von Zell-Untergang oder akuter Zell-Schädigung ist zu diesem Zeitpunkt nicht mehr möglich. Insofern die in dieser Studie verwendete embryonale EPC Population keine Überlappung mit inflammatorischen Zellen aufweist, konnte sie ohne Nebenwirkungen zu Beginn der Reperfusion appliziert werden. Interessanterweise hat in einer klinischen Studie mit akuten Myokardinfarktpatienten die frühe Applikation von gereinigten Knochenmarkszellen (<24 h nach Reperfusionbeginn) keinen Effekt auf die Myokardfunktion, die mit Echokardiographie, Kernspintomographie und Positronen-Emissions-Tomographie gemessen wurde, gehabt (Janssens et al. 2006). Neben diesem Aspekt der Zeitabhängigkeit der Reperfusionstherapie (Piper et al. 2004) ist jedoch die Pleiotropie des therapeutischen Ansatzes, d.h. die Wirkung auf die durch die Reperfusion geschädigten Zell-Kompartimente von großer Relevanz.

### **Kardiomyozytäre Reaktion auf Ischämie/Reperfusion**

Neben dem Kardiomyozytenuntergang in der Ischämiezeit kommt es auch in der Reperfusion zu einer weiteren Schädigung der Herzmuskelzellen. Diese ist gekennzeichnet durch eine Hyperkontraktur der Muskelzellen, Freisetzen von reaktiven Sauerstoffspezies, eine Kalziumüberladung, einer dauerhafte Öffnung der mitochondrialen „permeability transition pore“ und der Apoptose der Zellen. Die Apoptose von Myozyten, induziert in der Reperfusion, trägt zu dem letalen Reperfusionsschaden nach akuter Ischämie bei (Gottlieb et al. 1994, Freude et al.

2000). Eine Reduktion der Apoptoserate von Kardiomyozyten kann den Reperfusionsschaden verringern und die myokardiale Funktion verbessern (Zhao et al. 2003). Der dafür verantwortliche RISK-Signalweg führt zu einer Phosphorylierung von zentralen Proteinkinasen, wie die Proteinkinase B, Erk 1/2, und JNK. Eine Aktivierung des RISK Signalweges kann durch Wachstumsfaktoren wie VEGF, FGF, IGF oder auch TGF- $\beta$  erreicht werden, aber auch durch die Applikation von Zytokinen (IL-6), Adenosin, Insulin oder natriuretische Peptide. Tierexperimentell zeigte sich, dass die Kardioprotektion mittels Aktivierung des RISK Signalweges nur in den ersten Minuten der Reperfusion erfolgreich war. Dies spricht dafür, dass eine erfolgreiche Therapie nach akutem Myokardinfarkt nur zu erwarten ist, wenn der RISK Aktivator vor oder direkt mit der Reperfusion appliziert wird.

Die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies und die Kalziumüberladung der Zelle sind weitere Pathomechanismen des Reperfusionsschadens, die mögliche Therapiestrategien darstellen. Reaktive Sauerstoffspezies führen zu einer Öffnung der mitochondrialen Pore, wirken chemoattraktiv für Endzündungszellen, führen zu einer Dysfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums und tragen zur Kalziumüberladung der Myozyten bei. Weitere Folgen der ROS sind die Enzymdenaturierung und die oxidative Schädigung der DNA, so dass sich hier zwei Therapiemöglichkeiten eröffnen: zum einen die Reduktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch Sauerstoffradikalfänger, zum anderen die Reduktion der Kalziumüberladung (durch Kalziumkanalinhibitoren oder Natrium-Protonen-Austauscher-Inhibitoren). In einer tierexperimentellen Studie konnte bereits gezeigt werden, dass die Applikation von Natrium-Protonen-Austauscher-Inhibitoren bereits vor der Reperfusion erfolgen muss, um die Infarktgröße zu reduzieren (Klein et al. 2000). In einer Studie unserer Arbeitsgruppe führte die regionale Applikation von Cariporide alleine nicht zu einer signifikanten Infarktgrößenreduktion (Kupatt et al. 2004b). Hier zeigte sich erst durch die Kombinationstherapie mit einem Sauerstoffradikalfänger (Gluthation) eine signifikante Verbesserung des Reperfusionsschadens. Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei der Analyse klinischer Studien mit einem Natrium-Protonen-Austauscher-Inhibitor. Nur in einer relativ kleinen Studie mit 100 Patienten war die alleinige Applikation von Cariporide kardioprotektiv, die meisten anderen Studien verfehlten jedoch eine deutliche klinische Verbesserung nach der Applikation von zum Beispiel Eniporide (Rupprecht et al. 2000, Zeymer et al. 2001, Bar et al. 2006). Auch der

Einsatz von Kalziumkanalblockern zeigte in ersten klinischen Studien sehr unterschiedliche Ergebnisse (Theroux et al. 1998, Pizzetti et al. 2001). Bei der Applikation von Magnesiumsulfat (ein endogener Kalziumantagonist) sind die Ergebnisse ähnlich wie bei den Natrium-Protonen-Austauscher-Inhibitoren. Tierexperimentell zeigte sich nur eine deutliche Verringerung der Infarktgröße, wenn diese vor der Reperfusion verabreicht wurden (Christensen et al. 1995). In großen klinischen Studien konnte durch die Applikation von Magnesiumsulfat keine Verbesserung der linksventrikulären Funktion und der klinischen Endpunkte erreicht werden (Antman et al. 2002).

Die Retroinfusion von eEPCs in unserer Studie bewirkte eine Kardioprotektion, die über eine PI3-Kinase/AKT-Aktivierung vermittelt war. Das in unserer Studie untersuchte Thymosin  $\beta$ 4 verringerte in vitro das Myozytensterben nach Hypoxie und Reoxygenation, in Übereinstimmung mit einer Infarktgrößenreduktion durch eEPCs oder Thymosin  $\beta$ 4 in vivo.

### **Die Relevanz des Endothels und der Mikrozirkulation bei Ischämie und Reperfusion**

Neben dem Untergang von Kardiomyozyten in der Ischämiephase und in der Reperfusionsphase kommt es auch zu einer Endothelzellschädigung in der Reperfusion. Endotheliale Apoptose (vgl. Fig.1) sowie Sauerstoff-Radikal bedingte Endotheldysfunktion führen zu einem Verlust endothelialer Funktionen wie Vasodilatation, Aufrechterhaltung eines anti-adhäsiven und antikoagulatorischen Phänotyps. Ein zentraler Regulator der Endothelzellaktivierung ist Stickstoff-Monoxid (NO). Das von den Endothelzellen freigesetzte NO schützt seinerseits die Myozyten durch eine Reduktion von endotheliale Zelltod und Zelldysfunktion (Gao et al. 2002, Bolli 2001, Hafezi-Moghadam et al. 2002, Kupatt et al. 2003). Die verminderte Endothelschädigung sowie die erhöhte Bioverfügbarkeit von NO ist in der Lage, über eine verminderte Mikrozirkulationsstörung (Kupatt et al. 1997a) die Infarktausbreitung zu begrenzen (Kupatt et al. 2003). Ähnliche Befunde wurden auch von eNOS-transgenen Mäusen nach LAD-Occlusion berichtet (Sumeray et al. 2000, Brunner et al. 2003, Elrod et al. 2006), wobei interessanterweise auch die Kardiomyozyten-spezifische eNOS-Überexpression für die Kardioprotektion ausreichte (Abunasra et al. 2001, Elrod et al.

2005). Dies könnte auf eine direkte kardiomyozytäre Wirkung oder auf eine, durch die enge Nachbarschaft von Kardiomyozyten und Mikrogefäßen bedingte, vaskuläre Wirkung des frei diffusiblen Gases Stickoxid bei myozytärer Überexpression der eNOS hinweisen.

Für Thymosin  $\beta$ 4 ist die Auswirkung auf die eNOS-Aktivität bislang nicht untersucht worden. Allerdings hat sich nach Ischämie und Reperfusion eine Verminderung der Endothel-Apoptose nachweisen lassen (Fig.1), die eine Verbesserung der mikrovaskulären Funktion nach sich ziehen könnte. In Übereinstimmung mit diesen Befunden induziert Thymosin  $\beta$ 4 in vitro Endothelzell-Proliferation und Angiogenese (Hinkel, Kupatt, unpublizierte Befunde).

