

Aus der
Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie am Universitätsklinikum Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff

***In vitro* Charakterisierung des
Migrationsverhaltens gegenüber SDF-1 und
ATP von Zellen des humanen Knochenmarks**

Inauguraldissertation zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock



vorgelegt von

Michael Maximilian Sebastian Laupheimer
geb. am 01.10.1982 in Isny im Allgäu

Rostock, den 22.12.2013

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff
Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Christian Junghanß
Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin Universität Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Ingo Kutschka
Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie Universitätsklinikum Magdeburg

Tag der Einreichung: 27.01.2014

Tag der mündlichen Verteidigung: 13.08.2014

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Publikation:

Donndorf P, Useini D, Lux CA, Vollmar B, Delyagina E, **Laupheimer M**, Kaminski A, Steinhoff G. - „*Analysing migratory properties of human CD 133⁺ stem cells in vivo after intraoperative sternal bone marrow isolation*”.

Cell Transplantation 2013;22(9):1627-35. DOI: 10.3727/096368912X657729. Epub 2012 Oct 8.

Poster:

Laupheimer M, Lux CA, Ma N, Steinhoff G - „*CD133⁺ stem cells migrate towards extracellular ATP in vitro*“ - 6th Annual Congress of the German Society for Stem Cell Research, Düsseldorf, 20.-22. November 2011

Lux CA, Mark P, **Laupheimer M**, Klopsch C, Gäbel R, Ma N, Steinhoff G - „*Non-freezing human stem cell preservation for transportation*” – Cardiac Stem Cell and Tissue Engineering Conference 2011 – San Servolo – Venedig (Italien), 18.-20. Mai 2011

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	4
1. EINLEITUNG	6
2. LITERATUR	8
2.1 Kardiale Regeneration	8
2.1.1 Chron. Herzinsuffizienz/Myokardinfarkt: Epidemiologie/Pathophysiologie	8
2.1.2.1 Myokardiale Regeneration: Mechanismen	9
2.1.2.2 Regeneration unter der Beteiligung von Knochenmarkzellen	10
2.1.3.1 Zellprodukte zur kardialen Stammzelltherapie	11
2.1.3.2 Differenzierte Zellen - Skelettmyoblasten	12
2.1.3.3 Zellgemische	12
2.1.3.4 Isolierte Stammzellen	14
2.1.3.5 Kultivierte oder veränderte Zellen – iPS-Zellen	18
2.1.3.6 Kardiale Stammzellen	19
2.2. Migration	19
2.2.1 Mechanismen der Zellmigration	19
2.2.2 Stammzell-Homing	20
2.2.2.1 Mechanismen der SDF-1 induzierten Chemotaxis	21
2.2.2.2 Manipulation des Stammzell-Homings in der regenerativen Medizin	22
2.3 ATP	23
2.3.1 Bedeutung	23
2.3.2 Mechanismus, Pathophysiologie, regulatorische Wirkung	23
3. MATERIAL UND METHODEN	25
3.1 Verwendete Geräte	25
3.2 Software	25
3.3 Standard- und Pufferlösungen	26
3.4 Punktion und Entnahme von verwendeten Knochenmarkproben	26
3.5 Bestimmung der Zellzahl/Vitalität und Reinheit der isolierten BM-TNCs des entnommenen Knochenmarks	27
3.6 Zellgewinnung	27
3.6.1 Zellgewinnung CD133+ Zellen	27
3.6.1.1 Materialien	27
3.6.1.2 Isolierung der CD133+ Zellen	28
3.6.2 Zellgewinnung der BM-TNCs	30
3.6.2.1 Materialien	30
3.6.2.2 Isolierung der BM-TNCs mittels ResQ-Isolation	30
3.6.2.3 Charakterisierung der isolierten BM-TNCs	33
3.7 Durchflusszytometrie – FACS Analyse	34
3.7.1 Materialien	34
3.7.2 Durchführung	34

3.8 In vitro – Zellmigrationstest: Boyden Kammer	36
3.8.1 Materialien	36
3.8.2 Herstellung/Lagerung Stocksolution SDF-1/ATP	36
3.8.3 Migration der CD133+ Zellen (SDF-1/ATP)	37
3.8.4 Migration der BM-TNCs - ResQ	38
3.9 Untersuchung der Toxizität von ATP auf CD133+ Zellen	39
3.9.1 Materialien	39
3.9.2 Durchführung	39
3.10 CFU-EC	40
3.10.1 Materialien	40
3.10.2 Durchführung	40
3.11 Konfokalmikroskopische Analyse der Zellmobilität von CD133+ Zellen	41
3.12 Statistische Methoden/Auswertung	41
4. ERGEBNISSE	42
4.1 Untersuchung der Migration von isolierten CD133+ Zellen	42
4.1.1 Zusammensetzung und Qualität der isolierten CD133+ Zellen	42
4.1.2 Migration von CD133+ Zellen zu SDF-1	44
4.1.3 Beeinflussung des Migrationsverhaltens von CD133+ Zellen durch ATP	44
4.1.4 Einfluss einer Präkonditionierung mit ATP auf die Migration von CD133+ Zellen zu SDF-1	46
4.1.5 Erhalt von Viabilität und Funktion ATP-behandelter CD133+ Stammzellen	47
4.2. Untersuchung der Migration von BM-TNCs aus Knochenmark	50
4.2.1 Zusammensetzung und Qualität der isolierten BM-TNCs	50
4.2.2 Analyse von Stammzellmarkern auf spontan migrierten Zellen im Vgl. zu frisch isolierten BM-TNCs	53
4.2.3 BM-TNCs migrieren zu SDF-1, ATP, sowie zur Kombination SDF-1/ATP	55
4.2.4 Differenzielle Migration verschiedener Zellpopulationen zu SDF-1 oder SDF-1/ATP	56
4.2.5 Migration versch. Zellpopulationen zu SDF-1 oder der Kombination aus SDF-1/ATP – Vgl. der Subpopulationen	62
5. DISKUSSION	71
6. ZUSAMMENFASSUNG	83
7. LITERATURVERZEICHNIS	84
8. ANHANG	95
i. Ergänzende Diagramme	95
ii. Abkürzungsverzeichnis	97
iii. Danksagung	99
iv. Selbstständigkeitserklärung	100
v. Thesen	101

1. Einleitung

Die kardiale Stammzelltherapie stellt seit Jahren ein wichtiges Forschungsgebiet in der regenerativen Medizin dar. In mehreren klinischen Untersuchungen konnte bereits ein positiver Effekt von Knochenmarkszellen auf geschädigtes Myokard nachgewiesen werden. Autologe CD133-positive Stammzellen zeigten in klinischen Phase I bzw. II Studien positive Effekte auf die Herzfunktion nach einem Myokardinfarkt (1).

Das Oberflächenmolekül CD133 bzw. sein glykosilierungs-abhängiges Epitop AC133 gilt als Oberflächenmarker für humane hämatopoetische Stammzellen (2,3). Auch nicht-hämatopoetische Zellen, wie z.B. neurale Stammzellen, können CD133 als Oberflächenmolekül tragen (4). Wie CD34+ Stammzellen besitzen auch CD133+ Zellen als Hämangioblasten sowohl hämatopoetisches, als auch angiogenetisches Potenzial (5–7).

SDF-1 (Stromal cell-derived Factor), gebildet in den Stromazellen des Knochenmarks, spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation von Migration und Mobilisierung von CXCR4+ hämatopoetischen Stammzellen (8). Das Chemokin SDF-1, synonym auch bekannt als CXCL12, stellt einen potenten Lockstoff für verschiedenartige Leukozytenpopulationen dar.

Der Chemokin-Rezeptor CXCR4 (syn. CD184) ist funktionell in einer Vielzahl von Geweben und Zelltypen exprimiert. So z.B. in hämatopoetischen Vorläuferzellen, sowie auch auf der Zelloberfläche der meisten Leukozyten-Subpopulationen. Auch auf der Mehrheit aller T-Lymphozyten-Untergruppen, aller B-Zellen und Monozyten, sowie schwach auf natürlichen Killerzellen, ist der CXCR4 Rezeptor exprimiert (9).

Die SDF-1 Genexpression wird unter anderem in Endothelzellen durch den Hypoxie-indizierbaren Faktor-1 (HIF-1) reguliert. Hierdurch kommt es zu einer erhöhten Adhäsion, Migration und Homing zirkulierender CXCR4-positiver Vorläuferzellen in das ischämische Gewebe (10).

Zusätzlich kommt es im menschlichen Herzen aufgrund von Hypoxie oder Ischämie des Herzens, beispielsweise durch einen Infarkt zu einer vermehrten Ausschüttung von ATP in den extrazellulären Raum (11–15). Die Motilität und Migration von Zellen verschiedener Typen, wie z.B. Fibroblasten, Endothelzellen oder Nervenzellen, können durch Nukleotide, wie ATP beeinflusst werden (16). In humanen

Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass ATP eine Migrationsbewegung durch Veränderungen im Zytoskelett bewirkt (17).

Rossi *et al.* berichtete in einer 2007 veröffentlichten Untersuchung über UTP bzw. auch ATP als chemotaktisches Molekül, das die Regulation von hämatopoetischen Stammzellen, insbesondere die Beeinflussung der Motilität von CD34+ Zellen *in vivo* und *in vitro* beschreibt (18). Mitogen-activated Protein Kinasen (MAPKs), aktiviert durch extrazelluläre Signalmoleküle, sind an der Migration von Zellen beteiligt. ATP besitzt die Möglichkeit, an Purinorezeptoren zu binden und z.B. über die EPK („extracellular-signal regulated kinase“) oder über den p38 Signalweg die Migration von Zellen zu beeinflussen (19).

Insgesamt besteht Uneinigkeit, ob ATP ein Lockstoff für die Migration der Zellen ist oder die zufällige Eigenbewegung der Zelle durch ATP unterstützt wird (16).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die *in vitro* Charakterisierung der Migration von Zellpopulationen aus humanem Knochenmark zu den Chemokinen SDF-1 und ATP. Einerseits soll die differenzielle Migration von Stammzellsubpopulationen in einem zur Therapie vorgesehenen Zellkonzentrat (BM-TMC) untersucht, andererseits das Migrationspotenzial isolierter CD133+ Stammzellen ermittelt werden. Des Weiteren soll eine mögliche Verstärkung der durch SDF-1 ausgelösten Chemotaxis durch ATP, sowie der Nutzen einer Vorbehandlung der Zellen mit ATP analysiert werden.

2. Literatur

2.1 Kardiale Regeneration

2.1.1 Chron. Herzinsuffizienz/Myokardinfarkt: Epidemiologie/Pathophysiologie

Im Jahre 2010 verstarben in der Bundesrepublik Deutschland ca. 850.000 Menschen. Davon starben insgesamt ca. 352.000 Menschen infolge einer Erkrankung des Herz-/Kreislaufsystems, wovon ca. 149.000 männlich und ca. 153.000 weiblich waren. Somit stellen Herz-/Kreislauf-Erkrankungen mit 41,1% eine der häufigsten Todesursachen in der Bundesrepublik dar. An einem Myokardinfarkt verstarben im Jahre 2010 ca. 59.000 Personen (20).

Durch einen Myokardinfarkt kommt es im Herzmuskel zu einem Verlust von vitalem Herzmuskelgewebe. Sekundär führt ein Myokardinfarkt im weiteren Verlauf zu Umbauprozessen (Remodelling) im Infarktgebiet (21).

Arteriosklerose, charakterisiert durch eine aktive und komplexe inflammatorische Gefäßwandreaktion wird als Hauptursache des Myokardinfarkts angesehen. Ursprünglich liegt der Arteriosklerose eine endotheliale Dysfunktion der Gefäßwand zu Grunde (22). Durch die Einlagerung von Lipiden und die Einwanderung von Leukozyten in das Endothel bildet sich im weiteren Verlauf ein Atherom. Die Ruptur dieses Atheroms führt durch die Aktivierung und Anlagerung von Thrombozyten zum Verschluss eines Herzkranzgefäßes (23).

Je nach Dauer der Ischämie des Herzmuskels werden die Kardiomyozyten unterschiedlich geschädigt. Bereits nach 20 – 40 Minuten führt die Mangelversorgung zur irreversiblen Schädigung der kontraktilen Elemente. Ist die myokardiale Ischämie weniger schwer, dafür aber von längerer Dauer, können Kardiomyozyten bei reduzierter Kontraktilität vital bleiben. Die Funktion kann sich nach Reperfusion wieder verbessern. Man spricht hier auch vom „hibernating Myokard“ (24).

Basierend auf der Erkenntnis von Masuda *et al.*, die Stammzellen in knochenmarkfernen Organen fanden (25), gelang es erst in Tierversuchen (26), später in klinischen Studien nachzuweisen (27), dass eine Verbesserung des geschädigten, minder versorgten Herzmuskels durch die Transplantation von Stammzellen möglich ist.

Die lokale Ischämie im „hibernating Myokard“ wird als der stärkste Auslöser für kardiale Regeneration durch Knochenmarkstammzellen beschrieben (28).

Der grundlegende Mechanismus, der hierbei für eine Verbesserung der Herzfunktion verantwortlich ist, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden und ist Gegenstand aktueller Diskussionen. Die ursprünglich favorisierte These der Bildung von Myokardgewebe und Kapillargefäßen durch Transdifferenzierung von Knochenmarkzellen ist umstritten (29). Vieles spricht derzeit für eine parakrine Sekretion. Die beobachteten Effekte der parakrinen Sekretion führen zu einer Proliferation der Myokardzellen und hierdurch zu einer Verbesserung der Herzfunktion (30). Dadurch soll das geschädigte Myokard besser durchblutet werden und die ventrikuläre Pumpfunktion verbessert werden (31).

2.1.2.1 Myokardiale Regeneration: Mechanismen

In Folge eines Herzinfarktes kommt es im Myokard des Ventrikels aufgrund der Ischämie bzw. der Reperfusion zu einer interstitiellen Fibrose, zur Apoptose und zur Hypertrophie der Kardiomyozyten. Die Hypertrophie der Kardiomyozyten ist eine adaptive Antwort auf die erhöhte kardiale Belastung des linken Ventrikels. Neben den verschiedenen Stimulatoren für eine Hypertrophie der Kardiomyozyten führen parakrine und autokrine Mechanismen zu einer Aktivierung von Membranrezeptor gestützten Signalwegen. Folge ist unter anderem eine Zunahme der Zellgröße, der Proteinsynthese und einer verbesserten Organisation der Sarkomere (32–34).

Im Verlauf kann es im Rahmen der physiologischen Umbauvorgänge zur Bildung neuer Blutgefäße im ischämischen Infarktareal kommen, wodurch eine Verbesserung der myokardialen Pumpfunktion erreicht werden kann. Die Ischämie im Herzmuskelgewebe und die damit verbundene Abnahme des zellulären Sauerstoffpartialdrucks führen zu einer Gefäßneubildung im Infarktareal (35). Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnte nachgewiesen werden, dass es in Folge der Ischämie im Herzmuskel zunächst zu einer vermehrten Expression des hypoxieinduzierbaren Faktors (HIF-1) kommt (36). HIF-1 ist ein oxygenierungsabhängiger Transkriptionsfaktor, der in Abhängigkeit des Sauerstoffgehalts der Zelle die Transkription verschiedener Gene aktiviert, die an der Angiogenese und Zellproliferation im ischämischen Herzmuskelgewebe beteiligt sind (37). Unter anderem wird die Transkription des vaskulären endothelialen Faktors (VEGF) durch

HIF-1 gesteuert (38). Im Stadium des akuten Infarkts kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von VEGF (39). VEGF stimuliert das Gefäßwachstum, verändert die Morphologie von Endothelzellen, induziert Zellmigration und erhöht die Gefäßpermeabilität. Außerdem konnte gezeigt werden, dass VEGF Auswirkungen auf das Überleben von Endothelzellen und der neugebildeten Blutgefäße als sog. „Survival Factor“ haben kann (40). Des Weiteren ist VEGF auch an inflammatorischen Prozessen und der damit verbundenen chemotaktischen Anlockung von Monozyten beteiligt. Monozyten können durch Wachstumsfaktoren die Bildung von Endothelzellen und glatten Muskelzellen induzieren (41). Außerdem führt eine vermehrte Ausschüttung von VEGF zur Mobilisierung von verschiedenartigen Stammzellen (42).

2.1.2.2 Regeneration unter der Beteiligung von Knochenmarkzellen

Bis vor wenigen Jahren galt das menschliche Herz als postmitotisches, terminal differenziertes Organ (43). Aufgrund der terminalen Differenzierung der Kardiomyozyten und der damit verminderten Fähigkeit der Zellerneuerung wurde davon ausgegangen, dass eine Erneuerung der Kardiomyozyten nicht möglich ist und das Herz somit keine regenerativen Fähigkeiten besitzt (44). Als einzige Möglichkeit der Kompensation der Herzinsuffizienz nach einem Herzinfarkt wurde die Hypertrophie der Herzmuskelzellen angenommen (45). Mittlerweile konnte dieses Dogma anhand von Befunden von Patienten nach einer Herztransplantation widerlegt werden. In Myokardbiopsien von männlichen Transplantatempfängern, die ein weibliches Spenderorgan bekamen, wurden Y-chromosomale Zellen nachgewiesen. Y-Chromosomen fanden sich nicht nur in den Kardiomyozyten, sondern auch in Endothelzellen der Gefäße. Hieraus resultierte die Annahme, dass eingewanderte Zellen an der Regeneration des Myokards und der Bildung neuer Gefäße beteiligt sind (46).

Bestärkt wird die Annahme der physiologischen myokardialen Regeneration durch Untersuchungen von Bergmann *et al.* aus dem Jahre 2009 (47). Durch den Einbau von radioaktiv markiertem C14 in die DNA von Myokardzellen konnte das Alter der Zellen abgeschätzt werden. Mit Hilfe des radioaktiven Zerfalls von C14 wurde festgestellt, dass die Erneuerungsrate durch körpereigene Stammzellen pro Jahr ca.

1 % (im Alter von 20 Jahren) beträgt. Allerdings werden weniger als 50% der Kardiomyozyten im Laufe eines Lebens ausgetauscht.

Kommt es aber, wie bei einem Myokardinfarkt, zum massiven Absterben von Herzmuskelzellen, reicht diese kardiale Regeneration allein nicht aus (48).

Orlic *et al.* gelang es 2001 mittels Tierversuchen an Mäusen nachzuweisen, dass bestimmte Subpopulationen aus dem Knochenmark in geschädigtes Myokard, z.B. nach einem Infarkt einwandern können (49). Hattori und Matsubara *et al.* berichteten 2004 von positiven Effekten auf die Neovaskularisierung von ischämischem Winterschlaf-Myokard durch mononukleäre Knochenmarkszellen (50). Durch eine Differenzierung der Knochenmarkszellen zu Myozyten und Blutgefäßen ist eine Linderung der koronaren Herzkrankheit möglich (26). Am 7.Tag nach einem akuten Myokardinfarkt ist die Zahl der zirkulierenden CD34+ Zellen und der Konzentration von endothelialen Wachstumsfaktoren im Plasma am höchsten (51).

Regenerationsprozesse auf der Basis von Stammzellen stellen somit einen physiologischen Prozess dar, der auf verschiedenartigen, teilweise noch ungeklärten Mechanismen basiert. Aktuell wird einerseits die Induktion der Neovaskularisierung des Infarktgebietes, andererseits die Verminderung der Apoptoserate der Kardiomyozyten, u.a. induziert durch von Stammzellen sezernierte Wachstumsfaktoren als Hauptmechanismen der kardialen Regeneration angesehen (30,31). Die Neovaskularisierung im ischämischen Gewebe, ausgelöst durch Stammzellen, kann durch Einspritzung von Kapillaren aus proliferierenden Endothelzellen, sowie durch Differenzierung von endothelialen Vorläuferzellen aus peripherem Blut oder Knochenmark erfolgen (52). Außerdem werden weitere Mechanismen der Regeneration durch Stammzellen diskutiert: Differenzierung von mononukleären Zellen in Kardiomyozyten, Wachstum von im Grenzbereich befindlichen Myozyten durch Zytokine, Aktivierung von gewebeeigenen Stammzellen und Vereinigung von injizierten Stammzellen und von vorhandenen Myozyten (53,54).

2.1.3.1 Zellprodukte zur kardialen Stammzelltherapie

Durch Einsatz von Stammzellen zur myokardialen Regeneration ergaben sich im letzten Jahrzehnt neue Behandlungsansätze zur Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen (55). Ziel der kardialen Stammzelltherapie ist es, die Herzfunktion bei

Herzinsuffizienz bzw. nach einem Infarkt zu erhalten bzw. zu verbessern. Mittlerweile gelang es in verschiedenen Studien, die Leistungsfähigkeit der kardialen Stammzelltherapie in der Regeneration von erworbenen und angeborenen Herzerkrankungen nachzuweisen (56). Allerdings wird diese therapeutische Regeneration aktuell kontrovers diskutiert (57).

Sowohl embryonale, als auch adulte Stammzellen wie endotheliale Progenitorzellen, mesenchymale, hämatopoetische, kardiale Stammzellen und Myoblasten sind Gegenstand der Forschung zur Bildung von kardiovaskulären Strukturen. Erste Versuche zur kardialen Stammzelltherapie wurden mit den als differenziert geltenden Skelettmyoblasten durchgeführt (58).

2.1.3.2 Differenzierte Zellen - Skelettmyoblasten

Nach zunächst vielversprechenden Tierversuchen war es Philippe Menasché, der im Jahr 2000 die erste Injektion von Skelettmyoblasten bei einem Patienten mit Hinterwandinfarkt durchführte (59). Die autologen Skelettmyoblasten liegen als Vorläuferzellen im Ruhezustand in der Basalmembran von Skelettmuskelzellen vor, können rasch mobilisiert werden, sind gegenüber Ischämie sehr resistent und können problemlos in einer großen Anzahl durch Biopsie entnommen werden (59,60). Myoblasten sind nicht zur Kontraktion befähigt und haben auch keine elektrische Kopplung zu myokardialen Zellen (61,62). Durch Zelltransplantation bzw. Injektion von Myoblasten kommt es zu einer Verbesserung der Herzfunktion und zu einer Verminderung der ventrikulären Dilatation (63,64). Ursächlich hierfür sind vermutlich parakrine Mechanismen. Durch indirekte Beeinflussung des Gewebes durch die Donorzellen kommt es zu einer Induktion der Angiogenese, zu einer Verlangsamung der Progression des Postinfarktremodellings und zur Verbesserung der elastischen Eigenschaften des Narbengewebes (61). Die multizentrisch-randomisiert durchgeführte MAGIC-Studie konnte die zunächst vielversprechenden Ergebnisse der Injektion von Skelettmyoblasten nicht bestätigen (64).

2.1.3.3 Zellgemische

Es bestehen bereits klinische Erfahrungen mit Zellgemischen aus humanem Knochenmark, die frisch autolog gewonnen werden können.

Humanes Knochenmark stellt ein sehr heterogenes Zellgemisch mit unterschiedlichen Zellpopulationen dar. Rotes Knochenmark ist als einziges zur Bildung von Blutzellen befähigt und befindet sich beim Erwachsenen hauptsächlich in den platten Knochen, wie z.B. dem Sternum. Gelbes und weißes Knochenmark sind nicht an der Blutbildung beteiligt (65).

Die im roten Knochenmark stattfindende Hämatopoese beschreibt die ständige Bildung von Zellen des Blutes aus blutbildenden Stammzellen. Der multipotente Vorläuferpool hämatopoetischer Stammzellen ist heterogen und kann in long-term HSCs, die eine unbegrenzte Möglichkeit zur Selbsterneuerung besitzen, in short-term HSCs, die nur begrenzt zur Selbsterneuerung befähigt sind, sowie in multipotente Vorläuferzellen eingeteilt werden, die unterschiedliche Linien differenzierter Zellen hervorbringen können (Abb.1) (66,67).

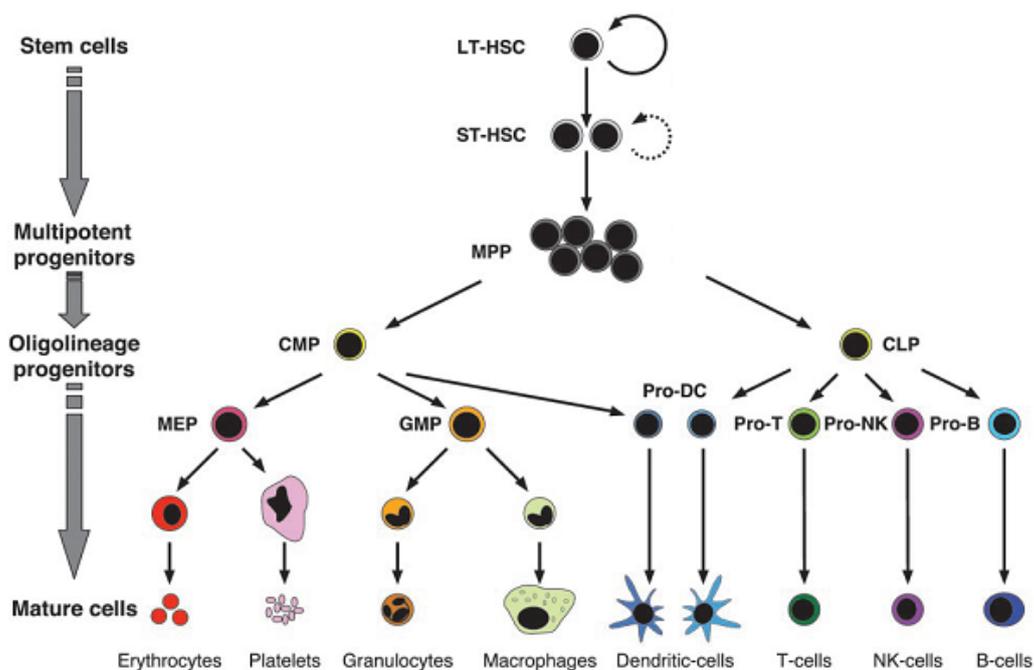


Abb. 1: Schema der Hämatopoese – modifiziert nach Passegue et. al., 2003

In einem irreversiblen Reifungsschritt entwickeln sich aus den multipotenten Vorläuferzellen (MPP) myeloide (CMP – common myeloid progenitor) und lymphoide (CLP – common lymphoid progenitor) Stammzellen. Aus den lymphoiden Vorläuferzellen (CLP) entwickeln sich über verschiedene Vorstufen T- und B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen. Myeloide Vorläuferzellen (CMP) können sich zu megakaryozytären-erythroiden Progenitorzellen (MEP) differenzieren, aus denen über Zwischenstufen Erythrozyten und Thrombozyten gebildet werden. Alternativ können sich aus den myeloiden Vorläuferzellen (CMP) auch myelo-monozytäre Vorläuferzellen entwickeln, aus den Monozyten bzw. Makrophagen, sowie Granulozyten reifen. Dendritische Zellen können sowohl aus lymphoiden, als auch aus myeloiden Vorläuferzellen gebildet werden. Die Zellen können über ihre jeweiligen exprimierten Oberflächenmarker identifiziert werden (68).

Aufgrund der ablaufenden Hämatopoese finden sich dort hämatopoetische Stamm- bzw. Vorläuferzellen. Das Knochenmark von Mensch und Maus besteht zu 0,05% aus Stammzellen (69). Daneben gibt es auch mesenchymale Stammzellen, endotheliale Vorläuferzellen und multipotente adulte Zellen.

Mittels Dichte-zentrifugation ist u.a. eine Anreicherung von mononukleären Zellen aus humanem Knochenmark möglich. Mononukleäre Zellen, wie differenzierte Monozyten und Lymphozyten, sind wichtiger Bestandteil humanem Knochenmarks. In geringem Maße befinden sich auch Stamm- bzw. Vorläuferzellen unter den mononukleären Zellen. Diese können durch Differenzierung in Endothelprogenitorzellen oder in Endothelzellen eine Induktion der Angiogenese hervorrufen (70,71). Ebenfalls ist eine Differenzierung in myokardiale Zellen und Bildung von spezifischen kardialen Proteinen wie Troponin I möglich (72). Es konnte auch die Differenzierung der mononukleären Zellen im Randbereich des Infarkts zu Kardiomyozyten, sowie zu Fibroblasten in der Infarkt-narbe gezeigt werden (73). Hamano *et al.* konnte bei Patienten mit geschädigtem Myokard eine verbesserte Perfusion des Infarktgebietes nach intramyokardialer Applikation von mononukleären Zellen nachweisen (74). Durch die applizierten mononukleären Knochenmarkzellen kam es zu einer therapeutischen Angiogenese und Myogenese, die zu verbesserter kardialer Perfusion und Kontraktilität des Herzmuskels führten (75).

2.1.3.4 Isolierte Stammzellen

Als Stammzellen werden unreife Zellen definiert, die das Potenzial zur ständigen Selbsterneuerung und Differenzierung in jegliche Gewebe (embryonale Stammzellen) oder determinierte Gewebe (adulte Stammzellen) besitzen.

Bereits 1868 beschäftigte sich der Jenaer Professor Dr. Ernst Haeckel in seinem Werk „Die natürliche Schöpfungsgeschichte“ mit dem Konzept der Stammzellen und deren Möglichkeit zur Differenzierung in weitere Zelltypen (76). In den frühen 60er Jahren gelang James Till und Ernest Mc Culloch die Existenz von Stammzellen nachzuweisen. Mit Hilfe von injiziertem Knochenmark konnten letal bestrahlte Mäuse vor der Insuffizienz des Knochenmarks und dem damit verbundenen Tod bewahrt werden (77).

Humanes Knochenmark ist derzeit die am häufigsten verwendete Quelle von Stammzellen für die myokardiale Regeneration (78). Ausgehend von mononukleären Zellen (BM-MNC) können CD133+, CD34+ oder CD271+ Stammzellen durch magnetische Isolationstechniken angereichert werden. Insbesondere hämatopoetische Stammzellen, die verschiedene Oberflächenrezeptoren wie CD133 und CD34 tragen, sind während des letzten Jahrzehnts zu einem Forschungsschwerpunkt der regenerativen kardialen Stammzelltherapie geworden (56).

Hämatopoetische Stammzellen lassen sich allerdings auch aus Nabelschnurblut gewinnen. Sie besitzen keine Differenzierungsmarker reifer Leukozyten (79).

Hämatopoetische Stammzellen sind nach Gewebeschäden unter bestimmten Bedingungen in der Lage, sich in andere Zelltypen als Blutzellen wie z.B. Muskelzellen oder Hautzellen zu differenzieren (80). Erste Versuche zur Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu kardialem Gewebe wurden von Jackson *et al.* und Orlic *et al.* in Tiermodellen durchgeführt (42,49). Experimentelle Daten sprechen jedoch mehr für eine Neovaskularisation durch hämatopoetische Stammzellen nach Myokardinfarkt, die zu einer Verbesserung der kardialen Pumpfunktion und damit der Sauerstoffversorgung des hypoxischen Areal und des damit verbundenen „Reverse-Remodeling“ führen (56,78). Insbesondere hämatopoetische Stammzellen, die die Oberflächenmarker CD34, c-kit (CD117) oder CD133 tragen, werden vermehrt zur Therapie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen eingesetzt (56).

Das diagnostisch wichtigste Oberflächenprotein hämatopoetischer Stammzellen ist das CD34-Antigen, ein Protein aus der Gruppe der Sialomucine, das neben Stamm- und Progenitorzellen auch auf Endothelzellen und auf embryonalen Fibroblasten nachgewiesen werden konnte (2,81–83). Im Knochenmark beträgt der Anteil CD34+ Zellen 1,5%, im peripheren Blut >0,5% (83,84). Mit Hilfe weiterer spezifischer Membranantigene lassen sich die CD34+ Stammzellen nach ihrem Entwicklungsstadium und ihrer Entwicklungsrichtung charakterisieren (85,86). So exprimieren bestimmte hämatopoetische Stammzellen entsprechend ihrem Entwicklungsstadium neben CD34 auch die charakteristischen Oberflächenproteine CD133 und CD117 (87). Hierdurch ergibt sich ein Unterscheidungsmerkmal für die Zählung, Isolation und Manipulation von menschlichen hämatopoetischen

Stammzellen (83,88). Es sind auch CD34-negative hämatopoetische Stammzellen beschrieben (89).

Der c-kit Rezeptor (Synonym CD117) und dessen Ligand Stem Cell Factor (SCF), exprimiert auf hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, besitzen als Tyrosin-Kinase Rezeptor eine wichtige Rolle in der Proliferation, Differenzierung und dem Überleben von hämatopoetischen Blutzellen (90,91). Kuang *et al.* konnte 2008 mittels Tierversuchen nachweisen, dass es nach einem Myokardinfarkt zu einer Erhöhung von Stem Cell Factor um das Infarktgebiet im Myokardgewebe kommt, was eine erhöhte Migrationsrate von c-kit+ Zellen zur Folge hat (92). Die rekrutierten c-kit+ Zellen schaffen ein proangiogenes Milieu im Grenzbereich des Infarktgebietes und erhöhen die Ausschüttung von VEGF, die zu einer Verbesserung der Herzfunktion nach einem Infarkt führt. Die c-kit+ Zellen regulieren im Infarktgebiet den Übergang von der Entzündungsphase zur Reparaturphase (90).

Im Jahre 1997 gelang es Yin *et al.* erstmals AC133, ein glykosilierungsabhängiges Epitop von CD133 mittels monoklonaler Antikörper als Oberflächenmarker auf Stammzellen nachzuweisen (93). CD133 (Prominin 1) selbst wird in vielen Geweben des menschlichen Körpers exprimiert. Es besteht aus einer Einzelstrang-Polypeptidkette von 865 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 120 kD (3). Die spezifische physiologische Aufgabe von Prominin 1 ist genauso unbekannt wie seine Liganden (94).

Der Anteil von CD133+ Zellen im humanen Knochenmark macht weniger als ein Prozent aller Zellen aus (1). De Wynter *et al.* fand auf 36 % der CD 34+ Zellen eine Co-Expression von CD 133, im peripheren Blut 75%. Es gibt wenige Zellen, die CD133 als Oberflächenmarker tragen, aber nicht CD34 (84).

Im Tiermodell konnte eine verbesserte kardiale Funktion durch isolierte humane CD34+ Zellen im Vergleich zu mononukleären Knochenmarkzellen beschrieben werden (95). Stamm *et al.* gelang es 2007, eine Verbesserung der myokardialen Perfusion, sowie eine signifikant verbesserte linksventrikuläre Ejektionsfraktion durch im Rahmen einer koronaren Bypass-Operation verabreichte CD133+ CD34+ Stammzellen nachzuweisen (96).

