

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

Innovative diagnostische und therapeutische Optionen bei der linksventrikulären kardialen Hypertrophie

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

vorgelegt von
Nick Lasse Beetz

aus Bremen

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Stefan Brunner
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Nikolaus Haas Priv.-Doz. Dr. med. Michael Irlbeck Prof. Dr. med. Ellen Hoffmann
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Priv.-Doz. Dr. med. Bruno Huber Dr. rer. nat. Alexandra Laskowski
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	17.05.2018

Meiner Familie

1 Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Beetz, Nick Lasse

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

"Innovative diagnostische und therapeutische Optionen bei der linksventrikulären kardialen Hypertrophie"

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

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

Berlin, 01.09.2017

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

2 Inhaltsverzeichnis

1	Eidesstattliche Versicherung	4
2	Inhaltsverzeichnis	5
3	Abkürzungsverzeichnis	6
4	Publikationsliste	7
5	Einleitung.....	8
5.1	Linksventrikuläre Hypertrophie	
5.2	Kardiale Fibrose	
5.3	Monitoring der linksventrikulären Hypertrophie und Fibrose im Mausmodell	
5.4	Stammzellmobilisierung durch G-CSF als therapeutische Option bei kardialen Erkrankungen	
5.5	Fragestellungen der eingereichten Arbeit	
6	Beitrag des Autors	14
6.1	Veröffentlichung I	
6.2	Veröffentlichung II	
6.3	Etablierung von neuen Methoden	
7	Zusammenfassung der Veröffentlichungen	15
8	Summary of the publications.....	18
9	Veröffentlichung I (Huber BC* and Beetz NL* et al., 2015).....	20
10	Veröffentlichung II (Todica A et al., 2017).....	30
11	Literaturverzeichnis	32
12	Danksagung	37
13	Lebenslauf	38

3 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
Akt1	Gen der Proteinkinasen B
c-kit	Tyrosinkinase KIT, Stammzellfaktor-Rezeptor
CXCR4	Chemokine Receptor Type 4
FDG	2-Fluor-2-desoxy-D-glucose
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
HF-PEF	Heart Failure with Preserved Ejection Fraction
HF-REF	Heart Failure with Reduced Ejection Fraction
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
JAK	Januskinase
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
NYHA	New York Heart Association
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PI3K(p110 α)	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
SCF	Stem Cell Factor
SDF-1	Stromal-derived Factor-1
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TAC	Transverse Aortic Constriction
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VLA-4	Very Late Antigen 4

4 Publikationsliste

1. Huber BC, **Beetz NL**, Laskowski A, Ziegler T, Grabmaier U, Kupatt C, Herbach N, Wanke R, Franz WM, Massberg S, Brunner S. Attenuation of cardiac hypertrophy by G-CSF is associated with enhanced migration of bone marrow-derived cells. *J Cell Mol Med*. 2015 May;19(5):1033-41. doi: 10.1111/jcmm.12494. Epub 2015 Mar 8.
2. Todica A, **Beetz NL**, Günther L, Zacherl M, Grabmaier U, Huber BC, Bartenstein P, Brunner S, Lehner S. Molecular Imaging and Biology. Monitoring of Cardiac Remodeling in a Mouse Model of Pressure-Overload Left Ventricular Hypertrophy with [18F]FDG MicroPET. *Mol Imaging Biol*. 2018 Apr;20(2):268-274. doi: 10.1007/s11307-017-1114-6.
3. Zacherl M, Günther L, Todica A, **Beetz NL**, Paintmayer L, Huber BC, Bartenstein P, Brunner S, Lehner S. Monitoring of left ventricular function and scar burden in the mouse model of cardiac hypertrophy with F-18 FDG microPET. *J Nucl Med* May 1, 2016 vol. 57 no. supplement 2 1625 (Abstract).

5 Einleitung

Die linksventrikuläre, Druck-induzierte kardiale Hypertrophie ist Folge weit verbreiteter kardiovaskulärer Erkrankungen wie die arterielle Hypertonie und die Aortenklappenstenose. Die Nachlasterrhöhung induziert eine kardiale Hypertrophie, die zunächst zu einer Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion, jedoch beeinträchtigter diastolischer linksventrikulärer Funktion (Heart Failure with Preserved Ejection Fraction, HF-PEF) führt. Im weiteren Verlauf der Erkrankung entwickeln die Patienten häufig eine Herzinsuffizienz mit eingeschränkter systolischer linksventrikulärer Funktion (Heart Failure with Reduced Ejection Fraction, HF-REF) (1).

Die zunehmende interstitielle Fibrosierung des Myokards gilt als wichtiger morphologischer Faktor für die Entstehung einer Herzinsuffizienz und ist selbst nach optimaler Therapie nicht komplett reversibel. Dabei korreliert das Stadium der Insuffizienz nach NYHA I-IV und die systolische Pumpfunktion mit dem Ausmaß der Fibrose (2). Im Endstadium der Herzinsuffizienz kann die Druck-induzierte kardiale Hypertrophie zu einer sekundären dilatativen Kardiomyopathie führen. Trotz prognoseverbessernde Medikamente wie Beta-Blocker, ACE-Hemmer, Aldosteronantagonisten und dem Neprilysin-Inhibitor Sacubitril, sowie invasive Therapieformen wie die kardiale Resynchronisationstherapie und der implantierbarer Kardioverter-Defibrillator (3-5), bleibt die Prognose einer dilatativen Kardiomyopathie mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von 10-15% denkbar schlecht (6). Als Ultima Ratio für diese Patienten kommen nur eine Herztransplantation oder die Implantation eines mechanischen Herzunterstützungssystems in Betracht (7, 8). Aufgrund der geringen und abnehmenden Verfügbarkeit von Spenderherzen, der langen Wartezeit mit entsprechend hoher Mortalität und der hohen Komplikationsrate bei Herztransplantationen und Herzunterstützungssystemen ist die Suche nach alternativen Therapieformen zur Reduktion der Fibrose und damit Verbesserung der kardialen Pumpfunktion von größter Bedeutung (9-12).

Die Regeneration des geschädigten Myokards mithilfe der Stammzelltherapie erscheint hier als aussichtsreiche Zukunftsoption (13). Die Mobilisierung von Knochenmarksstammzellen in den Blutstrom durch das Zytokin Granulocyte Colony Stimulating Factor G-CSF als Alternative zur direkten intramyokardialen Injektion von Stammzellen wurde in den vergangenen Jahren erfolgreich bei kardiovaskulären Erkrankungen durchgeführt (14-17). Klinisch wird das Zytokin G-CSF bereits seit langem zur Mobilisierung von Knochenmarksstammzellen im Rahmen von Knochenmarktransplantationen eingesetzt.

Im ischämischen Gewebe spielt die Migration von mobilisierten Knochenmarksstammzellen für die Regeneration des Myokards eine entscheidende Rolle. In präklinischen Studien konnte für verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen, wie nach einem Myokardinfarkt, ein kardioprotektiver Effekt durch die Gabe von G-CSF nachgewiesen werden (18-21)

Im ischämischen Myokard ist die Interaktion des Chemokins stromal-derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) mit dem Liganden chemokine receptor type 4 (CXCR4), das vor allem an der Oberfläche von vielen Knochenmarksstammzellen exprimiert wird, für die Migration in das Gewebe verantwortlich (22, 23). Die G-CSF-Gabe nach akutem Herzinfarkt bewirkt allerdings eine N-terminale Spaltung von SDF-1, wodurch ein vermindertes Homing von Knochenmarksstammzellen in das Myokard resultiert. Dies wiederum könnte eine Erklärung für die enttäuschenden Ergebnisse erster klinischer Studien sein (24, 25).

Im Gegensatz zum ischämischen Myokard scheint die CXCR4/SDF1-Achse bei nicht-ischämischen Kardiomyopathien keine Rolle für das Homing von Knochenmarksstammzellen zu spielen. Dafür spricht, dass in humanen Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie SDF-1 nicht hochreguliert ist (26). Tatsächlich konnten erste Studien zeigen, dass die Gabe von G-CSF bei Druck-induzierter Hypertrophie einen positiven Effekt auf die Pumpfunktion und die Regeneration des Herzens, insbesondere in Hinblick auf die Fibrose, hat (27).