### **Anti-inflammatorische Strategien**

Neben dem Endothelzellüberleben und dem vasodilatatorischen Potential sind die Steuerung der Mikrozirkulation und die Inhibition von pro-inflammatorischen sowie pro-koagulatorischen Funktionen für ruhendes Endothel charakteristisch. In der Reperfusion kommt es nach Eröffnen des Gefäßes zu einer akuten sowie zu einer subakuten pro-inflammatorischen und pro-koagulatorischen Aktivierung des Endothels (Jordan et al. 1999). Diese verursacht nicht nur Mikrozirkulationsstörungen, sondern führt auch zu einer weiteren Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Zytokinen und verstärkt dadurch den bereits bestehenden Schaden (Review bei Vinten-Johansen 2004). Um diese Verstärkung des Reperfusionsschadens zu reduzieren, sind in tierexperimentellen und auch in klinischen Studien unterschiedliche anti-inflammatorische Therapiestrategien untersucht worden.

Die Adhäsion der Inflammationszellen ist sowohl durch ihre eigenen Adhäsionsmoleküle (Selectine,  $\beta$ 2-Integrine = CD11<sub>a-c</sub>/CD18), als auch durch deren Partner auf der Endotheloberfläche (Selektine, ICAM-1) reguliert. In der Ischämie und Reperfusion kommt es zu einer schnellen Erhöhung des P-Selektins durch Weibel-Palade Körperchen, in denen das P-Selektin gespeichert wird und einer subakuten Hochregulation der Adhäsionsmoleküle über eine Zytokinfreisetzung und Komplementaktivierung (Weyrich et al. 1995). Das Rollen der neutrophilen Granulozyten ist durch P-Selektin auf der Endothelzelseite und PSGL-1 auf der Granulozytenseite vermittelt (Moore et al. 1995). Diese erste lockere Anhaftung der Zellen am Endothel

wird durch eine Interaktion von  $\beta$ 2-Integrinen mit ICAM-1 auf den Endothelzellen in eine stabile Adhäsion überführt.

Eine Verminderung der Leukozytenadhäsion kann über eine Inhibition des Rollens oder der Adhäsion erreicht werden. Die Verabreichung von P-Selektin Antikörpern direkt vor Beginn der Reperfusion führte tierexperimentell zu einer deutlichen Reduktion der Infarktgröße und der endothelialen Dysfunktion (Weyrich et al. 1993). In einer klinischen Studie, in der ein rekombinanter PSGL- Ig Antikörper verwendet wurde, konnte keine Verbesserung der linksventrikulären Auswurffraktion oder der klinischen Endpunkte festgestellt werden (Mertens et al. 2006). Eine Inhibition der stabilen Adhäsion ist durch  $\beta$ 2 Integrin- oder ICAM-Antikörper zu erreichen. Experimentelle Ansätze zeigen, dass sowohl die Blockade von CD11 als auch die Applikation von einem monoklonalen CD18-Antikörper die Infarktgröße nach Ischämie und Reperfusion verringern. Jedoch nicht jede CD18 Inhibition führte zu einer Kardioprotektion, diese ist neben der Wahl des Antikörpers auch abhängig von der Dauer der Ischämie. So konnte in einem tierexperimentellen Modell an Hunden gezeigt werden, dass nach 30 min Ischämie eine CD18 Blockade erfolgreich war, wohingegen bei einer Ischämiedauer von 45 min dieser Effekt nicht mehr zu sehen war (Williams et al. 1994). Die Translation in die Klinik war leider erfolglos, die Verabreichung von einem CD18 Antikörper führte zu keiner Verbesserung der linksventrikulären Funktion. Auch die Kombinationstherapie aus CD11 und CD18 Inhibition hatte in klinischen Studien keinen protektiven Effekt auf die Myokardfunktion (Baran et al. 2001, Rusnak et al. 2001, Faxon et al. 2002).

Um den subakuten Anteil der Endothelzellaktivierung mit der Transkription von pro-inflammatorischen Proteinen zu behandeln, reicht die einmalige Applikation von neutralisierenden Antikörpern, die mit leukozytären Epitopen interagieren und rasch sequestriert werden, nicht aus, da diese Phase über Tage hinaus andauern kann. Die Induktion der pro-inflammatorischen Reaktion wird durch Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF $\kappa$ B reguliert (Barnes & Karin 1997, Chandrasekar & Freeman 1997, Kupatt et al. 1997b). Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von NF $\kappa$ B wesentlich erfolgreicher ist als die Inhibition einzelner pro-inflammatorischer Gene (Morishita et al. 1997). Eine selektive Inhibition des NF $\kappa$ B kann durch eine Decoy Transfektion mit doppelsträngigen Oligonukleotiden erreicht werden, die für die DNA-Bindungssequenz von NF $\kappa$ B kodieren und mit den genomischen Promotorbindungsstellen um die Protein-

Interaktion konkurrieren (Morishita et al. 1997, Kupatt et al. 2002). In einem Modell der akuten Ischämie/Reperfusion am Schwein führte die regionale Applikation von NF $\kappa$ B Decoy zu einer deutlichen Reduktion des Leukozyteninflux nach 24 h. Diese selektiv-anti-inflammatorische molekulare Intervention war ausreichend für eine signifikante Reduktion der Infarktgröße. Dieser Befund weist auf die Bedeutung der postischämischen Inflammation für die Infarktausbreitung hin.

Eine anti-inflammatorische Wirkung wurde mittels Adhäsions-Assays unter venolärem Scherstress für Thymosin  $\beta$ 4 gezeigt (Fig.5). In vivo fand sich eine deutliche Reduktion der Leukozytenadhäsion nach Thymosin  $\beta$ 4 Proteinapplikation. Auch die Retroinfusion von murinen eECPs in einem xenogenen Modell führte zu einer Verringerung der Inflammation im ischämischen Areal (Kupatt et al. 2005a). Die kurze Inkubationsdauer von 1 h, die für die Erzielung eines anti-inflammatorischen Effekts in vitro notwendig ist, weist auf eine direkte Hemmung der akuten, posttranslationalen Endothelaktivierung hin.

### **Zelltherapeutische Strategien**

Die Zelltherapie ist eine neue Komponente der Therapie-Strategien des Ischämie/Reperfusionsschadens. Hierbei sind grundsätzlich zwei Arten der Therapie zu unterscheiden: zum einen die Mobilisation von körpereigenen Zellen aus dem Knochenmark, zum anderen die Applikation von Zellen, isoliert aus dem Knochenmark oder dem Blut.

Durch die Verabreichung von G-CSF (Granulozyten Kolonie-stimulierenden Faktor) direkt nach Wiedereröffnen des Gefäßes kommt es zu einer Ausschwemmung von hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark. Neben seiner Wirkung auf das Knochenmark hat G-CSF (zumindest tierexperimentell) noch eine direkte kardioprotektive Wirkung über den PI3-Kinase/Akt Signaltransduktionsweg (Ince et al. 2006). Bereits in den tierexperimentellen Studien mit G-CSF zeigten sich sehr kontroverse Ergebnisse, je nach Applikationszeitpunkt und Studie. Während es in einer Studie zu einer signifikanten Verringerung der Infarktgröße - auch bei post-ischämischer Verabreichung des Medikamentes - kam (Orlic et al. 2001), konnte eine andere Gruppe nur einen kardioprotektiven Effekt zeigen, wenn G-CSF vor Ischämie oder in Kombination mit Flt-3 verabreicht wurde (Dawn et al. 2006), während eine dritte Gruppe

keinen funktionellen Effekt von G-CSF feststellen konnte (Deten et al. 2005). Ähnliche Kontroversen zeigen sich auch in der Analyse der klinischen Studien nach der Verabreichung von G-CSF. Auch wenn es immer zu einer Erhöhung der hämatopoetischen Vorläuferzellen im Blut kam, war dies mehrheitlich mit keiner Verbesserung der linksventrikulären Funktion verbunden (Zohlhofer et al. 2006, Engelmann et al. 2006, Review bei Ince et al. 2008).