Mesenchymale Stammzellen umgeben die hämatopoetischen Stammzellen als Stromazellen (97). Sie gelten als multipotent und sind positiv für verschiedene Oberflächenmarker wie CD105, CD73 und CD90 (98). Sie exprimieren keine hämatopoetische Oberflächenmarker wie CD45 und CD34 oder Marker für Monozyten und Makrophagen (99). Auch eine Differenzierung zu Herzmuskulatur und Gefäßendothelien ist beschrieben (100). Humane mesenchymale Stammzellen exprimieren Gene für anti-apoptotische, angio/arteriogene Faktoren, sowie vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (101,102).

Ursächlich für das kardiale regenerative Potenzial ist nicht wie ursprünglich angenommen die Differenzierung von MSCs in Kardiomyozyten, sondern vermutlich die parakrine Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren. So werden u.a. angiogene Faktoren wie VEGF, IGF-1, EGF, Angiopoietin 1 und SDF-1, aber auch zellprotektive und antiinflammatorische Faktoren durch die transplantierten Zellen sezerniert (56,103). Hierdurch kommt es zu Effekten wie einer verringerten Apoptoserate der Kardiomyozyten, geringerem Remodelling, verbesserter Myokardfunktion im Post-Infarktgebiet und zur Induktion von Angiogenese bei myokardialer Ischämie.

In der klinischen Anwendung stellen isolierte mesenchymale Stammzellen eine attraktive Stammzellpopulation für die Regeneration von Geweben dar. Grund hierfür ist die hohe proliferative Kapazität und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (104).

Isolierte CD271+ Zellen, die mesenchymale Stammzellen umfassen, wurden *in vivo* bereits zur Regeneration von geschädigtem Myokard eingesetzt (105). CD271 wird als neurotropher Faktor auf mesenchymalen Stammzellen exprimiert. CD271+ mesenchymale Stammzellen besitzen die gleichen Differenzierungsmöglichkeiten wie mesenchymale Stammzellen, haben aber die Fähigkeit einer höheren Zytokin-Sekretion, sowie eine größere immunsuppressive Wirkung (105). *In vitro* Studien konnten zeigen, dass kultivierte CD271+ MSCs aus dem Knochenmark in Zellen, die glatten Muskelzellen ähnlich sind, differenzieren und gleichzeitig verschiedenartige proangiogene Zytokine sezernieren. Diese sezernierten angiogenen Faktoren führten in Versuchen mit Mäusen zu einer Zunahme der Blutgefäße nach akutem Myokardinfarkt (106). Zusätzlich konnte eine immunsuppressive Wirkung von CD271+, die vermutlich durch unspezifische anti-proliferative Effekte bedingt ist, *in vitro* nachgewiesen werden (107).

Auch endotheliale Progenitorzellen lassen sich sowohl aus Knochenmark, als auch aus peripherem Blut stammenden CD34+ Zellen gewinnen. Erstmals wurden endotheliale Progenitorzellen 1997 von T. Asahara und J. Isner *et al.* beschrieben (85). Sie wiesen CD133, CD34 und VEGFR-2 auf der Oberfläche dieser Zellen nach. Zusätzlich können endotheliale Progenitorzellen aus isolierten mononukleären Zellen gewonnen werden (108). Die Mobilisierung der endothelialen Stammzellen erfolgt u.a. durch den Granulozyten kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF), durch den Granulozyten-Makrophagen kolonie-stimulierenden Faktoren (GM-CSF) und durch den Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) (109,110).

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gelang es nachzuweisen, dass sich endotheliale Progenitorzellen in reife Endothelzellen differenzieren können (85). In ischämischen Geweben kann es durch EPCs zur Induktion der Neoangiogenese kommen (111), was eine Neovaskularisierung im geschädigten Infarktgebiet ermöglicht (112–114). Durch rekrutierte EPCs kommt es im Infarktgebiet zur Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie VEGF, SDF-1 und zusätzlich zur indirekten Unterstützung der Proliferation und Transmigration von lokalen endothelialen Zellen für die Angiogenese (102), wodurch die Bildung von Kapillarbestandteilen durch endotheliale Progenitorzellen gefördert wird (54).

2.1.3.5 Kultivierte oder veränderte Zellen – iPS-Zellen

Die Kultivierung von Zellen bzw. Stammzellen ermöglicht unter Beachtung der jeweiligen zellulären Eigenschaften eine Vermehrung der Zellen, sowie eine Differenzierung und Modifikation. Insbesondere bei endothelialen Vorläuferzellen (EPC) und bei mesenchymalen Stammzellen (MSC) spielt die Kultivierung eine wichtige Rolle und wurde mehrfach untersucht (1). Beide Zellarten spielen eine wichtige Rolle im Bereich der Regeneration von geschädigtem Myokard, u.a. durch Induktion von Angiogenese im geschädigten Myokardgewebe.

Erstmals gelang es Takahashi und Yamanaka *et al.* 2006, sogenannte induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) herzustellen (115). C. Mauritz *et al.* konnte 2008 beweisen, dass aus iPS-Zellen generierte Kardiomyozyten mit aus embryonalen Stammzellen abgeleiteten Kardiomyozyten funktionell vergleichbar sind (116). Die Differenzierung von humanen iPS-Zellen zu Kardiomyozyten konnte durch Zhang *et al.* 2009 gezeigt werden. Hieraus resultiert eine weitere autologe Stammzellquelle für

die kardiale Stammzellforschung (117). Derzeit ist aber die iPS-Zell-Therapie für einen klinischen Einsatz zu wenig ausgereift (118). Risiken bei der Implantation von iPS-Zellen, wie die Entstehung von sekundären refraktären Herzrhythmusstörungen, ermöglichen derzeit keinen klinischen Einsatz (119). Trotzdem gehen Stammzellforscher aktuell davon aus, dass zukünftige Stammzelltherapiekonzepte aufgrund der Vermeidung der Nutzung von Embryonen- bzw. Eizellen auf iPS-Zellen basieren werden (118).

Unklar sind zum jetzigen Zeitpunkt die längerfristigen Effekte der genetisch veränderten Stammzellen auf den menschlichen Körper. Insbesondere bei iPS-Zellen, als auch bei endothelialen Stammzellen besteht die Gefahr der Entwicklung von Tumoren, z.B. von Teratomen (120).

2.1.3.6 Kardiale Stammzellen

Die kardialen Stammzellen wurden erstmals von Anversa und Kollegen in Rattenherzen entdeckt (121). Humane kardiale Stammzellen können aus gesundem humanem Myokardgewebe isoliert werden. Die c-kit+, aber CD45-, CD34-, CD31- und KDR- Zellen erfüllen mit Funktionen wie Multipotenz, Selbsterneuerung und Kolonienbildung die formalen Eigenschaften von Stammzellen (102).

Kardiale Stammzellen ermöglichen es dem Herz, apoptotische Kardiomyozyten in gewissem Maße zu erneuern (122). Die vorgeprägten Zellen sind zur Differenzierung in alle Zelllinien des Myokards befähigt und ermöglichen somit eine gewisse Regeneration des Herzens (56). Kardiale Stammzellen können durch ischämische Konditionierung in ihrer Zahl vermehrt werden. Allerdings bestehen derzeit noch Grenzen in der Gewinnung und Kultivierung bzw. im effektiven Einsatz dieser Stammzellen (47,56).

2.2. Migration

2.2.1 Mechanismen der Zellmigration

Zellmigration (lateinisch migrare – wandern) beschreibt die aktive Ortsveränderung (Lokomotion) von Zellen oder Zellverbänden. Im menschlichen Körper spielt

Zellmigration bei vielen biologischen Vorgängen, egal ob physiologisch oder pathologisch, eine wichtige Rolle (123).

Prinzipiell lassen sich zwei Arten von Zellmigration unterscheiden: Einerseits die Chemokinese, eine ungerichtete Bewegung der Zelle, und andererseits die Chemotaxis, eine gerichtete Bewegung der Zellen entsprechend eines Gradienten eines Stoffes (124).

Chemotaxis beinhaltet drei grundlegende Vorgänge: Motilität, Polarisation und Gradient Sensing. Motilität, unabhängig von extrazellulären Signalen, beschreibt die aktin-vermittelte selbstregulierende Pseudopodienbildung der Zelle. Im Zuge der durch extrazelluläre Signale vermittelten Polarisation kommt es durch Interaktionen im Zytoskelett zur Ausbildung von Ausstülpungen der Zellmembran, zur Aufhebung von integrin-basierenden Kontakten und zur Kontraktion der gegenüberliegenden Seite (125). Gradient Sensing beschreibt die Fähigkeit der Zelle, den räumlichen Konzentrationsunterschied eines Chemotaxins zu erkennen und durch auf der Zelloberfläche lokalisierte G-Protein gekoppelte Rezeptoren weitere Proteine und Lipide zu aktivieren, die dann zu einer Richtungsänderung führen (126,127). Schon bei nur sehr geringen Konzentrationsunterschieden des Chemotaxins kommt es auf der Seite der erhöhten Konzentration zur Orientierung der Signalmoleküle auf der Zelloberfläche und zur Aktivierung von entsprechenden Signalkaskaden (128,129).

2.2.2 Stammzell-Homing

Der Begriff „Homing“ beschreibt ursprünglich die Rückkehr bzw. Wiederansiedlung von intravenös verabreichten Spenderstammzellen im Empfänger Knochenmark nach einer Knochenmarktransplantation (130). Er beschreibt aber auch die Zielwanderung von transplantierten Stammzellen in spezifische Gewebe und Organe (131).

Auch am Herzen findet ein „Homing“ von Stammzellen statt: Es konnte nachgewiesen werden, dass kardiale Progenitorzellen und Stammzellen in das ischämisch geschädigte Myokard einwandern können (132). In einem schnell ablaufenden Prozess überwinden zirkulierende hämatopoetische Blutzellen aktiv die Blut-Endothelium-Barriere (133). Eine Interaktion der Stammzellen mit den Endothelzellen der Gefäßwand des Zielgewebes ist hierfür grundlegende Bedingung. Die durch den Blutstrom zum geschädigten Organ transportierten Stammzellen

wandern in einem kaskadenartigen Prozess, der mit dem „Rolling“ der Zelle am Gefäßendothel beginnt, ins Zielgewebe ein (134).

Grundlegend für das Homing von kardialen Stammzellen in das geschädigte Gewebe nach Myokardinfarkt ist die Aktivierung von molekularen Signalwegen durch Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren (135). Die lokale Ischämie und Inflammation von geschädigtem Gewebe aktiviert durch ausgeschüttete Signalmoleküle, wie z.B. Tumornekrosefaktor alpha (TNF-alpha), die Rekrutierung von Stammzellen (134,136). Asahara *et al.* gelang es 1999 nachzuweisen, dass Vascular endothelial growth factor (VEGF) die Mobilisierung von im Knochenmark gereiften endothelialen Progenitorzellen induziert und somit zu einer verbesserten Neovaskularisierung des geschädigten Gewebes führt (137). Ebenfalls konnte SDF-1 (Stromal cell-derived Factor) als wichtiger Faktor für das Homing von Stammzellen identifiziert werden (138).

2.2.2.1 Mechanismen der SDF-1 induzierten Chemotaxis

In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass SDF-1 die transendotheliale Chemotaxis von T-Lymphozyten, pro- und prä-B-Lymphozyten, Monozyten, CD34+Zellen, sowie deren Vorläuferzellen, verschiedene Leukämiezellen und polyplöider Megakaryozyten induziert (139). Die wichtige Wirkung von SDF-1 in hämatopoetischen und lymphatischen Zellen wird ausschließlich über CXCR4, einem G-Protein gekoppelten Rezeptor, vermittelt (8).

SDF-1 als chemotaktischer Ligand induziert über den CXCR4-Rezeptor die Aktin-Polymerisation und Pseudopodienbildung durch eine G-Protein vermittelte Aktivierung der p85/p110 PI3-Kinase (140–143). Zusätzlich ist SDF-1 in der Lage, verschiedene wichtige Signalwege, wie den Calcium-Efflux und die Phosphorylierung der MAP-Kinase zu aktivieren (8).

24 Stunden nach einem Myokardinfarkt kommt es zur Hochregulierung der SDF-1 mRNA bis um das Siebenfache des Ausgangswerts (144). Bei *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass SDF-1 die zielgerichtete Migration von Stammzellen (Homing) induziert und vermittelt. Durch *in vivo* Versuche konnte eine intensiviertere Interaktion von Stammzellen und mikrovaskulärem Endothel durch SDF-1 gezeigt werden (144).

2.2.2.2 Manipulation des Stammzell-Homings in der regenerativen Medizin

Das „Homing“ von Stammzellen in Organe bzw. Gewebe, wie z.B. in das post-infarakt geschädigte Myokardgewebe kann auf verschiedene Weise beeinflusst werden und wird in der regenerativen Medizin eingesetzt (134).

Die Rekrutierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen nach der Behandlung mit Zytokinen, wie z.B. G-CSF oder GM-CSF oder Chemotherapeutika wie Cyclophosphamid, ermöglicht eine Verbesserung der physiologischen Freisetzung von Stamm- bzw. Vorläuferzellen aus dem Knochenmark durch Stresssignale nach Verletzung oder Entzündung (145).

Der Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), hauptsächlich produziert von hämatopoetischen Stammzellen, wie z.B. Monozyten oder Lymphozyten, stimuliert die Proliferation und Mobilisierung von Stamm- bzw. Progenitorzellen (146,147). Für die Mobilisierung der Stammzellen ist der CXCR4/SDF-1 Komplex von entscheidender Bedeutung (148). Die Spaltung des Komplexes erfolgt u.a. durch Proteasen, freigesetzt aus G-CSF Rezeptor tragenden neutrophilen Granulozyten, aber auch durch die verminderte Expression von SDF-1 bzw. CXCR4 (149–151).

Um die Transplantationseffizienz bzw. die Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark in die Peripherie zu steigern, beschäftigte sich Christopherson *et al.* mit der Blockierung des u.a. auf hämatopoetischen Stammzellen exprimierten CD26 Moleküls (152). CD26, auch als Dipeptidyl peptidase IV bekannt, inaktiviert als Ektopeptidase am N-terminalen Ende verschiedene Proteine, u.a. CXCL12 (SDF-1), was durch eine Veränderung der Struktur des Moleküls eine Interaktion mit dem SDF-1 Rezeptor unmöglich macht. Die zunächst vielversprechende Transplantationseffizienzsteigerung durch Inaktivierung von CD26 in Mäuseexperimenten (153) konnte in weiteren Untersuchungen nur für Cord Blood CD34+ Zellen nachgewiesen werden, allerdings nicht für durch granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) mobilisierte CD34+ Stammzellen (154).

Chemotherapeutika aus der klinischen Anwendung, wie z.B. Cyclophosphamid, führen zu einem Absterben von zirkulierenden hämatopoetischen Zellen im Knochenmark. Durch den verursachten Gewebeschaden kommt es zu einer Mobilisierung von Stammzellen und zu einer vermehrten Ausschüttung von angiogenen Faktoren wie SDF-1. Somit kommt es zu einer Verbesserung des Homings von CD34+ Zellen durch eine Erhöhung der Produktion von SDF-1 durch die Induktion von DNA-Schäden (133).

2.3 ATP

2.3.1 Bedeutung

Adenosintriphosphat (ATP) wurde 1929 als wichtiger Energieträger der Zelle entdeckt. ATP gilt in allen Zellen des menschlichen Körpers als wichtiger Energieträger.

Lange Zeit galten Nukleotide wie ATP im extrazellulären Raum als unwahrscheinlich. Unter anderem wurde angenommen, dass Zellen so wichtige Energieträger wie ATP nicht im Extrazellulärraum „vergeuden“ würden. Außerdem wurde argumentiert, dass ATP bzw. ADP als stark geladenes und hydrophiles Teilchen die Zellmembran nicht passieren könne. Mittlerweile gilt aber als gesichert, dass Nukleotide eine wichtige physiologische Rolle im Extrazellulärraum spielen (155).

2.3.2 Mechanismus, Pathophysiologie, regulatorische Wirkung

Die extrazelluläre Wirkung von ATP wird über verschiedene ATP-Rezeptoren reguliert. Ursprünglich als Purinorezeptoren benannt, sind verschiedene ATP-Membranrezeptoren, über die sowohl ATP, als auch UTP die biologischen Effekte als Neurotransmitter vermitteln, bekannt. Grundsätzlich lassen sich zwei Arten von ATP-Rezeptoren unterscheiden. P1-ATP-Rezeptoren werden hauptsächlich über das ATP-Abbauprodukt Adenosin aktiviert. P2-ATP-Rezeptoren können prinzipiell in 2 Gruppen eingeteilt werden. P2X Rezeptoren bestehen aus einem Ionenkanal. P2Y Rezeptoren sind an ein G-Protein gekoppelt. Beide Rezeptortypen interagieren mit intrazellulären Signalkaskaden, unter anderem mit der Proteinkinase C (156).

Durch freigesetztes extrazelluläres ATP über P2-Purinorezeptoren hervorgerufene Effekte auf z.B. hämatopoetischen Stammzellen beinhalten Zellproliferation, Differenzierung, Chemotaxis und Zytokinsekretion. Diese Effekte werden durch intrazelluläre Signalkaskaden hervorgerufen, die gleichzeitig oder synergistisch mit verschiedenen Wachstumsfaktoren wirken und durch extrazelluläres ATP aktiviert werden (157,158). Bei akuten Entzündungsreaktionen (159), immunologischen Reaktionen oder bei Zellyse, sowie unter ischämischen bzw. hypoxischen Zuständen kommt es ebenfalls zur erhöhten extrazellulären Konzentration von ATP (11,160). Im

menschlichen Herzen kommt es aufgrund von Hypoxie, Ischämie, elektrischer Stimulation, vermehrten Blutfluss oder zunehmender Belastung des Herzens zu einer gesteigerten Ausschüttung von ATP in den extrazellulären Raum, wo es in variabler Konzentration vorkommt (12,161). So führt ein Myokardinfarkt aufgrund der kardialen Ischämie zu einer erhöhten Konzentration von ATP im Plasma (13–15). Außerdem wird ATP durch mechanische und chemische Reize, wie z.B. durch Bradykinin, Acetylcholin und Serotonin und durch das sympathische und parasympathische Nervensystem in den interstitiellen Raum von Endothelzellen freigesetzt. In den Kardiomyozyten übt das freigesetzte ATP über Stimulierung der cAMP- und IP₃-Signalkaskade einen positiv inotropen Effekt auf das Herz aus. Außerdem kommt es durch ATP in Kombination mit β -adrenergen Agonisten zu einer Verbesserung der Kontraktilität der Myozyten (162). Das extrazellulär freigesetzte ATP schützt auch vor dem durch Reperfusion des ischämischen Gebiets verursachten myokardialen Ödems der Endothelzellen. Eine Hemmung des ATP-Abbaus hat stabilisierende Wirkung auf die endotheliale Barrierefunktion (163). Extrazellulär freigesetzte Nukleotide wie ATP schützen Kardiomyozyten durch die Verminderung von freien Radikalen vor und während der hypoxischen Phase (164).

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Firma
Laminar Luftstrombank	Safeflow 1.2	Nunc
CO ₂ -Brutschrank	APT.Line CB	Binder
Wasserbad	W6	Medingen
Große Zentrifuge	Multifuge 1 S-R	Heraeus
Kleine Zentrifuge	Biofuge primo R	Heraeus
Mini Zentrifuge	C1213 und C12XX	VWR international
Cytospin Zentrifuge	A78300002	Thermo SCIENTIFIC
Schüttler	W-150 Wver	VWR international SCIENTIFIC
Vortex	SI-0156	INDUSTRIES INC
Thermocycler	PTC-2100	MJ Research
Nano Drop Spectrophotometer	ND-1000	Thermo SCIENTIFIC
Mikroskope	Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss
	Leica DMIL	Leica
	LSM 780 ELYRA	Carl Zeiss
	PS.1	
FACS LSR-II-Durchflußzytometer		Becton Dickinson, CA
Res-Q™ 60 BMC		ThermoGenesis Corp.

3.2 Software

Software	Name	Firma
Bearbeitungs- und Auswertungssoftware für FACS	FACS Diva	Becton Dickinson
Sigma Plot für Windows 11.0	Sigma Plot 11.0	Systat. Software
Mikroskopie	ZEN 2011 blue edition	Carl Zeiss
Konfokale Mikroskopie	ZEN 2011	Carl Zeiss

3.3 Standard- und Pufferlösungen

Produktbezeichnung	Katalognummer	Firma
PBS (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	P04 362500	PAN Biotech
PBS EDTA (2 mM): 500 ml PBS 2 ml 0,5M EDTA	15575 038	GIBCO™
RMPI 1% BSA :	4740413	PAN Biotech
50 ml RPMI 1640 L-Glutamine 2,0g/L 0,5g Bovines Serum Albumin (BSA)	A7906	Sigma Aldrich
MACS® Puffer (PBS, 2mM EDTA, 0,5% BSA)	130-091-221	Miltenyi Biotec
StemSpam Medium	09600	Stem cell™Technology

3.4 Punktion und Entnahme von verwendeten Knochenmarkproben

Die verwendeten Knochenmarkproben wurden von der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie Rostock im Rahmen einer herzchirurgischen Operation durch den Operateur entnommen und zur Verfügung gestellt. Im Rahmen des Aufnahmegesprächs stimmte der Patient mittels vorgefertigtem Aufklärungsbogen gemäß dem Abkommen nach Helsinki der Entnahme zu. Mittels einer 14 Gauge Nadel wurde nach erfolgter Sternotomie die Probe durch den Operateur mittels einer Spritze entnommen. Die Spritze enthielt zur Verhinderung der Koagulation des Knochenmarks Heparin. Mittels Kurier wurde die Probe zeitnahe ins Labor transportiert.

Die Entnahme der Knochenmarkproben, sowie die Durchführung der entsprechenden Versuche wurden von der Ethikkommission genehmigt (Registrierungsnummer: A 2010 23 – 28.04.2010).

3.5 Bestimmung der Zellzahl/Vitalität und Reinheit der isolierten BM-TNCs des entnommenen Knochenmarks

Die Bestimmung der Zellzahl des verwendeten Knochenmarks wurde mittels der Neubauer Zählkammer durchgeführt, die Bestimmung der zellulären Zusammensetzung und Vitalität des entnommenen Knochenmarks mittels einer FACS-Analyse.

3.6 Zellgewinnung

3.6.1 Zellgewinnung CD133+ Zellen

3.6.1.1 Materialien

Produkt	Katalognummer	Firma
CD133 Microbead Kit (human), beinhaltet:	130-050-801	Miltenyi Biotec
- CD133-Microbeads		
- FCR Blocking Reagent		
RPMI 1640-Medium	E15-840	PAA Laboratories
DNase I	13498000, 10 104 159 001	Roche
MACS [®] Pre-Separation Filter	130-041-407	Miltenyi Biotec
Zentrifugationsröhrchen mit poröser Trennscheibe, Leucosep [®] , 30 ml, sterile	227 290	Greiner Bio-One
Ficoll Paque [™] PLUS	17-1440-03	GE Healthcare
Neubauer-Hämozytometer	T728.1	Carl Roth GmbH & Co
MACS-Separatoren:		
OctoMACS (für MS-Säulen)	130-042-109	Miltenyi Biotec
QuadroMACS (für LS Säulen)	130-090-976	
MACS-Säulen:		
MS-Säule (für bis zu $2 \cdot 10^8$ Zellen)	130-042-201	Miltenyi Biotec
LS-Säule (für bis zu $2 \cdot 10^9$ Zellen)	130-042-401	

FcR Blocking Reagent	130-059-901	Miltenyi Biotec
Anti-CD133-PE (293C2)	130-090-853	Miltenyi Biotec
Anti-CD34-FITC	130-081-001	Miltenyi Biotec
Anti-CD45-APC H7	560178	BD Biosciences
7-Aminoactinomycin 7AAD	559925	BD Biosciences
IgG2b-PE	130-092-215	Miltenyi Biotec

3.6.1.2 Isolierung der CD133+ Zellen

Prinzip: Die Isolierung der CD133+ Zellen wurde mit dem Manual-MACS[®]- System (Miltenyi Biotec) durchgeführt. Zellen wurden entsprechend ihrer Oberflächenmoleküle mittels eines spezifischen Antikörpers, der mit einem „bead“, einem ferromagnetischen Partikel (ca. 50 nm) versehen bzw. markiert ist, isoliert. Die „bead“ markierten Zellen wurden über eine Separationssäule gegeben, die in einer Magnethalterung (MACS) mit entsprechendem magnetischem Feld gehalten wurde. Im Anschluss konnten die Zellen aus der Separationssäule eluiert werden.

Im Folgenden werden detailliert Arbeitsschritte der Zellisolierung der CD133+ Zellen aus dem humanen Knochenmark beschrieben:

Um das Knochenmark von Verunreinigungen wie Knochensplittern oder ähnlichem und von Blutkoageln zu befreien, wurde die Knochenmarkprobe über einen Filter mit 50 µm Porengröße pipettiert. Der filtrierten Probe wurde PBS/EDTA, RMPI, DNase Stammlösung und Collagenase B Stammlösung zugegeben und mit gelegentlichem Schütteln für 30 Minuten inkubiert. Nach Inkubation der Probe folgte eine Ficoll-dichtezentrifugation, einem physikalischen Trennverfahren, das durch Zentrifugation die Trennung der Blutbestandteile erlaubt. Ficoll ist ein ungeladenes Sucrose-Polymer, das aufgrund seiner Dichte (1,077 g/ml) so eingestellt ist, dass Zellen entsprechend ihres spezifischen Gewichts getrennt werden. Erythrozytenaggregate und tote Zellen durchwandern die Ficollschicht, Granulozyten sammeln sich in der Ficollschicht und mononukleäre Zellen (Monozyten, Lymphozyten, Thrombozyten) lagern sich oberhalb der Ficollschicht in der sogenannten Interphase ab. Die Knochenmarkprobe wurde über das Ficoll-Medium

in Zentrifugationsröhrchen geschichtet und bei 400g für 35 Minuten mit niedriger Beschleunigung und ungebremst zentrifugiert. Die durch die Dichtezentrifugation entstandene Interphase wurde mittels Pipette abgenommen und in einem neuen 50 ml Röhrchen gesammelt. Nach Zugabe von PBS folgte ein Waschschrift bei 300g für 10 Minuten. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift mit MACS-Puffer bei 300g für 10 Minuten. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 300 μ l (pro 1×10^8 Zellen) kaltem MACS-Puffer resuspendiert.

Den Zellen wurde im folgenden Arbeitsschrift 100 μ l (pro 1×10^8 Zellen) FcR-blocking Reagenz (Miltenyi Biotec) zugegeben. Dieses Reagenz verhindert die unspezifische Bindung des im nächsten Arbeitsschrift verwendeten Antikörpers an den Fc-Rezeptor der Zellen. Anschließend wurden 100 μ l CD133 MicroBeads (Miltenyi Biotec) zugegeben und für 30 Minuten bei 4°C unter gelegentlichen Schütteln inkubiert. Nach der 30-minütigen Inkubation erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 300g für 10 Minuten. Danach wurden die Zellen in 500 μ l MACS-Puffer aufgenommen. Sie wurden nun über die bereits eingespülte Separationssäule gegeben und im Weiteren dreimal mit 500 μ l PBS gewaschen. Während der Waschschrift wurde die zweite Säule mit PBS eingespült. Nach Beendigung der Waschschrift wurde die erste Separationssäule mit 1000 μ l MACS-Puffer in die zweite Separationssäule mittels des dazugehörigen Stempels eluiert. Es wurde ebenfalls ein dreimaliger Waschvorgang durchgeführt. Die zweite Säule wurde mit 1000 μ l MACS-Puffer in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen eluiert, danach mit 300g für 10 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 200 μ l MACS-Puffer aufgenommen und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gekühlt.

Während und nach der Isolation wurden mittels der Neubauer Zählkammer die Zellzahl und nach Isolation zusätzlich die Vitalität (Trypanblau-Färbung) der Zellen überprüft.

Die Isolation der CD133+ Zellen aus Knochenmarkproben wurde teilweise durch die Firma Miltenyi Biotec im Rahmen der Validierungsläufe für den CliniMACS® durchgeführt. Die hierbei isolierten CD133+ Zellen wurden mir freundlicherweise für meine Versuche zur Verfügung gestellt.

Zur durchflusszytometrischen Qualitätskontrolle wurden die Zellen in PBS-Puffer mit 0,5% bovinem Serumalbumin resuspendiert. Um eine unspezifische Antikörperbindung zu verringern, wurde zu allen Proben FcR blocking-Reagenz (Miltenyi Biotec) gegeben. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei 4°C lichtgeschützt

mit den Antikörpern inkubiert und am LSR-II-Durchflußzytometer mit Hilfe der FACSDiva-Software (beides Becton Dickinson) analysiert. Die Kompensation wurde mit Hilfe von Einzelfärbungen erstellt, das Gating nach passenden Isotyp/Fluorescence minus one (FMO)-Kontrollen festgelegt.

Zur Qualitätskontrolle der CD133-positiven Zellen wurde eine auf booleschen Operationen basierende Gating-Strategie verwendet, die sich an den ISHAGE-Richtlinien zur Ermittlung der Zahl CD34-positiver Zellen orientiert.

3.6.2 Zellgewinnung der BM-TNCs

3.6.2.1 Materialien

Produkt	Katalognummer	Firma
ResQ-Zellisoliationsset – Bestehend aus: <ul style="list-style-type: none"> • Res-Q 60 BMC Processing Kit • Res-Q 60 BMC Disposable • 10 ml Syringe • Clot Filter (200 micron) • Transfer Tubing • Res-Q™ 3400 Centrifuge • Processing Tray • Counterbalance 	8-4357	Thermogenesis

3.6.2.2 Isolierung der BM-TNCs mittels ResQ-Isolation

Die Isolierung von BM-TNCs erfolgte im Rahmen des Projekts „ResQ“ in unserem Labor. Im Rahmen des Gesamtprojektes wurden mir die isolierten BM-TNCs für meine Versuche zur Verfügung gestellt. Für die Isolation wurde das Res-Q™ 60 BMC System (ThermoGenesis Corp.) verwendet, im Folgenden kurz als „ResQ“ bezeichnet.

Prinzip: Das Res-Q™ 60 BMC ist ein Point of Care-Gerät, das eine Isolierung von Stammzellen aus Knochenmarkaspiraten in kurzer Zeit ermöglicht. Eine schwimmende Kammer im Zentrifugationsgefäß ermöglicht die Abtrennung der vorwiegend Leukozyten enthaltenden „Buffy coat“ Schicht (ohne die Verwendung von

Dichtegradientenmedium). Aus der Kammer wird das Zellprodukt mit Hilfe einer Spritze, die an einem Ventil konnektiert wird, entnommen.

Insgesamt werden 45 - 60 ml heparinisiertes (250 I.E./ml) Knochenmark benötigt, welches über spezielle Filter in das Einweggefäß gefüllt wird. Anschließend wird das Gefäß mit dem Knochenmark für 12 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird das Zentrifugationsgefäß in das „Process Tray“ gestellt. Hiernach kann mittels einer speziellen Spritze das fertige Zellprodukt abgezogen werden.

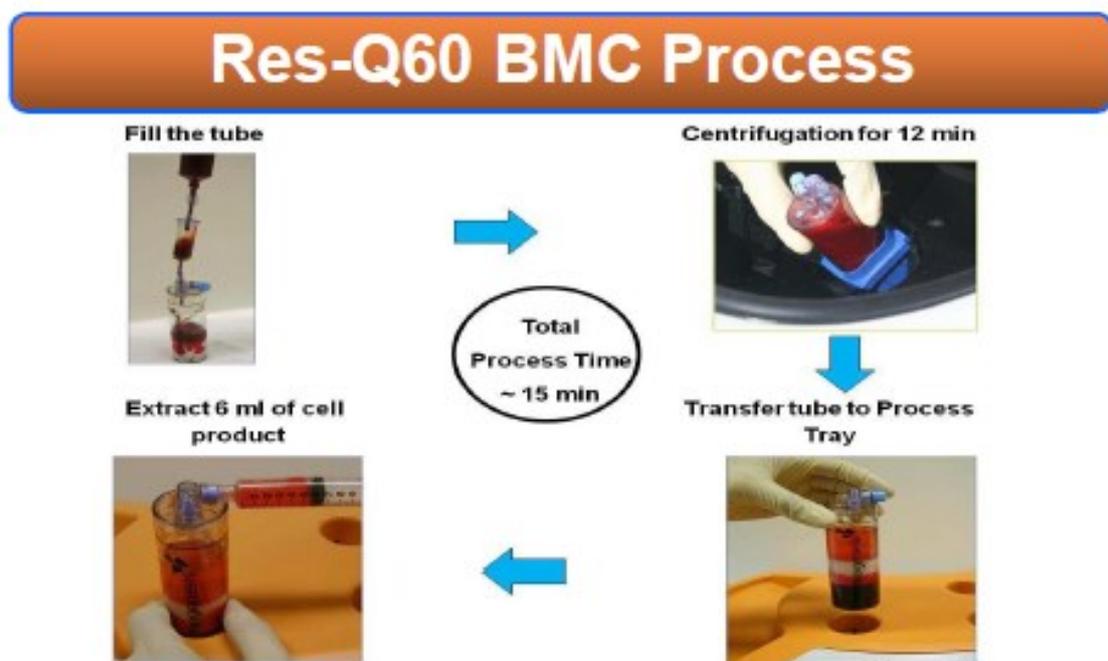


Abb. 2 – Prinzip Isolation - Res-Q™ 60 BMC

Die abgebildeten Bilder stellen die Grundarbeitsschritte der Isolierung mit dem Res-Q60 BMC dar.