In dem ersten Teil der vorliegenden Forschungsarbeit soll geklärt werden, ob eine Druck-induzierte kardiale Hypertrophie durch eine Therapie mit G-CSF positiv beeinflusst werden kann. Hierbei soll neben der Mobilisierung der Knochenmarksstammzellen, insbesondere das Homing in das erkrankte Myokard mit den zugrundeliegenden Faktoren untersucht werden. Weiterhin wird der Einfluss auf das myokardiale Remodelling, mit dem Fokus auf das Ausmaß der Hypertrophie und der myokardialen Fibrosierung, analysiert. Die Untersuchungen werden am Mausmodell der Druck-induzierten linksventrikulären Hypertrophie durchgeführt, bei dem eine sogenannte Transverse Aortic Constriction durchgeführt wird.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Etablierung einer innovativen diagnostischen Option des *in vivo* Monitorings. Erforscht werden soll, ob sich die micro-FDG-Positronen-Emissions-Tomographie zur Bildgebung von kardialer Hypertrophie und der einhergehenden Fibrose eignet.

5.1 Linksventrikuläre Hypertrophie

Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen oder kardiovaskulären Risikofaktoren weisen häufig eine linksventrikuläre Hypertrophie auf, die echokardiographisch und elektrokardiographisch diagnostiziert wird. Die linksventrikuläre Hypertrophie ist ein unabhängiger Risikofaktor für das Auftreten eines akuten Koronarsyndroms, für die Entstehung einer Herzinsuffizienz, sowie für ventrikuläre und supraventrikuläre Arrhythmien (28, 29). Des Weiteren erhöht die linksventrikuläre Hypertrophie das Risiko für einen plötzlichen Herztod (30).

Physiologisch kommt eine linksventrikuläre Hypertrophie als Antwort auf den erhöhten Bedarf nach Sauerstoff und Nährstoffen bei Sportlern, während der Schwangerschaft und in der Wachstumsphase von Kindern vor (31). Die Vergrößerung der Kardiomyozyten geht einher mit einer entsprechenden Expansion des Kapillarnetzwerkes und ist nicht verbunden mit funktionellen oder strukturellen Anomalitäten (32).

Dagegen ist die pathologische linksventrikuläre Hypertrophie durch eine Hochregulation von neurohumeralen Mediatoren und ein myokardiales Wachstum, das die Kapazität der Blutgefäße für eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen übertrifft, gekennzeichnet. Hierdurch kommt es zu Gewebeschädigung, Absterben von Kardiomyozyten und maladaptives kardiales Remodelling, das letztendlich zur einer Herzinsuffizienz führt (33, 34).

Die konzentrische linksventrikuläre Hypertrophie zeichnet sich durch eine Verdickung der einzelnen Kardiomyozyten und eine relative Zunahme der Wanddicke im Verhältnis zur Ventrikelgröße aus. Ursächlich ist eine Nachlasterhöhung, wie sie bei einer Aortenklappenstenose oder bei arterieller Hypertonie auftritt. Im Gegensatz dazu entsteht eine exzentrische linksventrikuläre Hypertrophie als Folge von Volumenbelastung, zum Beispiel bei einer Aortenklappeninsuffizienz. Auf Zellebene kommt es zu einer Verlängerung der einzelnen Kardiomyozyten, was sich morphologisch in einer Volumenzunahme des Ventrikels äußert (35).

In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die physiologische Hypertrophie bei Sportlern maßgeblich durch die erhöhte Ausschüttung des Wachstumshormons IGF-1, welches das Wachstum von Kardiomyozyten via Aktivierung von PI3K(p110 α) und Akt1 stimuliert, induziert wird. Bei der pathologischen Hypertrophie hingegen wird das Wachstum hauptsächlich über Angiotensin II, Noradrenalin und Endothelin-1 aktivierte G-Proteine aktiviert (36).

5.2 Kardiale Fibrose

Das kardiale Remodelling bleibt in der linksventrikulären Hypertrophie nicht auf die Veränderungen der Kardiomyozyten beschränkt. Insbesondere die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems stimuliert die Kollagensynthese mit daraus resultierender Fibrosierung der extrazellulären Matrix (37, 38). Die zunehmende Steifigkeit des Myokards beeinträchtigt die diastolische Füllung und Saugwirkung des Herzens. Die diastolische Dysfunktion führt zu einer reduzierten körperlichen Belastbarkeit und ist somit ein Risikofaktor für die Entstehung einer HF-PEF (39-41).

In Patienten mit HF-REF korreliert die linksventrikuläre Fibrose mit der Reduktion der systolischen linksventrikulären Funktion sowie mit dem Grad der Herzinsuffizienz nach NYHA und ist ein Indikator für das Langzeit-Überleben (42, 43). Der Progress der Erkrankung wird durch einen Circulus vitiosus aus latenter kardialer Ischämie, Inflammation, Apoptose und zunehmender Fibrosierung aufrechterhalten (44-46).

Die disseminierte kardiale Fibrose in der linksventrikulären Hypertrophie kann zu einer Beeinträchtigung der homogenen Ausbreitung und Rückbildung der elektrischen Erregung im Myokard führen. Fibrose gilt daher als morphologisches Hauptsubstrat für die Entstehung von ventrikulären und supraventrikulären Arrhythmien (47).

5.3 Monitoring der linksventrikulären Hypertrophie und Fibrose im Mausmodell

Für die Entwicklung und Erforschung neuer Therapieansätze, aber auch für die Diagnostik bei Patienten mit linksventrikulärer Hypertrophie und Herzinsuffizienz, ist das *in vivo* Monitoring des Herzens von immenser Bedeutung (48). Therapieerfolge und Therapieindikation, zum Beispiel in Hinblick auf Fibrose oder Hypertrophie, könnten prinzipiell kontinuierlich und bei den gleichen untersuchten Herzen erfolgen. Das kardiale Remodelling nicht-invasiv quantitativ und qualitativ verfolgen zu können ist von großem wissenschaftlichen Interesse (49, 50).

In der präklinischen Forschung im Mausmodell stehen als bildgebende Diagnostik zum Monitoring von kardialer Hypertrophie neben der Echokardiographie die kardiale Magnetresonanztomographie und die invasive Vermessung mittels Kontrastmittel-Ventrikulographie zur Verfügung. Obwohl die Echokardiographie in der kardialen Diagnostik an erster Stelle steht, so ist zu berücksichtigen, dass die Auswertungen stark untersucherabhängig sind. Die Magnetresonanztomographie dagegen ermöglicht eine sehr genaue Berechnung der linksventrikulären Masse und kann zudem Fibroseareale detektieren

(51). Allerdings birgt die Methode zumindest im klinischen Setting den Nachteil, dass sie bei einigen Metall-Implantaten und Herzschrittmacher kontraindiziert ist. Die invasive Vermessung im Herzkatheter mithilfe der Rackley-Methode hat den Vorteil, dass in gleicher Sitzung hämodynamische Untersuchungen sowie eine Koronarangiographie durchgeführt werden können. Jedoch erfordert die Kalibrierung zur Vermessung der linksventrikulären Masse in der Lävokardiographie eine große Erfahrung des Untersuchers (52, 53).

Die Positronen-Emissions-Tomographie stellt im Gegensatz zur Magnetresonanztomographie keine anatomische, sondern eine funktionelle Bildgebung dar. Die PET besitzt daher eine sehr hohe diagnostische Genauigkeit für den Ischämie-Nachweis und die Vitalitätsabklärung (54). Darüber hinaus bietet die PET die Möglichkeit Mikrozirkulationsstörungen darzustellen und ist daher in der weiteren Diagnostik der Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion besonders bedeutsam (55).

Unklar ist bisher, ob die PET auch für das Monitoring von linksventrikulärer Hypertrophie und der damit einhergehenden Fibrosierung als neue diagnostische Möglichkeit zur *in vivo* Evaluation neuer Therapieoptionen geeignet ist. Perspektivisch würde diese *in vivo* Bildgebung zudem die Anzahl an benötigten Tieren für zukünftige Experimente reduzieren können.