Für die exogene Zelltherapie nach akutem Myokardinfarkt wurde eine Vielzahl von verschiedenen Stamm- und Vorläuferzellen eingesetzt. Diese Zelllinien unterscheiden sich in ihren Vor- und Nachteilen sowie in der Praktikabilität der Verwendung (Anzahl und Gewinnung). Endotheliale Vorläuferzellen zeichnen sich durch eine Expression von CD133- Antigen und CD34- Antigen an der Zelloberfläche aus. Sie haben die Möglichkeit, in Endothelzellen zu differenzieren und an Orten der Gefäßneubildung zu inkorporieren. Tierexperimentell konnte in initialen Studien gezeigt werden, dass endotheliale Vorläuferzellen selektiv in das Ischämiegebiet einwandern und die Neovaskularisierung deutlich erhöhen (Asahara et al. 1997). Neben einer gesteigerten Gefäßneubildung gibt es Hinweise, dass diese Zellen zumindest in Nagern in Myozyten transdifferenzieren können (Orlic et al. 2001, Yoon et al. 2005, Balsam et al. 2004). Andere Untersuchungen wiesen auf parakrine Effekte der Zellen durch eine Zytokinfreisetzung hin, die eine gesteigerte Angiogenese, Reduktion der Apoptose sowie eine Verminderung der Inflammation bewirkten (Kinnaird et al. 2004, Mirosou et al. 2007). In ersten klinischen Anwendungen zeigten sowohl die aus dem Knochenmark stammenden Zellen als auch die aus dem peripheren Blut isolierten Vorläuferzellen eine kardioprotektive Wirkung nach akutem Myokardinfarkt (Strauer et al. 2002, Schächinger et al. 2004). In größeren randomisierten, placebokontrollierten Studien, in denen knochenmarkstämmige Zellen verabreicht wurden, fielen die Ergebnisse nicht eindeutig aus. In zwei Studien kam es zwar zu einer Verbesserung der linksventrikulären Auswurfraction (Schächinger et al. 2006). In zwei anderen Studien jedoch, die auch mit knochenmarkstämmigen Zellen nach akutem Myokardinfarkt durchgeführt wurden, zeigte sich keine Verbesserung der Myokardfunktion im Vergleich zur Kontrollgruppe (Review bei Wollert 2008).

Allerdings zielt die verzögerte Applikation von Progenitorzellen eher auf die subakute und chronische Phase des Ischämie/Reperfusionsschadens, die durch



Neovaskularisierung und Reparatur-Prozesse gekennzeichnet ist. Die akute Reperfusionphase ist für die Applikation von adulten EPCs klinisch nicht geeignet (Janssens et al. 2006). Eine Überlappung des EPC-Phänotyps mit dem entzündlicher Zellen könnte in diesem Szenario zu einer Verstärkung der potentiell schädigenden postischämischen Inflammation führen (s.o.). Daher bleibt die Frühphase der Reperfusion, in der ausschließlich der Erhalt von potentiell gefährdeten Kardiomyozyten möglich ist (Review bei Piper et al. 2004), von der Anwendung adulter EPCs unberührt. Durch Verwendung eines embryonalen Progenitor-Zelltyps, der keine Überlappung mit inflammatorischen Zellen aufweist, gelang es in der vorliegenden Arbeit, diese Limitation der Zelltherapie zu überwinden. Dabei zeigte sich erstmals in einer präklinischen Großtierstudie, dass die Zelltherapie in der Lage ist, den akuten Ischämie/Reperfusionsschaden mit Bezug auf die Parameter Infarktgröße, Endothelschaden und Inflammation abzuschwächen.

Für die Wirkung der zelltherapeutischen Ansätze wurde bereits mehrfach auf die Rolle von parakrinen Faktoren hingewiesen. Jüngst konnte gezeigt werden, dass Interleukin 10 von knochenmarkstämmigen mononukleären Zellen freigesetzt wird und maßgeblich zur Infarktgrößenverkleinerung in Mäusen beigetragen hat (Burchfield et al. 2008). In einer anderen Arbeit konnte dargestellt werden, dass mesenchymale Stammzellen VEGF, bFGF-2, PIGF und MCP-1 sezernieren. Durch die Applikation von konditioniertem Medium dieser Zellen konnte die Hinterlaufischämie deutlich verbessert werden und die VEGF und FGF Level im Gewebe erhöht werden (Kinnaird et al. 2004). Die Ergebnisse unserer Studie zeigen einen parakrinen Effekt von eEPCs auf Kardiomyozyten und Endothelzellen in vitro und in vivo (siehe Fig. 6). Mithilfe der Kombination von Transkriptom- und Signalweg-Analyse gelang es, aus der Fülle von Kandidaten Thymosin  $\beta$ 4 als essentiellen Faktor der eEPC-vermittelten Kardioprotektion zu isolieren und therapeutisch einzusetzen (Fig. 5-6).

### Expressionsprofil

Faktor	%
Mif	8745
Aamp	3253
Pdap	2703
VEGF b	1997
Follistatin	4495
Wnt1 1	1776
<b>Thymosin <math>\beta</math>4</b>	<b>7173</b>

*Abbildung 5: Ausgewählte Faktoren, die in murinen embryonalen endothelialen Vorläuferzellen sehr stark exprimiert werden. Dazu gehören unter anderem der Makrophagen Migrations-inhibierende Faktor (Mif) aus der Gruppe der Angiogenese-verbundenen Faktoren, das angio-assoziierte Migrationsprotein (Aamp), VEGF b und das „Platelet derived Growth Factor - A,, assoziierte Protein 1 (Pdap), das Follistatin, ein Mitglied des Wnt-Signaltransduktionsweges Wnt1 1 und das Thymosin  $\beta$ 4 (modifiziert nach Kupatt 2005).*

#### **Applikationsart**

Da es sich bei dem Ischämie/Reperfusionsschaden um ein akutes und subakutes Geschehen handelt, ist neben dem Ort der Applikation auch der Zeitpunkt entscheidend für die erfolgreiche Therapie. Die systemische Applikation ist eine einfache Applikationsart, die jedoch eine große Menge an Substanz erfordert, um im Zielareal eine ausreichende Konzentration zu erreichen. Diese Applikationsart eignet sich nur bei Substanzen, die wenige bis keine Nebenwirkungen haben und in großer Menge zur Verfügung stehen. Bei der direkten intramyokardialen Applikation, zum Beispiel über ein elektromechanisches endokardiales NOGA™-Mapping (Perin et al. 2003) wird visuell

gesteuert mittels Katheter vom linken Ventrikel aus die Applikation von Zellen vorgenommen. Da hierbei eine Punktion des Myokards vom Ventrikel aus durchgeführt wird, besteht das Risiko von ventrikulären Tachykardien und Blutungen aus der Punktionsstelle.

Bei der intrakoronaren Applikation kann man den arteriellen oder den venösen Zugangsweg nutzen, um Medikamente oder Zellen zu verabreichen. Die Koronararterie wird dazu mittels Katheter und Ballon sondiert und die Substanz appliziert (Wollert 2008). Dies kann jedoch erst nach Eröffnen des Koronararterienverschlusses durchgeführt werden, so dass bei dieser Applikationsart die ersten Minuten der Reperfusion nicht mit behandelt werden können. Zum anderen haben die Patienten mit akutem Myokardinfarkt eine Koronargefäßerkrankung im arteriellen Teil, so dass auch die Aufnahme von Medikamenten oder das Anheften von Zellen gestört sein kann. In den koronarvenösen Gefäßen finden sich in der Regel keine Engstellen oder Verschlüsse, die das Ischämiegebiet vor Eröffnen des Gefäßes verlegen. Durch den Einsatz einer selektiven druckregulierten Retroinfusion kann bereits vor Wiedereröffnen der Koronararterie effektiv therapiert werden, da der venöse Abfluss zum Zeitpunkt der Infusion geblockt ist. Durch eine Steuerung des Infusionsdruckes und der Verweildauer kann die Effektivität noch erhöht werden. Geringere Konzentrationen der Substanz oder der Zellen werden benötigt, um eine gleiche Konzentration im Zielgebiet zu erreichen und verringert somit auch die systemische Belastung (Kupatt et al. 2004a; Kupatt et al. 2005a).