Quelle: Abbildung zur Verfügung gestellt von recuperate medical



Abb. 3 – Bestandteile des Res-Q™ 60 BMC Systems

Quelle: Abbildung zur Verfügung gestellt von recuperate medical

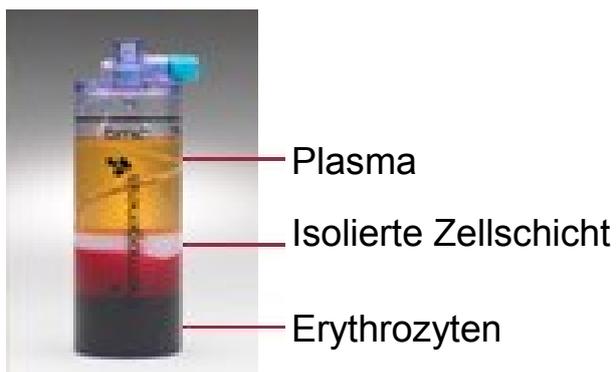


Abb. 4 – Beispielhafte Zellverteilung nach Isolation mit dem Res-Q™ 60 BMC

Quelle: Abbildung zur Verfügung gestellt von recuperate medical

3.6.2.3 Charakterisierung der isolierten BM-TNCs

Zur Charakterisierung der BM-TNCs wurde das Stem Cell Enumeration Kit nach Herstelleranweisung benutzt (BD Biosciences). Die viablen Leukozyten und CD34+ Stammzellen wurden nach ISHAGE – Guidelines analysiert, zudem wurden aus den viablen Zellen anhand ihrer CD45-Expression, sowie des sideward scatter (SSC) MNCs (untergliedert in Monozyten und Lymphozyten) und Granulozyten ausgewertet. Die Zellzahlen dieser Populationen wurden im single platform-Verfahren ermittelt.

Die Analyse von CD271+ Zellen der isolierten BM-TNCs beruhte auf einer Dreifachfärbung. Es wurden viable CD271+ Zellen erfasst. CD133+ Zellen wurden aus einer Vierfachfärbung (CD133/CD34/CD45/7-AAD) adaptiert und nach ISHAGE-Guidelines analysiert (Vgl. Abschnitt 3.6.1.2). Die Gating-Strategie wurde mit FMO/Isotypkontrollen erstellt. Für diese Populationen wurde die Zellzahl anhand der Anzahl viabler Leukozyten über die Resultate der Stem Cell Enumeration Kit-Analyse ermittelt (dual platform).

Antikörper	Fluorochrom	Hersteller	Katalognummer
CD271	APC	Miltenyi Biotec	120-002-230
7-AAD		BD Biosciences	559925
CD45	AM Cyan (V500)	BD Biosciences	560777
CD45	APC-H7	BD Biosciences	560178
CD133	PE	Miltenyi Biotec	130-090-085
CD34	FITC	Miltenyi Biotec	130-081-001

Tabelle 1 - Antikörper der durchflusszytometrischen Mehrfachfärbung

Diese Daten wurden von Mitarbeitern des RTC erhoben und zur Verfügung gestellt.

3.7 Durchflusszytometrie – FACS Analyse

3.7.1 Materialien

Produktbezeichnung	Katalognummer	Firma
FACS Flow™ (20 Liter)	342003	BD Biosciences
BD Falcon 5 ml Tubes	352054	BD Biosciences
CD34 FITC	130-081-001	Miltenyi Biotec
CD133 PE	130-090-085	Miltenyi Biotec
CD184 PE-Cy5	555975	BD Biosciences
CD117 PE-Cy7	339217	BD Biosciences
CD 309 APC	130-093-061	Miltenyi Biotec
NearIR LiveDead Stain APC-Cy7	L10119	Life Technologies Corp.
CD 14 Pacific blue (V450)	560349	BD Biosciences
CD45 AM Cyan (V500)	560777	BD Biosciences

3.7.2 Durchführung

Für die FACS-Analysen wurden die aus den unteren Boyden Kammer bzw. aus den Kontroll-Wellplatten entnommenen Zellen genutzt. Ferner wurden Färbungen des frisch isolierten Zellproduktes zur Kontrolle herangezogen. Die Färbung der Proben erfolgte bei etwa 4°C lichtgeschützt. Zur Analyse hämatopoetischer Stammzellen und endothelialer Progenitoren anhand bekannter Oberflächenmarker wurde eine Achtfachfärbung (Panel „EPC“) verwendet, deren Antikörper vorgemischt wurden, um eine gleichmäßige Färbung aller Ansätze zu gewährleisten. Proteinhaltiger Puffer (PBS/2mM EDTA mit 0,5% bovinem Serumalbumin), sowie FcR Blocking-Reagenz (Miltenyi Biotec) wurden verwendet, um unspezifische Antikörperbindung zu verringern. Nach Färbung der Zellen für 10 Minuten bei 4°C wurden die Zellen gewaschen, in PBS aufgenommen und in Polypropylen-Röhrchen überführt. Während der Messung wurden die noch zu messenden Ansätze auf Eis lichtgeschützt gelagert.

Antikörper	Fluorochrom	Hersteller	Katalognr.
CD34	FITC	Miltenyi Biotec, Deutschland	130-081-001
CD133	PE	Miltenyi Biotec	130-090-085
CD184	PE-Cy5	BD Biosciences	555975
CD117	PE-Cy7	BD Biosciences	339217
CD309	APC	Miltenyi Biotec	130-093-061
NearIR LiveDead Stain	APC-Cy7	Life Technologies Corp.	L10119
CD14	Pacific blue (V450)	BD Biosciences	560349
CD45	AM Cyan (V500)	BD Biosciences	560777

Tabelle 2 - Antikörper der durchflusszytometrischen Mehrfachfärbung „EPC“

Zur Kompensation der Mehrfachfärbung wurden die verwendeten Antikörper, sowie der Lebend-Tot-Farbstoff Near IR LiveDeadStain in Einzelfärbungen an Beads gebunden, dabei wurden die ArB bzw. ArC Bead Kits (Life Technologies) verwendet. Die Bead-Einzelfärbungen wurden zur automatischen Kompensation mittels FACSDiva Software am LSR-II-Durchflußzytometer (Becton Dickinson) verwendet. Die Auswertegates wurden mit Hilfe von Fluorescence-minus-one (FMO) – Kontrollen gesetzt, für jede Probe manuell kontrolliert und ggf. angepasst.

Für die Auswertung wurden zunächst Debris über die forward-/sideward-scatter-Einstellungen ausgeschlossen, dann wurden lebende Zellen gegatet. CD34⁺ Stammzellen wurden anhand des ISHAGE-Verfahrens quantifiziert (Expression von CD34 auf Zellen mit schwacher CD45-Expression und lymphozytenartiger Morphologie) (165), analoge mehrstufige Gating-Strategien wurden für die Ermittlung der CD133⁺ und CD117⁺ Zellzahlen angewandt. Die so ausgewählten Populationen wurden dann auf Koexpression der Marker CD184 (syn. CXCR4) und CD309 (syn. KDR, VEGFR-2) hin analysiert. Zudem wurden Subpopulationen ausgewertet, die mehrere Stammzellmarker aufwiesen (CD34+CD117+, CD34+CD133+, CD34+CD133+CD117+).

Die Mehrfachfärbung mit Kontrollen und Auswertestrategie wurde zunächst von Mitarbeitern des RTC etabliert. Die Durchführung der Färbung, Messung, ggf. Anpassung der Auswertung, sowie Auswahl und weitere Analyse der betrachteten Subpopulationen erfolgte selbständig.

3.8 *In vitro* – Zellmigrationstest: Boyden Kammer

3.8.1 Materialien

Produktbezeichnung	Katalognummer	Firma
CD133+ Zellen:		
Corning® HTS Transwell® 96 Well Permeable Supports	3382	Corning®
Recombinat human Stromal cell-Derived Factor-1 alpha	1118005	Pan Biotech
Adenosine 5`Triphosphate disodium salt hydrate Stock Solution	A 1852-1VL	Sigma Aldrich
BM-TNCs:		
Costar® 6-Well Cluster/Case (Sterile) 24mm Diameter 3,0 µm, Polycarbonate Plates	3496	Transwell®
Recombinat human Stromal cell- Derived Factor – 1 alpha	1118005	Pan Biotech
Adenosine 5`Triphosphate disodium salt hydrate Stock Solution	A 1852-1VL	Sigma Aldrich

Verwendete Puffer siehe Abschnitt 2.3. Standard und Pufferlösungen

3.8.2 Herstellung/Lagerung Stocksolution SDF-1/ATP

Die für die Versuche benötigten Konzentrationen der Chemokine wurden zu Beginn der Versuchsreihe aus den jeweiligen Stammlösungen hergestellt.

Die verwendete ATP-Stammlösung wurde mit PBS angesetzt (Konzentration 4,5 mg/ml), sterilfiltriert und aliquotiert. Eine pH-Wert Angleichung war nicht notwendig. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Für die verwendete SDF-1 Stammlösung wurde das definierte Volumen von sterilem PBS mit 0,1 % BSA entsprechend der Herstellerangabe hinzu pipettiert und gemischt (Konzentration der Stammlösung 100 µl/ml). Die Lösung wurde bei -20°C gelagert.

3.8.3 Migration der CD133+ Zellen (SDF-1/ATP)

Für die Untersuchung des Migrationsverhaltens von CD133+ Stammzellen wurde die sog. Boyden Kammer (engl. Boyden Chamber) verwendet.

Prinzip: Zwei Kammern sind durch einen Filter getrennt und ermöglichen die Untersuchung des chemotaktischen bzw. chemokinen Verhaltens von Zellen. Entwickelt wurde dieses von Stephen Boyden (1966). Zellen werden in den oberen Teil der Kammer eingesetzt, der untere Teil der Kammer enthält die Testsubstanz. In Abhängigkeit der Porengröße des Filters ist eine Transmigration der Zellen entsprechend des chemotaktischen bzw. chemokinetischen Verhaltens möglich.

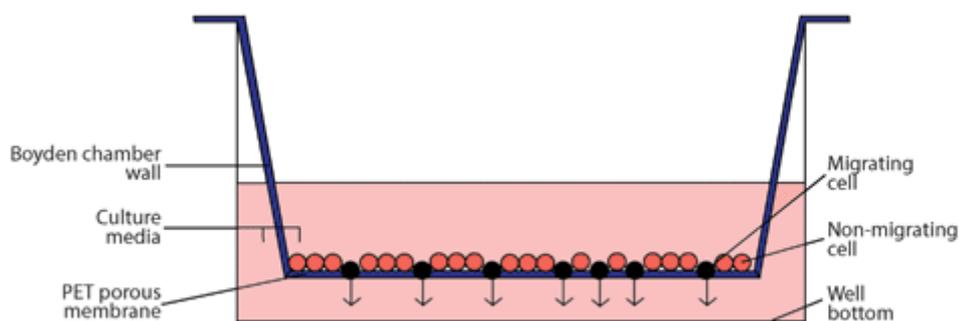


Abb. 5 – Schematische Darstellung des Grundprinzips einer Boyden Kammer – modifiziert nach Oppegard *et al.* (167)

Für die Migration der CD133+ Zellen wurden die Wells der verwendeten Boyden Kammer mit 100 ng/ml Fibronectin in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur gecoatet. Nach einer Stunde Inkubation schloss sich ein dreimaliger Waschschrift mit PBS an.

Im Anschluss wurden pro Ansatz 50.000 CD133+ Zellen in 30 µl StemSpan Medium aufgenommen und ggf. nach der Inkubationszeit zur Präkonditionierung in den oberen Einsatz der Boyden Kammer pipettiert. Die Testsubstanzen (ATP bzw. SDF-1) wurden in 300 µl StemSpan Medium pro Well aufgenommen und in den unteren Teil der Boyden Kammer pipettiert. Zusätzlich wurden als Negativkontrollen Ansätze mit je 300 µl StemSpan Medium im unteren Teil eines Wells mitgeführt. Es schloss sich eine 12- bis 16-stündige Inkubationszeit bei 37°C bei 5% CO₂ im Brutschrank an.

Nach Inkubation wurde das Volumen des oberen Teils der Boyden Kammer abpipettiert und verworfen. Im Anschluss wurde die Boyden Kammer mit dem

eingesetzten oberen Teil der Kammer mit 300g für 10 Minuten zentrifugiert, um bereits migrierte Zellen, die noch an der Unterseite des Einsatzes der Boyden Kammer haften, ebenfalls zu erfassen.

Von den migrierten Zellen im unteren Teil der Boyden Kammer wurden nach der Zentrifugation mit Hilfe des Zeiss-Mikroskops (100x Vergrößerung) mit der ZEN „light“ Software Fotos angefertigt. Pro Well wurden fünf Fotos angefertigt (oben, unten, mittig, links und rechts). Die fotografierten Zellen wurden im Anschluss am PC ausgezählt.

3.8.4 Migration der BM-TNCs - ResQ

Prinzip: siehe 3.8.2.

Für die Migration der Zellen der BM-TNCs wurden die Membraneinsätze einer 6 Well Boyden Kammer mit 100 ng/ml Fibronectin in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur gecoatet. Nach einer Stunde erfolgten drei Waschschriffe der gecoateten Einsätze mit 2 ml PBS.

In den unteren Teil der Boyden Kammer wurde die Testsubstanz (ATP und SDF-1) mit 2,6 ml RPMI 1% BSA pipettiert. Als Negativkontrolle wurden die Wells in 2,6 ml RPMI 1% BSA gefüllt. 1 Millionen Zellen der isolierten BM-TNCs wurden mit 1,5 ml RPMI 1% BSA gemischt (1,5 ml Endvolumen) und in die Einsätze (oberer Teil der Boyden Kammer) pipettiert. Es folgte eine 24-stündige Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank.

Nach 24 Stunden wurden die Einsätze aus der 6-Well Platte entfernt und die Zellen im unteren Teil der Platte resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 15 ml Röhrchen überführt, erneut gewaschen und die Zellpellets in 50 µl kalten MACS-Puffer aufgenommen. Nach einem erneuten Waschschriffe wurden die Zellen in einem Eppendorf-Röhrchen mit FCR-Block resuspendiert und gemischt. Im Anschluss wurden die vorgemischten FACS-Antikörper (Vgl. 3.7.2) den Zellen zugegeben und bei 4°C im Dunkeln für 10 Minuten inkubiert. Mit Red Cell Lyse Puffer wurden übrige Erythrozyten lysiert. Nach einem weiteren Waschschriffe wurden die Zellen in MACS-Puffer resuspendiert. 10 µl der resuspendierten Zellen wurden mit 3% Essigsäure/Methylenblau gemischt und die Zahl der migrierten Zellen in der

Neubauer Kammer gezählt. Die restlichen Zellen wurden für die FACS-Analyse verwendet.

Zusätzlich wurden die BM-TNCs in weiteren Triple-Ansätzen mit und ohne SDF-1 100 ng/ml und ATP 100 μ M für 24 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte ebenfalls eine durchflusszytometrische Analyse der Zellen bezüglich der Veränderung der Oberflächenproteine.

3.9 Untersuchung der Toxizität von ATP auf CD133+ Zellen

3.9.1 Materialien

Produktbezeichnung	Katalognummer	Firma
FACS Flow™ (20 Liter)	342003	BD Biosciences
BD Falcon 5 ml Tubes	352054	BD Biosciences
Annexin V FITC Detection Kit enthält:	556420	BD Biosciences
<ul style="list-style-type: none"> • Annexin-Bindungspuffer • 7AAD • Annexin - FITC 		

3.9.2 Durchführung

Prinzip: Frisch isolierte CD133+ Zellen wurden mit ATP 100 μ M für 16 Stunden inkubiert und anschließend mittels durchflusszytometrischer Analyse auf Veränderungen bezüglich der Apoptose bzw. Nekrose der Zellen untersucht. Anhand der durchflusszytometrischen Doppelfärbung mit Annexin und 7AAD ist eine Bestimmung des Apoptose- bzw. Nekrotestadiums möglich (beispielhafte Dot-Plots siehe Abb. 10). Bei der Apoptose kommt es in der Zellmembran zur Externalisierung von Phosphatidylserin, an das Annexin bindet. Nekrotische bzw. spätapoptotische Zellen haben keine intakte Plasmamembran mehr, so dass 7AAD eindringen und in die DNA interkalieren kann; außerdem ist eine Bindung von Annexin an Phosphatidylserin auch an der Innenseite der Zellmembran möglich. Frühapoptotische Zellen binden demnach nur Annexin, intakte Zellen binden weder 7AAD, noch Annexin.

30.000 frisch isolierte Zellen wurden nach Isolation und einem Waschschrift mit 1 ml PBS in 50 μ l Annexin-Bindungspuffer aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurden jeweils 5 μ l Annexin-FITC und 5 μ l 7AAD zugegeben und für 15 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden 150 μ l Annexin-Bindungspuffer zugegeben und die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und analysiert.

3.10 CFU-EC

3.10.1 Materialien

Produktbezeichnung	Katalognummer	Firma
Methocult H 4236	4236	Stem Cell Technologies
FCS	CH3016003	Hyclone
Rh IL-3 20n g/ml	CB-2130301	PAN Biotech
Rh VEGF 50 ng/ml	CB-1114102	PAN Biotech
Rh SCF 100 ng/ml	CB-1110001	PAN Biotech
Rh IGF-1 50 ng/ml	CB-1104112	PAN Biotech
Rh EGF 50 ng/ml	CB-1101001	PAN Biotech
Rh bFGF 50 ng/ml	CB-1102021	PAN Biotech
Heparin-Na 2 U/ml	3029843	Ratiopharm
Penicillin/Streptomycin	P11-010	GE Healthcare

3.10.2 Durchführung

Prinzip: Der CFU-EC ermöglicht es, Zellen bezüglich ihrer Fähigkeit zur Bildung von Kolonien, analog auch als Colony-forming units (CFU) bezeichnet, zu untersuchen (168). Er ist somit die geeignete Methode, den Einfluss von ATP auf die Proliferation bzw. Differenzierung von CD133+ Stammzellen zu untersuchen. Mittels des Kolonie-Assays CFU-EC wurde der Einfluss von ATP 100 μ M auf isolierte CD133+ Zellen untersucht. 10.000 isolierte CD133+ Zellen wurden nach 16-stündiger Inkubation mit ATP 100 μ M in 9 ml CFU-EC Medium gegeben und mittels 18G-Kanüle und 5 ml Spritze in Triplikaten in Primaria-Petrischalen ausplattiert (3 ml/Schale). Nach 21

Tagen Kultur bei 37°C und 5% CO₂ erfolgte die mikroskopische Auszählung der Kolonien bei 40-facher Vergrößerung am Leica DMIL Mikroskop (Leica).

3.11 Konfokalmikroskopische Analyse der Zellmobilität von CD133+ Zellen

Prinzip: Die konfokale Mikroskopie erlaubt eine Betrachtung von Geweben oder Zellen in der dritten Dimension. Unterschied zur normalen Lichtbildmikroskopie ist, dass es nicht zur gesamten Beleuchtung des Objektes kommt, sondern nur ein Lichtpunkt eines Gewebes bzw. einer Zelle beleuchtet wird. Die unterschiedliche Intensität des Lichtpunktes wird nacheinander gemessen und im Anschluss zu einem Gesamtbild zusammengesetzt. Durch Fluoreszenzfarbstoffe können verschiedene Zellen unterschiedlich dargestellt werden (169,170).

Frisch isolierte, nicht fixierte CD133+ Zellen wurden mit Immunfluoreszenzfärbung gegen CD133 und CD34 entsprechend der Färbung für die Durchflusszytometrie (Vgl. Abschnitt 3.6.1.2) angefärbt und unter dem Konfokal-Mikroskop (LSM 780 ELYRA PS.1 Carl Zeiss) in Medium allein oder im Zusatz von ATP 100 µM untersucht. Die Aufnahmen wurden mit dem 20x Objektiv, sowie der ZEN-Software von Carl Zeiss angefertigt.

3.12 Statistische Methoden/Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Excel 2003 für Windows, sowie mit SigmaPlot 11.0. Auch die grafischen Darstellungen wurden mit SigmaPlot 11.0 angefertigt.

Die statistische Auswertung der dargestellten Versuche bezüglich Signifikanz erfolgte beim Vergleich der Mittelwerte für zwei Gruppen mit Hilfe des t-tests. Mögliche signifikante Unterschiede der Mittelwerte mehrerer Gruppen wurden durch eine zweiseitige Varianzanalyse (ANOVA) untersucht. Zeigten sich in der Varianzanalyse (ANOVA) signifikante Unterschiede, wurde mittels der post-hoc Vergleichstestung nach Dunn geprüft, welche Mittelwerte signifikant verschieden waren. Als statistisch signifikant wurde $p \leq 0,05$ betrachtet. Die im Ergebnisteil dargestellten Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (MW \pm SE) abgebildet.

4. Ergebnisse

Im Rahmen der kardialen Regeneration sind transplantierte Zellen in Abhängigkeit von ihrer jeweiligen Zellcharakteristik unterschiedlich in der Lage, in geschädigte Areale zu migrieren und im Gewebe zu überleben. Eine Migration zu SDF-1 konnte bereits für verschiedene Zellpopulationen nachgewiesen werden (139).

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Migration isolierter CD133+ Zellen aus humanem Knochenmark untersucht. In den Boyden Kammer Versuchen wurde dabei die chemotaktische Wirkung von SDF-1 auf die CD133+ Zellen nachgewiesen. Ein weiterer Schwerpunkt der Versuche stellte die Charakterisierung der Migration von CD133+ Zellen unter Einwirkung von ATP dar, das bei Hypoxie oder Ischämie des Herzens extrazellulär ansteigt und die Beweglichkeit verschiedener Zelltypen beeinflussen kann.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Migration von Knochenmarkzellen untersucht, die mit einem für den klinischen Einsatz vorgesehenen Point-of-Care-System (Res-™ 60 BMC – ThermoGenesis Corp.) aufgereinigt worden waren. Anhand dieses Gemischs von Stammzellen, sowie reifen hämatopoetischen Zellpopulationen wurde das Migrationsverhalten verschiedener Zelltypen untersucht. Die migrierten Zellen wurden dabei einer durchflusszytometrischen Analyse unterzogen, um Subpopulationen zu charakterisieren, die durch SDF-1 bzw. der Kombination aus SDF-1 und ATP verstärkt oder vermindert wanderten.

4.1 Untersuchung der Migration von isolierten CD133+ Zellen

4.1.1 Zusammensetzung und Qualität der isolierten CD133+ Zellen

Nach der Isolation der CD133+ Zellen aus dem Spender-Knochenmark wurde die Reinheit und Viabilität der Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Für die durchgeführten Versuche wurden lediglich Zellen verwendet, die eine Reinheit bzw. Viabilität von mindestens 70% besaßen.

Die folgende Abbildung zeigt beispielhaft an drei Proben die Ergebnisse der selbständig frisch isolierten CD133+ Zellen. CD133+ Zellen, die von der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) im Rahmen der Validierungsläufe für den

CliniMACS[®] Prodigy zur Verfügung gestellt wurden, sind in dieser Abbildung nicht berücksichtigt.

Die ermittelte Reinheit der frisch isolierten Zellen, gemessen an der Expression von CD34 und CD133 auf viablen, niedrig CD45 exprimierenden Zellen (Beurteilung nach adaptierten ISHAGE-Richtlinien) lag bei $74,5 \pm 13,2$ %. Die Viabilität der frisch isolierten Zellen betrug $92,1 \pm 7,0$ %.

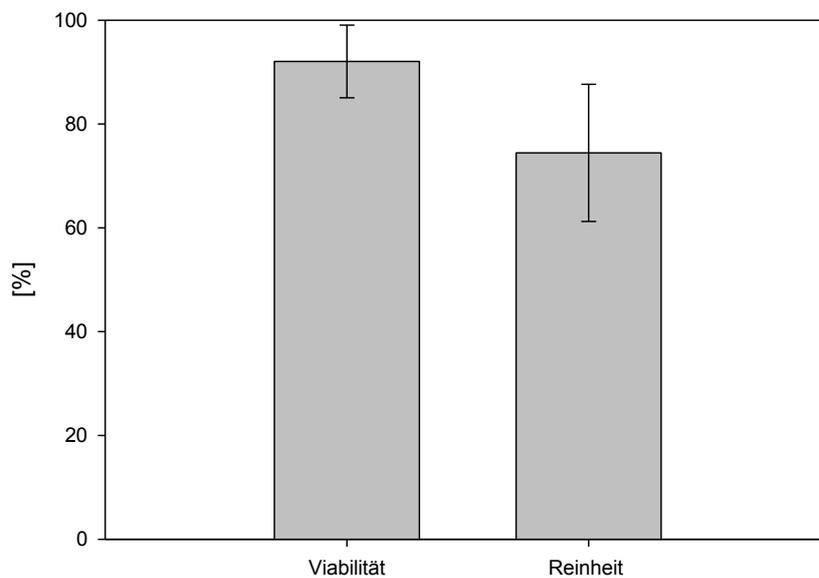


Abb. 6 – Reinheit/Viabilität der isolierten CD133+ Zellen

Mittels Durchflusszytometrie wurden die Reinheit und Viabilität von frisch isolierten CD133+ Zellen ermittelt. $74,5 \pm 13,2$ % der isolierten Zellen exprimierten CD34+ und CD133+ auf ihrer Zelloberfläche. Gleichzeitig konnte eine Viabilität der isolierten Zellen von $92,1 \pm 7,0$ % ermittelt werden.

n=3; Säulen zeigen Mittelwert \pm Standardfehler

4.1.2 Migration von CD133+ Zellen zu SDF-1

Im Vergleich zu Zellen, die gegen das Kontrollmedium wanderten, zeigten CD133+ Zellen eine signifikant höhere Migration in Richtung eines SDF-1 Gradienten *in vitro*.

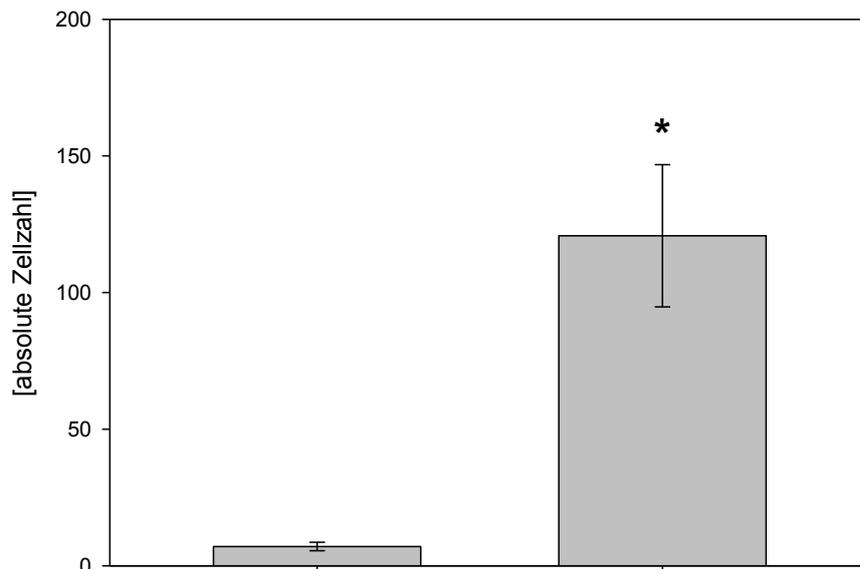


Abb. 7 – SDF-1 beeinflusst die Migration von CD133+ signifikant

Mittels der Boyden Kammer wurden frisch isolierte CD133+ Zellen im Tripel-Ansatz für 16 Stunden zu SDF-1 100 ng/ml mit frisch isolierten CD133+ Zellen wandern gelassen. In den durchgeführten Versuchen zeigte sich für SDF-1 eine signifikante erhöhte Migration ($p < 0,05$).

*n=4 in Tripelansätzen; * $p < 0,05$; Säulen zeigen Mittelwert \pm Standardfehler*

4.1.3 Beeinflussung des Migrationsverhaltens von CD133+ Zellen durch ATP

Da Nukleotide einen Einfluss auf die Motilität von Zellen ausüben und im geschädigten Myokard extrazelluläres ATP ansteigt, wurde im Folgenden der Einfluss von ATP in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Migration von CD133+ Zellen untersucht. Eine Höchstkonzentration von 100 μ M ATP wurde nach Literaturrecherche gewählt und gilt als unbedenkliche Konzentration bezüglich der Toxizität des Nukleotids für Zellen (13,157,171).

In den durchgeführten Versuchen konnte bei den isolierten CD133+ Stammzellen eine konzentrationsabhängige Beeinflussung der Migration von CD133+ Zellen durch ATP festgestellt werden. Bei einer ATP-Konzentration von 100 μ M war die Migration

von CD133+ Zellen im Vergleich zu CD133+ Zellen, die gegen ein Kontrollmedium wanderten, signifikant größer. Bei einer Konzentration von 10 μM bzw. 1 μM kam es zu einer Zunahme der Migration, die jedoch im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant war. Für die Migration zu einer Kombination aus SDF-1 und ATP konnte ebenfalls eine Signifikanz gezeigt werden.

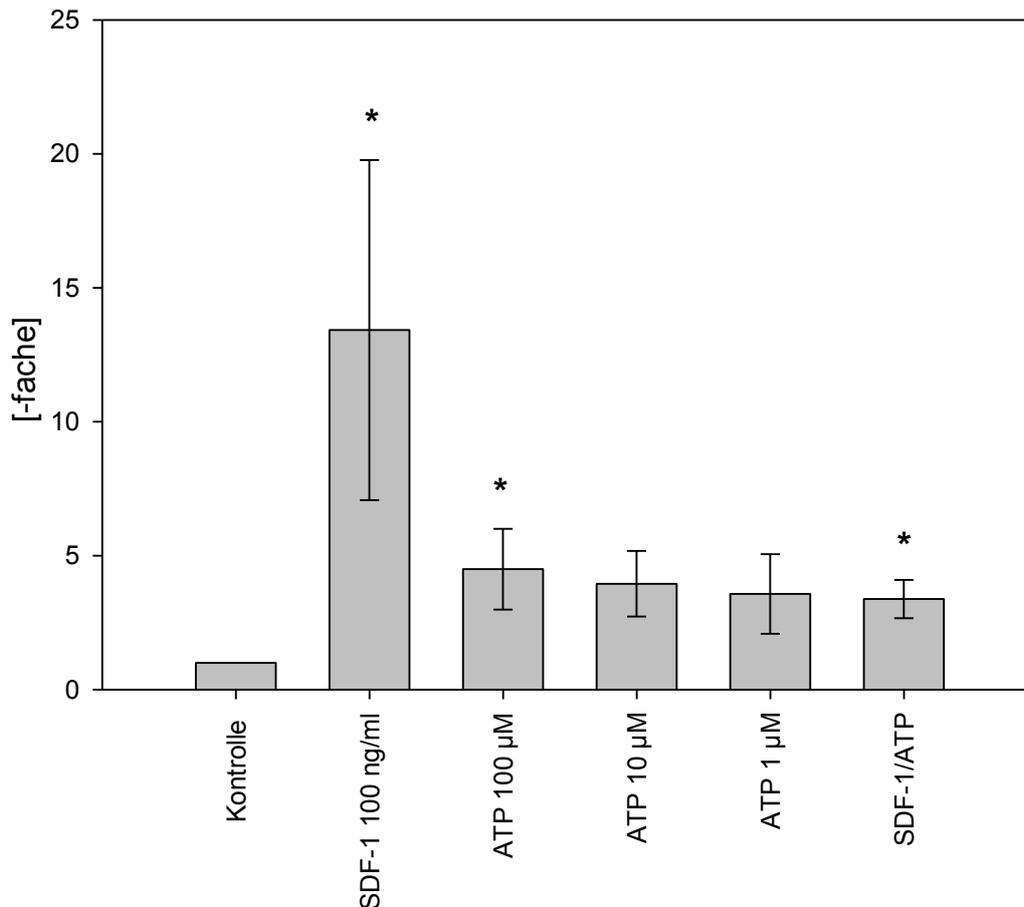


Abb. 8 – Effekt von SDF-1 und ATP auf die Migration von CD133+ Zellen

Sowohl SDF-1 als auch ATP (100 μM) induzierten die Migration von CD133+ Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant (SDF-1: $p < 0,001$, ATP 100 μM : $p = 0,003$). Für ATP in einer Konzentration von 10 μM bzw. 1 μM kam es zu einer Zunahme der Migration von CD133+ Zellen, allerdings war diese nicht signifikant. Für die Kombination aus SDF-1/ATP konnte ebenfalls eine signifikante ($p < 0,001$) Zunahme im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden.

n ≥ 4 in Tripelansätzen; * $p < 0,05$; Säulen zeigen Mittelwert \pm Standardfehler

4.1.4 Einfluss einer Präkonditionierung mit ATP auf die Migration von CD133+ Zellen zu SDF-1

In weiteren Versuchen mit isolierten CD133+ Zellen wurde die Möglichkeit einer Vorbehandlung („Präkonditionierung“) von Stammzellen mit ATP zur Verstärkung ihrer Migration überprüft. Hierfür wurden die isolierten CD133+ Zellen für 24 Stunden mit 100 μ M ATP inkubiert und im Anschluss gegen SDF-1 migrieren gelassen. Im Vergleich zu Kontrollzellen, die in Medium alleine inkubiert worden waren, zeigten die ATP-präkonditionierten Zellen eine leicht erhöhte Migration (Vgl. Abb. 9), der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

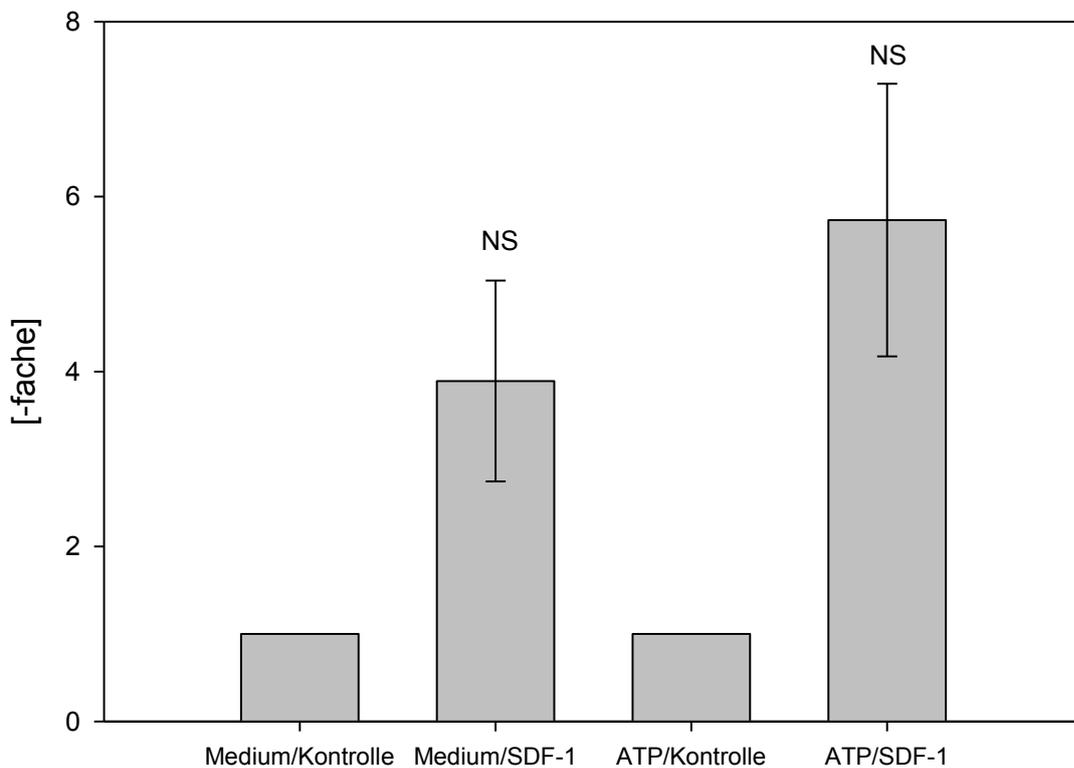


Abb. 9 – Darstellung der Präkonditionierung von CD133+ Zellen mit ATP

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Vorbehandlung („Präkonditionierung“) von Stammzellen mit ATP (100 μ M) nach Vorinkubation für 24 Stunden. Die Präkonditionierung der CD133+ Zellen führte zu einer tendenziell erhöhten Migration der Zellen zu SDF-1 im Vergleich zu nicht vorinkubierten CD133+ Zellen, der Effekt war jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$) (ATP-Präkonditionierung: 5,73-fache \pm 1,56 vs. Kontrolle: 3,89-fache \pm 1,5).

n=5 in Tripelansätzen; NS=nicht signifikant; Säulen zeigen Mittelwert \pm Standardfehler

4.1.5 Erhalt von Viabilität und Funktion ATP-behandelter CD133+ Stammzellen

Extrazelluläre Nukleotide wie ATP können auf Zellen eine toxische Wirkung haben (172). Um CD133+ Stammzellen auf eine eventuelle Schädigung durch ATP zu untersuchen, wurden diese einer FACS-Analyse unterzogen. Nach deren Vorinkubation für 16 Stunden mit 100 μ M ATP führten wir eine FACS-Färbung mit Annexin und 7AAD durch. Es konnte in den durchgeführten Versuchen eine geringe Anzahl von apoptotischen bzw. nekrotischen CD133+ Stammzellen identifiziert werden. Eine geringe Reduzierung der Apoptoserate durch die Vorinkubation erwies sich aber als nicht signifikant, ebenso wenig eine leichte Erhöhung der Anzahl viabler Zellen. Insgesamt konnte kein negativer Effekt von ATP auf das Überleben der Zellen festgestellt werden.