5.4 Stammzellmobilisierung durch G-CSF als therapeutische Option bei kardialen Erkrankungen

G-CSF ist ein hämopoetisches Zytokin mit immunregulierender Funktion und wird klinisch zur Mobilisierung von hämopoetischen Stammzellen im Rahmen von Knochenmarktransplantationen eingesetzt (56). In präklinischen Studien konnte ferner gezeigt werden, dass G-CSF für einige kardiovaskuläre Erkrankungen, wie beispielsweise nach einem Myokardinfarkt und bei der dilatativen Kardiomyopathie, kardioprotektive Effekte besitzt (18, 20-23, 26). Einerseits wird dies auf die von G-CSF ausgelöste Mobilisierung von Knochenmarksstammzellen in das periphere Blut zurückgeführt (24, 26). Andererseits konnte ein durch G-CSF ausgelöster antiapoptotischer Effekt nachgewiesen werden, welcher über den Jak-Stat und PI3K-Akt Signalweg vermittelt wird (57).

In ersten klinischen Studien, in denen der Effekt von G-CSF nach Myokardinfarkt untersucht wurde, konnten die positiven Ergebnisse, die im Tiermodell festgestellt wurden, nicht reproduziert werden (58). Eine mögliche Erklärung dieser negativen Ergebnisse ist die durch G-CSF bedingte Beeinträchtigung der Migration von Knochenmarksstammzellen in das ischämische Myokard. Im akutem Myokardinfarkt findet das Homing von

Knochenmarksstammzellen in das geschädigte Gewebe über die Interaktion von CXCR-4, einem Oberflächenliganden von Knochenmarksstammzellen, und SDF-1, ein myokardialer Homing-Faktor, statt (59, 60). Die Gabe von G-CSF führt zu einem verstärkten Abbau von CXCR-4, sodass es zwar zu einer Mobilisierung der Knochenmarksstammzellen in die Blutzirkulation kommt (24, 25). Jedoch führt dieser Abbau von CXCR-4 gleichzeitig dazu, dass die CXCR-4/SDF-1 vermittelte Migration dieser Knochenmarksstammzellen in das ischämische Myokard beeinträchtigt wird (61, 62).

Anders als bei der ischämischen Kardiomyopathie wird bei der postmyokarditischen dilatativen Kardiomyopathie das Homing der Knochenmarksstammzellen nicht über die CXCR-4/SDF-1-Achse, sondern über das Oberflächenprotein VCAM-1 und dessen Liganden VLA-4 vermittelt. In diesen postmyokarditischen Herzen konnte im Mausmodell durch die Therapie mit G-CSF ein verbessertes Homing von Knochenmarksstammzellen mit konsekutiv deutlicher Reduktion der Fibroseareale erzielt werden (63).

5.5 Fragestellungen der eingereichten Arbeit

Die Fragestellungen dieser Arbeit sind, ob in der Druck-induzierten, nicht-ischämischen Kardiomyopathie durch die Gabe von G-CSF neben der Mobilisierung von Knochenmarksstammzellen ein verbessertes Homing von Knochenmarksstammzellen in das Myokard erreicht werden kann und dadurch ein positiver Effekt bezüglich der Fibrose, der kardialen Funktion und das Überleben erzielt werden kann. Des Weiteren soll geklärt werden, ob die FDG-Positronen-Emissions-Tomographie für das *in vivo* Monitoring im Mausmodell der kardialen Hypertrophie anwendbar ist.

6 Beitrag des Autors

6.1. Veröffentlichung I (Huber BC* and Beetz NL* et al., 2015)

Bruno Huber und Nick Lasse Beetz entwarfen das Konzept für die Studie und planten die Experimente. Alle publizierten Experimente wurden von Nick Lasse Beetz durchgeführt. Zudem führte der Autor die Erhebung und Analyse aller veröffentlichten Daten durch. Bei dem Verfassen des Manuskripts arbeiteten Bruno Huber und Nick Lasse Beetz eng zusammen, wobei Nick Lasse Beetz den Methodenteil sowie wesentliche Teil der Einführung, Ergebnisse und Diskussion selbstständig verfasste. Auch der Großteil der Abbildungen wurde von Nick Lasse Beetz erstellt.

6.2. Veröffentlichung II (Todica A et al., 2017)

Nach der ersten Publikation (Huber BC* and Beetz NL* et al., 2015) entwarfen Andrei Todica und Nick Lasse Beetz diese vorliegende nuklearmedizinische Studie. Der Autor führte alle publizierten Experimente durch, erhob und analysierte die veröffentlichten Daten. Nick Lasse Beetz trug wesentliche Beiträge beim Verfassen des Manuskripts und bei dessen Korrekturlesen bei.

6.3 Etablierung von neuen Methoden

Die Transverse Aortic Constriction als Modell für die Druck-induzierte linksventrikuläre Hypertrophie wurde von Nick Lasse Beetz in dem Forschungslabor neu etabliert. Der Autor verifizierte den Erfolg der neuen Methode mittels histologischer Auswertungen, Gewichtsmessungen und Bestimmung des Herz-Körper-Gewichtverhältnisses. Zusätzlich erarbeitete er ein Standard-Operation-Protokoll, das seither für weitere Versuche mit der entsprechenden Methode genutzt wird. Durch Verbesserung einzelner Operationsschritte (verkürzte partielle Sternotomie, Positionierung der Einzelknopfnähte, etc.) und Optimierung des perioperativen Ablaufs (steriles Vorgehen, Optimierung des perioperativen Schmerzmanagements) konnte der Autor ein zunehmend verbessertes Überleben der Tiere erreichen.

Auch im Labor der Nuklearmedizin war das Modell der Transverse Aortic Constriction nicht etabliert. Hier führte Nick Lasse Beetz erstmalig zusätzliche Untersuchungen mittels PET durch und konnte erstmalig zeigen, dass die ^{18}F -FDG micro-PET im Mausmodell ein geeignetes Instrument ist, um die linksventrikuläre Hypertrophie und die damit einhergehende Fibrose im Verlauf und *in vivo* zu überwachen.

7 Zusammenfassung der Veröffentlichungen

Bei der Pathogenese der Herzinsuffizienz spielen die linksventrikuläre Hypertrophie und die zunehmende kardiale Fibrosierung eine entscheidende Rolle. Dies trifft besonders in den häufigen kardiovaskulären Erkrankungen wie die arterielle Hypertonie und die Aortenklappenstenose zu, die eine Druck-induzierte kardiale Hypertrophie verursachen.

Zwar konnte in den letzten Jahren durch eine konservativ-medikamentöse Therapie mittels Betablocker, ACE-Hemmern, Sartanen, Aldosteron-Antagonisten und dem Neprilysin-Inhibitor Sacubitril die Prognose bei Herzinsuffizienz deutlich verbessert werden. Allerdings ist selbst nach Behandlung der ursächlichen Erkrankungen, das heißt operativer beziehungsweise interventioneller Aortenklappenersatz oder optimale Einstellung des arteriellen Blutdrucks, eine komplette Regeneration vom maladaptiven Remodelling im Myokard nicht möglich. Dabei korreliert der Grad der myokardialen Fibrosierung mit dem Stadium der Herzinsuffizienz nach NYHA.

In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, dass nach einem Myokardinfarkt mit der Mobilisierung von Knochenmarksstammzellen in das Blut durch das hämopoetische Zytokin G-CSF ein verbessertes Überleben und eine verbesserte myokardiale Funktion erreicht werden kann. Darüber hinaus konnte ein antifibrotischer Effekt von G-CSF in der ischämischen Kardiomyopathie nachgewiesen werden. Offen ist bisher, welchen Effekt G-CSF im Mausmodell der kardialen Hypertrophie hat.

Der Grad der Fibrose wird im experimentellen Kontext meistens mittels histopathologischer Bestimmung *ex vivo* analysiert. Eine individuelle Bestimmung eines möglichen Therapieerfolges lässt sich somit nicht nachweisen. Bezüglich der linksventrikulären Hypertrophie ist es dagegen zum Beispiel mittels echokardiographischen oder magnetresonanztomographischen Untersuchungen möglich *in vivo* eine Dynamik zu erkennen. Zum gleichzeitigen *in vivo* Monitoring der linksventrikulären Hypertrophie und der kardialen Fibrose ist die ¹⁸F-FDG micro-PET als diagnostische Bildgebung bisher nicht untersucht und etabliert.