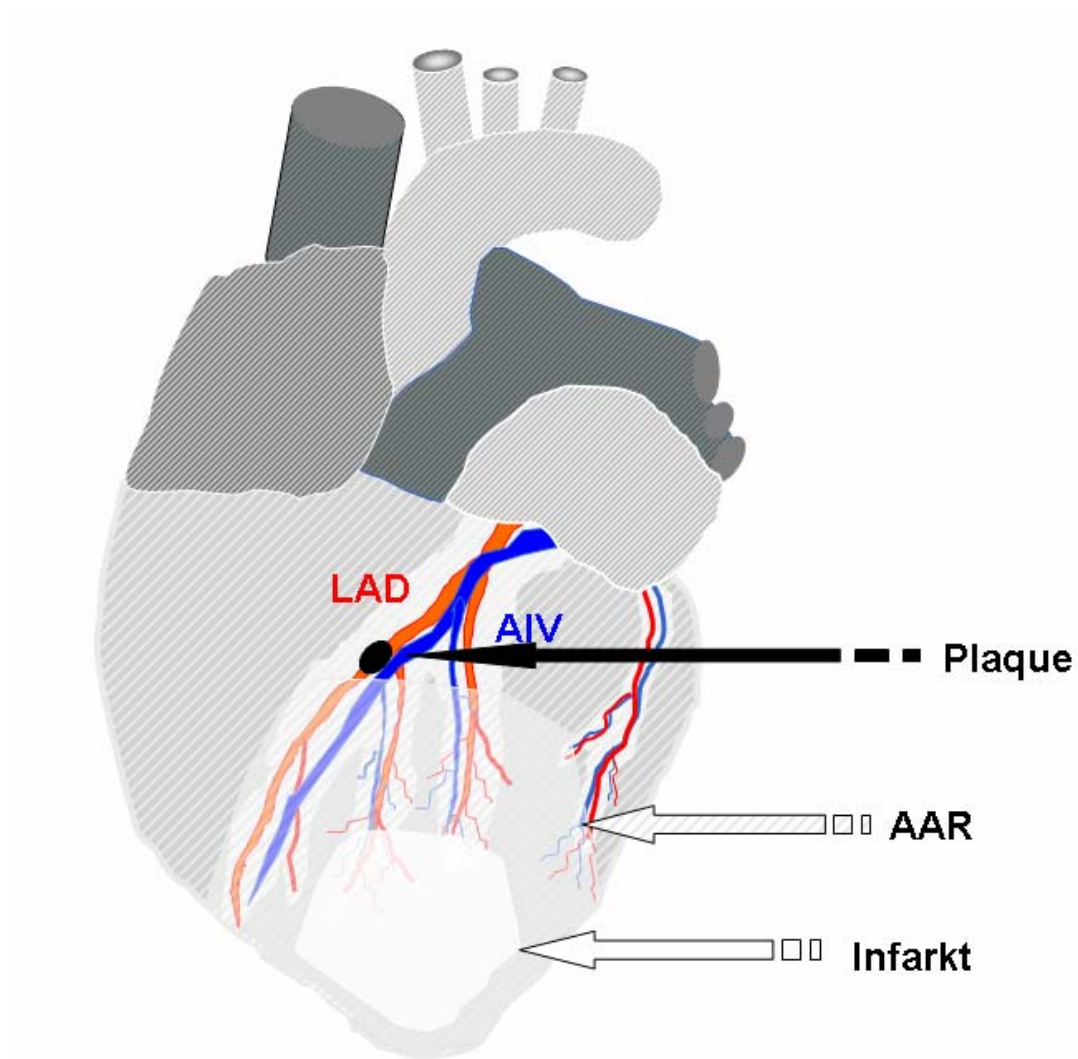


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines akuten Myokardinfarktes nach Plaqueruptur in der medialen linken anterioren Herzerterie. Grau schraffiert dargestellt die so genannte „Area at risk“, das primär ischämische Areal, weiß dargestellt die endgültige Infarktgrößenangabe nach Wiedereröffnen des Koronargefäßes.

## **Schlussfolgerung / Ausblick**

Eine Zelltherapie nach akutem Myokardinfarkt ist nur zeitverzögert möglich, da die Gewinnung und Aufreinigung der Zellen einige Zeit in Anspruch nimmt und man zudem mit mononukleären Zellen nicht in der Akutphase der Reperfusion behandeln sollte. Fast allen Zellpopulationen ist jedoch gemeinsam, dass zumindest ein Teil ihrer protektiven Wirkung durch parakrine Faktoren vermittelt wird. Die Zellen können als Instrument der Ermittlung von neuen parakrinen protektiven Faktoren genutzt werden und somit neue mögliche Proteine zur Behandlung des Ischämie/Reperfusionsschadens entdeckt und entwickelt werden. Thymosin  $\beta$ 4 ist ein solches Kandidatenprotein, das aufgrund seiner pleiotropen Wirkung und der nicht beobachteten Nebenwirkungen eine neue Therapiestrategie für den akuten Myokardinfarkt beim Menschen darstellt. Von Vorteil ist hierbei, dass Thymosin  $\beta$ 4 alle großen Teilbereiche des Ischämie/Reperfusionsschadens anspricht. Neben einer direkten Protektion der Myozyten und Endothelzellen reduziert es auch die post-ischämische Inflammation und hat pro-angiogenetische Eigenschaften.

## Zusammenfassung

Der akute Myokardinfarkt stellt in den Industrienationen immer noch eine der häufigsten Todesursachen dar. Auch nach Wiedereröffnen des Gefäßes führt eine prolongierte myokardiale Ischämie zur Ausbildung eines Infarktareals. Neben der irreversiblen Schädigung der Myozyten während der Ischämie kommt es auch zu dem so genannten Reperfusionsschaden, dieser kann aber, zumindest tierexperimentell, durch eine entsprechende Therapie verringert werden. Wir konnten bereits zeigen, dass die retrograde Applikation von embryonalen endothelialen Vorläuferzellen, von murinen Embryonen Tag 7,5 (Tie-2+, c-Kit+, Sca-1+, flk-1 low, MHC-1-) eine Kardioprotektion über lösliche Faktoren vermittelt. Diese Reduktion der Infarktgröße war über einen PI3K-AKT Signaltransduktionsweg vermittelt. In der hier vorliegenden Studie haben wir uns mit dem Einfluss von Thymosin  $\beta$ 4 auf die eEPC vermittelte Kardioprotektion beschäftigt.

Methoden: In vitro wurden neonatale ventrikuläre Myozyten der Ratte einer Hypoxie (4 h) und Reoxygenation (1 h) ausgesetzt. Die überlebenden Zellen wurden mittels Trypan-Blau-Exklusion identifiziert. Des Weiteren wurden neonatale ventrikuläre Endothelzellen der Ratte auch einer Hypoxie (18 h) und Reoxygenation (4 h) ausgesetzt und die Apoptoserate mittels TUNEL-Färbung analysiert. Embryonale EPCs mit/ohne Thymosin  $\beta$ 4 shRNA Transfektion wurden während Hypoxie kokultiviert oder Thymosin  $\beta$ 4 Protein wurde dem Medium zugesetzt. In Schweinen (n= 9 pro Gruppe) wurde am Tag 1 mittels LAD-Verschluss (1 h) ein Infarkt induziert.  $5 \times 10^6$  eEPCs mit/ohne Thymosin  $\beta$ 4 shRNA Transfektion oder Thymosin  $\beta$ 4 Protein wurden nach 55 min Ischämie in die anteriore interventrikuläre Herzvene retroinfundiert. Nach 24 h Reperfusion wurden die globale und regionale Myokardfunktion (Sonomikrometrie) sowie die Infarktgröße bestimmt. Darüber hinaus wurde die Inflammation mittels Myeloperoxidase Analyse im Gewebe untersucht.