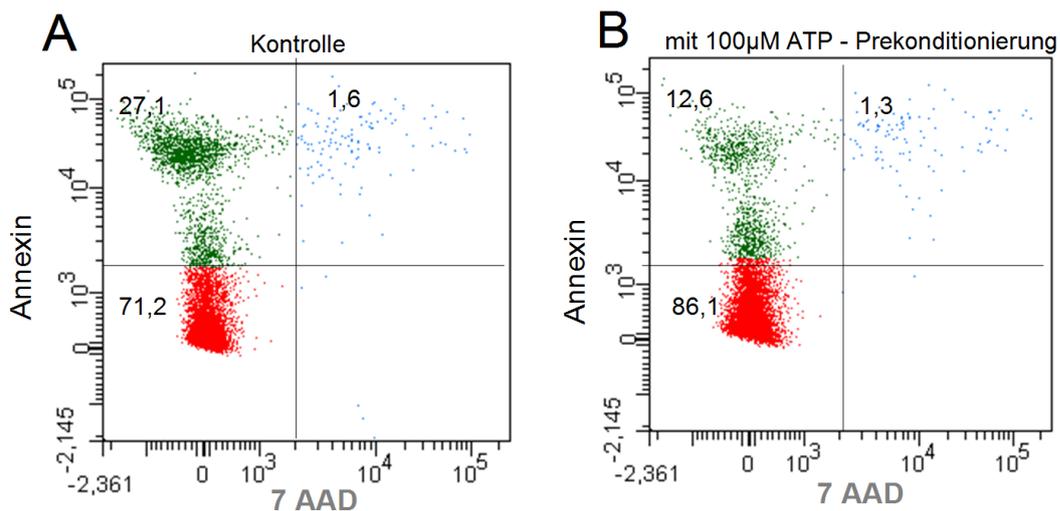


Abb. 10 – Apoptose / Nekrose von CD133+ Zellen mit u. ohne ATP-Inkubation

Die Abbildung zeigt beispielhaft Dot Plots mit Annexin und 7AAD gefärbter CD133+ Zellen. A) Durchflusszytometrische Messung nach Inkubation mit Medium für 16 Stunden. B) Messung von mit 100 μ M ATP vorinkubierten CD133+ Zellen. Lebende (Annexin- und 7-AAD-negativ) Zellen sind in rot dargestellt, frühapoptotische Zellen (Annexin-positiv, 7-AAD-negativ) grün, nekrotische bzw. spätapoptotische Zellen (Annexin- und 7-AAD-positiv) sind blau. Angegeben ist jeweils der Anteil an den Gesamtzellen in %.

Repräsentative Dot Plots aus n=3

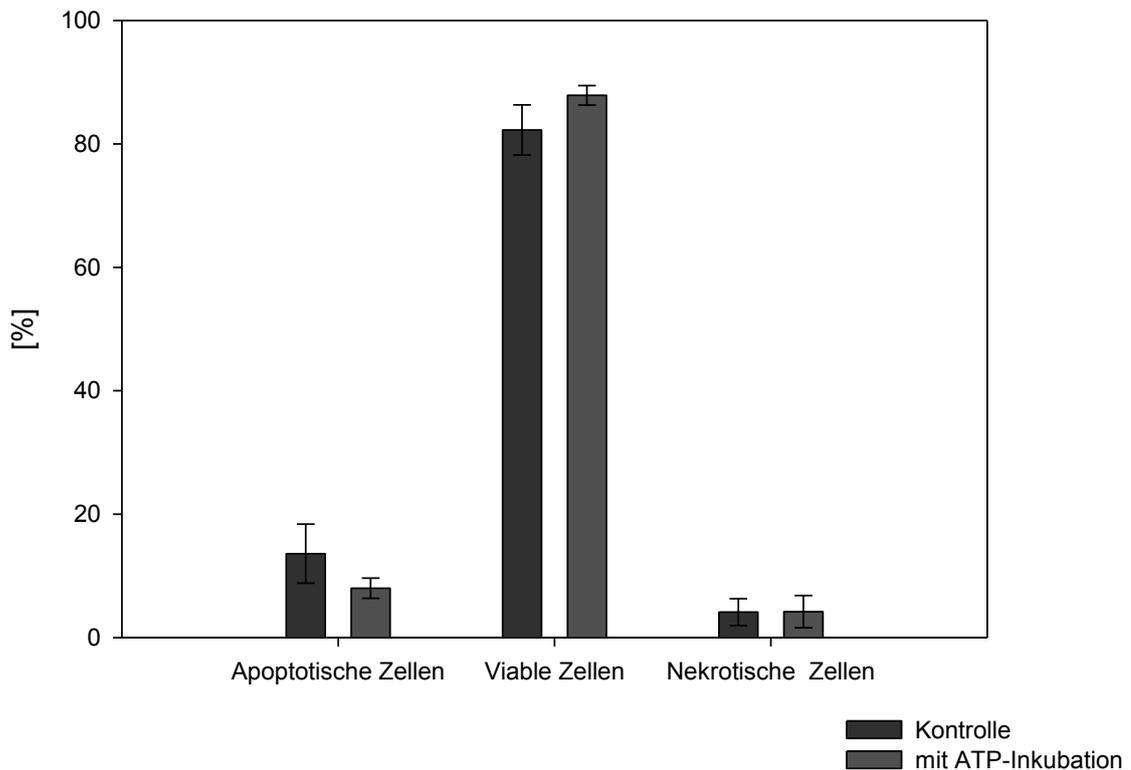


Abb. 11 – Effekt der Inkubation mit 100 μ M ATP auf CD133+ Zellen

Darstellung der FACS-Messung von CD133+ Zellen. Es zeigte sich eine nicht signifikante Reduzierung der apoptotischen Zellen (Kontrolle: 13,6 % \pm 4,78 % vs. Inkubation: 8,00 % \pm 1,63 %), sowie eine Zunahme der Anzahl an viablen Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolle: 82,27 % \pm 4,06 % vs. Inkubation: 87,87 % \pm 1,56 %).

n=3; Säulen zeigen Mittelwert \pm Standardfehler

Typisch für hämatopoetische Stammzellen ist die Fähigkeit zur Proliferation und Differenzierung. Ein CFU-Assay ermöglicht es, Zellen bezüglich ihrer Fähigkeit zur Bildung von Kolonien, analog auch als Colony-forming units (CFU) bezeichnet, zu untersuchen. Um den Einfluss von ATP auf die Proliferation bzw. Differenzierung von CD133+ Stammzellen zu untersuchen, wurde der CFU-EC angewandt, ein Test auf Proliferation und endothelartige Differenzierung von CD133+ Zellen (168,173). Isolierte CD133+ Zellen wurden nach 16-stündiger Inkubation mit 100 μ M ATP in das CFU-EC Medium gegeben. Nach 21 Tagen erfolgte die mikroskopische Auszählung der Kolonien (Vgl. Abb. 13). In den durchgeführten CFU-EC Assays konnte kein Einfluss von 100 μ M ATP auf die Proliferation bzw. Viabilität von CD133+ Zellen im Vergleich zu CD133+ Zellen im Kontrollmedium festgestellt werden.

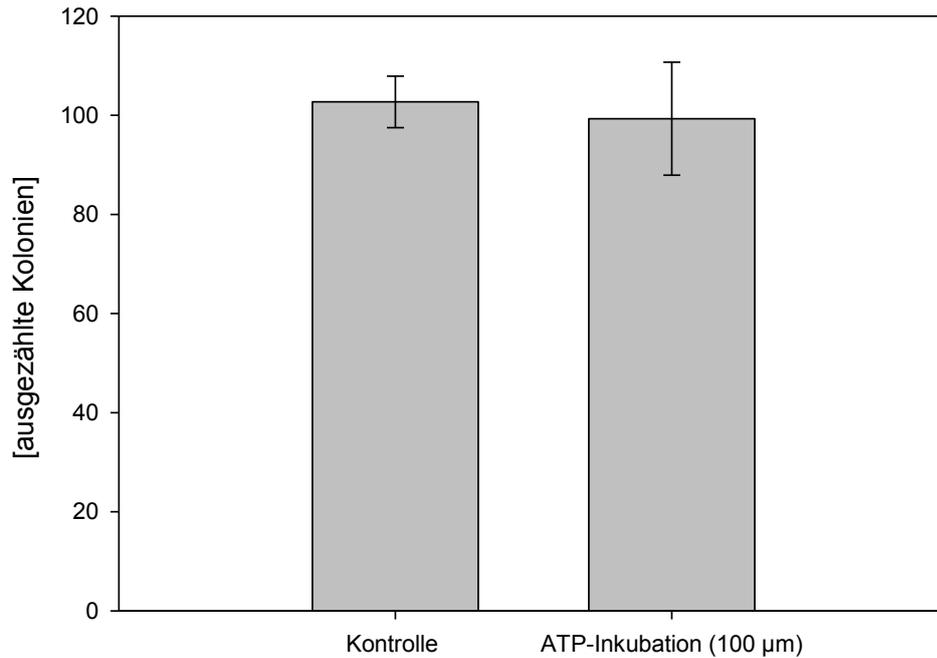


Abb. 12 – ATP-Inkubation beeinflusst die Bildung von CFU-EC Kolonien durch CD133+ Zellen nicht

Darstellung der CFU-EC Assays nach Inkubation von CD133+ Zellen mit 100 µM ATP im Vergleich zu CD133+ Zellen im Kontrollmedium. Nach 21-tägiger Bebrütung konnte kein Einfluss von ATP auf die Proliferation von CD133+ Zellen nachgewiesen werden (Kontrolle: 102,7 +/- 5,2 Kolonien vs. ATP-Inkubation: 99,3 +/- 11,4 Kolonien).

n=3; Säulen zeigen Mittelwert ± Standardfehler

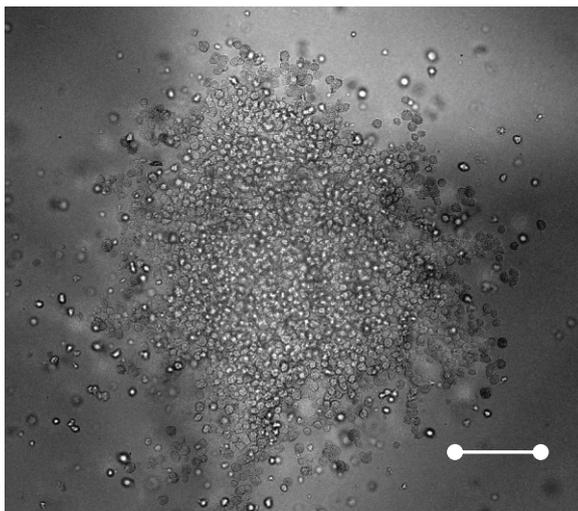


Abb. 13 – Darstellung eines CFU-EC aus CD133+ Zellen

Repräsentative mikroskopische Aufnahme einer Kolonie eines CFU-EC Assays nach 16-stündiger Inkubation mit ATP 100 µM und anschließender Bebrütung für 21 Tage. Der im Bild dargestellte Messbalken entspricht 200 µm.

Lebende CD133+ Zellen, mit und ohne ATP, wiesen eine typische Morphologie, sowie Verteilung der Antigene CD34 und CD133 auf.

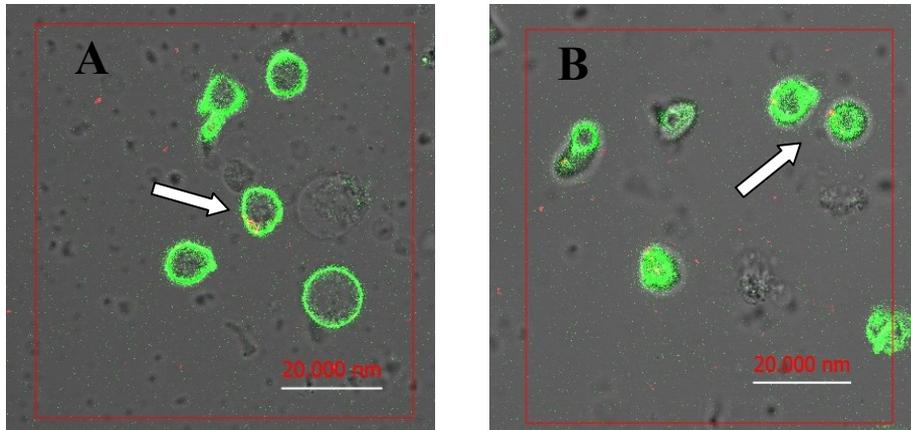


Abb. 14 – Morphologie von CD133+ Zellen mit und ohne ATP 100 µM

Isolierte, nicht fixierte CD133+ Zellen mit (B) und ohne (A) ATP wurden per Immunfluoreszenzfärbung gegen CD133 (rot) und CD34 (grün) angefärbt und unter dem Konfokalmikroskop untersucht. Der dargestellte Messbalken entspricht 20 µm.

4.2. Untersuchung der Migration von BM-TNCs aus Knochenmark

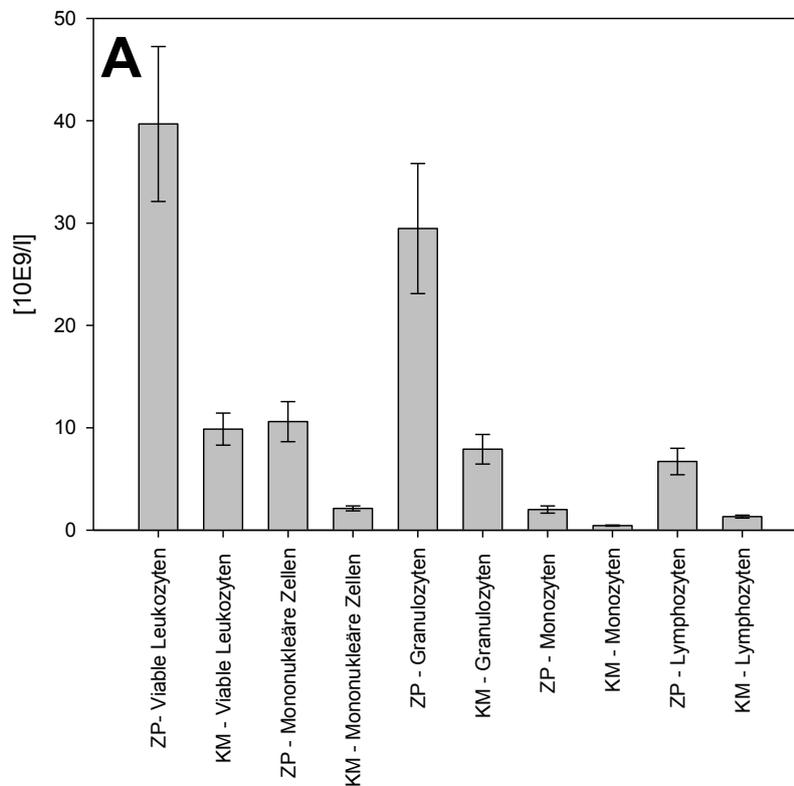
Die durchflusszytometrische Analyse eines Zellgemisches aus Knochenmark im Vergleich zu isolierten Einzelzellen erlaubt die Betrachtung verschiedener Subpopulationen, die durch spezifische Marker bzw. Markerkombinationen gekennzeichnet sind. In den durchgeführten Experimenten wurden BM-TNCs bezüglich der Migration in Abhängigkeit von SDF-1, ATP, sowie einer Kombination aus SDF-1 und ATP charakterisiert.

4.2.1 Zusammensetzung und Qualität der isolierten BM-TNCs

Zunächst wurden sowohl die verwendete Knochenmarkprobe, als auch die isolierten BM-TNCs mittels Durchflusszytometrie bezüglich der enthaltenen Zellen untersucht. Abbildung 15 zeigt die Verteilung der enthaltenen Zelltypen.

Die verwendeten Knochenmarkproben enthielten $9,87 \pm 1,57 \cdot 10^9/l$ lebende Leukozyten. Die lebenden Leukozyten beinhalteten $7,91 \pm 1,45 \cdot 10^9/l$ Granulozyten, sowie $2,12 \pm 0,24 \cdot 10^9/l$ mononukleäre Zellen. Die mononukleären Zellen setzten sich aus $1,32 \pm 0,14 \cdot 10^9/l$ Lymphozyten, sowie $0,45 \pm 0,06 \cdot 10^9/l$ Monozyten zusammen. $0,06 \pm 0,02 \cdot 10^9/l$ der isolierten Zellen waren CD34+ Zellen. CD133 als Oberflächenmarker fanden sich auf $0,01 \pm 0,003 \cdot 10^9/l$ der Zellen.

Die isolierten BM-TNCs enthielten im Durchschnitt $39,69 \pm 7,57 \cdot 10^9/l$ lebende Leukozyten. Die lebenden Leukozyten beinhalteten $29,47 \pm 6,36 \cdot 10^9/l$ Granulozyten, sowie $10,6 \pm 1,96 \cdot 10^9/l$ mononukleäre Zellen. Die mononukleären Zellen setzten sich aus $6,71 \pm 1,29 \cdot 10^9/l$ Lymphozyten, sowie $2,01 \pm 0,35 \cdot 10^9/l$ Monozyten zusammen. Die isolierten BM-TNCs enthielten $0,28 \pm 0,04 \cdot 10^9/l$ CD34+ Zellen. CD133 als Oberflächenmarker fand sich auf $0,13 \pm 0,03 \cdot 10^9/l$ Zellen.



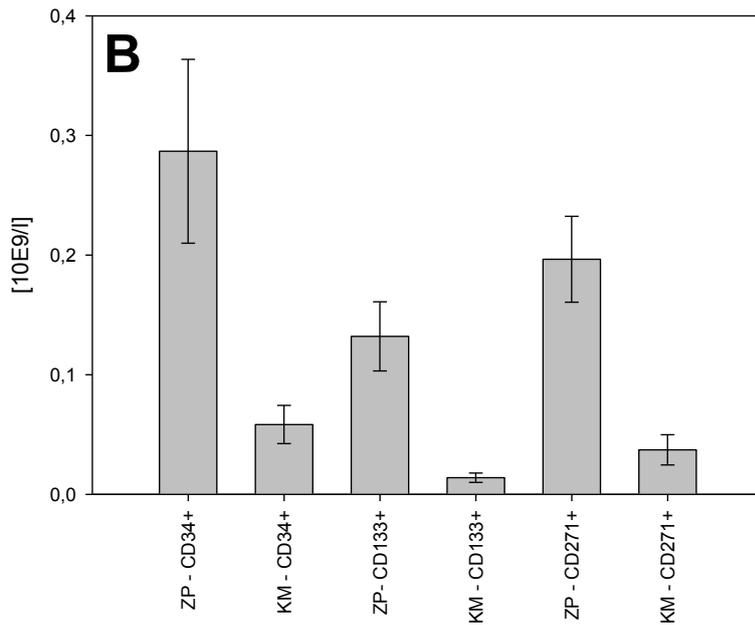


Abb. 15 – Zusammensetzung von verwendeten Knochenmarkproben im Vergleich zu isoliertem BM-TNCs:

Durchflusszytometrische Analyse des verwendeten Knochenmarks (KM) im Vergleich zu den isolierten BM-TNCs (ZP).

A: Die Abbildung zeigt lebende Leukozyten, mononukleäre Zellen, Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten der verwendeten Knochenmarkproben im Vergleich zum isolierten Zellprodukt.

B: Die Abbildung zeigt CD34+ Zellen, CD133+ Zellen und CD271+ Zellen der verwendeten Knochenmarkproben (KM) im Vergleich zum isolierten Zellprodukt (ZP).

n=9; Säulen zeigen Mittelwert ± Standard Standardfehler

Zur Charakterisierung der BM-TNCs wurden CD34+ Zellen, sowie Leukozyten bezüglich ihrer Viabilität mittels FACS-Analyse überprüft. Die Viabilität der CD34+ Zellen der verwendeten Knochenmarkproben lag bei $84,83 \pm 10,79$ %. Die Viabilität der in den verwendeten Knochenmarkproben enthaltenen Leukozyten betrug $97,45 \pm 1,51$ %.

Die ermittelte Viabilität der isolierten CD34+ Zellen aus dem Zellprodukt lag bei $90,86 \pm 4,79$ %. Die Viabilität der Leukozyten im Zellprodukt betrug $97,83 \pm 2,05$ %.

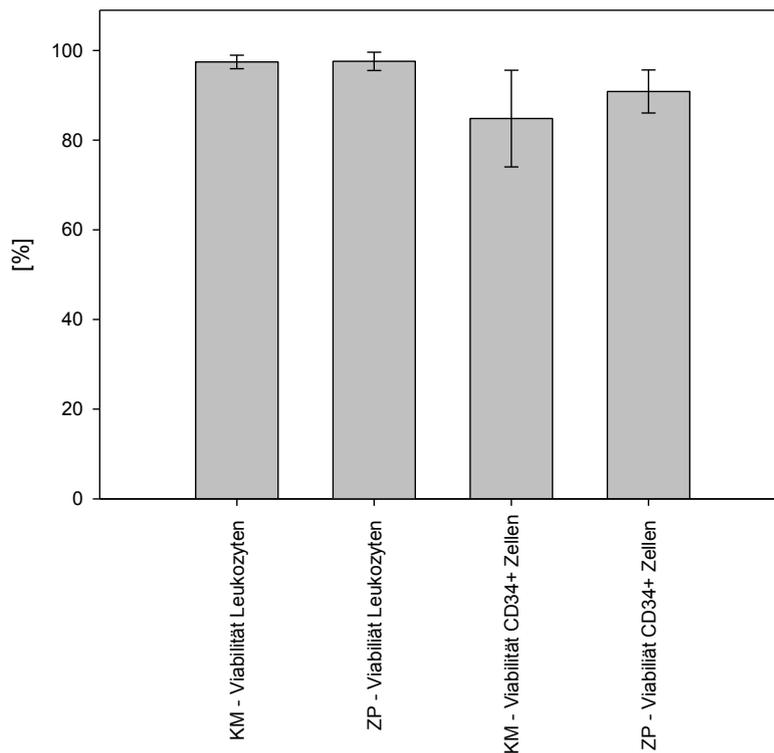


Abb. 16 – Viabilität der Knochenmarkprobe und des isolierten Zellprodukts

Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse von CD34+ Zellen, sowie Leukozyten des verwendeten Knochenmarks (KM) im Vergleich zu den isolierten BM-TNCs (ZP).

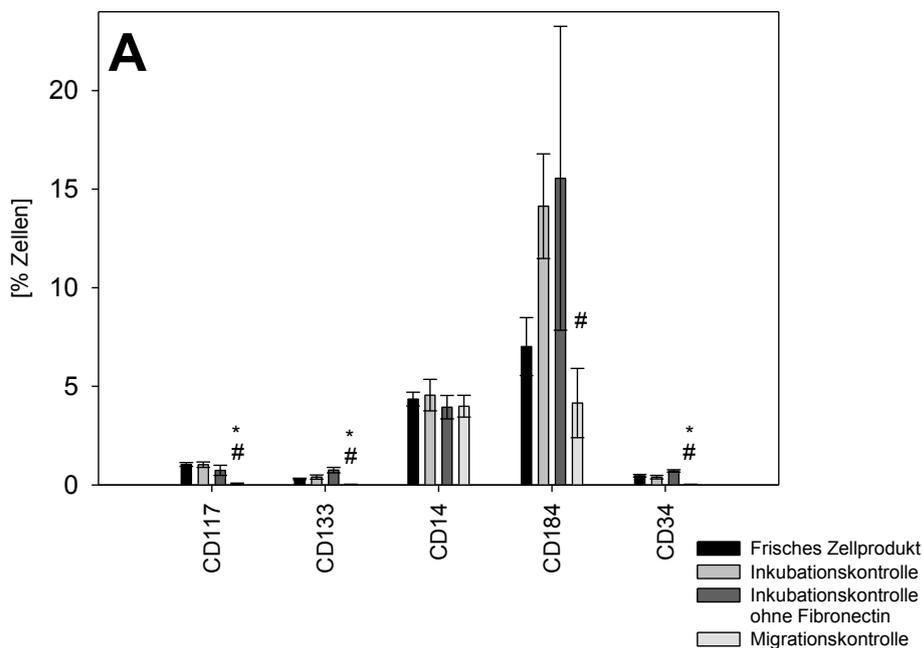
n=9; Säulen zeigen Mittelwert \pm Standard Standardfehler

4.2.2 Analyse von Stammzellmarkern auf spontan migrierten Zellen im Vgl. zu frisch isolierten BM-TNCs

Zunächst wurde eine Analyse der Stammzellmarker CD34, CD133 und CD117, sowie der Rezeptoren CD184 und CD309 auf den frisch isolierten BM-TNCs durchgeführt. CD45 als pan-Leukozytenmarker und Near IR Live Dead Stain zur Beurteilung der Zellviabilität waren in die Mehrfachfärbung integriert, um die Auswertung nach ISHAGE-Richtlinien (CD34+) bzw. adaptierten Richtlinien (CD133+, CD117+, CD34+ CD133+) zu ermöglichen. Als Nicht-Stammzellpopulation wurde zu Kontrollzwecken außerdem der Monozytenmarker CD14 integriert.

Aufgrund sehr geringer Expression wurde CD309 aus der Analyse ausgeschlossen, die übrigen Marker wurden einzeln, sowie in ausgewählten mehrfach positiven Subpopulationen betrachtet.

Um eine Veränderung der Markerexpression durch die Kulturzeit von 24 Stunden während des Boyden Kammer Versuchs feststellen zu können, wurden Kontrollzellen auf fibronectinbeschichteten Zellkulturplatten ohne Membraneinsatz mitgeführt und ebenfalls analysiert. Wie Abbildung 17 zeigt, fand keine signifikante Veränderung der Marker durch die Inkubation statt. Ein Trend zur erhöhten Expression von CD184 blieb unter Signifikanzniveau. Die Beschichtung der Plattenoberfläche mit Fibronectin hatte keinen Einfluss. Dagegen war der Anteil der für einzelne, sowie mehrere Stammzellmarker positiven Zellen in der Migrationskontrolle signifikant verringert.



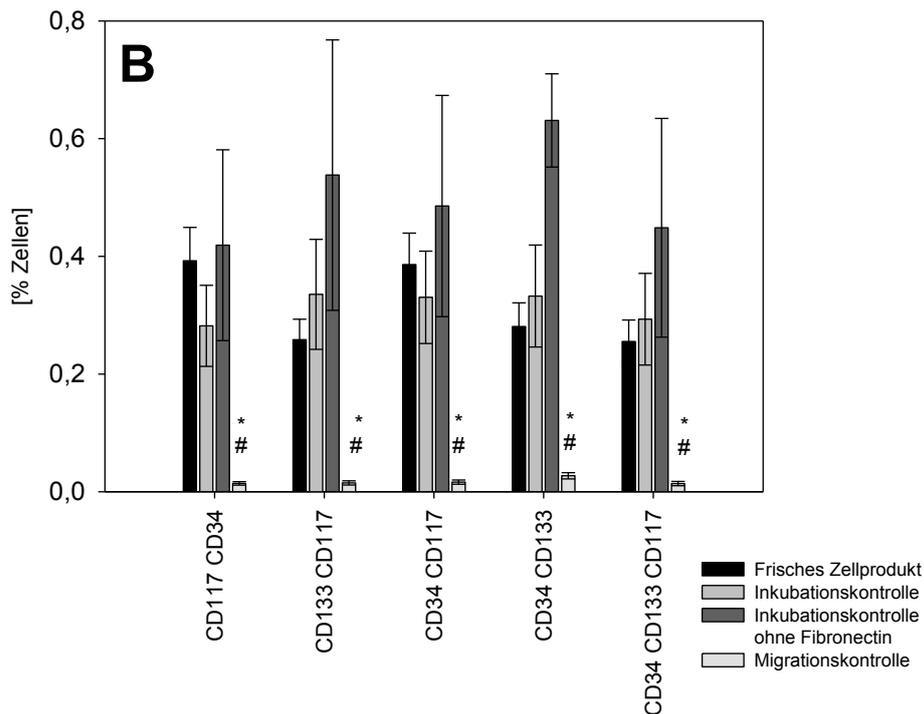


Abb. 17 – Veränderung der Markerexpression zwischen spontan migrierten Zellen und dem frischen Zellprodukt

Es fand keine signifikante Veränderung der Marker durch die Inkubation statt. Die Fibronectin-Beschichtung hatte keinen Einfluss. Der Anteil der für einzelne, sowie mehrere Stammzellmarker positiven Zellen war in der Migrationskontrolle signifikant verringert.

Abbildung A: Einzelmarker B: Markerkombinationen

$n=10$ ($n=3$ für Inkubationskontrolle ohne Fibronectin); Säulen zeigen Mittelwert \pm Standardfehler, * $p<0,05$ vs. frischem Zellprodukt, # $p<0,05$ vs. Inkubationskontrolle

4.2.3 BM-TNCs migrieren zu SDF-1, ATP, sowie zur Kombination SDF-1/ATP

Vorangegangene Versuche (Vgl. Abschnitt 4.1.3, Migration von CD133+ Zellen zu ATP) ließen einen Einfluss von ATP auf die Migration von Knochenmarkszellen erwarten. Um die Gesamtmigration der Knochenmarkszellen zu ermitteln, wurden nach Migration gegen Medium (Kontrolle), SDF-1 (100 ng/ml), ATP (100 μ M) oder SDF-1/ATP in Kombination die migrierten Zellen aus der unteren Kammer entnommen und die kernhaltigen Zellen in der Neubauerkammer quantifiziert.

In den durchgeführten Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass Knochenmarkzellen zu einem SDF-1 Gradienten (100 ng/ml) nicht signifikant ($p=0,098$) im Vergleich zum Kontrollmedium wandern.

Für die SDF-1/ATP-Kombination konnte eine signifikant ($p=0,024$) höhere Migration von Knochenmarkzellen im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden.

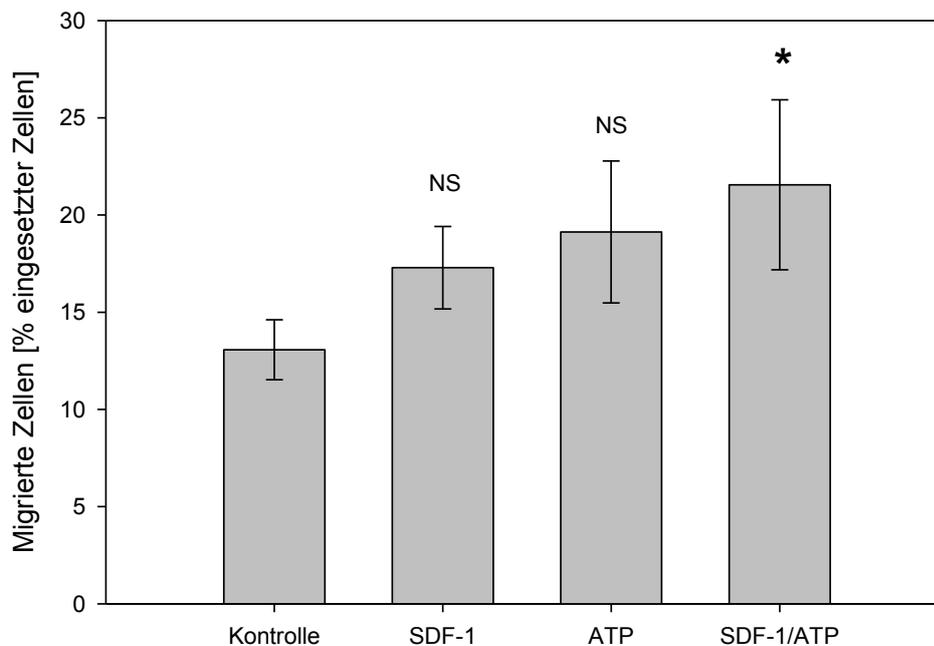


Abb. 18 – Effekt von SDF-1 von SDF-1/ATP auf Knochenmarkzellen

Knochenmarkzellen migrierten zu SDF-1 und ATP. Nach 16-stündiger Migration zu SDF-1 100 ng/ml und ATP 100 μ M wanderten signifikant ($p=0,024$) mehr Zellen zu SDF-1/ATP in Kombination im Vergleich zur Kontrolle (Medium). Die Effekte von SDF-1 ($p=0,098$) und ATP ($p=0,071$) alleine war nicht signifikant.