Die erste Arbeit (Huber BC* and Beetz NL* et al., 2015) beruhte auf der Arbeitshypothese, dass durch die Gabe von G-CSF ein antifibrotischer und antihypertropher Effekt im Mausmodell der kardialen Hypertrophie induziert werden kann. Insbesondere die G-CSF induzierte Mobilisierung von Knochenmarksstammzellen in die Blutstrombahn und die konsekutive Einwanderung in das geschädigte Myokard waren hierbei das Hauptinteresse.

Die linksventrikuläre Hypertrophie wurde bei C57BL/6J Mäusen durch die Transverse Aortic Constriction induziert. Vier Wochen nach der Operation wurden die Mäuse über einen Zeitraum von zwei Wochen mit G-CSF behandelt. Anschließend wurde die Menge an eingewanderten Knochenmarksstammzellen im Myokard durch Durchflusszytometrie gemessen. Die Expression von mRNA wurde mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion und die Proteinlevel von verschiedenen Wachstumsfaktoren anhand Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay analysiert. Außerdem wurden 8 Wochen nach erfolgter Transverse Aortic Constriction die Herzfunktion anhand der Echokardiographie untersucht und eine histopathologische Begutachtung durchgeführt.

Mit G-CSF therapierte Tiere zeigten eine signifikant verstärkte Einwanderung von VLA-4+ und c-kit+ Knochenmarksstammzellen in das hypertrophierte Myokard. Dies ging einher mit einer erhöhten Expression von mRNA und erhöhten Proteinlevels der korrespondierenden Homing-Faktoren VCAM-1 und SCF in dem hypertrophierten Myokardium.

Echokardiographisch zeigte sich, dass die systolische linksventrikuläre Funktion nach Transverse Aortic Constriction durch eine Therapie mit G-CSF im Gegensatz zur Kontrollgruppe erhalten werden konnte. Dies korrelierte histologisch mit signifikant reduzierten Fibrosearealen im Vergleich zur Kontrollgruppe, die mit Saline behandelt wurde. Zudem konnte die Therapie mit G-CSF ein signifikant verbessertes Überleben der Mäuse nach der Transverse Aortic Constriction erzielen.

Ziel der zweiten Arbeit (Todica A et al., 2017) war es, am Mausmodell der linksventrikulären Hypertrophie die linksventrikuläre Funktion, die Menge an Narbengewebe und das Ausmaß der Hypertrophie durch ¹⁸F-FDG micro-PET zu analysieren. Ergänzend wurde erforscht, ob sich die ¹⁸F-FDG micro-PET als diagnostisches Verfahren zum Monitoring der linksventrikulären Hypertrophie und kardialen Fibrose *in vivo* eignet.

Die linksventrikuläre Hypertrophie wurde ebenfalls bei C57BL/6 Mäusen durch Transverse Aortic Constriction induziert. Nach jeweils vier und acht Wochen wurden EKG-getriggerte micro-PET mit ¹⁸F-FDG durchgeführt und der Grad der Fibrose im Myokard histopathologisch ausgewertet. Die linksventrikulären Funktionsparameter und die Narbenlast wurden mittels „Quantitative Gated SPECT“ / „Quantitative Perfusion SPECT“ und linksventrikulären metabolischen Volumen berechnet. Der Prozentanteil der injizierten Dose pro Gramm wurde anhand der Schwellenwertanalyse ermittelt.

Das Fibrosevolumen zeigte sich im Vergleich von vier Wochen und acht Wochen nach erfolgter Transverse Aortic Constriction signifikant erhöht. Zudem zeigte sich eine

signifikante Erhöhung des enddiastolischen Volumens und des linksventrikulären metabolischen Volumens sowie eine signifikante Reduktion der linksventrikulären systolischen Funktion. Die Zunahme des linksventrikulären metabolischen Volumens hatte einen hohen prädiktiven Wert für das *ex vivo* gemessene Fibrosevolumen. Die myokardialen metabolischen Defekte nahmen innerhalb der vier Wochen zu, was moderat mit dem Fibrosevolumen korrelierte. Die Steigerung des enddiastolischen Volumens hatte eine positive Korrelation mit der Zunahme der Fibrose.

Zusammenfassend zeigen die beiden vorliegenden Arbeiten, dass die Behandlung mit G-CSF in der Druck-induzierten kardialen Hypertrophie die kardiale Funktion erhalten und die kardiale Fibrose vermindern kann. Dies ist mit einer erhöhten Einwanderung von VLA-4+ und c-kit+ Knochenmarksstammzellen und deren entsprechenden Homing-Faktoren VCAM-1 und SCF verbunden. Außerdem ist die ¹⁸F-FDG micro-PET für das *in vivo* Monitoring im Mausmodell der kardialen Hypertrophie anwendbar. Die linksventrikuläre Hypertrophie, die Dilation des linken Ventrikels und die Verschlechterung der systolischen linksventrikulären Funktion sowie die Entwicklung der lokalisierten Fibrose konnten zuverlässig über die Zeit quantifiziert werden.

8 Summary of the publications

Left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis play a major role in the pathogenesis of heart failure, especially in pressure overload induced cardiomyopathies. Pressure overload may be induced by arterial hypertension or aortic stenosis.

In recent years, optimal medical treatment by beta-blockers, sartans, ACE-inhibitors, aldosterone-antagonist and the neprilysin inhibitor sacubitril has improved the prognosis of heart failure. However, even after treatment of the underlying cardiovascular disease by optimal setting of blood pressure or operative / interventional aortic valve replacement, a complete reversing of cardiac remodeling is not possible. In fact, the degree of cardiac fibrosis correlates with the NYHA class of heart failure.

In the past, it has already been proven that G-CSF is able to promote mobilization of bone marrow-derived stem cells into the bloodstream. This mobilization is associated with an improvement of survival and cardiac function after myocardial infarction. Furthermore, G-CSF has been shown to have an antifibrotic effect in ischemic cardiomyopathies. Nonetheless, the role of G-CSF in left ventricular hypertrophy remains unclear.

In experimental settings, the degree of fibrosis is most often evaluated *ex vivo* by histopathological analysis. Therefore, an individual follow-up of a possible therapy success regarding fibrosis is not possible. A dynamic evaluation of left ventricular hypertrophy can be assessed *in vivo* by echocardiography or magnetic resonance imaging. For a combined monitoring of left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis *in vivo*, positron emission tomography has not yet been studied or established.

In the first publication (Huber BC* and Beetz NL* et al., 2015), we wanted to investigate the antifibrotic and antihypertrophic effects of G-CSF in a mouse model of pressure-induced left ventricular hypertrophy. We were mainly interested in the G-CSF induced mobilization of bone marrow cells and the consecutive homing and migration into the damaged myocardium. Four weeks after induction of left ventricular hypertrophy by transverse aortic constriction, C57BL/6J mice were treated with G-CSF for two weeks. The number of migrated bone marrow cells into the heart was counted by flow cytometry. Protein level and mRNA expression of various growth factors in the myocardium were analyzed by ELISA and RT-PCR. Echocardiography and histopathological analysis were performed eight weeks after transverse aortic constriction.

Mice treated with G-CSF revealed augmented homing of VLA-4+ and c-kit+ bone marrow cells. This increase was associated with enhanced mRNA expression and protein level of the corresponding homing factors VCAM-1 and SCF in the hypertrophic myocardium. In addition, G-CSF treatment showed a significant preservation of left ventricular systolic function after transverse aortic constriction, a significant reduction of fibrosis area and a significant improved survival after transverse aortic constriction.

The aim of the second publication (Todica A et al., 2017) was to analyze the left ventricular systolic function, scar load and hypertrophy in pressure-overload left ventricular hypertrophy over the course of eight weeks using ¹⁸F-FDG micro-PET. Additionally, we investigated whether ¹⁸F-FDG micro-PET is suitable for *in vivo* monitoring of left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis.

Four and eight weeks after transverse aortic constriction in C57BL/6 mice, ECG-gated micro-PET scans with ¹⁸F-FDG were performed. Fibrosis was measured by histopathologic analysis, whereas left ventricular parameters and scar load were calculated using “Quantitative Gated SPECT” / “Quantitative Perfusion SPECT”. Threshold based analysis was used for estimation of left ventricular metabolic volume and percentage injected dose per gram.