Ergebnisse: Die „short hairpin“ Ribonukleinsäure (shRNA) Transfektion führte zu einer verringerten Thymosin „messenger“ RNA Expression in „real time“ Polymerase Kettenreaktions-Untersuchungen (rt-PCR). In Zellkultur war der Anteil überlebender neonataler Kardiomyozyten in Anwesenheit von eEPCs signifikant erhöht, wenn diese Zellen Thymosin  $\beta$ 4 exprimierten. Die Analyse der TUNEL-Färbung zeigte eine deutlich geringere Apoptoserate der neonatalen Endothelzellen, die mit eEPCs kokultiviert

wurden, es sei denn die Thymosin  $\beta$ 4 Expression wurde durch Transfektion der shRNA reduziert. Die Applikation von Thymosin  $\beta$ 4 Protein zeigte bei beiden Zellarten ein ähnliches Ergebnis wie die Kokultivierung mit den eEPCs. In vivo waren nach 24 h zahlreiche Zellen im ischämischen Areal nachweisbar. Die Anzahl der Zellen war durch die Reduktion der Thymosin  $\beta$ 4 Expression nicht beeinträchtigt. Die regionale Applikation der eEPCs reduzierte die Infarktgröße signifikant gegenüber der Kontrollgruppe, wohingegen die Thymosin  $\beta$ 4 shRNA Transfektion der eEPCs diesen Effekt inhibierte. Auch hier zeigte die retrograde Applikation des Thymosin  $\beta$ 4 Proteins eine kardioprotektive Wirkung, die ähnlich ausgeprägt war wie die der eEPCs. Die Analyse der TUNEL-positiven Zellen zeigte eine deutliche Reduktion der Apoptoserate nach Retroinfusion der eEPCs oder des Thymosin  $\beta$ 4 Protein, auch hier verloren die eEPCs ihre protektiven Eigenschaften nach der Transfektion mit Thymosin  $\beta$ 4 shRNA. Die Inflammation im Ischämieareal, ein wichtiges Kennzeichen für die Ausprägung des Ischämie/Reperfusionsschadens, konnte durch die Verabreichung von eEPCs und auch Thymosin  $\beta$ 4 Protein signifikant reduziert werden. Die Reduktion der Thymosin  $\beta$ 4 Expression verhinderte wiederum diesen kardioprotektiven Effekt.

Diese Untersuchungen zeigen, dass embryonale endotheliale Vorläuferzellen den Ischämie/Reperfusionsschaden zu einem frühen postischämischen Zeitpunkt verringern. Der kardioprotektive Effekt dieser Zellen ist zumindest teilweise Thymosin  $\beta$ 4 abhängig, da eine analoge Protektion durch die lokale Applikation von Thymosin  $\beta$ 4 Protein erreicht werden kann.

Generell zeigt diese Arbeit, dass neben dem direkten Einsatz von Vorläuferzellen und Stammzellen zur Behandlung des Reperfusionsschadens diese Zellen auch genutzt werden können, um mögliche Kandidatenproteine zur Kardioprotektion nach akutem Myokardinfarkt zu identifizieren und somit eine effektive Therapie des Reperfusionsschadens beim Menschen zu ermöglichen.

## Summary

The acute myocardial infarction is still one of the major causes of death in the industrial nations. Also after reopening of the vessel, a prolonged myocardial ischemia still leads to an infarcted area. Beside the irreversible damage of the myocytes during ischemia, a so called reperfusion injury occurs, which may be reduced through an adequate therapy, at least in animal experiments. We could demonstrate before, that the retrograde application of embryonic endothelial progenitor cells, derived from murine embryos day 7.5 (Tie-2+, c-Kit+, Sca-1+, flk-1 low, MHC-1-) is cardioprotective, mediated through paracrine factors. This reduction of the infarct size is PI3K-AKT pathway mediated. In the here presented study we investigated the influence of thymosin  $\beta$ 4 on the eEPCs mediated cardioprotection.

**Methods:** In vitro, neonatal rat cardiomyocytes were subjected to hypoxia (4 h) and reoxygenation (1 h), cell survival was analysed via trypan blue staining. Furthermore rat neonatal ventricular endothelial cells were subjected to hypoxia (18 h) and reoxygenation (4 h), apoptosis rate was investigated using TUNEL-staining. Embryonic EPCs with/without thymosin  $\beta$ 4 shRNA transfection were during hypoxia and reoxygenation cocultivated, or thymosin  $\beta$ 4 protein was added to the media. In pigs (n=9 per group) percutaneous LAD occlusion (1 h) at day 1 was performed to induce an infarction.  $5 \times 10^6$  eEPCs with/without thymosin  $\beta$ 4 shRNA transfection or thymosin  $\beta$ 4 protein were applied after 55 min of ischemia through retroinfusion into the anterior interventricular vein. After 24 h of reperfusion regional and global myocardial function were analysed and infarct size was determined. In addition, the inflammation via Myeloperoxidase analysis was examined in the tissue.

**Results:** The transfection of the short hairpin ribonucleotid acid (shRNA) led to a reduction of the messenger ribonucleotid acid (mRNA) expression of the thymosin in real time polymerase chain reaction (rt-PCR) analysis. In cell culture the survival of the neonatal cardiomyocytes was significantly increased after eEPC application, if the cells express thymosin  $\beta$ 4. The analysis of the TUNEL-staining displayed a considerable lower apoptosis rate of the neonatal endothelial cells, if cocultivated with eEPCs, unless thymosin  $\beta$ 4 expression was reduced via shRNA transfection. The application of thymosin  $\beta$ 4 protein showed similar effects to the eEPC cocultivation in both celltypes. In vivo, numerous eEPCs were detected after 24 h in the ischemic area. The number of



cells was not influenced through the expression of thymosin  $\beta$ 4. The regional application of the eEPCs significantly decreased the infarct size compared to the control group, whereas thymosin  $\beta$ 4 shRNA transfected eEPCs blunted this effect. Once again, the retrograde application of thymosin  $\beta$ 4 protein showed a cardioprotective effect, analog to the effect of the eEPCs. The analysis of the TUNEL-positive cells displayed a clear reduction of the apoptosis rate after retroinfusion of the eEPCs or thymosin  $\beta$ 4 protein. Once more, the eEPCs lost their cardioprotective potential when thymosin  $\beta$ 4 shRNA was transfected. The inflammation in the ischemic area, an important marker for the value of the ischemia/reperfusion injury, was significantly reduced through the administration of the eEPCs or thymosin  $\beta$ 4 protein. Again the reduction of the thymosin  $\beta$ 4 expression abrogated this cardioprotective effect.

These investigations show that embryonic endothelial progenitor cells reduce the ischemia/reperfusion injury at an early postischemic timepoint. The cardioprotective effect of the cells is at least partially dependent on thymosin  $\beta$ 4, since an analog protection may be achieved by local delivery of thymosin  $\beta$ 4 protein.

In general this work shows, that beside a direct use of the progenitor cells and stem cells for the treatment of the reperfusion injury, these cells may be used to identify potential candidate proteins for cardioprotection after acute myocardial infarction and to enable a more effective treatment of the reperfusion injury in humans.

## Literaturverzeichnis

Abunasra HJ, Smolenski RT, Morrison K, Yap J, Sheppard MN, O'Brien T, Suzuki K, Jayakumar J & Yacoub MH (2001). Efficacy of adenoviral gene transfer with manganese superoxide dismutase and endothelial nitric oxide synthase in reducing ischemia and reperfusion injury. *Eur J Cardiothorac Surg.* 20, 153-158.

Antman EE, Cooper H, Domanski M, Feinstein S, Gersh B, Gibler WB, Haigney M, Hochman J, McKinlay S, Norman J, Opie L, Rogers W, Rosenberg Y, Woods K (2002). Early administration of intravenous magnesium to high-risk patients with acute myocardial infarction in the Magnesium in Coronaries (MAGIC) Trial: a randomised controlled trial. *Lancet* 360, 1189-1196.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der ZR, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G & Isner, J.M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964-967.

Avkiran M & Marber MS (2002). Na(+)/H(+) exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects. *J. Am. Coll. Cardiol.* 39, 747-753.

Ballweber E, Hannappel E, Huff T, Stephan H, Haener M, Taschner N, Stoffler D, Aebi U & Mannherz HG (2002). Polymerisation of chemically cross-linked actin:thymosin beta(4) complex to filamentous actin: alteration in helical parameters and visualisation of thymosin beta(4) binding on F-actin. *J. Mol. Biol.* 315, 613-625.

Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL & Robbins RC (2004). Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 428, 668-673.

Bar FW, Tzivoni D, Dirksen MT, Fernandez-Ortiz A, Heyndrickx GR, Brachmann J, Reiber JH, Avasthy N, Tatsuno J, Davies M, Hibberd MG & Krucoff MW (2006). Results of the first clinical study of adjunctive CAldaret (MCC-135) in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention for ST-Elevation Myocardial Infarction: the randomized multicentre CASTEMI study. *Eur. Heart J.* 27, 2516-2523.

Baran KW, Nguyen M, McKendall GR, Lambrew CT, Dykstra G, Palmeri ST, Gibbons RJ, Borzak S, Sobel BE, Gourlay SG, Rundle AC, Gibson CM & Barron HV; Limitation of Myocardial Infarction Following Thrombolysis in Acute Myocardial Infarction (LIMIT AMI) Study Group. (2001). Double-blind, randomized trial of an anti-CD18 antibody in conjunction with recombinant tissue plasminogen activator for acute myocardial infarction: limitation of myocardial infarction following thrombolysis in acute myocardial infarction (LIMIT AMI) study. *Circulation* 104, 2778-2783

Barnes PJ & Karin M (1997). Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* 336, 1066-1071.