$n \geq 4$; * $p < 0,05$; NS= nicht signifikant; Säulen zeigen Mittelwert \pm Standardfehler

4.2.4 Differenzielle Migration verschiedener Zellpopulationen zu SDF-1 oder SDF-1/ATP

Nach der Untersuchung der quantitativen Migration von Knochenmarkzellen gegenüber einem SDF-1-, ATP- bzw. SDF-1/ATP-Gradienten wurden in einem weiteren Schritt die Migration spezifischer Subpopulationen anhand der exprimierten Oberflächenmarker charakterisiert.

Die Abbildung 19 zeigt die Expression der untersuchten Einzelmarker auf migrierten Zellen. Die migrierten Zellen wurden aus der unteren Kammer entnommen und durchflusszytometrisch charakterisiert. Zellen, die CD117 oder CD133 als Marker für hämatopoetische Stammzellen trugen, zeigten keine signifikanten Unterschiede bei Migration zu SDF-1 vs. Kontrolle. Die zu SDF-1 und ATP migrierte Fraktion wies allerdings signifikant mehr CD34+ Zellen auf als die Migrationskontrolle. Monozyten, ausgewertet anhand ihrer Expression von CD14, waren in allen migrierten Fraktionen gleich häufig vertreten. Der prozentuale Anteil der CD184+ Zellen sank bei der Migration zu SDF-1 100 ng/ml bzw. zur Kombination aus SDF-1 100 ng/ml und ATP 100 µM leicht ab, dieser Effekt war jedoch nicht signifikant.

Marker	Migrationskontrolle	SDF-1 Migration	ATP Migration	SDF-1/ATP Migration
CD34+ Zellen	0,032 ± 0,001 %	0,062 ± 0,016 %	0,033 ± 0,005 %	0,081 ± 0,015 %
CD184+ Zellen	1,72 ± 0,39 %	1,020 ± 0,195%	4,447 ± 2,200 %	0,646 ± 0,257 %
CD117+ Zellen	0,067 ± 0,02 %	0,091 ± 0,013 %	0,034 ± 0,009 %	0,117 ± 0,010 %
CD133+ Zellen	0,031 ± 0,007 %	0,061 ± 0,019 %	0,0366 ± 0,008%	0,087 ± 0,027 %
CD14+ Zellen	3,641 ± 1,421 %	3,969 ± 0,741 %	5,939 ± 1,680 %	3,478 ± 0,750 %

Tabelle 3 – Ergebnisse der Einzelmarker ($n \geq 4$; Säulen zeigen Mittelwert \pm Standardfehler)

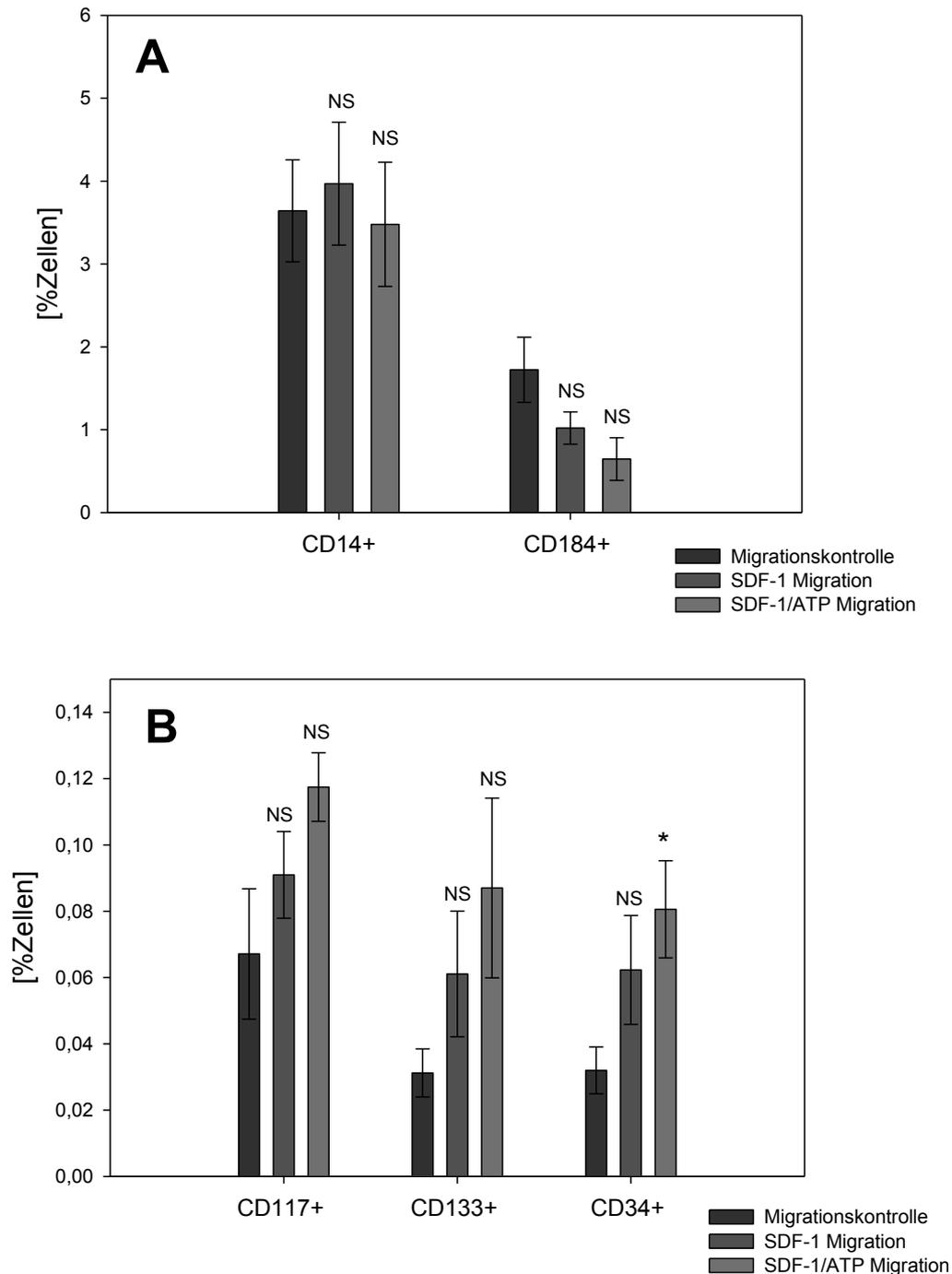


Abb. 19 – Migration von Knochenmarkszellen mit SDF-1 bzw. SDF-1/ATP – Einzelmarker

Nach 24-stündiger Migration in der Boyden Kammer zu Medium (Migrationskontrolle), SDF-1 (100 ng/ml) bzw. SDF-1 (100 ng/ml) / ATP (100 μ M) ergab die durchflusszytometrische Analyse der BM-TNCs eine signifikant erhöhte Migration von CD34+ Zellen zu SDF-1/ATP. CD184 zeigte allerdings einen Trend zur Verringerung bei Migration gegen SDF-1 bzw. SDF-1/ATP. Die Verringerung des Anteils an CD184+ Zellen nach Migration zu SDF-1 bzw. SDF-1/ATP war knapp nicht signifikant ($p=0,063$).

Abbildung A: CD 14+ und CD184+ Zellen - Abbildung B: CD 117+, CD133+ und CD34+ Zellen
 $n \geq 4$; * $p < 0,05$; Säulen zeigen Mittelwert \pm Standardfehler

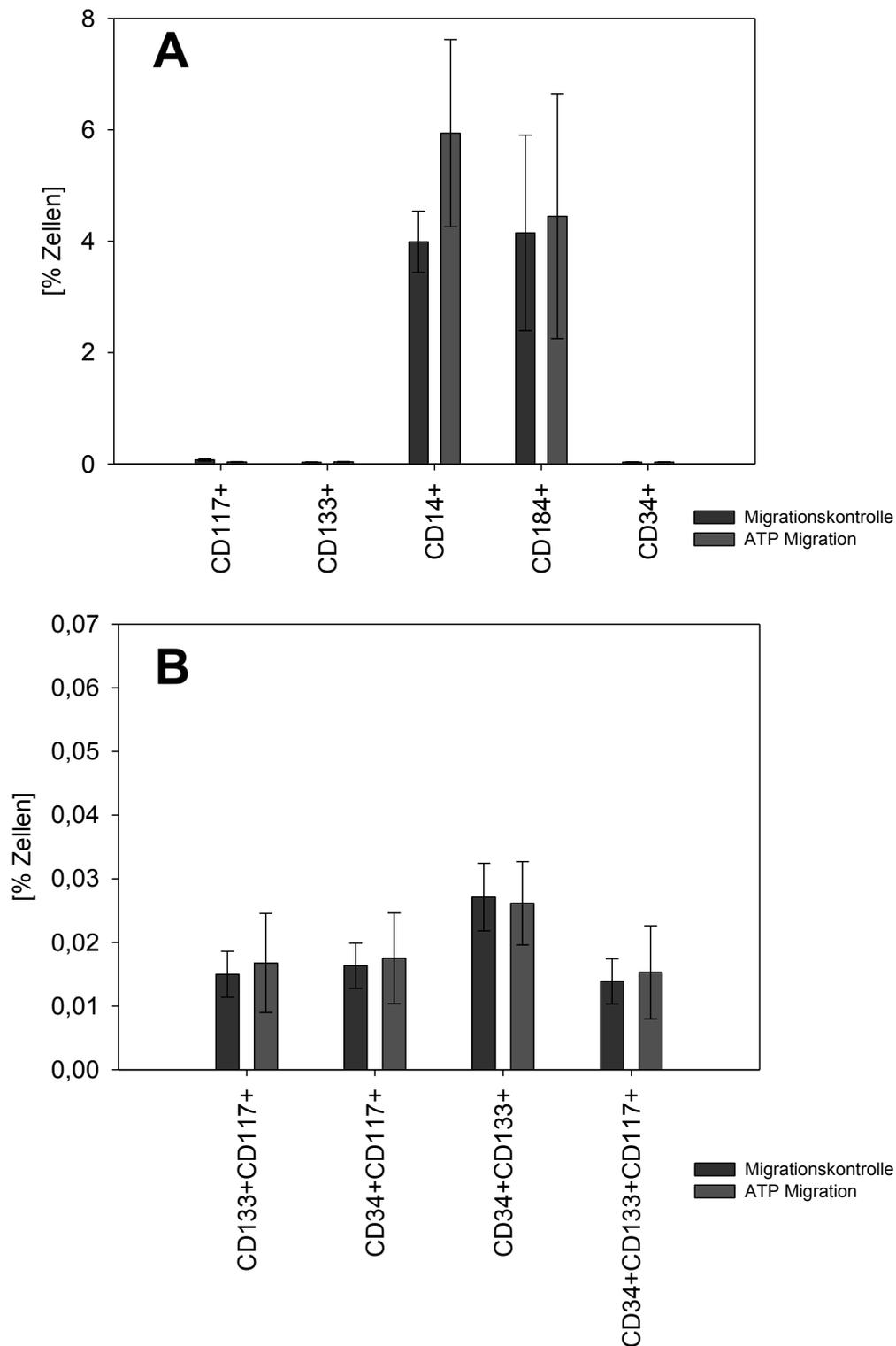


Abb. 20 – Migration von Knochenmarkszellen zu ATP

Nach 24-stündiger Migration in der Boyden Kammer zu Medium (Migrationskontrolle) und ATP 100 μ M ergab die durchflusszytometrische Analyse der BM-TNCs keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Expression einzelner Marker bzw. Subpopulationen.

Abbildung A: Einzelmarker - Abbildung B: Markerkombinationen

n=4; Säulen zeigen Mittelwert \pm Standardfehler

Nach Migration zu CXCL12 (SDF-1) kam es zu einer Abnahme des Anteils an CD184+ Zellen im Vergleich zur Migrationskontrolle. Diese Abnahme der CD184+ Zellen kann auf dem Mechanismus der Rezeptorinternalisierung von CXCR4 durch den Kontakt mit CXCL12 beruhen (174).

Der CXC-Chemokin-Rezeptor-4 (CXCR4), synonym auch bekannt als CD184, kann u.a. auf hämatopoetischen Stammzellen nachgewiesen werden. Die CXCR4 Expression auf der Zelloberfläche gilt bisher noch nicht als endgültig bzw. vollständig verstanden (175). CXCL12 (SDF-1) geht mit CXCR4 eine spezifische Bindung ein. Nach Kontakt zwischen Rezeptor und dem Ligand SDF-1 kommt es zur Internalisierung des Rezeptors durch Endozytose (174). SDF-1 in geringen Konzentrationen führt zu einer Hochregulation von CXCR4 (148).

Um zu prüfen, ob die CD184-Expression der BM-TNCs durch den Kontakt mit SDF-1 gesenkt wird, somit die Abnahme von CD184+ Zellen in den zu SDF-1 migrierten Fraktionen auf Rezeptorinternalisierung zurückgehen könnte, wurden Inkubationskontrollen durchgeführt. BM-TNCs wurden für 24 Stunden mit SDF-1 bzw. mit SDF-1/ATP inkubiert und im Anschluss mittels FACS-Analyse untersucht. Abbildung 21 zeigt die Veränderung der Einzelmarker durch die Inkubation. Für CD184+ Zellen konnte durch SDF-1 Inkubation eine signifikante ($p=0,007$) Reduzierung der Expression des Oberflächenproteins gezeigt werden.

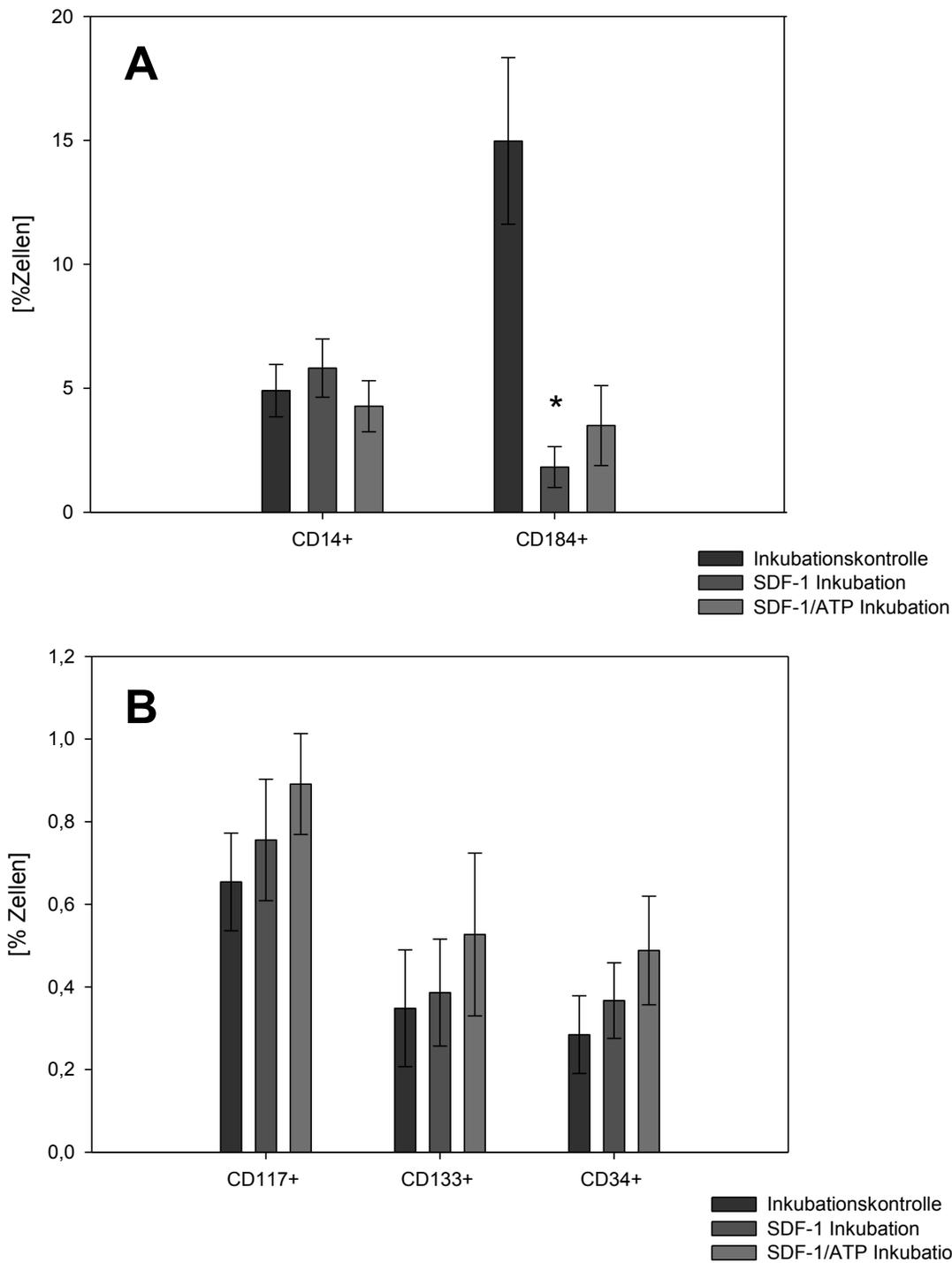


Abb. 21 – Inkubation von Knochenmarkzellen mit SDF-1 bzw. SDF-1/ATP - Einzelmarker

Darstellung der Inkubation von Knochenmarkzellen. Bedingungen gelten wie in Abb. 17. Für CD184+ Zellen kam es durch die Inkubation mit SDF-1 100 ng/ml zu einer signifikanten ($p=0,007$) Abnahme der Expression von CD184 im Vergleich zur Inkubationskontrolle.

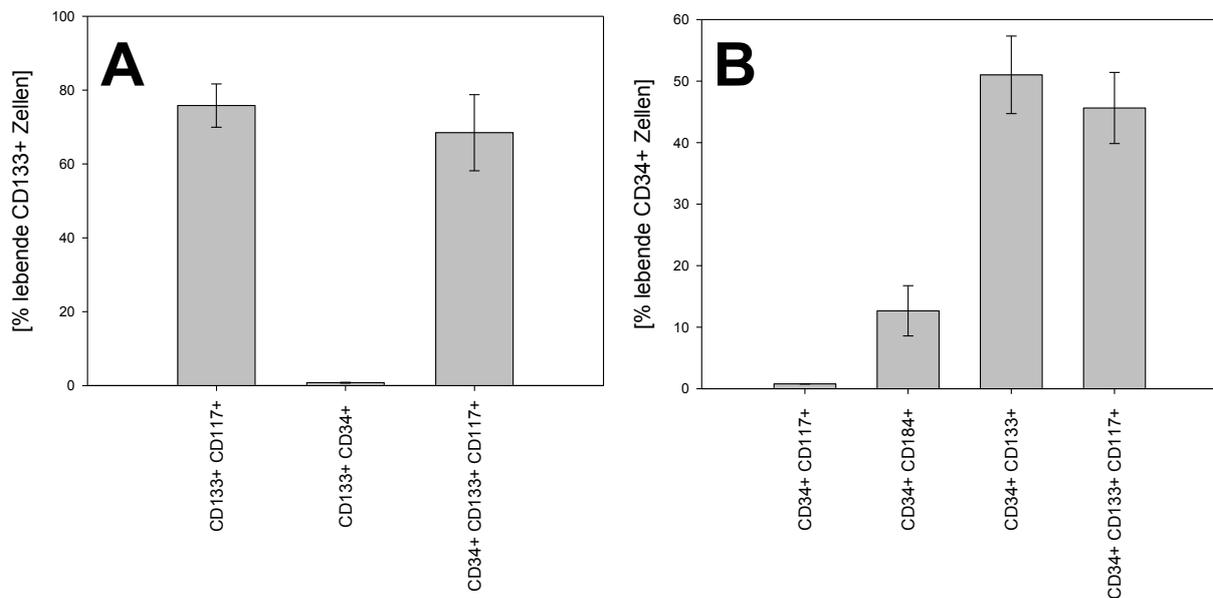
Abbildung A: CD 14+ und CD184+ Zellen - Abbildung B: CD 117+, CD133+ und CD34+ Zellen
 $n \geq 4$; * $p < 0,05$; Säulen zeigen Mittelwert \pm Standardfehler

4.2.5 Migration versch. Zellpopulationen zu SDF-1 oder der Kombination aus SDF-1/ATP – Vgl. der Subpopulationen

Im vorangehenden Teil der Ergebnisse wurden die Zellpopulationen betrachtet, die sich durch einzelne (Stammzell-)Marker definieren lassen.

Zunächst wurden Subpopulationen der frisch isolierten BM-TNCs dargestellt (Vgl. Abbildung 22).

Um Veränderungen durch Kultivierung in Medium während der Dauer der Migrationsversuche zu erfassen, wurden die BM-TNCs außerdem für 24 Stunden mit Medium inkubiert, angefärbt und analysiert. Es konnten keine Veränderungen durch die Inkubation festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).



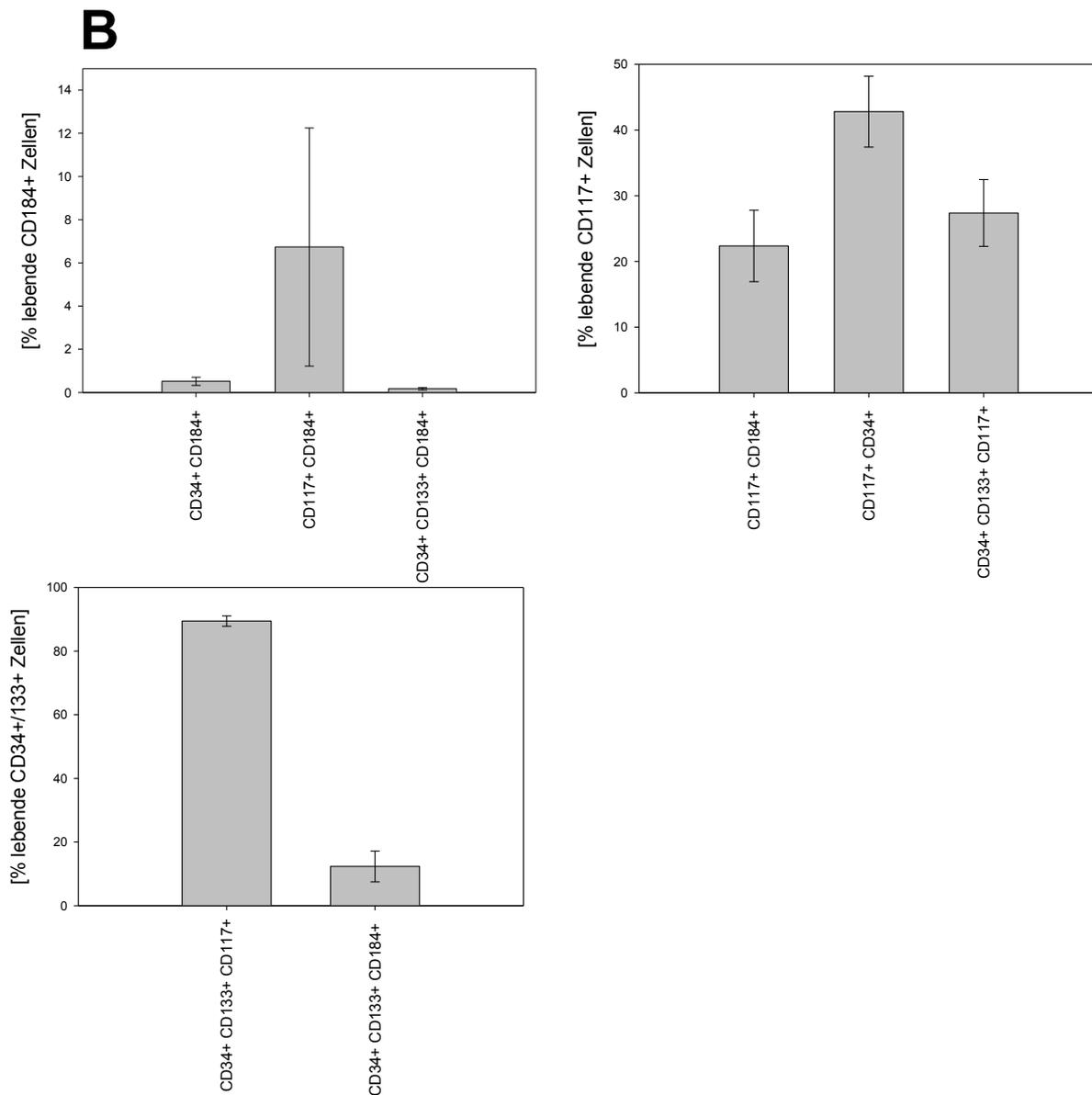


Abb. 22 – Markerverteilung Subpopulationen der frisch isolierten BM-TNCs

Frisch isolierte Knochenmarkszellen wurden mittels durchflusszytometrischer Analyse nach Mehrfachfärbung bezüglich ihrer verschiedenen Markerexpressionen untersucht. Die jeweilige Kombination der Marker ist in Bezug auf eine Zellpopulation dargestellt. Die Diagramme zeigen Mittelwerte mit Standardfehler aller verwendeten BM-TNC Proben.

Abbildung A: CD133+ Zellpopulation, Abbildung B: CD34+ Zellpopulation, C: CD184+ Zellpopulation, Abbildung D: CD117+ Zellpopulation, E: CD34/133+ Zellpopulation

Abbildung 23 zeigt die Expression verschiedener Markerkombinationen auf migrierten Zellen, bezogen auf alle viablen Zellen. Die Darstellung zeigt Subpopulationen, die nach Migration zu SDF-1 bzw. SDF-1/ATP im Vergleich zur Migrationskontrolle signifikant erhöht waren. Die vollständige Auswertung ist im Anhang dargestellt.

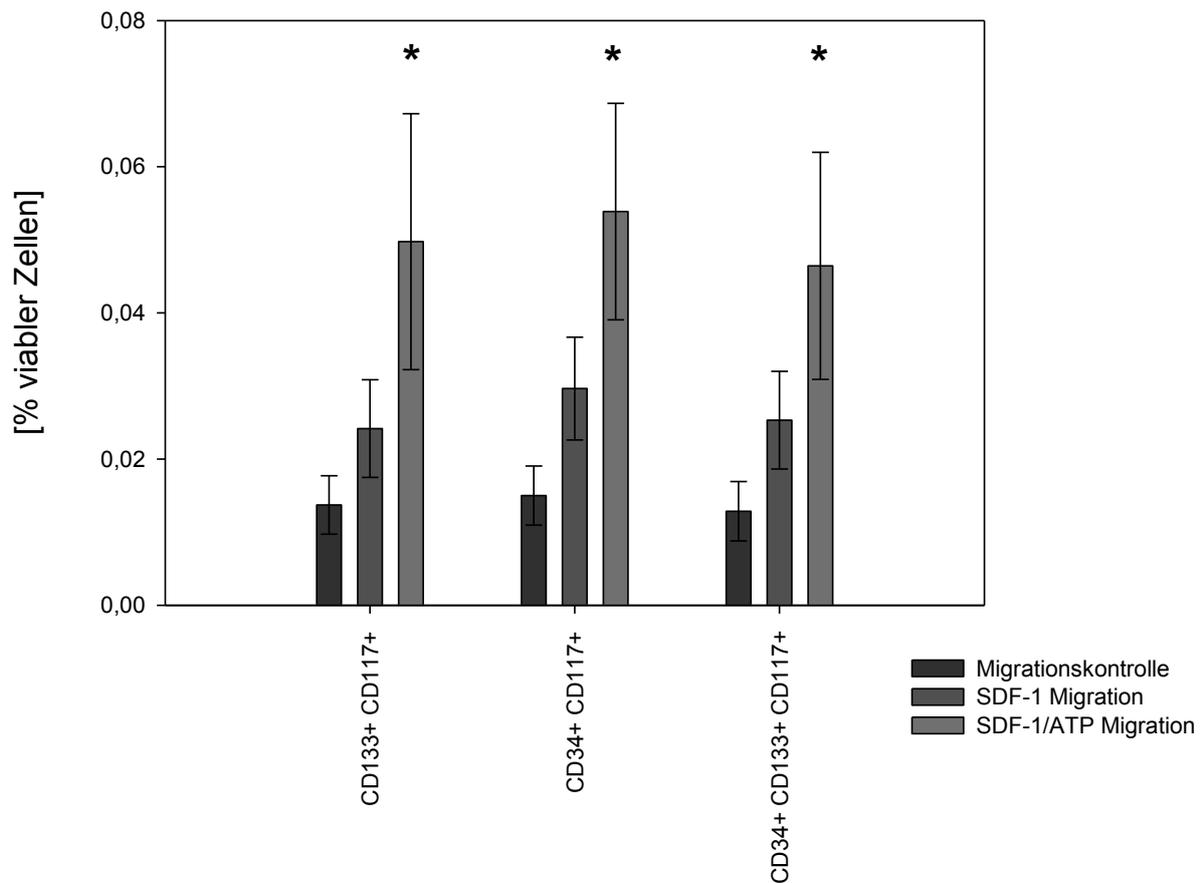


Abb. 23 – Migration von Subpopulationen der Knochenmarkzellen zu SDF-1 bzw. SDF-1/ATP bezogen auf alle viablen Zellen

Die Abbildung zeigt eine signifikante Zunahme der CD133+/CD117+, CD34+/CD117+, sowie CD34+/CD133+/CD117+ Subpopulationen nach Migration zu SDF-1/ATP.

n≥4; **p*<0,05; Säulen zeigen Mittelwert ± Standardfehler

Im Folgenden sollen die Subpopulationen CD184-positiver Zellen näher betrachtet werden. Wie im vorhergegangenen Teil für CD 184+ Zellen dargestellt (Vgl. Abb. 19), kam es durch CXCL12 (SDF-1) zu einer Abnahme der CD184+ Zellen. Um einschätzen zu können, ob diese Abnahme auf dem Mechanismus der Rezeptorinternalisierung von CXCR4 durch den Kontakt mit CXCL12 beruht, wurde wiederum die Analyse von Inkubationskontrollen herangezogen.

In der durchflusszytometrischen Analyse der migrierten Zellen zeigte sich bei der Migration gegen die Kombination SDF-1 100 ng/ml mit ATP 100 µM eine signifikante (*p*<0,001) Zunahme der Migration für die CD117+ Subpopulationen der CD184+

Zellen. Die Subpopulation, die den Stammzellmarker CD34+ koexprimierte, nahm ebenfalls zu, dieser Effekt stellte sich aber als nicht signifikant heraus.

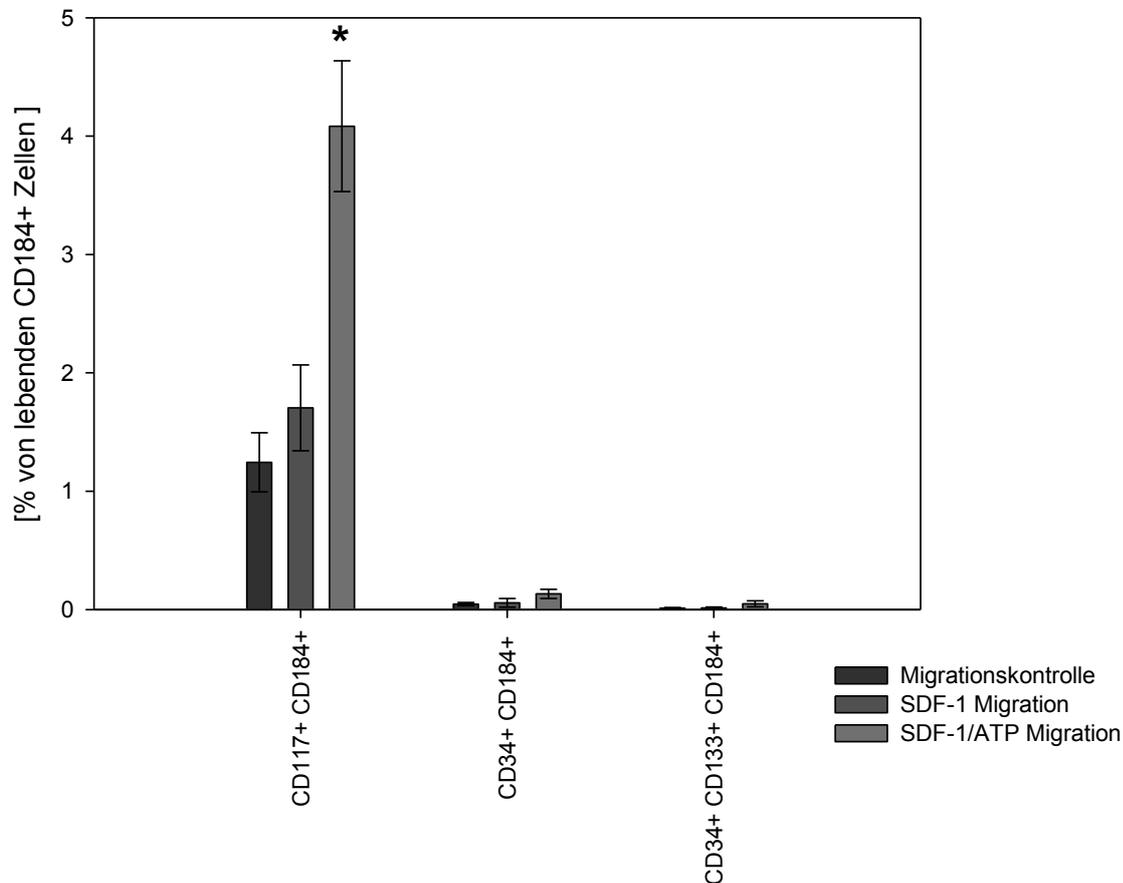


Abb. 24 – Migration zu Medium / SDF-1 / SDF-1/ATP: Subpopulationen der CD184+ Zellen

Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen nach 24-stündiger Migration in der Boyden Kammer zeigte bei der Migration gegen die Kombination SDF-1 100 ng/ml in Kombination mit ATP 100 μ M eine signifikante ($p < 0,001$) Zunahme der Migration für CD117+/CD184+ Zellen bezogen auf lebende CD184+ Zellen im Vergleich zur Migrationskontrolle.

n \geq 4; * $p < 0,05$; Säulen zeigen Mittelwert \pm Standardfehler

Es zeigte sich, dass der Anteil der CD117+ Population innerhalb der CD184+ Zellen nach Inkubation mit SDF-1 bzw. mit SDF-1/ATP in Kombination anstieg, die Zunahme war jedoch nicht signifikant. Entsprechendes konnte für CD34+/CD184+, sowie CD34+/CD133+/CD184+ Zellen beobachtet werden.