In comparison from four weeks to eight weeks after transverse aortic constriction the fibrotic tissue volume increased significantly. There was also a significant increase of the end-diastolic volume and left ventricular metabolic volume. Functionally, there was a significant decrease of left ventricular systolic function. Left ventricular metabolic volume had a high predictive value for the *ex vivo* measured fibrosis volume. Moreover, there was an increase in myocardial metabolic defects within four weeks, which only moderately correlated with the fibrosis volume. Increased end-diastolic volumes positively correlated with the fibrosis at eight weeks.

In summary, the published data suggest that G-CSF treatment in pressure-overload induced cardiac hypertrophy preserves cardiac function and reduces cardiac fibrosis. This is associated with an enhanced homing of VLA-4+ and c-kit+ bone marrow cells and increased expression of their corresponding homing factors VCAM-1 and SCF. Furthermore, ¹⁸F-FDG micro-PET may be used for *in vivo* monitoring of left ventricular hypertrophy, left ventricular dilation, left ventricular systolic function and development of fibrosis.

9 Veröffentlichung I (Huber BC* and Beetz NL* et al., 2015)

Attenuation of cardiac hypertrophy by G-CSF is associated with enhanced migration of bone marrow-derived cells

Bruno C. Huber^{a, #}, Nick L. Beetz^{a, #}, Alexandra Laskowski^a, Tilman Ziegler^a, Ulrich Grabmaier^a, Christian Kupatt^a, Nadja Herbach^b, Ruediger Wanke^b, Wolfgang-Michael Franz^c, Steffen Massberg^a, Stefan Brunner^{a, *}

^a *Medical Department I, Campus Grosshadern and Campus Innenstadt, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany*

^b *Institute of Veterinary Pathology, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany*

^c *Department of Internal Medicine III, Cardiology and Angiology, Medical University Innsbruck, Innsbruck, Austria*

Received: July 30, 2014; Accepted: October 20, 2014

Abstract

Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) has been shown to promote mobilization of bone marrow-derived stem cells (BMCs) into the bloodstream associated with improved survival and cardiac function after myocardial infarction. Therefore, the aim of the present study was to investigate whether G-CSF is able to attenuate cardiac remodelling in a mouse model of pressure-induced LV hypertrophy focusing on mobilization and migration of BMCs. LV hypertrophy was induced by transverse aortic constriction (TAC) in C57BL/6J mice. Four weeks after TAC procedure. Mice were treated with G-CSF (100 µg/kg/day; Amgen Biologicals) for 2 weeks. The number of migrated BMCs in the heart was analysed by flow cytometry. mRNA expression and protein level of different growth factors in the myocardium were investigated by RT-PCR and ELISA. Functional analyses assessed by echocardiography and immunohistochemical analysis were performed 8 weeks after TAC procedure. G-CSF-treated animals revealed enhanced homing of VLA-4⁺ and c-kit⁺ BMCs associated with increased mRNA expression and protein level of the corresponding homing factors Vascular cell adhesion protein 1 and Stem cell factor in the hypertrophic myocardium. Functionally, G-CSF significantly preserved LV function after TAC procedure, which was associated with a significantly reduced area of fibrosis compared to control animals. Furthermore, G-CSF-treated animals revealed a significant improvement of survival after TAC procedure. In summary, G-CSF treatment preserves cardiac function and is able to diminish cardiac fibrosis after induction of LV hypertrophy associated with increased homing of VLA-4⁺ and c-kit⁺ BMCs and enhanced expression of their respective homing factors VCAM-1 and SCF.

Keywords: G-CSF • hypertrophy • BMCs • migration • fibrosis

Introduction

LV hypertrophy accompanied by interstitial myocardial fibrosis is one of the main reasons for heart failure in patients with arterial hypertension and aortic stenosis (AS) [1]. Moreover, it has been shown that cardiac fibrosis is an important morphological substrate of postoperative clinical outcome in patients with severe AS and is not completely reversible after aortic valve replacement [2]. No medical therapies are particularly effective for retarding and reversing this maladaptive

remodelling in patients with LV hypertrophy [3]. Therefore, there is a great interest in new strategies to qualitatively and quantitatively alter collagen production and turnover, as well as to modify different extracellular matrix (ECM) components, which are crucial in mediating myocardial hypertrophy and fibrosis [4].

In the last years, regeneration of ischaemic myocardial tissue has been attempted using bone marrow-derived stem cells (BMCs) and pluripotent stem cells [5, 6]. As an alternative to the direct intramyocardial injection [7, 8], mobilization of BMCs using growth factors, such as the hematopoietic cytokine granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), have been successfully utilized [9–11]. Migration of circulating mobilized BMCs from the bloodstream into the damaged tissue is suggested to play a key role for tissue regeneration [12]. The interaction of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) with its ligand chemokine receptor type 4 (CXCR4) on mobilized hematopoietic progenitor cells has been shown to play a major role in migration

#Contributed equally to this work.

*Correspondence to: Dr. Med. Stefan BRUNNER, Medizinische Klinik und Poliklinik I, Klinikum Großhadern, Marchioninstr. 15, 81377 Munich, Germany.
Tel.: 0049 89 4400 7 6074
Fax: 0049 89 4400 7 6100
E-mail: stefan.brunner@med.uni-muenchen.de

© 2015 The Authors.

Journal of Cellular and Molecular Medicine published by John Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

doi: 10.1111/jcmm.12494

of BMCs into ischaemic myocardium [11, 13]. G-CSF administration after acute myocardial infarction (MI) resulted in diminished stem cell homing caused by the N-terminal cleavage of SDF1 [14] and this could be one explanation for the poor clinical results of patients treated with G-CSF post MI [15]. However, in non-ischaemic cardiomyopathy the interaction of SDF-1 with CXCR4 seems not to be involved in a cardiac self-repair mechanism, because cardiac SDF-1 expression was not up-regulated in dilated cardiomyopathy (DCM) hearts of humans [16].

There is first evidence that G-CSF might be a promising therapeutic agent to treat congestive heart failure because of cardiac hypertrophy and fibrosis. Szardien *et al.* were able to demonstrate that G-CSF leads to the regression of myocardial fibrosis and improves cardiac function after pressure unloading in mice [17]. However, the exact mechanisms of fibrosis regression after G-CSF treatment are still unclear.

Therefore, the aim of our study was to investigate whether G-CSF is able to attenuate cardiac hypertrophy and fibrosis in a mouse model of pressure-induced LV hypertrophy induced by transverse aortic constriction (TAC). Moreover, we wanted to exploit whether and how G-CSF is facilitating enhanced migration of BMCs after TAC procedure. To avoid impairing the cellular setting of this hypertrophy model and to ensure all findings are caused by the treatment only, we did not perform pressure unloading.

Material and methods

Animal model

As a model for pressure-induced LV hypertrophy, C57Bl/6 wild-type mice (Charles River Laboratories, Sulzbach, Germany) were subjected to TAC. All mice used in this study were 8–10 weeks old healthy males. Mice were anesthetized by an intra-peritoneal (i.p.) injection of a mixture of Medetomidine (Domitor[®], Pfizer, Berlin, Germany), Midazolam (Midazolam ratiopharm[®], Ratiopharm, Ulm, Germany) and Fentanyl (Fentanyl-Janssen[®], Janssen-Cilag, Neuss, Germany). Mice were placed in supine position on a heating pad and temperature was maintained at 37°C. For the surgical procedure mice were intubated, and artificially ventilated by a mouse ventilator (MiniVent, HUGO SACHS, March, Germany) with 200 strokes/min. and 200 µl/stroke. A short skin cut longitudinal to the sternum was followed by a 3–4 mm long sectioning of the cranial sternum. The thymus lobes were separated and secured by two retractors, giving a free view of the aortic arch. Between the right brachiocephalic artery and the left common carotid artery, the transverse aorta was carefully mobilized by forceps, allowing to navigate a silk thread (6-0 polypropylene suture) behind the aorta. For constriction, a 27-gauge needle was placed between transverse aorta and silk thread before instrument tying. The removal of the needle ensured a standardized diameter of 0.4 mm of the transverse aorta. The sternum was adapted with a 5-0 polypropylene suture. The skin was closed with a 5-0 silk suture and mice were allowed to recover from anaesthesia on the heating pad. Animal care and all experimental procedures were performed in strict accordance to the German and National Institutes of Health animal legislation guidelines and were approved by the local animal care committees (Regierung von Oberbayern). The investigation conforms to the Guide for the Care and Use of

Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

Administration of G-CSF

4 weeks after TAC procedure, mice were randomly divided into the following groups, each treated for 2 weeks, receiving five injections per week: (i) subcutaneous administration of saline (0.9% NaCl) and (ii) administration of G-CSF (100 µg/kg/day; Amgen Biologicals, Thousand Oaks, CA, USA).