Bock-Marquette I, Saxena A, White MD, DiMaio JM & Srivastava D (2004). Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature* 432, 466-472.

Boekstegers P, Giehl W, von DG & Steinbeck G. (1998). Selective suction and pressure-regulated retroinfusion: an effective and safe approach to retrograde protection against myocardial ischemia in patients undergoing normal and high risk percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J. Am. Coll. Cardiol.* 31, 1525-1533.

Boekstegers P, Peter W, von DG, Nienaber CA, Abend M, Rehders TC, Habazettl H, Kapsner T, von LM & Werdan K (1994). Preservation of regional myocardial function and myocardial oxygen tension during acute ischemia in pigs: comparison of selective synchronized suction and retroinfusion of coronary veins to synchronized coronary venous retroperfusion. *J. Am. Coll. Cardiol.* 23, 459-469.

Boekstegers P, von DG, Giehl W, Heinrich D, Hullin R, Kupatt C, Steinbeck G, Baretton G, Middeler G, Katus H & Franz WM (2000). Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins. *Gene Ther.* 7, 232-240.

Bolli R (2001). Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J. Mol. Cell Cardiol.* 33, 1897-1918.

Bolli R & Marban E (1999). Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev.* 79, 609-634.

Braunwald E & Kloner RA (1982). The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 66, 1146-1149.

Brunner F, Maier R, Andrew P, Wölkart G, Zechner R & Mayer B (2003). Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res.* 57, 55-62.

Burchfield JS, Iwasaki M, Koyanagi M, Urbich C, Rosenthal N, Zeiher AM & Dimmeler S (2008). Interleukin-10 from transplanted bone marrow mononuclear cells contributes to cardiac protection after myocardial infarction. *Circ. Res.* 103, 203-211

Chandrasekar B & Freeman GL (1997). Induction of nuclear factor kappaB and activation protein 1 in postischemic myocardium. *FEBS Lett.* 401, 30-34.

Christensen CW., Rieder MA, Silverstein EL & Gencheff NE (1995). Magnesium sulfate reduces myocardial infarct size when administered before but not after coronary reperfusion in a canine model. *Circulation* 92, 2617-2621.

Dawn B, Guo Y, Rezazadeh A, Huang Y, Stein AB, Hunt G, Tiwari S, Varma J, Gu Y, Prabhu SD, Kajstura J, Anversa P, Ildstad ST & Bolli R (2006). Postinfarct cytokine therapy regenerates cardiac tissue and improves left ventricular function. *Circ. Res.* 98, 1098-1105.

Deten A, Volz HC, Clamors S, Leiblein S, Briest W, Marx G & Zimmer HG (2005). Hematopoietic stem cells do not repair the infarcted mouse heart. *Cardiovasc. Res.* 65, 52-63.

Dimmeler S Aicher A., Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rutten H, Fichtlscherer S, Martin H & Zeiher AM (2001). HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J. Clin. Invest* 108, 391-397.

Dimmeler S, Burchfield J & Zeiher AM (2008). Cell-based therapy of myocardial infarction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 208-216.

Elrod JW, Greer JJ, Bryan NS, Langston W, Szot JF, Gebregzlabher H, Janssens S, Feelisch M & Lefer DJ (2006). Cardiomyocyte-specific overexpression of NO synthase-3 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1517-1523.

Engelmann MG, Theiss HD, Hennig-Theiss C, Huber A, Wintersperger BJ, Werle-Ruedinger AE, Schoenberg SO, Steinbeck G & Franz WM (2006). Autologous bone marrow stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor after subacute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing late revascularization: final results from the G-CSF-STEMI (Granulocyte Colony-Stimulating Factor ST-Segment Elevation Myocardial Infarction) trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 48, 1712-1721

Faxon DP, Gibbons RJ, Chronos NA, Gurbel PA & Sheehan F (2002). The effect of blockade of the CD11/CD18 integrin receptor on infarct size in patients with acute myocardial infarction treated with direct angioplasty: the results of the HALT-MI study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 40, 1199-1204.

Ferdinandy P, Schulz R & Baxter GF (2007). Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol. Rev.* 59, 418-458.

Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin A, Kostin S, Zimmermann R, Ullmann C, Lorenz-Meyer S & Schaper J (2000). Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J. Mol. Cell Cardiol.* 32, 197-208.

Galli D, Innocenzi A, Staszewsky L, Zanetta L, Sampaolesi M, Bai A, Martinoli E, Carlo E, Balconi G, Fiordaliso F, Chimenti S, Cusella G, Dejana E, Cossu G & Latini R (2005). Mesoangioblasts, vessel-associated multipotent stem cells, repair the infarcted heart by multiple cellular mechanisms: a comparison with bone marrow progenitors, fibroblasts, and endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 692-697.

Gao F, Gao E, Yue TL, Ohlstein EH, Lopez BL, Christopher TA & Ma XL (2002). Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation* 105, 1497-1502.

Goldstein AL (2007). History of the discovery of the thymosins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1112, 1-13.

Goldstein AL, Guha A, Zatz MM, Hardy MA & White A (1972). Purification and biological activity of thymosin, a hormone of the thymus gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 69, 1800-1803.

Goldstein AL, Hannappel E & Kleinman HK (2005). Thymosin beta4: actin-sequestering protein moonlights to repair injured tissues. *Trends Mol. Med.* 11, 421-429.

Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM & Engler RL (1994). Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J. Clin. Invest* 94, 1621-1628.

Grant DS, Kinsella JL, Kibbey MC, LaFlamme S, Burbelo PD, Goldstein AL & Kleinman HK (1995). Matrigel induces thymosin beta 4 gene in differentiating endothelial cells. *J. Cell Sci.* 108 ( Pt 12), 3685-3694.

Hafezi-Moghadam A, Simoncini T, Yang Z, Limbourg FP, Plumier JC, Rebsamen MC, Hsieh CM, Chui DS, Thomas KL, Prorock AJ, Laubach VE, Moskowitz MA, French BA, Ley K & Liao JK (2002). Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat. Med.* 8, 473-479.

Hannappel E. (2007). beta-Thymosins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1112, 21-37.

Hatzopoulos AK, Folkman J, Vasile E, Eiselen GK & Rosenberg, R.D. (1998). Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from mouse embryos. *Development* 125, 1457-1468.

Hendrikx M, Hensen K, Clijsters C, Jongen H, Koninckx R, Bijmens E, Ingels M, Jacobs A, Geukens R, Dendale P, Vijgen J, Dilling D, Steels P, Mees U & Rummens JL (2006). Recovery of regional but not global contractile function by the direct intramyocardial autologous bone marrow transplantation: results from a randomized controlled clinical trial. *Circulation* 114, I101-I107.

Huang WQ & Wang QR (2001). Bone marrow endothelial cells secrete thymosin beta4 and AcSDKP. *Exp. Hematol.* 29, 12-18.

Huff T, Muller CS, Otto AM, Netzker R & Hannappel E (2001). beta-Thymosins, small acidic peptides with multiple functions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 205-220.

Ince H & Nienaber CA (2006). G-CSF and cardioprotection--deeper experimental insights. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 20, 155-156.

Ince H, Valgimigli M, Petzsch M, de Lezo JS, Kueth F, Dunkelmann S, Biondi-Zoccai G & Nienaber CA (2008). Cardiovascular events and re-stenosis following administration of G-CSF in acute myocardial infarction: systematic review and meta-analysis. *Heart.* 94, 610-616

Ito H (2006). No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 3, 499-506.

Itescu S, Kocher AA & Schuster MD (2003). Myocardial neovascularization by adult bone marrow-derived angioblasts: strategies for improvement of cardiomyocyte function. *Heart Fail Rev.* 8, 253-258.

Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van CJ, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M & Van de WF (2006). Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 367, 113-21.

Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA & Linn H (1960). Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch. Pathol.* 70, 68-78.

Jordan JE, Zhao ZQ & Vinten-Johansen J (1999). The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 43, 860-878.

Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM & Asahara T (2001). Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 103, 634-637.

Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S & Epstein SE (2004). Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 109, 1543-1549.