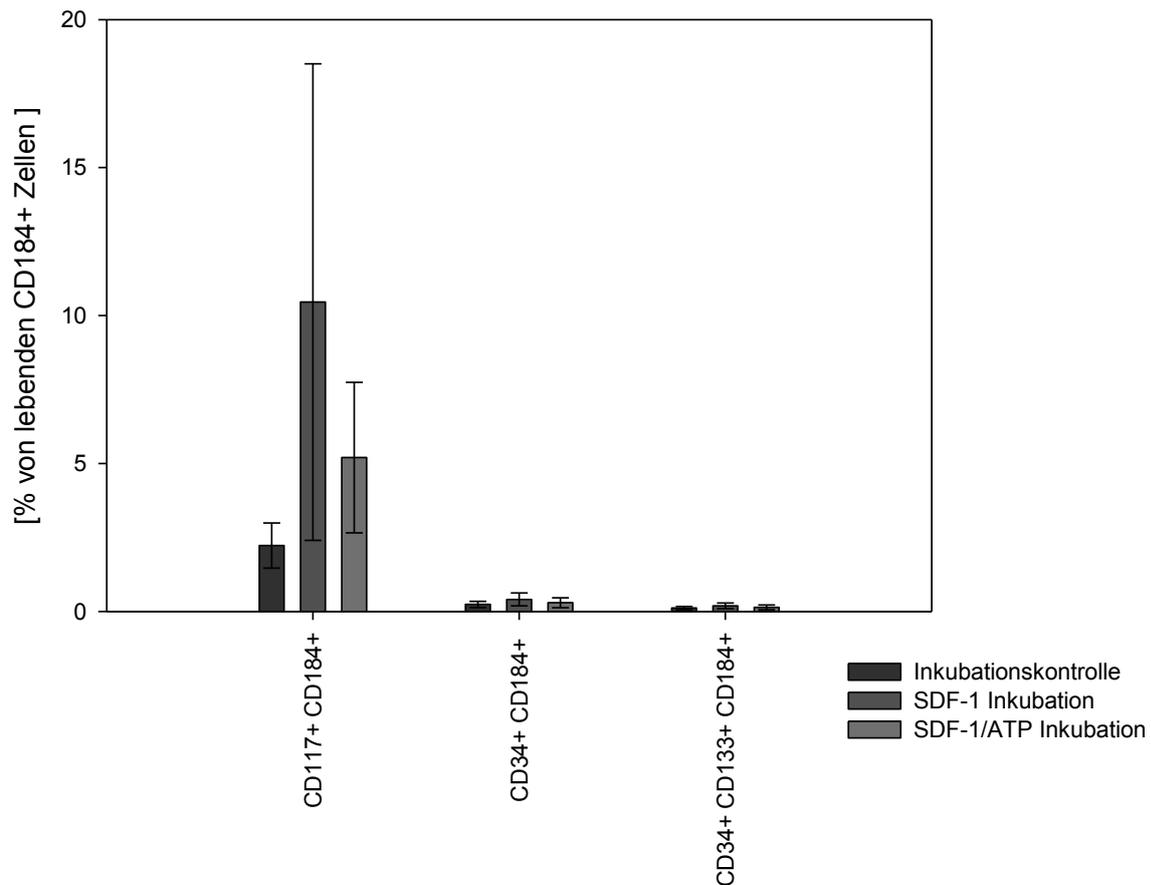


Abb. 25 – Inkubation mit Medium / SDF-1 / SDF-1/ATP: Subpopulationen der CD184+ Zellen

Durch Inkubation mit SDF-1 oder SDF-1/ATP erhöhte sich der Anteil der CD117-exprimierenden Zellen an der CD184+ Population, der Effekt war jedoch nicht signifikant.

n≥4; **p*<0,05; Säulen zeigen Mittelwert ± Standardfehler

Um zu prüfen, ob sich die Subpopulationen der CD184+ Zellen bereits durch spontane Migration verändern, wie es für die Stammzellpopulation gezeigt wurde (Vgl. Abb. 17), wurde die Migrationskontrolle im Vergleich zur Inkubationskontrolle analysiert (s. Abb. 26). Für die im Diagramm dargestellte CD34+ Population der CD184+ Zellen konnte eine signifikante Veränderung durch spontane Migration gezeigt werden, ebenfalls für die CD34+/CD133+ Population der CD184+.

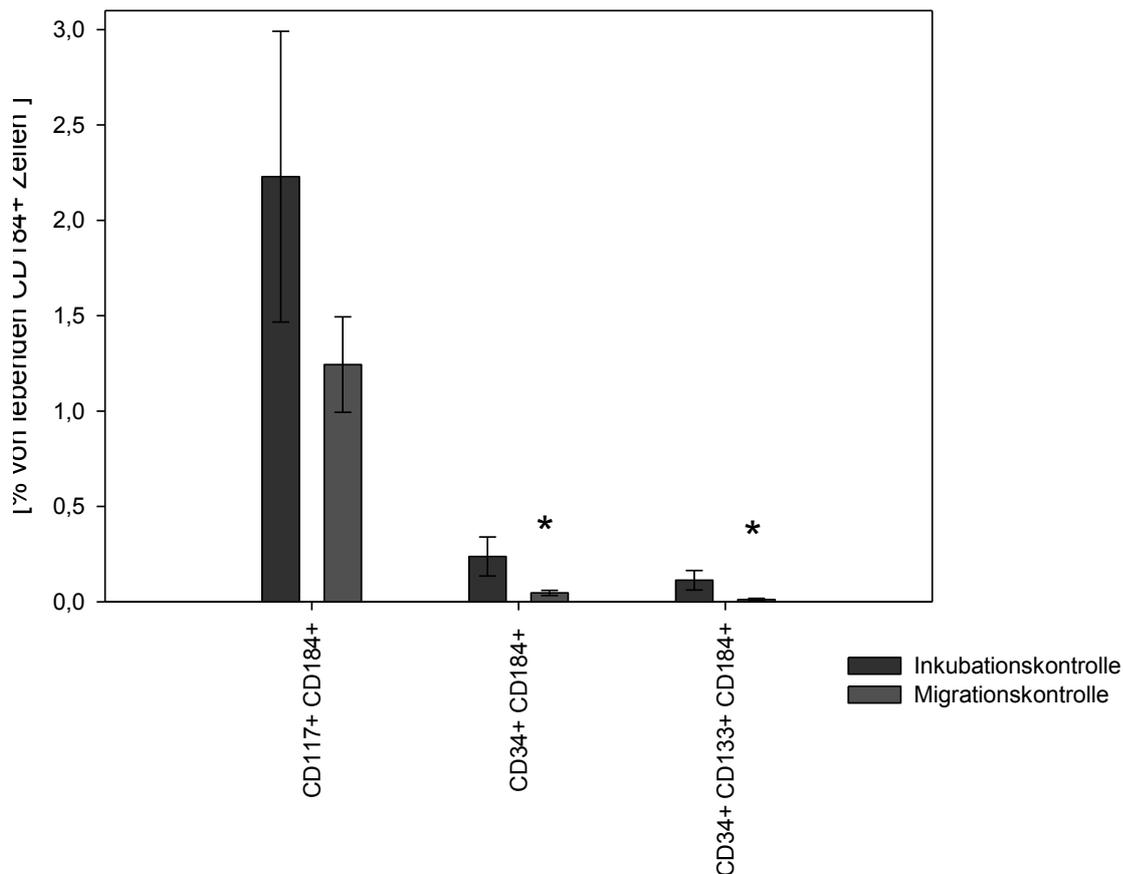


Abb. 26 – Subpopulationen der CD184+ Zellen nach Inkubation und Migration

Das Diagramm zeigt die Inkubationskontrolle und Migrationskontrolle von isolierten BM-TNCs mit Medium. Für CD34+/CD184+ Zellen konnte eine signifikant geringere ($p=0,015$) Migration im Vergleich zur Inkubation von isolierten Knochenmarkstammzellen gezeigt werden. Ebenfalls zeigte sich für CD34+/CD133+/CD184+ Zellen eine signifikante ($p=0,007$) Abweichung zwischen der Inkubation und Migration.

$n \geq 4$; * $p < 0,05$; Säulen zeigen Mittelwert \pm Standardfehler

Für aus dem Knochenmark isolierte Zellen, die CD133 als Oberflächenmarker auf ihrer Zelloberfläche trugen, konnte im vorausgegangenen Teil der Ergebnisse (Vgl. Abb. 8) eine Zunahme der Migration durch einen SDF-1 bzw. SDF-1/ATP Gradienten nachgewiesen werden. Das folgende Diagramm (Abb. 27) zeigt Subpopulationen der CD133+ Fraktion innerhalb der BM-TNCs. Nach Migration gegen einen SDF-1 bzw. SDF-1/ATP Gradienten nahm der Anteil an CD133+/CD117+ Zellen an migrierten CD133+ Zellen im Vergleich zur Migrationskontrolle tendenziell zu ($43,05 \pm 7,80\%$ vs. $47,63 \pm 6,15\%$ vs. $64,29 \pm 7,42\%$). Diese Zunahme war allerdings nicht signifikant. Es trat keine weitere Verschiebung der Subpopulationen auf.

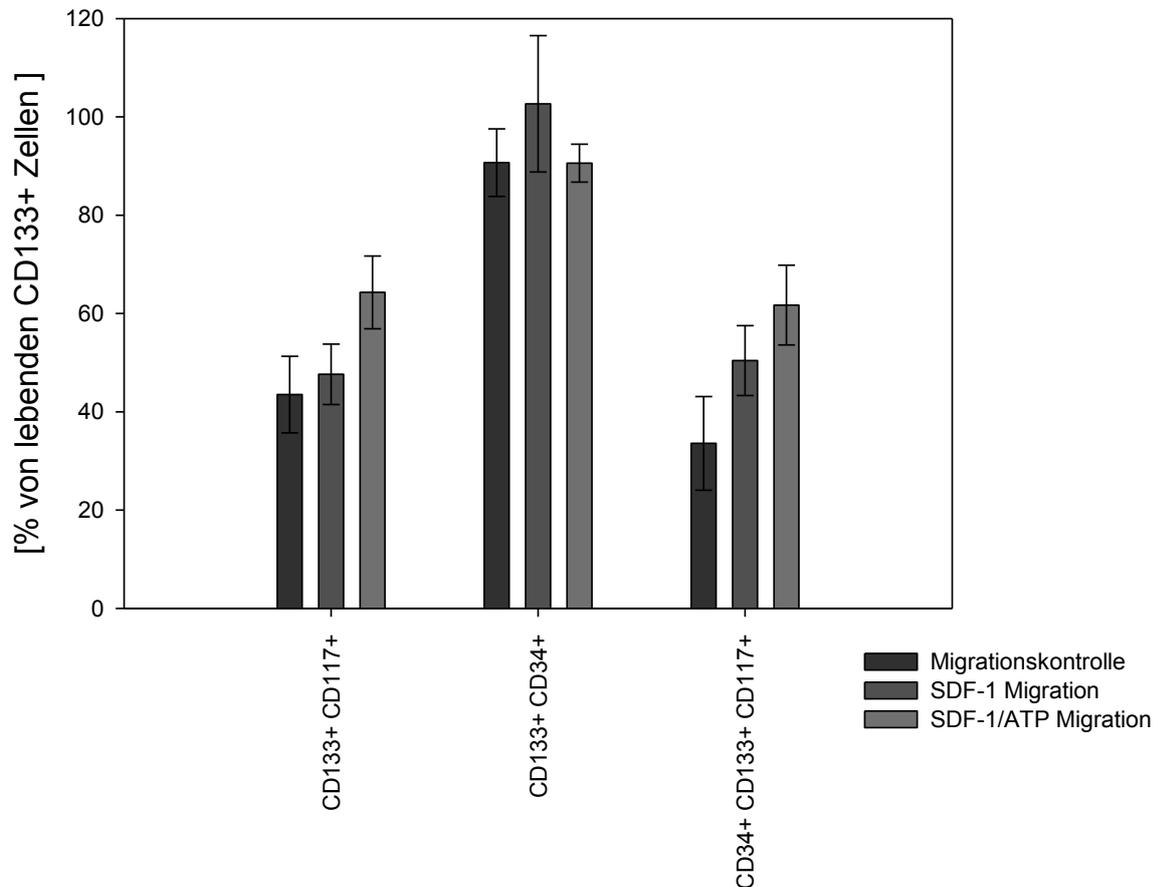


Abb. 27 – Subpopulationen migrierter CD133+ innerhalb der BM-TNCs

Für BM-TNCs, die 24 Stunden zu SDF-1 100 ng/ml und ATP 100 μ M migrierten, nahm die CD133+/CD117+ Subpopulation der CD133+ Zellen im Vergleich zur Migrationskontrolle ($43,05 \pm 7,80\%$ vs. $47,63 \pm 6,15\%$ vs. $64,29 \pm 7,42\%$) zu. Der Effekt erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau. Durch SDF-1 bzw. SDF-1 und ATP in Kombination veränderte sich die CD133+/CD34+ bzw. CD133+/CD34+/CD117+ Subpopulationen nicht.

n≥4; **p*<0,05; Säulen zeigen Mittelwert \pm Standardfehler

Die folgende Abbildung (Abb. 28) zeigt Subpopulationen der CD34+ Stammzellfraktion der isolierten BM-TNCs. Für die CD117+ Subpopulation kam es zu einer nicht signifikanten Zunahme der Migration durch die SDF-1/ATP Kombination im Vergleich zur Migrationskontrolle. Der Anteil von CD133+ Zellen an den CD34+ Zellen blieb nach Migration zu SDF-1 oder SDF-1/ATP unverändert, ebenso wie die CD133+/CD117+ Subpopulation.

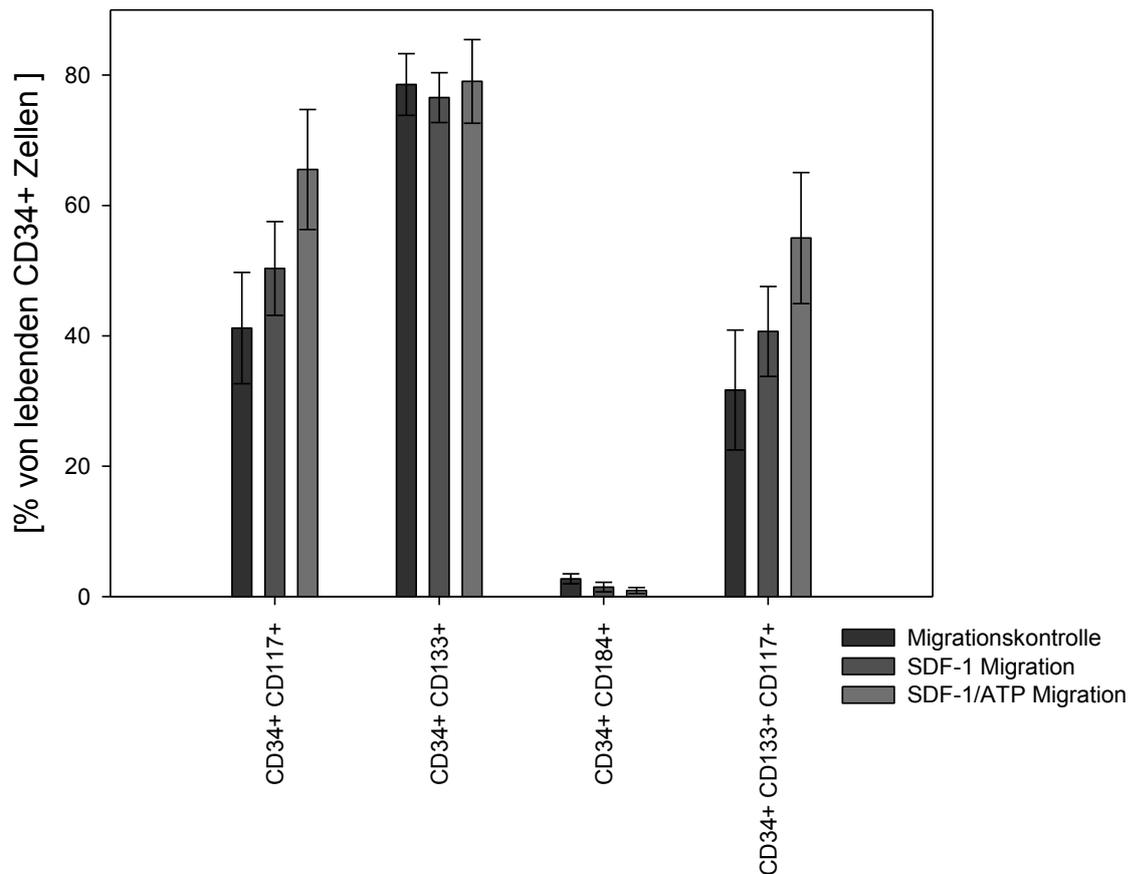


Abb. 28 – Subpopulationen migrierter CD34+ Zellen innerhalb der BM-TNCs

SDF-1 100 ng/ml und ATP 100 μ M führte zu einer tendenziellen Zunahme der CD34+/CD117+ Zellen, bezogen auf alle lebenden CD34+ Zellen im Vergleich zur Migrationskontrolle ($41,19 \pm 8,53$ % vs. $50,33 \pm 7,19$ % vs. $65,52 \pm 9,21$ %). Der Effekt war jedoch nicht signifikant. CD34+CD/133+ Zellen zeigten keine Veränderung durch einen Gradienten aus SDF-1 und ATP.

n≥4; **p*<0,05; Säulen zeigen Mittelwert \pm Standardfehler

Abschließend wurden Subpopulationen der CD117+ Zellen aus den isolierten BM-TNCs beurteilt (Vgl. Abb. 29).

Die untersuchten Subpopulationen wurden durch Migration zu SDF-1 oder SDF-1/ATP nicht beeinflusst.

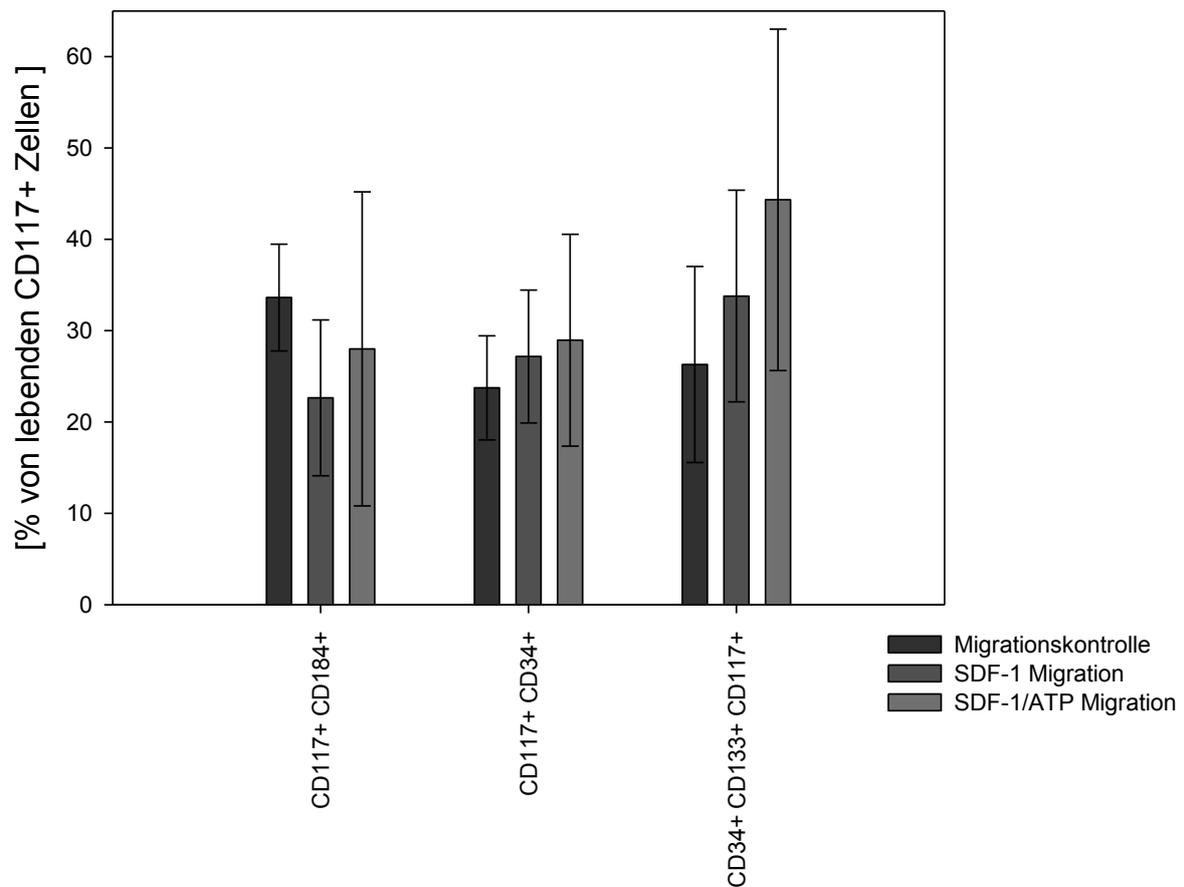


Abb. 29 – Subpopulationen migrierter CD117+ Zellen innerhalb der BM-TNCs

Nach Migration zu SDF-1 (100 ng/ml) bzw. SDF-1 (100 ng/ml) und ATP (100 μ M) für 24 Stunden im Vergleich zur Migrationskontrolle zeigten sich keine Veränderungen in der Verteilung der Subpopulationen von CD117+ Zellen.

n≥4; **p*<0,05; Säulen zeigen Mittelwert \pm Standardfehler

5. Diskussion

Die vorliegende wissenschaftliche Arbeit beschäftigte sich mit der Migration von isolierten CD133+ Stammzellen, sowie von verschiedenen Knochenmarkszellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die *in vitro* Charakterisierung der Migration von Zellpopulationen aus humanem Knochenmark. Es wurde in den durchgeführten Versuchen das Ausmaß der Migration zu SDF-1, ATP in unterschiedlichen Konzentrationen, sowie zu einer Kombination aus SDF-1 und ATP untersucht. Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurden aus BM-TNCs migrierte Zellen bezüglich exprimierter Oberflächenproteine charakterisiert, die entweder Stammzellmarker oder für die Stammzellfunktion relevante Rezeptoren darstellen. Zur Kontrolle wurde der Einfluss einer Inkubation der BM-TNCs mit SDF-1 und ATP ebenfalls untersucht.

In den durchgeführten Versuchen zeigte sich für isolierte CD133+ Zellen für ATP und SDF-1 eine signifikante Verstärkung der Migration im Vergleich zur Kontrolle.

Eine Vorbehandlung („Priming“) von CD133+ Zellen mit ATP hatte keine signifikante Wirkung.

Eine Toxizität von ATP gegenüber den Zellen und Veränderungen in der Proliferation der Zellen konnten ausgeschlossen werden.

Für isolierte BM-TNCs konnte eine signifikante Zunahme der Migration durch SDF-1 und ATP in Kombination gezeigt werden. SDF-1 allein bewirkte eine knapp nicht signifikante Zunahme der Gesamtzahl migrierter Zellen.

Nach spontaner Migration (in Abwesenheit von SDF-1 und ATP) wiesen BM-TNCs einen signifikant geringeren Anteil an CD133+, CD34+, CD117+, sowie CD184+ Zellen auf, als das frisch isolierte Zellprodukt oder eine mit Medium inkubierte Kontrolle. Zu SDF-1 oder einer Kombination von SDF-1 und ATP migrierte Zellen trugen dagegen mehr Stammzellmarker als spontan migrierte Zellen, jedoch erreichte dieser Trend nur für Subpopulationen, die mehrere Stammzellmarker trugen, das Signifikanzniveau (CD133+ CD117+, CD34+ CD117+, CD34+ CD133+CD117+ Zellen).

CD184+ Zellen waren in der zu SDF-1 migrierten Zellpopulation nicht häufiger vertreten als bei spontan migrierten Zellen. Die Analyse von Proben, die mit und ohne SDF-1 inkubiert worden waren, wies eine Reduktion von CD184 auf der Zelloberfläche bei Kontakt zu SDF-1 nach. Eine Downregulation dieses Rezeptors durch seinen Liganden SDF-1 wurde bereits gezeigt und könnte diesem Effekt zugrunde liegen (174).

Therapiekonzepte für die Regeneration bei chronischer Herzinsuffizienz oder nach einem Herzinfarkt verfolgen das Ziel der therapeutischen Applikation von Stammzellen aus humanem Knochenmark (176).

Die umfangreichsten Erfahrungen im Bereich der Implantation von Zellprodukten in das geschädigte Myokard liegen derzeit für mononukleäre Knochenmarkszellen vor. Sie bieten neben der einfachen Gewinnung ohne Expansion außerhalb des Körpers, sowie der ethischen Unbedenklichkeit (autologe Nutzung) auch den Vorteil eines geringen Nebenwirkungsprofils (177). Eine Beeinflussung der Migration von mononukleären Knochenmarkszellen konnte durch Seeger *et al.* gezeigt werden (178).

Über die Selektivität der Migration von Subpopulationen eines Zellgemisches aus humanem Knochenmark ist derzeit wenig bekannt. Die vorliegende Arbeit stellt nach unserem Wissen die erste *in vitro* Untersuchung des Migrationsverhaltens verschiedener Subpopulationen eines isolierten Zellprodukts zu SDF-1 bzw. SDF-1/ATP dar.

Die gezeigte signifikante Steigerung der Migration der Zellen durch die Kombination aus SDF-1 und ATP steht im Einklang mit den Arbeiten von Ratajczak *et al.* und Abbot *et al.*, die die Abhängigkeit der Migration von Stammzellen zu SDF-1 von weiteren Faktoren postulieren (138,179).

Rossi *et al.* konnte eine Beteiligung extrazellulärer Nukleotide wie ATP und UTP an der SDF-1 abhängigen Migration von hämatopoetischen Stammzellen zeigen (18). Abbot *et al.* beschrieb ebenfalls in seiner 2004 veröffentlichten Arbeit, dass neben SDF-1 weitere Faktoren notwendig sind, um eine Migration von Stammzellen in geschädigtes ischämisches Myokard zu erreichen (138).

Die in den Migrationsversuchen verwendeten BM-TNCs beinhalteten verschiedene Populationen hämatopoetischer Stammzellen, wie anhand der durchflusszytometrischen Analyse der Stammzellmarker CD34, CD133 und CD117, sowie des Zytokinrezeptors CD184 deutlich wurde.

Für hämatopoetische Stammzellen ist das CD34-Antigen das diagnostisch wichtigste Oberflächenprotein (2). Krause *et al.* beschreibt den Anteil von CD34+ Zellen im humanen Knochenmark mit 1,5% (83). Auch De Wynter *et al.* beschreibt für CD34+ Zellen im Knochenmark ähnliche Zahlen (84). Die verwendeten Knochenmarkproben enthielten im Vergleich weniger CD34+ Zellen. Auch für CD133+ Zellen lagen die Zellzahlen im Vergleich zu De Wynter *et al.* niedriger. Sowohl bei de Wynter *et al.* (84), als auch in der vorliegenden Arbeit wurden durchflusszytometrische Analysen der Zellen basierend auf dem ISHAGE Protokoll durchgeführt. Somit kann die unterschiedliche Zellzahl der CD34+ bzw. CD133+ Zellen nicht aufgrund von unterschiedlichen Analyseverfahren erklärt werden.

Ein möglicher Grund für die Unterschiede könnte jedoch, neben patientenspezifischen Faktoren, der unterschiedliche Entnahmeort der Knochenmarkprobe sein. De Wynter *et al.* verwendete Knochenmarkproben aus dem Beckenkamm (84). Die Proben für diese Arbeit wurden aus dem Sternum entnommen.

Zur Charakterisierung der *in vitro* Migration wurde in den durchgeführten Versuchen die Boyden Kammer verwendet. Dabei wurde ein Zeitraum von 16 bzw. 24 Stunden für die Inkubation in der Boyden Kammer gewählt. Im Vergleich beschreibt Rossi *et al.* in seiner Veröffentlichung eine deutlich kürzere Inkubationszeit von vier Stunden (18). Brehm *et al.* verwendete ebenfalls eine Inkubationszeit von 24 Stunden (180). Kurze Inkubationszeiten von 4-5 Stunden, wie von Rossi *et al.* angewandt, ermöglichen eine Verminderung von Störfaktoren. So kann zum Beispiel eine mögliche Proliferation der Zellen die Migration beeinflussen. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit, in denen BM-TNCs zum Einsatz kamen, wurde ein Medium ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren verwendet, so dass Einflüsse von Zellproliferation nicht zu erwarten waren. Frisch isolierte CD133+ Zellen aus dem Knochenmark benötigten im verwendeten CFU-EC mehrere Wochen für die

Proliferation und Differenzierung (173). So ist auch hier nicht von erheblichen Einflüssen möglicher Zellproliferation innerhalb von 16 Stunden auszugehen.

In der Boyden Kammer kommt es innerhalb von Stunden zu einem Ausgleich des chemischen Gradienten zwischen der oberen und unteren Kammer. Längere Inkubationszeiten von 16-24 Stunden, wie in den durchgeführten Versuchen angewandt, ermöglichen es, auch Zellen zu erfassen, deren Migration durch langsamere Aktivierung von Migrationsmechanismen oder langsames Durchwandern der Membranpore bis zur Membranunterseite verzögert abgeschlossen wird.

Neben der Inkubationszeit haben auch weitere Faktoren Einfluss auf die Migration der Zellen. So ist diese unter anderem von der Zelldichte und auch von der Größe der Poren der Boyden Kammer abhängig (181). Angelehnt an das von Kaminski *et al.* verwendete Protokoll wurde eine Porengröße von 3,0 μm gewählt (182), eine im Vergleich kleine Porengröße. Rossi *et al.* verwendete in seinen Versuchen eine Porengröße von 5,0 μm (18). Stein *et. al.* konnte für die Chemotaxis neutrophiler Zellen zeigen, dass die Porengröße einen Einfluss auf die Anzahl der migrierten Zellen hat (183). Für die verwendeten neutrophilen Zellen fand eine verringerte Migration bei einer Porengröße von 8,0 μm statt. Basierend auf seinen Ergebnissen kam er zum Schluss, dass auch mechanische Einflüsse wie Zellgröße und Porengröße die Zellmigration beeinflussen (183).

Beim Vergleich der frischen BM-TNCs mit der Migrationskontrolle (Zellprodukt in Boyden Kammer gegen Medium allein migriert) fiel auf, dass spontan migrierte viable Zellen signifikant weniger Stammzellmarker trugen als das Ausgangsmaterial. Der Monozytenmarker CD14 blieb hingegen von der spontanen Migration unbeeinflusst, was gegen unspezifischen Verlust von Membranproteinen beim Durchtritt durch die Boyden Kammer Pore spricht. Da hämatopoetische Stammzellen durch *ex vivo* Kultivierung ihre Stammzellmarker verlieren können (184), wurde zunächst überprüft, ob die Kultivierung während 24 Stunden im gewählten Medium zu einer Veränderung der Oberflächenmarker führt. Da sich Inkubationskontrollen in normalen Zellkulturplatten hinsichtlich der analysierten Stammzellmarker nicht signifikant von frisch isolierten BM-TNCs unterscheiden, konnte die Kultivierung als Ursache für den beobachteten Effekt ausgeschlossen werden. Die Fibronectinbeschichtung des Zellkulturmaterials war ebenfalls ohne Einfluss, eine spezifische Adhäsion von hämatopoetischen Stammzellen an fibronectinbeschichtete Kulturplatten fand nicht

statt. Die Verringerung des Anteils an CD34+, CD133+ und CD117+ Zellen nach spontaner Migration könnte einerseits durch geringere Chemokinese dieser Zellen bedingt sein, andererseits könnten die Marker bedingt durch Signalkaskaden des Migrationsprozesses internalisiert oder downreguliert werden. Eine Downregulation oder Internalisierung von Stammzellmarkern wie CD34, CD133 oder CD117 durch Migration wurde bislang jedoch nicht beschrieben. CD117 kann nach Bindung seines Liganden SCF (syn. Kit factor) internalisiert werden (185). CD133 bindet Cholesterole und ist somit in cholesterolreichen Membrandomänen lokalisiert. Während der Differenzierung von Stammzellen wird es durch Exozytose in Membranvesikeln freigesetzt (186). CD34 wurde nach Kontakt zu einem monoklonalen Antikörper, anti-HPCA-1, internalisiert (187). Prinzipiell ist denkbar, dass während der Migration ähnliche Prozesse ablaufen.

Eine aktuelle Studie von Shin *et al.* zeigt auf, dass hämatopoetische Stammzellen, bedingt durch unterschiedliche Lamin-Typen einen etwas weniger elastischen Zellkern besitzen als reife Leukozyten, was ihre Migration durch mikroporöse Barrieren erschwert (188). Dies steht im Einklang mit dem Befund der vorliegenden Arbeit.

Für isolierte humane CD133+ Stammzellen konnte eine signifikant erhöhte Migration durch SDF-1 *in vitro* gezeigt werden.

Peled *et al.* konnte in Versuchen die Beeinflussung der Migration von CD34+ humanen Stammzellen durch SDF-1/CXCR4 nachweisen (175). Auch Aiuti *et al.* berichtet in seiner Veröffentlichung ebenfalls von einer Zunahme der Migration von CD34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen durch SDF-1 (189).

Mittlerweile gelang es in unserer Arbeitsgruppe, unter Einbeziehung der hier gezeigten *in vitro* Daten, sowie eines *in vivo* Modells (Intravitalmikroskopie am Cremastermuskel der Maus) nachzuweisen, dass SDF-1 ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf die Migration von CD133+ humanen Stammzellen hat (190). Lehwald *et al.* beschreibt analog zu den vorliegenden Ergebnissen in seiner aktuell veröffentlichten Arbeit ebenfalls die SDF-1 vermittelte Mobilisierung von CD133+ Zellen in der Regeneration der Leber (191).