Flow cytometry of non-myocyte cardiac cells

For analysis of BMCs within the hearts, a 'myocyte-depleted' cardiac cell population was prepared, incubating minced myocardium in 0.1% collagenase IV (GIBCO BrL., Carlsbad, CA, USA) 30 min. at 37°C, lethal to most adult mouse CMs. Cells were then filtered through a 70 µm mesh. To exclude spurious effects of enzymatic digestion, BM cells with or without collagenase treatment were stained revealing no significantly changed staining of labelled cell antigens. Mononuclear cells were separated by density-gradient centrifugation using 1.077 g/ml Histopaque solution (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA), purified, and resuspended in PBS containing 1% BSA. Cells were incubated for 40 min. in the dark at 4°C with the following fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) and peridininchlorophyll-protein (PerCP) conjugated monoclonal antibodies: CD45-PerCP, CD34-FITC, VLA-4-PE, c-kit-PE and CXCR4-PE (all from BD Pharmingen). Matching isotype antibodies (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) served as controls. Cells were analysed by three-colour flow cytometry using a Coulter[®] Epics[®]XL-MCLTM flow cytometer (Beckman Coulter, Cincinnati, OH, USA). Each analysis included 50,000 events.

Quantitative RT-PCR and ELISA

Hearts were explanted and the LVs were separated. Isolation of total RNA from mouse heart tissue was performed with TRI REAGENT (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA) according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription was performed with the ImProm-ITM Reverse Transcription System (Promega, Fitchburg, WI, USA) according to the manufacturer's protocol. cDNA samples were analysed by quantitative RT-PCR using adequate murine primers purchased from MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, Germany. Quantitative RT-PCR was performed with SYBR Green Reaction Mix (Eurogentec, Cologne, Germany) on an ABI PRISM 7900HT Detection System (Applied Biosystems, Carlsbad, Germany). Each sample was run in duplicate. The expression of each gene within the different tissue samples was quantified relative to H4 mRNA expression levels according to the Sequence Detector User Bulletin (Applied Biosystems).

VCAM-1 and SCF protein levels were quantified using commercially available kits (R&D Systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions.

Histopathology

8 weeks after the TAC procedure, hypertrophic hearts were extracted after perfusion fixation *via* blood flow. Before punctuating the right ventricle,

hepatic veins were cut. First, the hearts were cleaned from blood with PBS buffer for 1 min. Then perfusion fixation started with formalin (4%) for 5 min. After carefully dissecting the LV, it was embedded in formalin (4%) for 24 hrs and afterwards in paraffin. 5 µm thick sections were stained with hematoxylin/eosin and Masson's trichrome. Fibrosis was measured using a blinded counting system. For detection of apoptotic nuclei, a terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling (TUNEL) was used, allowing to identify DNA fragmentation.

Echocardiographic imaging

Transthoracic echocardiography was performed with a Vevo2100 imaging system (Visual Sonics, Toronto, ON, Canada) using a 40 MHz transducer. Therefore, mice were placed on a heating pad, maintaining a body temperature of 37°C and providing ECG-triggered analysis of heart function. After chemical depilation of the chest, mice were prepared for echocardiography with ultrasound gel. Mice were sedated with 2% isoflurane in 100% O₂ at all times. Ejection fraction (EF) was evaluated by planimetric measurement in the parasternal long-axis (Simpson method). For evaluation of EF, three consecutive cycles were measured and averaged. Diastolic thickness of the LV posterior wall (LVPW) was measured in the parasternal short-axis. The measurements were performed twice by two blinded investigators.

Statistical analysis

Data are shown as mean ± SEM. Multiple group comparison was performed by one-way ANOVA followed by the Bonferroni procedure for comparison of means. Comparisons between two groups were performed with the unpaired *t*-test. Analysis of survival was performed by the Kaplan–Meier method. Between-group difference in survival was tested with the log-rank test. Values of *P* < 0.05 were considered statistically significant.

Results

BMCs in hearts of mice with induced cardiac hypertrophy

To analyse the influence of cardiac hypertrophy on migration of BMCs (CD45⁺/CD34⁺ cells), we performed flow cytometry of a myocyte-depleted fraction of cardiac cells. In mice with cardiac hypertrophy the number of migrated CD45⁺ CD34⁺ VLA-4⁺ and CD45⁺ CD34⁺ c-kit⁺ cells was significantly increased compared to healthy control mice (Fig. 1A and B), whereas the number of CD45⁺ CD34⁺ CXCR4⁺

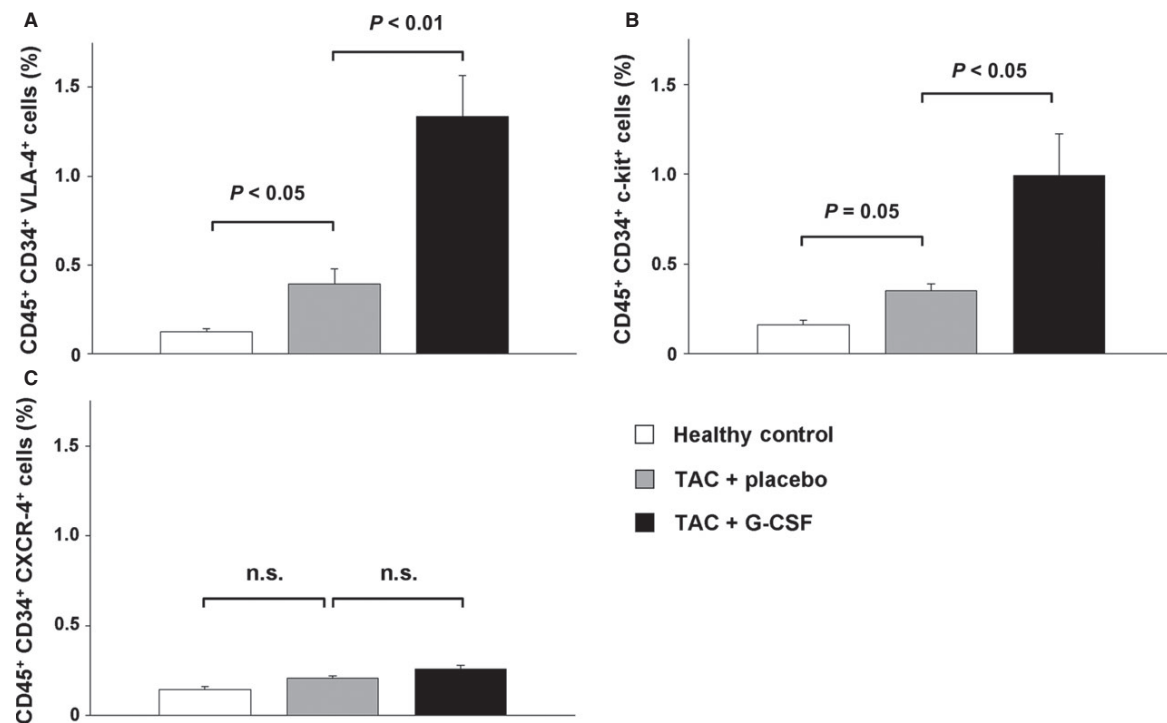


Fig. 1 Bone marrow-derived progenitor cells in the heart of healthy control mice (white bar), placebo treated mice with induced cardiac hypertrophy (TAC + placebo, grey bar) and G-CSF treated mice with induced cardiac hypertrophy (TAC + G-CSF, black bar). (A) CD45⁺ CD34⁺ VLA-4⁺ cells. (B) CD45⁺ CD34⁺ c-kit⁺ cells. (C) CD45⁺ CD34⁺ CXCR4⁺ cells. All cell populations are presented in % of mononuclear cells in the heart.