Klein HH, Pich S, Bohle RM, Lindert-Heimberg S & Nebendahl K (2000). Na(+)/H(+) exchange inhibitor cariporide attenuates cell injury predominantly during ischemia and not at onset of reperfusion in porcine hearts with low residual blood flow. *Circulation* 102, 1977-1982.

Klein HH, Pich S, Lindert S, Nebendahl K, Warneke G & Kreuzer H (1989). Treatment of reperfusion injury with intracoronary calcium channel antagonists and reduced coronary free calcium concentration in regionally ischemic, reperfused porcine hearts. *J. Am. Coll. Cardiol.* 13, 1395-1401.

Klein JJ, Goldstein AL & White A (1966). Effects of the thymus lymphocytopenic factor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 135, 485-495.

Kupatt C, Dessy C, Hinkel R, Raake P, Daneau G, Bouzin C, Boekstegers P & Feron O (2004a). Heat shock protein 90 transfection reduces ischemia-reperfusion-induced myocardial dysfunction via reciprocal endothelial NO synthase serine 1177 phosphorylation and threonine 495 dephosphorylation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1435-1441.

Kupatt C, Habazettl H, Zahler S, Weber C, Becker BF, Messmer K & Gerlach E (1997a). ACE-inhibition prevents postischemic coronary leukocyte adhesion and leukocyte-dependent reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 36, 386-395.

Kupatt C, Hinkel R, Horstkotte J, Deiss M, von Bruhl ML, Bilzer M & Boekstegers P (2004b). Selective retroinfusion of GSH and cariporide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in a preclinical pig model. *Cardiovasc. Res.* 61, 530-537.

Kupatt C, Hinkel R, Lamparter M, von Bruhl ML, Pohl T, Horstkotte J, Beck H, Muller S, Delker S, Gildehaus FJ, Buning H, Hatzopoulos AK & Boekstegers P (2005a). Retroinfusion of embryonic endothelial progenitor cells attenuates ischemia-reperfusion injury in pigs: role of phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase. *Circulation* 112, 1117-1122.

Kupatt C, Hinkel R, Vachenauer R, Horstkotte J, Raake P, Sandner T, Kreuzpointner R, Muller F, Dimmeler S, Feron O & Boekstegers P (2003). VEGF165 transfection decreases postischemic NF-kappa B-dependent myocardial reperfusion injury in vivo: role of eNOS phosphorylation. *FASEB J.* 17, 705-707.

Kupatt C, Horstkotte J, Vlastos GA, Pfosser A, Lebherz C, Semisch M, Thalgott M, Buttner K, Browarzyk C, Mages J, Hoffmann R, Deten A, Lamparter M, Muller F, Beck H, Buning H, Boekstegers P & Hatzopoulos AK (2005b). Embryonic endothelial progenitor cells expressing a broad range of proangiogenic and remodeling factors enhance vascularization and tissue recovery in acute and chronic ischemia. *FASEB J.* 19, 1576-1578.

Kupatt C, Weber C, Wolf DA, Becker BF, Smith TW & Kelly RA (1997b). Nitric oxide attenuates reoxygenation-induced ICAM-1 expression in coronary microvascular endothelium: role of NFkappaB. *J. Mol. Cell Cardiol.* 29, 2599-2609

Kupatt C, Wichels R, Deiss M, Molnar A, Lebherz C, Raake P, von DG, Hahnel D & Boekstegers P (2002). Retroinfusion of NFkappaB decoy oligonucleotide extends cardioprotection achieved by CD18 inhibition in a preclinical study of myocardial ischemia and retroinfusion in pigs. *Gene Ther.* 9, 518-526

Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin LZ, Cai CL, Lu MM, Reth M, Platoshyn O, Yuan JX, Evans S & Chien KR (2005). Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 433, 647-653.

Lemasters JJ, Bond JM, Chacon E, Harper IS, Kaplan SH, Ohata H, Trollinger DR, Herman B & Cascio WE (1996). The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS* 76, 99-114

Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebekk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Groggaard HK, Bjornerheim R, Brekke M, Muller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE & Forfang K (2006). Intracoronary Injection of Mononuclear Bone Marrow Cells in Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 355, 1199-1209.

Malinda KM, Goldstein AL & Kleinman HK (1997). Thymosin beta 4 stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J.* 11, 474-481.

Mertens P, Maes A, Nuyts J, Belmans A, Desmet W, Esplugas E, Charlier F, Figueras J, Sambuceti G, Schwaiger M, Mortelmans L & Van de Werf F; PSALM investigators. (2006). Recombinant P-selectin glycoprotein ligand-immunoglobulin, a P-selectin antagonist, as an adjunct to thrombolysis in acute myocardial infarction. The P-Selectin Antagonist Limiting Myonecrosis (PSALM) trial. *Am Heart J.* 152; 125 e1-8.

Messina E, De AL, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latronico MV, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G & Giacomello A (2004). Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ. Res.* 95, 911-921.

Mirotsov M, Zhang Z, Deb A, Zhang L, Gneccchi M, Noiseux N, Mu H, Pachori A & Dzau V (2007). Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 1643-1648.

Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, Kida I, Tomita N, Moriguchi A, Maeda K, Sawa Y, Kaneda Y, Higaki J & Ogihara T (1997). In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction. *Nat. Med.* 3, 894-899

Moore KL, Patel KD, Bruehl RE, Li F, Johnson DA, Lichenstein HS, Cummings RD, Bainton DF, McEver RP (1995). P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol.* 128, 661-71

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A & Anversa P (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410, 701-705.

Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA & Rafii S (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95, 952-958.

Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R., Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, Rossi MI, Carvalho AC, Dutra HS, Dohmann HJ, Silva GV, Belem L, Vivacqua R, Rangel FO, Esporcatta R, Geng YJ, Vaughn WK, Assad JA, Mesquita ET & Willerson JT (2003). Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 107, 2294-2302.

Philp D, Goldstein AL & Kleinman HK (2004). Thymosin beta4 promotes angiogenesis, wound healing, and hair follicle development. *Mech. Ageing Dev.* 125, 113-115.

Piper HM, Abdallah Y & Schafer C (2004). The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* 61, 365-371.



Piper HM, Garcia-Dorado D & Ovize M (1998). A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 38, 291-300.

Pizzetti F, Turazza FM, Franzosi MG, Barlera S, Ledda A, Maggioni AP, Santoro L & Tognoni G (2001). Incidence and prognostic significance of atrial fibrillation in acute myocardial infarction: the GISSI-3 data. *Heart* 86, 527-532.

Raake P, von DG, Hinkel R, Vachenaer R, Sandner T, Beller S, Andrees M, Kupatt C, Schuler G & Boekstegers P (2004). Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins: comparison with surgical and percutaneous intramyocardial gene delivery. *J. Am. Coll. Cardiol.* 44, 1124-1129.

Raake PW, Hinkel R, Muller S, Delker S, Kreuzpointner R, Kupatt C, Katus HA, Kleinschmidt JA, Boekstegers P & Muller OJ (2008). Cardio-specific long-term gene expression in a porcine model after selective pressure-regulated retroinfusion of adeno-associated viral (AAV) vectors. *Gene Ther.* 15, 12-17.

Rosenzweig A (2006). Cardiac Cell Therapy - Mixed Results from Mixed Cells. *N Engl J Med* 355, 1274-1277

Rupprecht HJ, vom DJ, Terres W, Seyfarth KM, Richardt G, Schultheibeta HP, Buerke M, Sheehan FH & Drexler H (2000). Cardioprotective effects of the Na(+)/H(+) exchange inhibitor cariporide in patients with acute anterior myocardial infarction undergoing direct PTCA. *Circulation* 101, 2902-2908.

Rusnak JM, Kopecky SL, Clements IP, Gibbons RJ, Holland AE, Peterman HS, Martin JS, Saoud JB, Feldman RL, Breisblatt WM, Simons M, Gessler CJ Jr & Yu AS (2001). An anti-CD11/CD18 monoclonal antibody in patients with acute myocardial infarction having percutaneous transluminal coronary angioplasty (the FESTIVAL study). *Am. J. Cardiol.* 88, 482-487.

Schächinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S & Zeiher AM (2004). Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 44, 1690-1699.

Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W., Hambrecht R, Höltschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Süselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S & Zeiher AM, for the REPAIR-AMI Investigators. (2006). Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction, *N. Engl. J. Med.* 355, 1210–1221

Smart N, Risebro CA, Melville AA, Moses K, Schwartz RJ, Chien KR & Riley PR (2007). Thymosin beta-4 is essential for coronary vessel development and promotes neovascularization via adult epicardium. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1112, 171-188.

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G & Wernet P (2002). Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 106, 1913-1918.

- Sumeray MS, Rees DD & Yellon DM (2000). Infarct size and nitric oxide synthase in murine myocardium. *J. Mol. Cell Cardiol.* 32, 35-42.
- Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magne M, Isner JM & Asahara T (1999). Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat. Med.* 5, 434-438.
- Theroux P, Gregoire J, Chin C, Pelletier G, de GP & Juneau M (1998). Intravenous diltiazem in acute myocardial infarction. Diltiazem as adjunctive therapy to activase (DATA) trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 32, 620-628.
- Vajkoczy P, Blum S, Lamparter M, Mailhammer R, Erber R, Engelhardt B, Vestweber D & Hatzopoulos AK (2003). Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis. *J. Exp. Med.* 197, 1755-1765.
- Vinten-Johansen J (2004). Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 61, 481-497.
- Wang CC, Chen CH, Lin WW, Hwang SM, Hsieh PC, Lai PH, Yeh YC, Chang Y & Sung HW (2008). Direct intramyocardial injection of mesenchymal stem cell sheet fragments improves cardiac functions after infarction. *Cardiovasc. Res.* 77, 515-524.
- Wei J, Blum S, Unger M, Jarmy G, Lamparter M, Geishauser A, Vlastos GA, Chan G, Fischer KD, Rattat D, Debatin KM, Hatzopoulos AK & Beltinger C (2004). Embryonic endothelial progenitor cells armed with a suicide gene target hypoxic lung metastases after intravenous delivery. *Cancer Cell* 5, 477-488.
- Weyrich AS, Ma XY, Lefer DJ, Albertine KH & Lefer AM (1993). In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J. Clin. Invest* 91, 2620-2629.
- Weyrich AS, McIntyre TM, McEver RP, Prescott SM & Zimmerman GA (1995). Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor-alpha secretion. Signal integration and NF-kappa B translocation. *J. Clin. Invest* 95, 2297-2303.
- White HD & Chew DP (2008). Acute myocardial infarction. *Lancet* 372, 570-584.
- Williams FM, Kus M, Tanda K & Williams TJ. (1994). Effect of duration of ischaemia on reduction of myocardial infarct size by inhibition of neutrophil accumulation using an anti-CD18 monoclonal antibody. *Br J Pharmacol.* 111, 1123-1128
- Wollert KC (2008). "Cell therapy for acute myocardial infarction", *Curr.Opin.Pharmacol.*, 8, S. 202-210.
- Yellon DM & Baxter GF (1999). Reperfusion injury revisited: is there a role for growth factor signaling in limiting lethal reperfusion injury? *Trends Cardiovasc. Med.* 9, 245-249.

Yellon DM & Hausenloy DJ (2007). Myocardial reperfusion injury. *N. Engl. J. Med.* 357, 1121-1135.

Yip HK, Chang LT, Wu CJ, Sheu JJ, Youssef AA, Pei SN, Lee FY & Sun CK (2008). Autologous bone marrow-derived mononuclear cell therapy prevents the damage of viable myocardium and improves rat heart function following acute anterior myocardial infarction. *Circ J.* 72, 1336-1345

Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, Hanley A, Scadova H, Qin G, Cha DH, Johnson KL, Aikawa R, Asahara T & Losordo DW (2005). Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J. Clin. Invest* 115, 326-338.

Zeymer U, Suryapranata H, Monassier JP, Opolski G, Davies J, Rasmanis G, Linssen G, Tebbe U, Schroder R, Tiemann R, Machnig T & Neuhaus KL (2001). The Na(+)/H(+) exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Results of the evaluation of the safety and cardioprotective effects of eniporide in acute myocardial infarction (ESCAMI) trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 38, 1644-1650.

Zhao ZQ, Morris CD, Budde JM, Wang NP, Muraki S, Sun HY, Guyton RA. (2003). Inhibition of myocardial apoptosis reduces infarct size and improves regional contractile dysfunction during reperfusion. *Cardiovasc Res.* 59, 132-142.

Zohlhofer D, Ott I, Mehilli J, Schomig K, Michalk F, Ibrahim T, Meisetschlager G, von WJ, Bollwein H, Seyfarth M, Dirschinger J, Schmitt C, Schwaiger M, Kastrati A & Schomig AI (2006). Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA* 295, 1003-1010.

Zweier JL & Talukder A (2006). The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 70, 181-190.

## Abkürzungsverzeichnis

AIV	Anteriore interventrikuläre Vene
Akt	Proteinkinase B
AP-1	Aktivator-Protein 1
bFGF	Basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
cAMP	Zyklisches Adenosin Monophosphat
CD	Cluster of Differentiation
c-Kit	Stammzelleffektor-Rezeptor (CD117)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eEPCs	Embryonale endotheliale Progenitorzellen
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	Endotheliale Stickoxid Synthase
EPCs	Endotheliale Progenitorzellen
Erk	Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
F-Aktin	Filamentöse Form des Aktin
FGF-2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2
flt 1	Tyrosin-Kinase Rezeptor (VEGF-Rezeptor) 1
Flt-3	FMS-artige Tyrosinkinase
G-Aktin	Globuläres Aktin
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GSH	Reduziertes Glutathion
h	Stunden / hours
IB4	Isolectin B4
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IGF	Insulinartiger Wachstumsfaktor
IL-6	Interleukin 6
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDA	Kilodalton
L-NAME	N-Nitro-L-Arginin-Methyl-Esther
MCP-1	Monozyten chemoattraktives Protein-1
MHC-I	Haupthistokompatibilitätskomplex

## 9. Abkürzungsverzeichnis

---

min	Minuten / minutes
mRNA	Boten-RNA
NFκB	Nukleus Faktor-kappa B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickoxid
Oct-4	Octamer-4
PI-3 Kinase	Phospho-Inositol-3-Kinase
PIGF	Plazenta Wachstumsfaktor
PSGL	P-Selektin Ligand
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rtPCR	„real time“ Polymerasekettenreaktion
sca-1	Stammzell-Antigen 1
shRNA	„short hairpin“ Ribonukleinsäure
SSR	Selektive druck-regulierte Retroinfusion
TGF-β	Transforming Growth Factor β
Tie-2	Tyrosinkinase-Rezeptor 2
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
VE-Cadherin	Vaskuläres Endotheliales Cadherin
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben:

Herrn PD Dr. Christian Kupatt für die Überlassung dieses interessanten Dissertationsthemas sowie die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung während dieser Zeit. Er hat mein Interesse an der Wissenschaft geweckt und stets gefördert.

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Wanke für seine Bereitschaft, mich als externen Doktoranden mitzubetreuen.

Herrn Prof. Dr. Peter Boekstegers für die Unterstützung und die Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Ein ganz spezieller Dank gilt auch den Kooperations-Partnern, ohne die diese Arbeit nicht zustanden gekommen wäre. Im Besonderen hier zu nennen:

- Herrn Prof. Antonis Hatzopoulos für die Überlassung der Zellen.
- Herrn Prof. Dr. Ewald Hannappel für die HPLC Analysen des Thymosin  $\beta$ 4 Gehaltes.
- Frau Prof. Ildiko Bock-Marquette für das zur Verfügungstellen des Thymosin  $\beta$ 4 Protein und die konstruktiven Diskussionen.
- Und die Kollegen/-innen, ohne deren Mitarbeit die Durchführung der Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Frau Susanne Helbig, die während der ganzen Zeit im Labor mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Pohl gilt mein Dank für die Bereitstellung des Großtier-OPs im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin zur Durchführung unserer Experimente. Im Besonderen möchte ich mich auch für die freundliche Aufnahme und

## 10. Danksagung

---

die vielfache Unterstützung bei den Mitarbeitern im Walter-Brendel-Zentrum bedanken, vor allem bei Herrn Dr. Eckart Thein, Frau Brigitte Blount und ihrem Team im Tierstall.

Der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projektes.

Meiner Familie möchte ich für ihren Zuspruch und die Aufmunterungen danken. Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Ehemann Gerd Hinkel für sein Verständnis und für die große moralische Unterstützung dieser Arbeit.