In den mit BM-TNCs durchgeführten Versuchen konnte zwar nachgewiesen werden, dass SDF-1 auf die Migration von Knochenmarkzellen tendenziell einen positiven Einfluss hat. Dieser war jedoch nicht signifikant. Die vorliegenden Daten dieser Arbeit

zeigen bei der Bestimmung der absoluten Zellzahl der migrierten Zellen eine knapp nicht signifikante Zunahme durch SDF-1. In der durchflusszytometrischen Kontrolle konnte für die Zellen, die CD117, CD133 und CD34 als Marker für hämatopoetische Stammzellen trugen, eine Zunahme der Migration durch SDF-1 gezeigt werden. Diese waren allerdings ebenfalls nicht signifikant.

Auch Seeger et. al sieht in seiner Arbeit von 2009 einen erhöhte Migration von im Knochenmark gereiften mononukleären Zellen durch eine SDF-1 Stimulation (192). Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit zeigt er allerdings die verstärkte Migration durch SDF-1 lediglich an mononukleären Zellen, die CXCR4 als Oberflächenprotein exprimieren.

Die Regulation des CXCR4 (CD184) in Bezug auf die Migration von hämatopoetischen Stammzellen ist noch nicht vollständig verstanden (148). Die Regulation der Rezeptorexpression kann durch verschiedene Stammzelloktoren, sowie durch Interleukine, insbesondere Interleukin 6, beeinflusst werden (175). Im hämatopoetischen System wird die Migration von HSCs in den Blutkreislauf durch die Wechselwirkung zwischen CXCR4 und SDF-1 (CXCL12) beeinflusst (193). CXCR4 spielt somit bei der Migration von hämatopoetischen Stammzellen eine zentrale Rolle. Auch beim Homing von hämatopoetischen Stammzellen, sowie bei der Überwindung der Knochenmark-Endothel-Schranke ist es beteiligt (148,194). Es gilt jedoch als gesichert, dass es nach der Bindung von SDF-1 (CXCL12) durch Endozytose zur Internalisierung des Rezeptors kommt (174). Allerdings scheint dies konzentrationsabhängig zu sein, da es bei geringen Konzentrationen von SDF-1 im Knochenmark zu einer Hochregulation von CXCR4 kommt (148).

Die nicht signifikant stärkere Migration der CD184+ Zellpopulation zu SDF-1 legt die Vermutung nahe, dass es bei CD184+ Zellen nach Migration durch den Kontakt mit SDF-1 zu einer Rezeptorinternalisierung und hierdurch zu einer Verringerung der CD184+ Zellpopulation kommt. Eine Verminderung der CXCR4 Expression durch die *in vitro* Kultivierung der migrierten Zellen kann anhand der Inkubationskontrolle ausgeschlossen werden.

In weiteren Versuchen mit isolierten Knochenmarkzellen konnten für CD34+ Zellen, sowie für die CD133+/CD117+, CD34+/CD117+ und CD34+/CD133+/CD117+

Subpopulationen eine signifikante Zunahme der Migration zu einer Kombination aus SDF-1 und ATP gezeigt werden.

Auch Rossi et. al. beschreibt den Einfluss von extrazellulären Nukleotiden, wie ATP und UTP, u.a. auch in Kombination mit SDF-1 auf die Migration hämatopoetischer Stammzellen. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit verwendete Rossi *et al.* in seinen Chemotaxis-Assays CD34+ Zellen aus mobilisiertem peripherem Blut. Außerdem legte er eine kürzere Inkubationszeit und eine niedrigere Konzentration von ATP zu Grunde (18). Die Ergebnisse seiner Veröffentlichung von 2007 zeigen für die Kombination aus SDF-1 und UTP eine signifikante Zunahme der Migration von CD34+ hämatopoetischer Stammzellen. Für die Kombination aus SDF-1 und ATP konnte er allerdings kein Signifikanzniveau für die Migration CD34+ hämatopoetischer Stammzellen zeigen.

Die vorliegenden Daten zur Migration von CD133/CD117, sowie CD34/CD117 und CD34/CD133/CD117 Zellen lassen weiterführende Untersuchungen zum regenerativen Potenzial dieser Population ratsam erscheinen. Da sie im Knochenmark jedoch nur in geringer Zahl auftreten, sollte eine mögliche Aufreinigung nach Expansion *in vitro* oder eine Isolation aus mobilisiertem peripherem Blut in Erwägung gezogen werden.

In der vorliegenden Arbeit migrierten isolierte CD133+ Zellen signifikant stärker zu einer Kombination aus SDF-1 und ATP, sowie zu ATP (100 µM) allein im Vergleich zur Migrationskontrolle. Auch hier zeigen die Ergebnisse von Rossi *et al.* nur eine signifikante Zunahme der Migration durch UTP, allerdings nicht für ATP (18).

Somit zeigt sich, dass die vorliegenden Ergebnisse im Widerspruch zu den Angaben in der Literatur stehen. Mögliche Gründe hierfür sind die unterschiedlich verwendeten Zellquellen. Rossi *et al.* verwendete CD34+ Zellen aus peripherem Blut im Vergleich zum hier verwendeten Knochenmark (18). Auch die unterschiedlichen Konzentrationen von ATP und die unterschiedlichen Inkubationszeiten können die differenten Ergebnisse erklären.

Mit weiteren Versuchen wiesen Rossi *et al.* durchflusszytometrisch nach, dass extrazelluläre Nukleotide wie UTP oder ATP auf die Dynamik von CXCR4 Einfluss nehmen können. Durch extrazelluläres UTP bzw. ATP kann eine Herabregulation von CXCR4 bzw. die Internalisierung des CXCR4 nach Bindung mit CXCL12 verhindert werden (18).

Gestützt auf diese von Rossi *et al.* postulierte Annahme, wurde in den durchgeführten Versuchen der Einfluss einer „ATP-Präkonditionierung“ auf CD133+ Zellen und anschließender Migration gegen einen SDF-1 Gradienten getestet.

Die erzielten Ergebnisse zeigen eine moderate, nicht signifikante Zunahme der Migration von CD133+ Zellen nach einer „ATP-Präkonditionierung“.

Rossi *et al.* zeigte für das Nukleotid UTP an CD34+ Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine signifikant erhöhte Empfindlichkeit gegenüber einem SDF-1 Gradienten nach einer einstündigen Präkonditionierung. Eine Präinkubation mit ATP mit anschließender Migration gegen einen SDF-1 Gradienten wie in der vorliegenden Arbeit wurde nicht getestet.

Somit konnte die von Rossi *et al.* gezeigte „ATP-Präkonditionierung“ für CD133+ Zellen mit den durchgeführten Versuchen nicht festgestellt werden. Die Ursachen hierfür liegen möglicherweise auch im Unterschied der verwendeten Zellen bzw. in der im Vergleich kurzen, einstündigen Präkonditionierung der Zellen.

Für die BM-TNCs wurde aufgrund der geringen Haltbarkeit des Produkts keine „ATP-Präkonditionierung“ durchgeführt.

Die durchflusszytometrische Analyse der migrierten BM-TNCs zeigte für die Zellpopulationen, die die Marker CD14, CD184, CD117 oder CD133 trugen, keine signifikante Veränderung durch SDF-1 bzw. der Kombination aus SDF-1 und ATP. Für die CD34+ Zellpopulation der isolierten Zellen konnte allerdings für die Kombination aus SDF-1 und ATP eine signifikante Zunahme gezeigt werden.

Die SDF-1 und ATP abhängige Migration von Subpopulationen, die verschiedene Stammzellmarker tragen, wurde nach unserem Kenntnisstand erstmals untersucht.

Basierend auf den dargestellten Ergebnissen stellt sich die Frage, warum Zellpopulationen, die CD133 oder CD117 allein trugen, keine signifikante Veränderung der Migration durch SDF-1 bzw. der Kombination aus SDF-1 und ATP zeigten, hingegen Subpopulationen wie CD133/CD117, signifikant zu SDF-1/ATP-migrierten. Eine mögliche Erklärung wäre die genauere Identifizierung von Stammzellen in der durchflusszytometrischen Analyse, die mehrere Stammzellmarker auf ihrer Zelloberfläche tragen. Da für alle untersuchten Stammzellpopulationen ein seit Jahren in der durchflusszytometrischen Analyse erprobtes und standardisiertes Auswerteschema, entsprechend dem ISHAGE

Gatingverfahren für CD34+ Zellen, angewandt wurde, scheint dies wenig wahrscheinlich (195). Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass Subpopulationen, die verschiedene Markerkombination tragen, funktionelle Unterschiede zu den übrigen Stammzellen aufweisen. So lassen sich CD34+ Stammzellen mit Hilfe weiterer spezifischer Membranantigene in ihrem Entwicklungsstadium und ihrer Entwicklungsrichtung charakterisieren (85,86). CD34+ Zellen können entsprechend ihrem Entwicklungsstadium auch CD133 und CD117 exprimieren (87). Während CD34 auch auf granulozytären und monozytären Vorläuferzellen exprimiert wird (196), tragen nur primitivere Stammzellen zusätzlich CD133. Bissels *et al.* charakterisierte durch die Analyse der zellulären miRNA, sowie Genexpression von CD34+CD133+ im Vergleich zu CD34+CD133- Stammzellen subpopulationsspezifisch verschiedene Entwicklungsstadien der Zellen (197).

Die Ergebnisse zeigten ein unterschiedliches Migrationsverhalten von unreiferen Stammzellen im Vergleich zu reifen Stammzellen. Basierend hierauf wäre denkbar, dass unreife Stammzellen insbesondere an der Regeneration von geschädigtem Myokard beteiligt sind. Weitere Versuche mit entsprechenden unreifen Zellen, charakterisiert durch die jeweiligen Oberflächenproteine, wären nötig.

Innerhalb der CD184+ Zellen nahm die CD117+ Subpopulation nach Migration zu einem SDF-1/ATP Gradienten signifikant zu. Die CD34+ Subpopulation war nicht signifikant verändert. Denkbar ist, dass die Kombination SDF-1/ATP einen spezifischen migratorischen Reiz für CD117+ Zellen darstellt; möglicherweise hemmt CD117 aber auch die Rezeptorinternalisierung von CD184 in Anwesenheit von SDF-1. Wojakowski *et al.* beschreibt eine Mobilisierung der CD117+ CD184+ Subpopulation im Rahmen eines Myokardinfarktes, die unter anderem von SDF-1 beeinflusst wird (198). Auch Brzoska *et al.* berichtet in ihrer Veröffentlichung von 2012 über die positive Auswirkung von SDF-1 auf die Mobilisierung von CXCR4/CD34+ nicht-muskulären Stammzellen und Myoblasten (199). Stammzellpopulationen, die CD184 tragen, sind offenkundig von hohem therapeutischem Interesse.

Das Ausmaß der Migration von CD117+ CD184+ Zellen zu SDF-1/ATP kann an isolierten humanen CD117+ Zellen weiter charakterisiert werden. Diese wären auch einer Präkonditionierung mit ATP besser zugänglich als das Zellgemisch der BM-TNCs, das neben Stammzellen Granulozyten und Erythrozyten enthält, die durch

Degradation die Zellen negativ beeinflussen können (200). Werden die frisch isolierten BM-TNCs direkt nach der Isolation angewandt, kann es von Vorteil sein, bei geringem Zellverlust hohe Zahlen frischer, autologer humaner Zellen zur kardialen Transplantation verfügbar zu machen. Die vorliegenden Daten belegen, dass BM-TNCs mehrere Stammzellpopulationen enthalten, die von SDF-1 und ATP angeregt selektiv in ischämisches Gewebe einwandern können.

Die signifikante Zunahme der Migration von Knochenmarkzellen bzw. CD133+ Zellen zu ATP, insbesondere in Kombination mit SDF-1, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Auch der Einfluss einer „ATP-Präkonditionierung“ wurde untersucht. Basierend auf den Ergebnissen stellt sich die Frage nach einem möglichen klinischen Einsatz von ATP in der Vorbehandlung von isolierten Zellen zur kardialen Transplantation. Lemoli *et al.* sieht physiologisch niedrige Konzentrationen von Nukleotiden als stimulierend auf hämatopoetische Zellen an und beschreibt eine Stimulation der Koloniebildung durch extrazelluläres ATP (157). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass extrazelluläres ATP in einer Konzentration von 100 μM keine schädigende Wirkung auf CD133+ Zellen hat und ihre Proliferation nicht hemmt. Eine Stimulation der Koloniebildung war nicht erkennbar. Dies könnte auf die unterschiedlichen verwendeten Konzentrationen zurückgehen oder darauf, dass der von Lemoli angewandte Assay die Bildung hämatopoetischer Kolonien zeigt, während im CFU-EC endotheliale Vorläuferzellen untersucht werden, was einen engeren Bezug zur kardialen Regeneration hat. Auch Ferrari *et al.* beschreibt in der Untersuchung von hämatopoetischen Zellen weder einen negativen Einfluss auf die Proliferation noch eine toxische Wirkung von ATP auf die Zellen (201). Insgesamt scheint die Wirkung von extrazellulärem ATP konzentrationsabhängig zu sein. Eine Konzentration zwischen 1 nM und 10 μM sieht Lemoli *et al.* als optimale Konzentration für die Stimulierung von hämatopoetische Zellen (157). Die in den hier beschriebenen Versuchen verwendeten Konzentrationen liegen zwischen für den Extrazellulärraum (10 nM) und das Zytosol (10 mM) in der Literatur genannten Werten für lebende Zellen (12). In Anbetracht der beschriebenen Erhöhung der extrazellulären ATP-Konzentration im ischämischen Myokard (11–15), erscheinen die hier verwendeten Konzentrationen plausibel, im Vergleich zu Rossi *et al.* und Lemoli *et al.* sind sie hoch (18,157). Allerdings konnte aufgrund der durchgeführten Versuche keine schädigende Wirkung von ATP 100 μM auf die isolierten Zellen

gezeigt werden. So kann man davon ausgehen, dass mit der verwendeten ATP-Konzentration bei niedriger Toxizität eine maximale Wirkung erreicht werden konnte.

Aufgrund der nicht signifikanten Migrationsverstärkung durch das Priming der CD133+ Zellen mit ATP erscheint eine klinische Nutzung dieses Verfahrens derzeit wenig sinnvoll. Basierend auf den Ergebnissen von Rossi *et al.* könnte jedoch ein Priming von Knochenmarkszellen durch das Nukleotid UTP weiter untersucht werden. Eine endgültige Aussage über den klinischen Einsatz einer solchen Vorbehandlung kann jedoch nur mit Hilfe von klinisch einsetzbaren Zellisolierungsverfahren und deren Produkte getroffen werden. Das ResQ-Zellprodukt, das mit einem geschlossenen Point-of-Care-System Res-Q™ 60 BMC aufgereinigt wird, ist dafür prinzipiell geeignet. Um eine bessere Aussage bezüglich der klinischen Nutzbarkeit zu bekommen, sollte nicht wie im Material- und Methodenteil beschrieben, mit dem MiniMACS®-System gearbeitet werden, sondern mit dem im klinischen Betrieb eingesetzten CliniMACS®-System.

Die erhobenen Daten bieten außerdem eine Grundlage für Folgeversuche, in denen der Mechanismus der Migration der Zellen unter Einfluss von ATP geklärt werden könnte. Insbesondere auch, inwieweit spezifische ATP-Rezeptoren an der Migration von CD133+ Zellen bzw. BM-TNCs beteiligt sind. Durch die mögliche Identifikation eines für die gezeigten Ergebnisse verantwortlichen Rezeptors kann ggf. unter Zuhilfenahme von Inhibitoren die zugrunde liegende intrazelluläre Signalkaskade identifiziert werden.

Die Migrationsversuche der vorliegenden Arbeit wurden mittels der Boyden Kammer als *in vitro* Versuche durchgeführt. Hierbei lagen idealisierte Bedingungen für die zu migrierende Zellen vor. Ein direkter Rückschluss auf die Verhältnisse *in vivo* ist mit den unter *in vitro* Bedingungen durchgeführten Versuchen somit nicht möglich.

Auch eine Vergleichbarkeit zwischen den isolierten CD133+ Zellen und den isolierten BM-TNCs ist aufgrund unterschiedlicher Methoden- bzw. Versuchskonstellationen nur eingeschränkt möglich. Die unterschiedliche Zellart, die abweichende Zellzahl und die unterschiedlichen Arten der Auswertung (FACS vs. mikroskopische Zählung), die in den jeweiligen Versuchen zugrunde gelegt wurden, lassen einen direkten Vergleich nicht zu.

Allerdings lässt sich erkennen, dass sowohl bei isolierten CD133+ Zellen, als auch bei der CD133+ Population der BM-TNCs eine gleichsinnige Tendenz in der Migration zu SDF-1 bzw. der Kombination von SDF-1 und ATP besteht.

6. Zusammenfassung

Im ischämischen Myokard kommt es durch Überexpression von SDF-1 zu vermehrter Rekrutierung von Stammzellen aus dem Knochenmark. Zudem werden Nukleotide wie ATP bei Myokardischämie in den Extrazellulärraum freigesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die selektive Migration von hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks zu SDF-1/ATP gezeigt. Die Daten legen die Bedeutung von Nukleotiden für die Migration von Stammzellen in das ischämisch geschädigte Gewebe nahe. Isolierte CD133+ Stammzellen migrierten *in vitro* sowohl zu SDF-1 als auch zu ATP und einer Kombination beider Faktoren. Ihre Viabilität und Koloniebildung wurden durch ATP nicht beeinträchtigt.

BM-TNCs migrierten signifikant nur zu einer Kombination aus SDF-1 und ATP. Insbesondere Subpopulationen, die CD34, CD133 und CD117 koexprimierten, wanderten verstärkt. Die gewonnenen Daten legen nahe, zukünftig die therapeutische Aktivität gerade dieser frühen Stammzellpopulationen näher zu untersuchen. CD184+ Zellen waren in der zu SDF-1 migrierten Zellpopulation vergleichbar häufig wie nach Chemokinese, obwohl für CD184 als SDF-1 Rezeptor eine entscheidende Rolle bei der Migration zu erwarten war. Mit SDF-1 direkt inkubierte Zellen zeigten eine Reduktion von CD184 auf der Zelloberfläche. Eine Downregulation dieses Rezeptors durch seinen Liganden SDF-1 wurde bereits gezeigt und kann diesem Effekt zugrunde liegen. Nach Chemokinese (in Abwesenheit von SDF-1 und ATP) wiesen BM-TNCs einen verringerten Anteil an CD133+, CD34+, CD117+, sowie CD184+ Zellen auf.

Während eine Vorbehandlung von Zellprodukten mit ATP klinisch nicht aussichtsreich scheint, sollte das Potential anderer migratorischer Faktoren wie UTP nicht aus den Augen verloren werden. Mit dem Res-Q™ 60 BMC System aufkonzentrierte BM-TNCs enthielten migratorisch aktive Stammzellpopulationen, die therapeutisches Potenzial für die kardiale Regeneration erwarten lassen. Die vorliegende Arbeit bietet damit eine eingehende Charakterisierung wirksamer Bestandteile eines klinisch einsetzbaren Zellprodukts. Die neuen Erkenntnisse zur geringeren Chemokinese von Stammzellpopulationen aus einem Zellgemisch heraus könnten zudem eine Anreicherung der Zellen ohne Zugabe weiterer Reagenzien (Antikörper, Magnetpartikel) ermöglichen.

7. Literaturverzeichnis

1. Steinhoff G. Stammzelltherapie zur Regeneration von Herzmuskelgewebe. *Der Internist*. Mai 2006;47(5):479–88.
2. Bonnet D. Biology of human bone marrow stem cells. *Clinical and Experimental Medicine*. November 2003;3(3):140–9.
3. Mizrak D, Brittan M, Alison M. CD133: molecule of the moment. *The Journal of Pathology*. Januar 2008;214(1):3–9.
4. Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, u. a. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 19. Dezember 2000;97(26):14720–5.
5. Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, Mansour S, De Bruyne B, De Bondt P, u. a. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction. *Circulation*. 2005;112(9 suppl):I–178.
6. Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, u. a. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*. 2000;95(10):3106–12.
7. Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GAJ, Guthrie SM, Mames RN, u. a. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nature medicine*. 2002;8(6):607–12.
8. Kucia M, Jankowski K, Reza R, Wysoczynski M, Bandura L, Allendorf DJ, u. a. CXCR4–SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *Journal of molecular histology*. 2004;35(3):233–45.
9. Murdoch C. CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. *Immunological reviews*. 2000;177(1):175–84.
10. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, u. a. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature Medicine*. 4. Juli 2004;10(8):858–64.
11. Williams CA, Forrester T. Possible source of adenosine triphosphate released from rat myocytes in response to hypoxia and acidosis. *Cardiovascular Research*. 1. Mai 1983;17(5):301–12.
12. Vassort G. Adenosine 5'-triphosphate: a P2-purinergic agonist in the myocardium. *Physiological reviews*. 2001;81(2):767–806.
13. Gordon JL. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J*. 15. Januar 1986;233(2):309–19.
14. Erlinge D, Harnek J, van Heusden C, Olivecrona G, Jern S, Lazarowski E. Uridine triphosphate (UTP) is released during cardiac ischemia. *International Journal of Cardiology*. April 2005;100(3):427–33.
15. Wihlborg A-K. Positive Inotropic Effects by Uridine Triphosphate (UTP) and Uridine Diphosphate (UDP) via P2Y2 and P2Y6 Receptors on Cardiomyocytes and Release of UTP in Man During Myocardial Infarction. *Circulation Research*. 14. April 2006;98(7):970–6.
16. Corriden R, Insel PA. New insights regarding the regulation of chemotaxis by nucleotides, adenosine, and their receptors. *Purinergic Signal*. September 2012;8(3):587–98.
17. Kaczmarek E, Erb L, Koziak K, Jarzyna R, Wink MR, Guckelberger O, u. a. Modulation of endothelial cell migration by extracellular nucleotides. Involvement of focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathways. *Thrombosis and haemostasis*. 2005;93(4):735.
18. Rossi L, Manfredini R, Bertolini F, Ferrari D, Fogli M, Zini R, u. a. The extracellular nucleotide UTP is a potent inducer of hematopoietic stem cell migration. *Blood*. 15. Januar 2007;109(2):533–42.

19. Shen J, DiCorleto PE. ADP Stimulates Human Endothelial Cell Migration via P2Y1 Nucleotide Receptor-Mediated Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. *Circulation Research*. 29. Februar 2008;102(4):448–56.
20. Staat & Gesellschaft - Todesursachen - Statistisches Bundesamt (Destatis) - 2010: Herz-/Kreislaufkrankungen verursachen 41 % aller Todesfälle - Statistisches Bundesamt (Destatis).
21. Hochman JS, Bulkley BH. Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study. *Circulation*. 1. Juni 1982;65(7):1446–50.
22. Drexler H. Endothelial Dysfunction in Human Disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Januar 1999;31(1):51–60.
23. Brehm M, Darrelmann E, Strauer BE. Stammzelltherapie nach akutem Myokardinfarkt. *Der Internist*. 1. August 2008;49(9):1068–78.
24. Heusch G, Schulz R. Hibernating Myocardium: A Review. In: Klein M, Schulte HD, Gams E, Herausgeber. *TMLR Management of Coronary Artery Diseases*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1998. S. 11–29.
25. Masuda H, Kalka C, Asahara T. Endothelial progenitor cells for regeneration. *Hum Cell*. Dezember 2000;13(4):153–60.
26. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, u. a. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 5. April 2001;410(6829):701–5.
27. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, u. a. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *The Lancet*. Juli 2004;364(9429):141–8.
28. Tse H-F, Yiu K-H, Lau C-P. Bone Marrow Stem Cell Therapy for Myocardial Angiogenesis. *Current Vascular Pharmacology*. 1. April 2007;5(2):103–12.
29. Anversa P, Kajstura J, Rota M, Leri A. Regenerating new heart with stem cells. *Journal of Clinical Investigation*. 2. Januar 2013;123(1):62–70.
30. Hsiao L-C, Carr C, Chang K-C, Lin S-Z, Clarke K. Stem Cell-Based Therapy for Ischemic Heart Disease. *Cell Transplantation*. 1. April 2013;22(4):663–75.
31. Donndorf P, Steinhoff G. Rolle der Stammzelltherapie in der chirurgischen Behandlung der Herzinsuffizienz. *Zeitschrift für Herz-,Thorax- und Gefäßchirurgie*. 2. Dezember 2009;23(6):331–4.
32. Kontaridis MI, Yang W, Bence KK, Cullen D, Wang B, Bodyak N, u. a. Deletion of Ptpn11 (Shp2) in Cardiomyocytes Causes Dilated Cardiomyopathy via Effects on the Extracellular Signal-Regulated Kinase/Mitogen-Activated Protein Kinase and RhoA Signaling Pathways. *Circulation*. 2008;117(11):1423–35.
33. Wang Y. Signal transduction in cardiac hypertrophy—dissecting compensatory versus pathological pathways utilizing a transgenic approach. *Current opinion in pharmacology*. 2001;1(2):134–40.
34. El Jamali A, Freund C, Rechner C, Scheidereit C, Dietz R, Bergmann MW. Reoxygenation after severe hypoxia induces cardiomyocyte hypertrophy in vitro: activation of CREB downstream of GSK3 β . *The FASEB journal*. 2004;18(10):1096–8.
35. Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *New England Journal of Medicine*. 2000;342(9):626–33.
36. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Current Opinion in Genetics & Development*. Oktober 1998;8(5):588–94.
37. Lee J-W, Bae S-H, Jeong J-W, Kim S-H, Kim K-W. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*. 29. Februar 2004;36(1):1–12.

38. Kim C-H. Early Expression of Myocardial HIF-1alpha in Response to Mechanical Stresses: Regulation by Stretch-Activated Channels and the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway. *Circulation Research*. 10. Januar 2002;90(2):25e–33.
39. Theiss HD, Franz W-M. Stammzelltherapie bei der Herzinsuffizienz. *Medizinische Klinik*. Januar 2006;101(1):77–81.
40. Kalka C, Asahara T, Krone W, Isner JM. Angiogenese und Vaskulogenese. *Herz*. 2000;25(6):611–22.
41. Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Röckl W, Waltenberger J, u. a. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(30):17629–34.
42. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, u. a. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *Journal of Clinical Investigation*. 2001;107(11):1395–402.
43. Soonpaa MH, Field LJ. Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circulation Research*. 1998;83(1):15–26.
44. Anversa P, Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature*. 10. Januar 2002;415(6868):240–3.
45. Molkenin JD, Dorn II GW. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annual review of physiology*. 2001;63(1):391–426.
46. Schächinger V, Assmus B, Zeiher AM. Die Herzfunktion wieder regenerieren?-Stammzelltherapie bei ischämischer Herzkrankheit Regeneration of Heart Funktion?-Stem Cell Therapy in Ischemic Heart Disease. *Klinikerzt*. 2004;33(3):68–73.
47. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, u. a. Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans. *Science*. 3. April 2009;324(5923):98–102.
48. Maisch B. Regeneration in der Kardiologie–Innovation oder Illusion? *Herz*. 2010;35(5):307–8.
49. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, u. a. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(18):10344–9.
50. Hattori R, Matsubara H. Therapeutic angiogenesis for severe ischemic heart diseases by autologous bone marrow cells transplantation. *Mol Cell Biochem*. September 2004;264(1-2):151–5.
51. Meyer GP, Drexler H. Role of stem- and progenitor cells in coronary artery disease. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift*. November 2004;129(46):2497–502.
52. Yoon Y, Johnson IA, Park J-S, Diaz L, Losordo DW. Therapeutic myocardial angiogenesis with vascular endothelial growth factors. *Mol Cell Biochem*. September 2004;264(1-2):63–74.
53. Schannwell C. Stammzelltherapie bei kardiovaskulären Erkrankungen. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 15. Dezember 2008;133(S 08):S274–S279.
54. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, u. a. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nature medicine*. 2001;7(4):430–6.
55. Yerebakan C, Kaminski A, Westphal B, Liebold A, Steinhoff G. Kardiale Stammzelltherapie: Die Rostocker Studien. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 20. Februar 2008;3(S1):77–82.
56. Klopsch C, Donndorf P, Kaminski A, Ma N, Steinhoff G. Zellquellen für kardiovaskuläres Tissue Engineering. *Der Chirurg*. 16. März 2011;82(4):295–302.
57. Krause K, Schneider C, Kuck K-H, Jaquet K. REVIEW: Stem Cell Therapy in Cardiovascular Disorders. *Cardiovascular Therapeutics*. Oktober 2010;28(5):e101–e110.

58. Müller-Ehmsen J. Zelltransplantation - Option bei der Therapie der Herzinsuffizienz? *Der Klinikarzt*. März 2003;32(3):107–10.
59. Menasché P. Skeletal myoblasts as a therapeutic agent. *Progress in cardiovascular diseases*. 2007;50(1):7–17.
60. Scorsin M, Hagege AA, Marotte F, Mirochnik N, Copin H, Barnoux M, u. a. Does transplantation of cardiomyocytes improve function of infarcted myocardium? *Circulation*. 4. November 1997;96(9 Suppl):II–188–193.
61. Rubart M, Field LJ. CARDIAC REGENERATION: Repopulating the Heart. *Annual Review of Physiology*. Januar 2006;68(1):29–49.
62. Chachques JC, Cattadori B, Herreros J, Prosper F, Trainini JC, Blanchard D, u. a. Treatment of Heart Failure with Autologous Skeletal Myoblasts. *Herz*. 1. November 2002;27(7):570–8.
63. Dowell J. Myocyte and myogenic stem cell transplantation in the heart. *Cardiovascular Research*. 1. Mai 2003;58(2):336–50.
64. Farahmand P, Lai TYY, Weisel RD, Fazel S, Yau T, Menasche P, u. a. Skeletal myoblasts preserve remote matrix architecture and global function when implanted early or late after coronary ligation into infarcted or remote myocardium. *Circulation*. 2008;118(14 suppl 1):S130–S137.
65. Rink L, Kruse A, Haase H. Die lymphatischen Organe: Blutbildung und Konferenzzentren. *Immunologie für Einsteiger*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2012. S. 19–37.
66. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995;11:35–71.
67. Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(6):3120.
68. Passegué E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(Suppl 1):11842.
69. Harrison DE. Effects of transplantation on the primitive immunohematopoietic stem cell. *Journal of Experimental Medicine*. 1. August 1990;172(2):431–7.
70. Kawamoto A, Gwon H-C, Iwaguro H, Yamaguchi J-I, Uchida S, Masuda H, u. a. Therapeutic Potential of Ex Vivo Expanded Endothelial Progenitor Cells for Myocardial Ischemia. *Circulation*. 6. Februar 2001;103(5):634–7.
71. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, u. a. Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells Responsible for Postnatal Vasculogenesis in Physiological and Pathological Neovascularization. *Circulation Research*. 6. August 1999;85(3):221–8.
72. Tomita S, Li R-K, Weisel RD, Mickle DAG, Kim E-J, Sakai T, u. a. Autologous Transplantation of Bone Marrow Cells Improves Damaged Heart Function. *Circulation*. 9. November 1999;100(Supplement 2):II–247–II–256.
73. Wang J-S, Shum-Tim D, Chedrawy E, Chiu RC-J. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: Pathophysiologic and therapeutic implications. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. Oktober 2001;122(4):699–705.
74. Hamano K, Nishida M, Hirata K, Mikamo A, Li T-S, Harada M, u. a. Local Implantation of Autologous Bone Marrow Cells for Therapeutic Angiogenesis in Patients With Ischemic Heart Disease. *Japanese Circulation Journal*. 2001;65(9):845–7.
75. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV, u. a. Intrakoronare, humane autologe Stammzelltransplantation zur Myokardregeneration nach Herzinfarkt. *DMW- Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 2001;126(34/35):932–8.
76. Haeckel ED. *Natürliche Schöpfungsgeschichte*. Verlag Georg Reimer, Berlin; 1868.

77. TILL JE, McCULLOCH EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* Februar 1961;14:213–22.
78. Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD, others. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest.* 2005;115(3):572–83.
79. Spangrude G, Heimfeld S, Weissman I. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science.* 1. Juli 1988;241(4861):58–62.
80. Tögel F, Lange C, Zander AR, Westenfelder C. Regenerative Medizin mit adulten Stammzellen aus dem Knochenmark. *Dtsch Arztebl.* 2007;104(23):1663–70.
81. Brown J, Greaves MF, Molgaard HV. The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *International Immunology.* 1991;3(2):175–84.
82. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, u. a. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood.* 1990;75(12):2417–26.
83. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility [see comments]. *Blood.* 1996;87(1):1–13.
84. De Wynter EA, Buck D, Hart C, Heywood R, Coutinho LH, Clayton A, u. a. CD34+ AC133+ Cells Isolated from Cord Blood are Highly Enriched in Long-Term Culture-Initiating Cells, NOD/SCID-Repopulating Cells and Dendritic Cell Progenitors. *Stem Cells.* 1998;16(6):387–96.
85. Asahara T. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science.* 14. Februar 1997;275(5302):964–6.
86. Civin CI. Human monomyeloid cell membrane antigens. [Exp Hematol. 1990].
87. Iwami Y, Masuda H, Asahara T. Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future. *Journal of cellular and molecular medicine.* 2007;8(4):488–97.
88. Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID. Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties. *The Journal of experimental medicine.* 1989;169(5):1721–31.
89. Huss R, Günther W, Schumm M, Ottinger H, Grosse-Wilde H, Kolb HJ. CD34-Negative Hematopoietic Stem Cells Isolated from Human Peripheral Blood Cells as Ultimate Precursors of Hematopoietic Progenitors. *Transfusion Medicine and Hemotherapy.* 1997;24(6):404–9.
90. Fazel S. Cardioprotective c-kit+ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *Journal of Clinical Investigation.* 3. Juli 2006;116(7):1865–77.
91. Edling CE, Hallberg B. c-Kit—A hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* Januar 2007;39(11):1995–8.
92. Kuang D, Zhao X, Xiao G, Ni J, Feng Y, Wu R, u. a. Stem cell factor/c-kit signaling mediated cardiac stem cell migration via activation of p38 MAPK. *Basic Research in Cardiology.* 17. Dezember 2007;103(3):265–73.
93. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, u. a. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 1997;90(12):5002.
94. Jászai J, Fargeas CA, Florek M, Huttner WB, Corbeil D. Focus on Molecules: Prominin-1 (CD133). *Experimental Eye Research.* November 2007;85(5):585–6.
95. Kawamoto A, Iwasaki H, Kusano K, Murayama T, Oyamada A, Silver M, u. a. CD34-Positive Cells Exhibit Increased Potency and Safety for Therapeutic Neovascularization After Myocardial Infarction Compared With Total Mononuclear Cells. *Circulation.* 14. November 2006;114(20):2163–9.
96. Stamm C, Westphal B, Kleine H-D, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, u. a. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *The Lancet.* Januar 2003;361(9351):45–6.