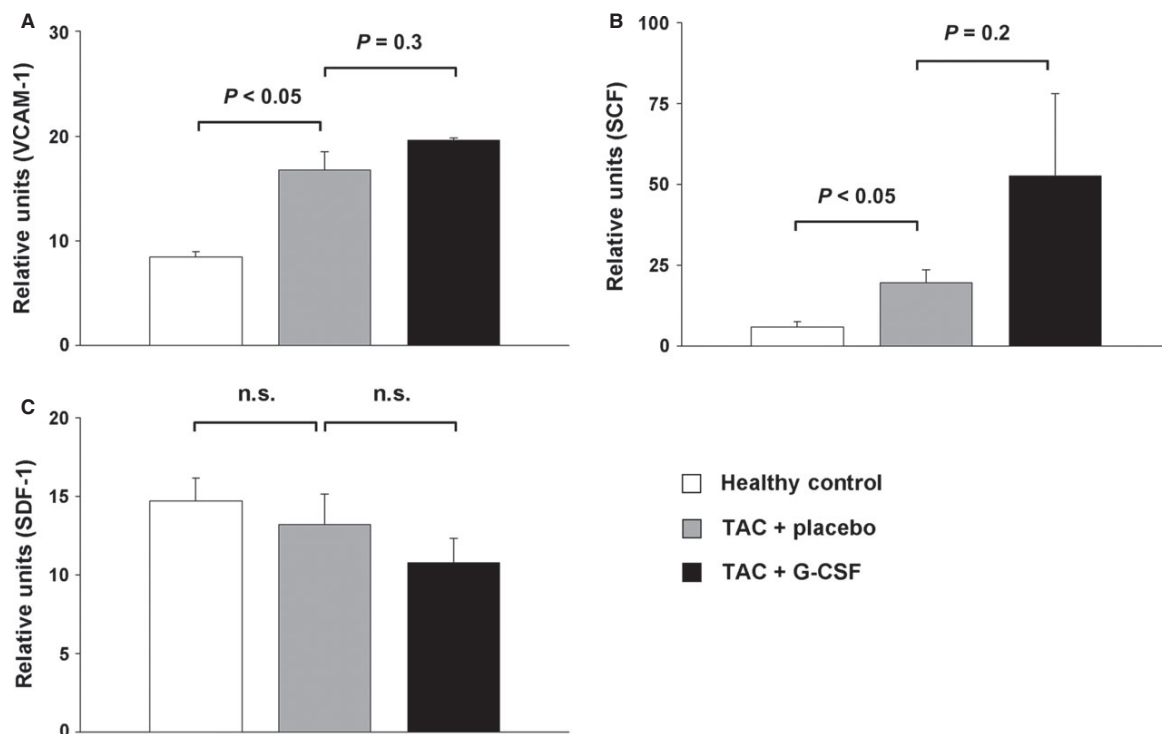


Fig. 2 Expression of homing factors in the heart of healthy control mice (white bar), placebo treated mice with induced cardiac hypertrophy (TAC + placebo, grey bar), and G-CSF treated mice with induced cardiac hypertrophy (TAC + G-CSF, black bar). (A) mRNA expression levels of VCAM-1. (B) mRNA expression levels of SCF. (C) mRNA expression levels of SDF-1.

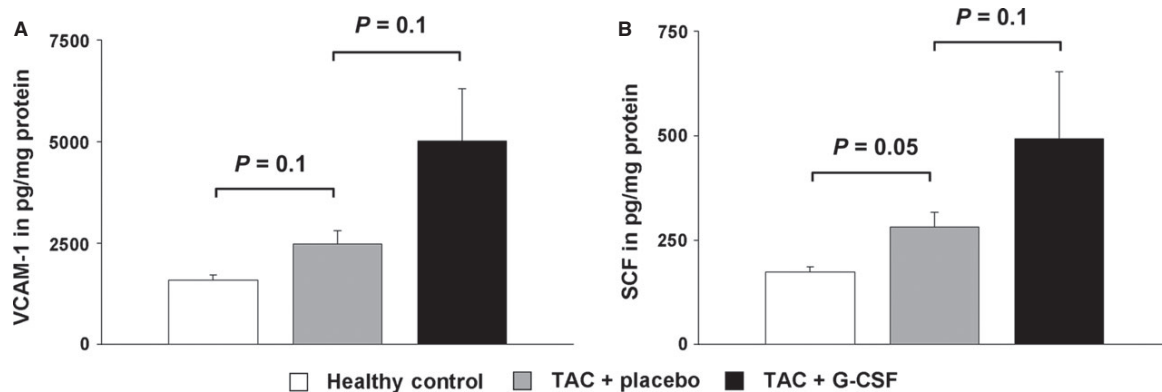


Fig. 3 Protein levels in the heart of healthy control mice (white bar), placebo treated mice with induced cardiac hypertrophy (TAC + placebo, grey bar), and G-CSF treated mice with induced cardiac hypertrophy (TAC + G-CSF, black bar) analysed by ELISA. (A) Protein levels of VCAM-1. (B) Protein levels of SCF.

cells showed no difference (Fig. 1C). G-CSF treatment in mice with cardiac hypertrophy further markedly increased the number of CD45⁺ CD34⁺ VLA-4⁺ cells (3.4-fold; $P < 0.01$) and CD45⁺ CD34⁺

c-kit⁺ cells (2.8-fold; $P < 0.05$; Fig. 1A and B). The number of CD45⁺ CD34⁺ CXCR4⁺ cells was not affected by the treatment with G-CSF (Fig. 1C).

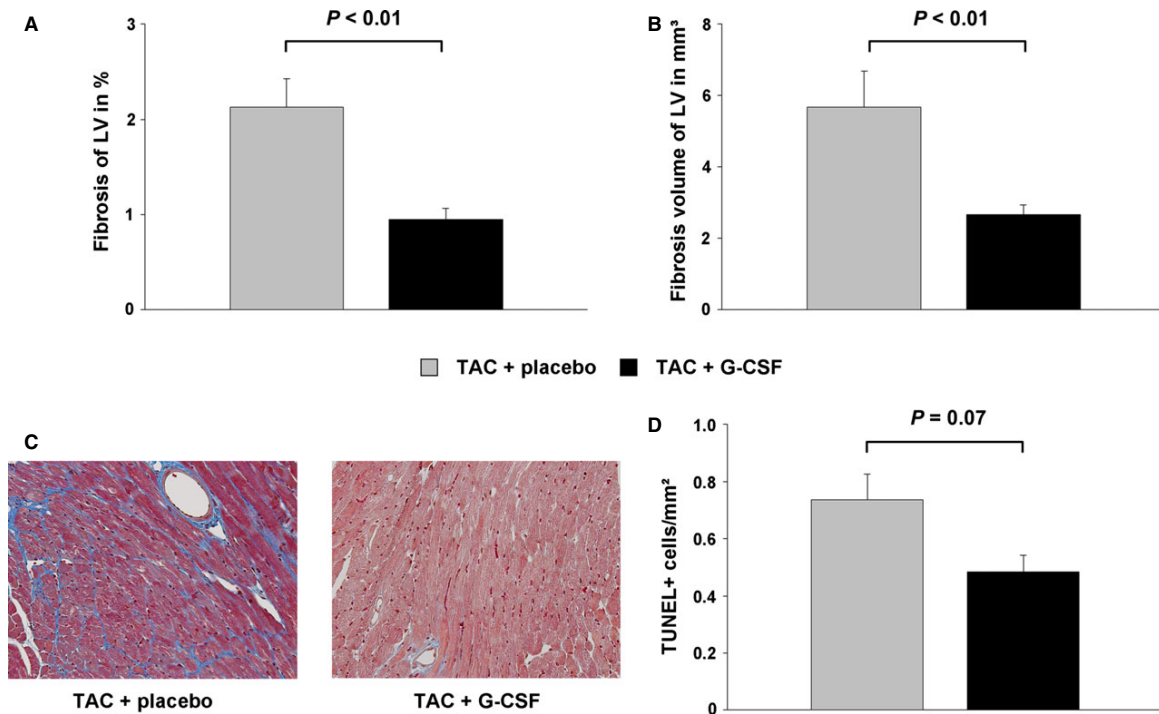


Fig. 4 Intramyocardial fibrosis and apoptosis in the LV analysed by histology in placebo treated mice with induced cardiac hypertrophy (TAC + placebo, grey bar), and G-CSF treated mice with induced cardiac hypertrophy (TAC + G-CSF, black bar). **(A)** Fibrosis of the LV in %. **(B)** Fibrosis volume of the LV in mm³. **(C)** Representative histological images of placebo treated mice (left) and G-CSF treated mice (right). **(D)** Number of TUNEL-positive cells/mm².