97. Pittenger MF. Mesenchymal Stem Cells and Their Potential as Cardiac Therapeutics. *Circulation Research*. 27. Mai 2004;95(1):9–20.
98. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, u. a. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 2. April 1999;284(5411):143–7.
99. Docheva D, Popov C, Mutschler W, Schieker M. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. Januar 2007;11(1):21–38.
100. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, u. a. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41–9.
101. Iso Y, Spees JL, Serrano C, Bakondi B, Pochampally R, Song Y-H, u. a. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. März 2007;354(3):700–6.
102. Nesselmann C, Li W, Ma N, Steinhoff G. Stem cell-mediated neovascularization in heart repair. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*. 30. Dezember 2009;4(1):27–42.
103. Ward MR, Stewart DJ. Erythropoietin and mesenchymal stromal cells in angiogenesis and myocardial regeneration: one plus one equals three? *Cardiovascular research*. 2008;79(3):357.
104. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells*. Mai 2006;24(5):1294–301.
105. Kuci S, Kuci Z, Kreyenberg H, Deak E, Putsch K, Huenecke S, u. a. CD271 antigen defines a subset of multipotent stromal cells with immunosuppressive and lymphohematopoietic engraftment-promoting properties. *Haematologica*. 23. Februar 2010;95(4):651–9.
106. Iso Y, Yamaya S, Sato T, Poole CN, Isoyama K, Mimura M, u. a. Distinct Mobilization of Circulating CD271+ Mesenchymal Progenitors from Hematopoietic Progenitors During Aging and After Myocardial Infarction. *Stem Cells Translational Medicine*. 5. Juni 2012;1(6):462–8.
107. Noort WA, Oerlemans MIFJ, Rozemuller H, Feyen D, Jaksani S, Stecher D, u. a. Human versus porcine mesenchymal stromal cells: phenotype, differentiation potential, immunomodulation and cardiac improvement after transplantation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. August 2012;16(8):1827–39.
108. Walter DH, Dimmeler S. Endothelial Progenitor Cells: Regulation and Contribution to Adult Neovascularization. *Herz*. 1. November 2002;27(7):579–88.
109. Cho H-J. Mobilized Endothelial Progenitor Cells by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Accelerate Reendothelialization and Reduce Vascular Inflammation After Intravascular Radiation. *Circulation*. 9. Dezember 2003;108(23):2918–25.
110. Wang W, Li W, Ong L-L, Lutzow K, Lendlein A, Furlani D, u. a. Localized and sustained SDF-1 gene release mediated by fibronectin films: A potential method for recruiting stem cells. *Int J Artif Organs*. März 2009;32(3):141–9.
111. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, u. a. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(7):3422.
112. Ma N, Ladilov Y, Moebius J, Ong L, Piechaczek C, David A, u. a. Intramyocardial delivery of human CD133+ cells in a SCID mouse cryoinjury model: Bone marrow vs. cord blood-derived cells☆. *Cardiovascular Research*. 1. Juli 2006;71(1):158–69.
113. Ma N, Stamm C, Kaminski A, Li W, Kleine H, Mullerhilke B, u. a. Human cord blood cells induce angiogenesis following myocardial infarction in NOD/-mice. *Cardiovascular Research*. 1. April 2005;66(1):45–54.
114. Kang H-J, Kim H-S, Zhang S-Y, Park K-W, Cho H-J, Koo B-K, u. a. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *The Lancet*. März 2004;363(9411):751–6.

115. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell*. 2006;126(4):663–76.
116. Mauritz C, Schwanke K, Reppel M, Neef S, Katsirntaki K, Maier LS, u. a. Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 2008;118(5):507–17.
117. Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, Koonce CH, Yu J, Palecek SP, u. a. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circulation Research*. 2009;104(4):e30–e41.
118. Hescheler J, Hauskeller C. Von der Grundlagenforschung in die Klinik. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*. 5. September 2008;51(9):1014–20.
119. Jiang B, Dong H, Li Q, Yu Y, Zhang Z, Zhang Y, u. a. Differentiation of Reprogrammed Mouse Cardiac Fibroblasts into Functional Cardiomyocytes. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 5. Dezember 2012;
120. Knoepfler PS. Deconstructing Stem Cell Tumorigenicity: A Roadmap to Safe Regenerative Medicine. *Stem Cells*. Mai 2009;27(5):1050–6.
121. Anversa P. Life and Death of Cardiac Stem Cells: A Paradigm Shift in Cardiac Biology. *Circulation*. 21. März 2006;113(11):1451–63.
122. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, u. a. Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration. *Cell*. September 2003;114(6):763–76.
123. Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell Migration: Review A Physically Integrated Molecular Process. *Cell*. 1996;84:359–69.
124. Byrne HM, Cave G, McElwain DLS. The effect of chemotaxis and chemokinesis on leukocyte locomotion: A new interpretation of experimental results. *Mathematical Medicine and Biology*. 1998;15(3):235–56.
125. Iglesias PA, Devreotes PN. Navigating through models of chemotaxis. *Current Opinion in Cell Biology*. Februar 2008;20(1):35–40.
126. Janetopoulos C. Chemoattractant-induced phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate accumulation is spatially amplified and adapts, independent of the actin cytoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 8. Juni 2004;101(24):8951–6.
127. Levchenko A, Iglesias PA. Models of eukaryotic gradient sensing: application to chemotaxis of amoebae and neutrophils. *Biophysical journal*. 2002;82(1 Pt 1):50.
128. Wang F, Herzmark P, Weiner OD, Srinivasan S, Servant G, Bourne HR. Lipid products of PI(3)Ks maintain persistent cell polarity and directed motility in neutrophils. *Nature Cell Biology*. 24. Juni 2002;4(7):513–8.
129. Devreotes P. Eukaryotic Chemotaxis: Distinctions between Directional Sensing and Polarization. *Journal of Biological Chemistry*. 2. April 2003;278(23):20445–8.
130. Kocher AA, Bonaros N, Ehrlich M, Schlechta B. Stammzelltherapie bei Herzerkrankungen-Status quo. *Journal für Kardiologie-Austrian Journal of Cardiology*. 2004;11(6):259–68.
131. Smart N, Riley PR. The Stem Cell Movement. *Circulation Research*. 23. Mai 2008;102(10):1155–68.
132. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, u. a. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(21):12313–8.
133. Lapidot T. How do stem cells find their way home? *Blood*. 15. September 2005;106(6):1901–10.
134. Donndorf PJ, Steinhoff G. Rolle der endothelialen Stickoxidproduktion bei SDF-1 α /TNF- α -vermittelter Migration von Stammzellen in vivo. *Zeitschrift für Herz-,Thorax- und Gefäßchirurgie*. 7. Oktober 2010;24(5):317–23.
135. Vandervelde S, Vanluyn M, Tio R, Harmsen M. Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. August 2005;39(2):363–76.

136. Guthrie SM. The nitric oxide pathway modulates hemangioblast activity of adult hematopoietic stem cells. *Blood*. 1. März 2005;105(5):1916–22.
137. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, u. a. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *The EMBO journal*. 1999;18(14):3964–72.
138. Abbott JD. Stromal Cell-Derived Factor-1 Plays a Critical Role in Stem Cell Recruitment to the Heart After Myocardial Infarction but Is Not Sufficient to Induce Homing in the Absence of Injury. *Circulation*. 23. November 2004;110(21):3300–5.
139. Jo DY, Rafii S, Hamada T, Moore MAS, others. Chemotaxis of primitive hematopoietic cells in response to stromal cell-derived factor-1. *Journal of Clinical Investigation*. 2000;105(1):101–11.
140. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, u. a. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 1. März 2001;410(6824):50–6.
141. Voermans C, Anthony EC, Mul E, van der Schoot E, Hordijk P. SDF-1-induced actin polymerization and migration in human hematopoietic progenitor cells. *Experimental hematology*. 2001;29(12):1456–64.
142. Ueda S, Mizuki M, Ikeda H, Tsujimura T, Matsumura I, Nakano K, u. a. Critical roles of c-Kit tyrosine residues 567 and 719 in stem cell factor-induced chemotaxis: contribution of src family kinase and PI3-kinase on calcium mobilization and cell migration. *Blood*. 2002;99(9):3342–9.
143. Vicente-Manzanares M, Rey M, Jones DR, Sancho D, Mellado M, Rodriguez-Frade JM, u. a. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in stromal cell-derived factor-1 α -induced lymphocyte polarization and chemotaxis. *The Journal of Immunology*. 1999;163(7):4001.
144. Kaminski A, Ma N, Choi Y, Stamm C, Liebold A, Lindenblatt N, u. a. Bedeutung von stromal cell derived factor-1 (SDF-1) für das »homing« von Stammzellen. *Chirurgisches Forum 2005*. 2005. S. 383–4.
145. Cottler-Fox MH, Lapidot T, Petit I, Kollet O, DiPersio JF, Link D, u. a. Stem cell mobilization. *ASH Education Program Book*. 2003;2003(1):419–37.
146. Kovacic JC, Muller DWM, Graham RM. Actions and therapeutic potential of G-CSF and GM-CSF in cardiovascular disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Januar 2007;42(1):19–33.
147. Basu S. Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood*. 18. Juli 2002;100(3):854–61.
148. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, u. a. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nature Immunology*. 17. Juni 2002;3(7):687–94.
149. Levesque J-P. Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice. *Blood*. 1. Juli 2004;104(1):65–72.
150. Dlubek D, Drabczak-Skrzypek D, Lange A. Low CXCR4 membrane expression on CD34+ cells characterizes cells mobilized to blood. *Bone Marrow Transplantation*. 17. Oktober 2005;
151. Semerad CL. G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood*. 1. November 2005;106(9):3020–7.
152. Christopherson KW 2nd, Hangoc G, Mantel CR, Broxmeyer HE. Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26. *Science*. 13. August 2004;305(5686):1000–3.
153. Christopherson KW. Cell surface peptidase CD26/DPPIV mediates G-CSF mobilization of mouse progenitor cells. *Blood*. 27. Februar 2003;101(>12):4680–6.
154. Christopherson KW, Frank RR, Jagan S, Paganessi LA, Gregory SA, Fung HC. CD26 protease inhibition improves functional response of unfractionated cord blood, bone marrow, and mobilized peripheral blood cells to CXCL12/SDF-1. *Experimental Hematology*. November 2012;40(11):945–52.
155. Lüthje J. Adenin-Nukleotide im Blut. (*Dt. Ärztebl.* 87, Heft 12, 22. März 1990):A927–32.

156. Brass D, Grably MR, Bronstein-Sitton N, Gohar O, Meir A. Using antibodies against P2Y and P2X receptors in purinergic signaling research. *Purinergic Signalling*. 16. November 2011;8(S1):61–79.
157. Lemoli RM. Extracellular nucleotides are potent stimulators of human hematopoietic stem cells in vitro and in vivo. *Blood*. 15. September 2004;104(6):1662–70.
158. Coppi E, Pugliese AM, Urbani S, Melani A, Cerbai E, Mazzanti B, u. a. ATP Modulates Cell Proliferation and Elicits Two Different Electrophysiological Responses in Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. Juli 2007;25(7):1840–9.
159. Bodin P, Burnstock G. Increased release of ATP from endothelial cells during acute inflammation. *Inflammation Research*. 1. August 1998;47(8):351–4.
160. Filippini A. Extracellular ATP in T-Lymphocyte Activation: Possible Role in Effector Functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1. November 1990;87(21):8267–71.
161. Ninomiya H, Otani H, Lu K, Uchiyama T, Kido M, Imamura H. Complementary role of extracellular ATP and adenosine in ischemic preconditioning in the rat heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2002;282(5):H1810–H1820.
162. Erlinge D, Burnstock G. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signalling*. 21. September 2007;4(1):1–20.
163. Gündüz D, Kasseckert SA, Härtel FV, Aslam M, Abdallah Y, Schäfer M, u. a. Accumulation of extracellular ATP protects against acute reperfusion injury in rat heart endothelial cells. *Cardiovascular research*. 2006;71(4):764–73.
164. Golan O, Issan Y, Isak A, Leipziger J, Robaye B, Shainberg A. Extracellular nucleotide derivatives protect cardiomyocytes against hypoxic stress. *Biochemical Pharmacology*. Mai 2011;81(10):1219–27.
165. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother*. 1996;5(3):213–26.
166. BOYDEN S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med*. 1. März 1962;115:453–66.
167. Oppegard SC, Blake AJ, Williams JC, Eddington DT. Precise control over the oxygen conditions within the Boyden chamber using a microfabricated insert. *Lab on a Chip*. 2010;10(18):2366.
168. Hill JM, Zalos G, Halcox JPJ, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, u. a. Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function, and Cardiovascular Risk. *New England Journal of Medicine*. 13. Februar 2003;348(7):593–600.
169. Just T, Zeisner C, Stave J, Pau HW. Confocal laser-scanning microscopy to analyse the epithelium of the tongue. *Laryngorhinootologie*. Februar 2004;83(2):108–12.
170. Hellmuth T. Neuere Methoden in der konfokalen Mikroskopie. *Physik Journal*. Juni 1993;49(6):489–91.
171. Ferrari D. The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release. *The FASEB Journal*. 1. Dezember 2000;14(15):2466–76.
172. Volonte C, Amadio S, Cavaliere F, D'Ambrosi N, Vacca F, Bernardi G. Extracellular ATP and Neurodegeneration. *Current Drug Target -CNS & Neurological Disorders*. 1. Dezember 2003;2(6):403–12.
173. Ong L-L, Li W, Oldigs JK, Kaminski A, Gerstmayer B, Piechaczek C, u. a. Hypoxic/normoxic preconditioning increases endothelial differentiation potential of human bone marrow CD133+ cells. *Tissue Eng Part C Methods*. Oktober 2010;16(5):1069–81.
174. Signoret N. Phorbol Esters and SDF-1 Induce Rapid Endocytosis and Down Modulation of the Chemokine Receptor CXCR4. *The Journal of Cell Biology*. 3. November 1997;139(3):651–64.
175. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, u. a. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science*. 5. Februar 1999;283(5403):845–8.

176. Schächinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, u. a. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. Oktober 2004;44(8):1690–9.
177. Strauer BE. Klinische Perspektiven der Herzmuskelregeneration durch Stammzellen. *Herz*. 29. Oktober 2010;35(7):474–7.
178. Seeger FH, Rasper T, Fischer A, Muhly-Reinholz M, Hergenreider E, Leistner DM, u. a. Heparin disrupts the CXCR4/SDF-1 axis and impairs the functional capacity of bone marrow-derived mononuclear cells used for cardiovascular repair. *Circ Res*. 14. September 2012;111(7):854–62.
179. Ratajczak MZ, Kim C, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J. The Expanding Family of Bone Marrow Homing Factors for Hematopoietic Stem Cells: Stromal Derived Factor 1 Is Not the Only Player in the Game. *The Scientific World Journal*. 2012;2012:1–11.
180. Brehm M, Picard F, Ebner P, Turan G, Bölke E, Köstering M, u. a. Effects of exercise training on mobilization and functional activity of blood-derived progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *European journal of medical research*. 2009;14(9):393.
181. Sieuwerts AM, Klijn JG, Foekens JA. Assessment of the invasive potential of human gynecological tumor cell lines with the in vitro Boyden chamber assay: influences of the ability of cells to migrate through the filter membrane. *Clinical & experimental metastasis*. 1997;15(1):53–62.
182. Kaminski A, Ma N, Donndorf P, Lindenblatt N, Feldmeier G, Ong L-L, u. a. Endothelial NOS is required for SDF-1 α /CXCR4-mediated peripheral endothelial adhesion of c-kit⁺ bone marrow stem cells. *Lab Invest*. Januar 2008;88(1):58–69.
183. Stein MD, Stevens JM, Herndon DN. Defective neutrophil chemotaxis resulting from thermal injury: restoration of directed migration by increasing Boyden chamber filter pore size. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1983;27(2):234–9.
184. Foguene J, Di Stefano I, Giet O, Beguin Y, Gothot A. Ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells is associated with downregulation of 4 integrin- and CXCR4-mediated engraftment in NOD/SCID 2-microglobulin-null mice. *Haematologica*. 14. Januar 2009;94(2):185–94.
185. Rönstrand L. Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cell Mol Life Sci*. Oktober 2004;61(19-20):2535–48.
186. Bauer N, Fonseca A-V, Florek M, Freund D, J´szai J, Bornhäuser M, u. a. New Insights into the Cell Biology of Hematopoietic Progenitors by Studying Prominin-1 (CD133). *Cells Tissues Organs*. 2008;188(1-2):127–38.
187. Krauter J, Hartl M, Hambach L, Kohlenberg A, Gunsilius E, Ganser A, u. a. Receptor-Mediated Endocytosis of CD34 on Hematopoietic Cells after Stimulation with the Monoclonal Antibody Anti-HPCA-1. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*. Dezember 2001;10(6):863–71.
188. Shin J-W, Spinler KR, Swift J, Chasis JA, Mohandas N, Discher DE. Lamins regulate cell trafficking and lineage maturation of adult human hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 4. November 2013;110(47):18892–7.
189. Aiuti A. The Chemokine SDF-1 Is a Chemoattractant for Human CD34⁺ Hematopoietic Progenitor Cells and Provides a New Mechanism to Explain the Mobilization of CD34⁺ Progenitors to Peripheral Blood. *Journal of Experimental Medicine*. 1. Januar 1997;185(1):111–20.
190. Donndorf P, Useini D, Lux CA, Vollmar B, Delyagina E, Laupheimer M, u. a. Analysing migratory properties of human CD 133⁺ stem cells in vivo after intraoperative sternal bone marrow isolation. *Cell Transplant*. 8. Oktober 2012;
191. Lehwald N, Duhme C, Wildner M, Kuhn S, Fürst G, Forbes SJ, u. a. HGF and SDF-1-mediated mobilization of CD133⁺ BMSC for hepatic regeneration following extensive liver resection. *Liver International*. Mai 2013;n/a–n/a.
192. Seeger FH, Rasper T, Koyanagi M, Fox H, Zeiher AM, Dimmeler S. CXCR4 Expression Determines Functional Activity of Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells for Therapeutic Neovascularization in Acute Ischemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 20. August 2009;29(11):1802–9.

193. Abkowitz JL. Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure. *Blood*. 24. April 2003;102(4):1249–53.
194. Lapidot T. Mechanism of Human Stem Cell Migration and Repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID Mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 25. Januar 2006;938(1):83–95.
195. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry. *Journal of Hematotherapy*. Juni 1996;5(3):213–26.
196. Van Lochem EG, van der Velden VHJ, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdaal NAC, van Dongen JJM. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: Reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry*. Juli 2004;60B(1):1–13.
197. Bissels U, Bosio A, Wagner W. MicroRNAs are shaping the hematopoietic landscape. *Haematologica*. 4. November 2011;97(2):160–7.
198. Wojakowski W. Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ Stem Cells, and Mononuclear Cells Expressing Early Cardiac, Muscle, and Endothelial Markers Into Peripheral Blood in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Circulation*. 16. November 2004;110(20):3213–20.
199. Brzoska E, Kowalewska M, Markowska-Zagrajek A, Kowalski K, Archacka K, Zimowska M, u. a. Sdf-1 (CXCL12) improves skeletal muscle regeneration via the mobilisation of Cxcr4 and CD34 expressing cells. *Biology of the Cell*. Dezember 2012;104(12):722–37.
200. Assmus B, Tonn T, Seeger FH, Yoon C-H, Leistner D, Klotsche J, u. a. Red Blood Cell Contamination of the Final Cell Product Impairs the Efficacy of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Therapy. *Journal of the American College of Cardiology*. März 2010;55(13):1385–94.
201. Ferrari D, Gulinelli S, Salvestrini V, Lucchetti G, Zini R, Manfredini R, u. a. Purinergic stimulation of human mesenchymal stem cells potentiates their chemotactic response to CXCL12 and increases the homing capacity and production of proinflammatory cytokines. *Experimental Hematology*. März 2011;39(3):360–374.e5.

8. Anhang

i. Ergänzende Diagramme

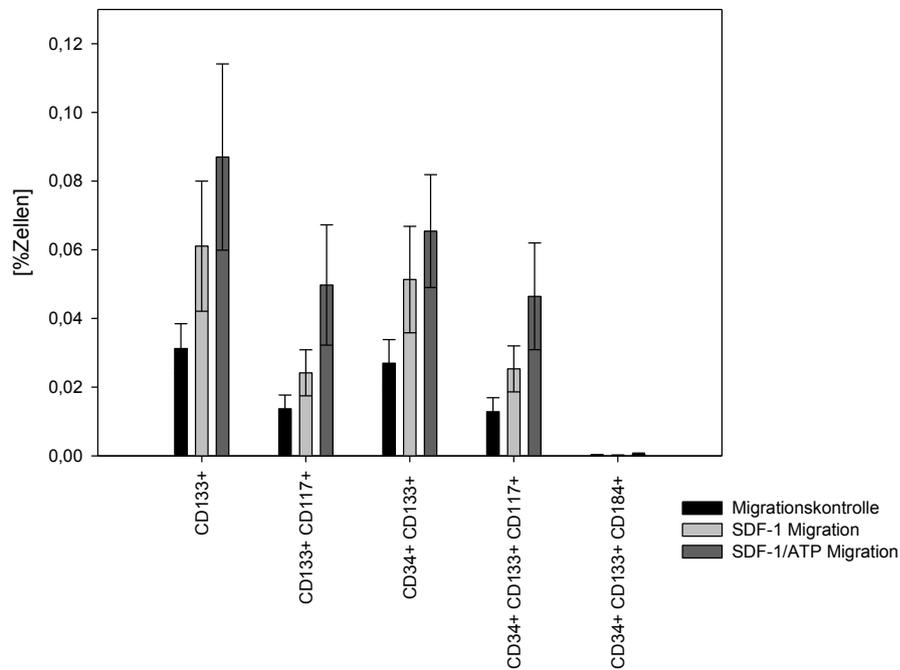


Abb. 30 – Subpopulationen migrierter CD133+ Zellen innerhalb der BM-TNCs

$n \geq 4$; $*p < 0,05$; Säulen zeigen Mittelwert \pm Standardfehler

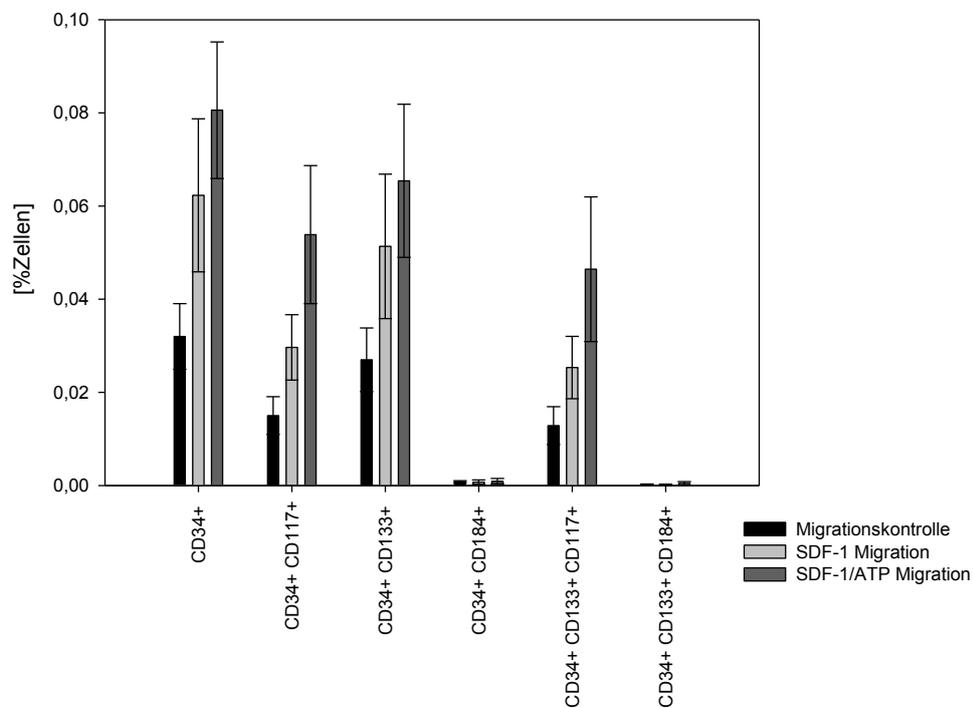


Abb. 31 – Subpopulationen migrierter CD34+ Zellen innerhalb der BM-TNCs

$n \geq 4$; $*p < 0,05$; Säulen zeigen Mittelwert \pm Standardfehler

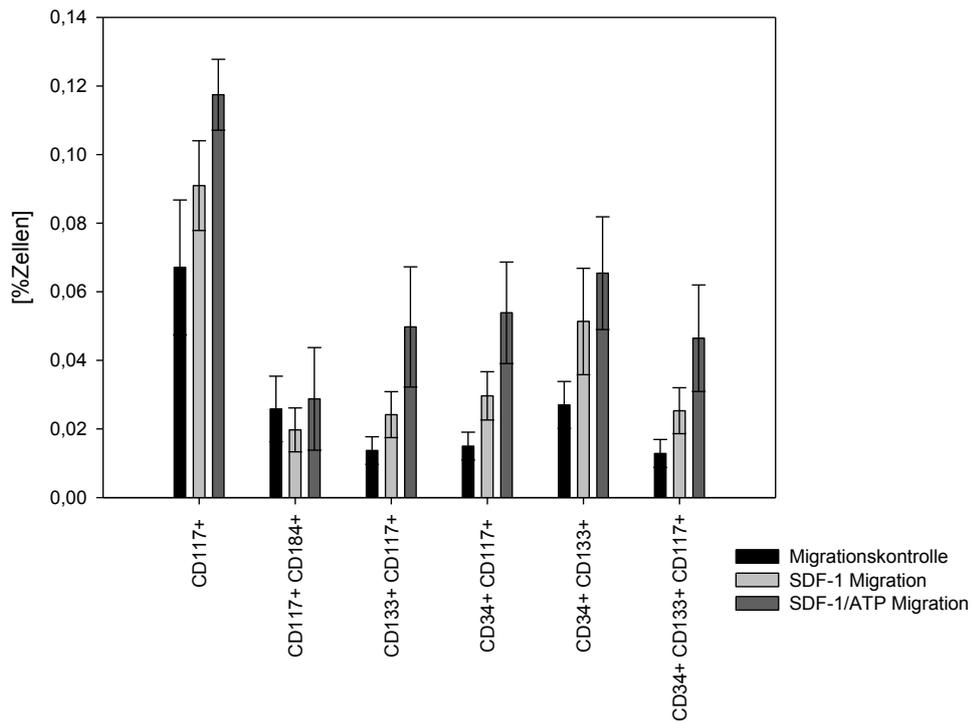


Abb. 32 – Subpopulationen migrierter CD117+ Zellen innerhalb der BM-TNCs

n≥4; **p*<0,05; Säulen zeigen Mittelwert ± Standardfehler

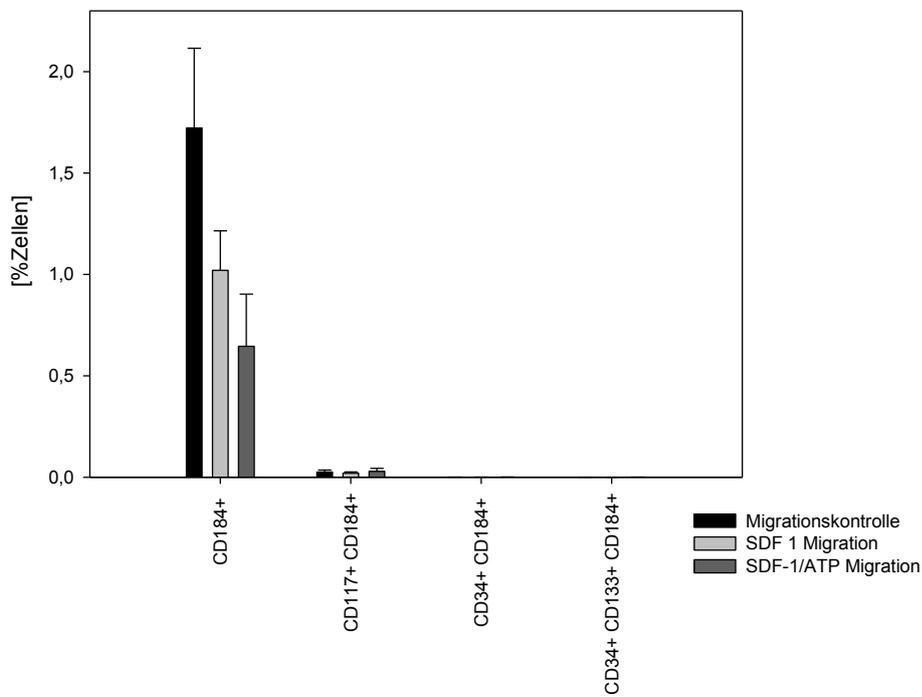


Abb. 33 – Subpopulationen migrierter CD184+ Zellen innerhalb der BM-TNCs

n≥4; **p*<0,05; Säulen zeigen Mittelwert ± Standardfehler

ii. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BM	Knochenmark – engl. Bone marrow
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
CLP	common lymphoid progenitor
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4, syn. SDF-1-Rezeptor (CD184)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Durchflusszytometrie - engl. Fluorescence activated cell sorting
G-CSF	Granulozyten – Kolonienstimulierender Faktor
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor-1
hMSC	Humane mesenchymale Stammzellen
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
HWZ	Halbwertszeit
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
iPS	induzierte pluripotente Stammzellen
KM	Knochenmark
Konz.	Konzentration
MACS	Magnetisch aktivierte Zellsortierung
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinasen (MAPK)
Min.	Minute
MNCs	mononukleäre Zellen
MSC	mesenchymale Stammzellen
MW	Mittelwert
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SCF	Stem cell factor
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1, syn. CXCL12, Ligand von CD184
s. Abb.	siehe Abbildung
SE	Standardfehler
Sek.	Sekunde
SZ	Stammzelle
TNC	Kernhaltige Zellen - engl. Total nucleated cells
TNF-alpha	Tumor Nekrose Faktor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Vgl.	Vergleich
vs.	versus
ZP	Zellprodukt

Zusätzlich gelten die allgemeinen SI Einheiten und die chemischen Elementsymbole.

iii. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gustav Steinhoff für die Überlassung des Themas, sowie die Möglichkeit der Durchführung meiner Doktorarbeit in seinem Labor.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Cornelia Lux für die engagierte Betreuung und die Unterstützung bei allen theoretischen und praktischen Fragen bezüglich meiner Promotion. Durch ihr hohes persönliches Engagement und ihre Hilfsbereitschaft begeisterte sie mich für das wissenschaftliche Arbeiten und ermöglichte mir ein zügiges Vorankommen bei der Durchführung meiner Promotion.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des FKGO und RTC Forschungslabor für die Unterstützung während meiner Versuche.

Den Ärzten der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie in Rostock möchte ich für die Bereitstellung bzw. Entnahme des Knochenmarks danken.

Bedanken möchte ich mich bei der Firma Miltenyi Biotec Deutschland, insbesondere bei Dr. Mike Essel und Juliane Stuth, für die Zurverfügungstellung der isolierten Stammzellen.

Der Firma *recuperate medical* möchte ich für die Bereitstellung des ResQ-Isolationengerätes und entsprechender ResQ-Sets im Rahmen eines Kooperationsprojekts mit dem RTC danken.

Bedanken möchte ich mich bei allen Freunden und Kommilitonen für die Unterstützung während des Studiums und der Promotion.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Freundin Katrin für ihre ausdauernde und motivierende Unterstützung während des Studiums und der Promotion.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums und der Promotion bedanken. Ohne ihre aufmunternde Unterstützung und Motivation wäre ich im Leben nicht soweit gekommen.

iv. Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig angefertigt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie Zitate kenntlich gemacht habe.

Die vorgelegte Dissertation wurde bisher weder im Ausland noch im Inland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Rostock, den 22.12.2013

Michael Laupheimer

v. Thesen

1. Knochenmarkstammzellen spielen eine wichtige Rolle in der Regeneration von ischämisch geschädigtem Myokardgewebe. Nach intramyokardialer Transplantation autologer CD133+ Zellen aus Knochenmark konnte sowohl im Tiermodell als auch in klinischen Studien Phase I/II eine Verbesserung der Herzfunktion nachgewiesen werden.
2. Durch kardiale Ischämie kommt es zu einer HIF-1 bedingten verstärkten SDF-1 Expression, was zur Rekrutierung von Knochenmarkstammzellen in das geschädigte Gewebe führt.
3. Isolierte CD133+ Stammzellen migrieren zu SDF-1.
4. Da ATP im Extrazellulärraum unter ischämischen Bedingungen erhöht ist, wurde der Einfluss von ATP auf die Migration von CD133+ bzw. Knochenmarkzellen (BM-TNCs) untersucht.
5. Isolierte CD133+ Stammzellen migrieren zu 100 μ M ATP *in vitro*, diese Konzentration ist für die Zellen untoxisch.
6. Eine Kombination von SDF-1 und ATP wirkt als starker migratorischer Reiz auf BM-TNCs *in vitro*.
7. Nach Chemokinese weisen BM-TNCs einen verringerten Anteil hämatopoetischer Stammzellen auf.
8. Migration zu einer Kombination aus ATP und SDF-1 hin führt dagegen zu einem erhöhten Anteil der CD34+, sowie CD133+/CD117+ Zellpopulationen in BM-TNCs.
9. Nach Inkubation mit SDF-1 und ATP ist der Anteil der CD184+ Zellen innerhalb der BM-TNCs erniedrigt, was durch Rezeptorinternalisierung nach Ligandenkontakt begründet sein kann.
10. Ein mit dem Point-of-Care-System Res-Q™ 60 BMC aufgereinigtes Zellprodukt enthält migratorisch aktive Stammzellpopulationen, die therapeutisches Potenzial für die kardiale Regeneration besitzen.