Expression of myocardial homing factors in mice with induced cardiac hypertrophy

To investigate potential migration pathways involved in cardiac hypertrophy, we analysed murine hearts for the expression of myocardial homing factors (VCAM-1, SCF, SDF-1) interacting with the measured subpopulations of BMCs using quantitative RT-PCR. The expression levels of VCAM-1 (interacting with VLA-4) and SCF (interacting with c-kit) were significantly up-regulated in mice with induced cardiac hypertrophy compared to healthy controls (Fig. 2A and B). The expression level of SDF-1 (interacting with CXCR4) showed no difference between mice with cardiac hypertrophy and healthy controls (Fig. 2C). G-CSF treatment in mice with cardiac hypertrophy showed a further increase of VCAM-1 and SCF, but without significance (Fig. 2A and B). G-CSF treatment did not affect the expression levels of SDF-1 (Fig. 2C).

Protein levels of VCAM-1 and SCF in mice with induced cardiac hypertrophy

To confirm these findings, we analysed VCAM-1 and SCF on protein levels using ELISA. VCAM-1 and SCF concentrations were increased in mice with cardiac hypertrophy compared to healthy

control mice. G-CSF treatment showed a further increase in protein levels of VCAM-1 and SCF in murine hearts (Fig. 3).

Impact of G-CSF therapy on myocardial fibrosis and apoptosis in mice with cardiac hypertrophy

To visualize the impact of G-CSF on myocardial fibrosis and apoptosis in cardiac hypertrophy, the murine hearts were analysed by histology. The percentage of intramyocardial fibrosis of the LV was significantly reduced in G-CSF treated mice ($0.95 \pm 0.11\%$ versus $2.13 \pm 0.30\%$; $P < 0.01$; Fig. 4A). The fibrosis volume of the LV, expressed in mm³, was also significantly reduced in G-CSF treated mice ($2.67 \pm 0.27 \text{ mm}^3$ versus $5.67 \pm 1.02 \text{ mm}^3$; $P < 0.01$; Fig. 4B and C). The number of TUNEL-positive nuclei was reduced in G-CSF treated mice ($0.49 \pm 0.06 \text{ TUNEL}^+ \text{ cells/mm}^2$, versus $0.74 \pm 0.09 \text{ TUNEL}^+ \text{ cells/mm}^2$), although the difference was not significant ($P < 0.07$; Fig. 4D).

Echocardiographic parameters in mice with cardiac hypertrophy

Cardiac parameters were assessed by echocardiography before and after G-CSF/placebo-treatment. The LVPW thickness was significantly

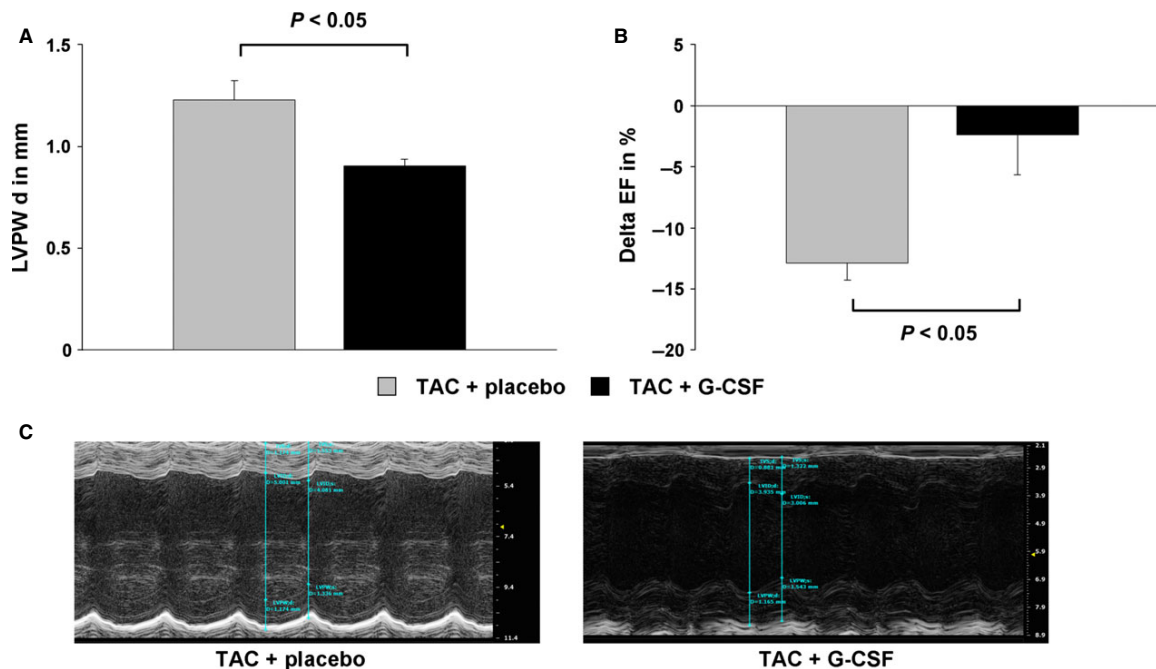


Fig. 5 Echocardiographic results in placebo treated mice with induced cardiac hypertrophy (TAC + placebo, grey bar), and G-CSF treated mice with induced cardiac hypertrophy (TAC + G-CSF, black bar). **(A)** Enddiastolic diameter of the LV posterior wall (LVPW d) after treatment with placebo or G-CSF. **(B)** Difference of ejection fraction (EF) before and after treatment with placebo or G-CSF expressed as Delta EF. **(C)** Representative echocardiogram (M-mode) of mice after TAC procedure and treatment with placebo or G-CSF.

reduced in G-CSF treated mice compared to the control group (-26% ; $P < 0.05$; Fig. 5A). EF in the G-CSF treated group decreased by $2.37\% \pm 3.31\%$ (Delta-EF concerning the difference of EF before treatment and EF 4 weeks later). In contrast, EF in the control group decreased by $12.85\% \pm 1.40\%$ (Delta-EF; Fig. 5B and C).

Cumulative survival 4 weeks after initiation of treatment

Cumulative survival of G-CSF as well as saline treated mice was recorded for 4 weeks after initiation of treatment. Mortality increased continuously throughout the recorded 4 weeks in both groups. However, G-CSF treated groups showed a significantly improved survival (61.8% versus 79.2% ; Fig. 6).

Discussion

In the present study, we wanted to investigate whether G-CSF is able to attenuate cardiac hypertrophy and fibrosis in a mouse model of pressure-induced LV hypertrophy induced by TAC. Our main findings were the following: (i) G-CSF administration significantly increased homing of VLA-4⁺ and c-kit⁺ BMCs to the hypertrophic heart after

TAC procedure. (ii) mRNA and Protein levels of VCAM-1- the ligand of VLA-4 and SCF- the ligand of c-kit were increased after G-CSF stimulation in the hypertrophic myocardium. (iii) G-CSF significantly reduced the area of fibrosis compared to untreated controls. (iv) Functionally, G-CSF significantly improved survival and preserved LV function after TAC procedure.

In the last years, several studies focused on the endogenous repair mechanisms after mobilization of BMCs by cytokines, like G-CSF [9, 11, 18], parathyroid hormone [10, 13, 19, 20] or erythropoietin [21, 22] in ischaemic diseases like MI. It could be clearly demonstrated that the interaction of SDF-1 with its ligand CXCR4 plays a major role in the migration of BMCs into ischaemic cardiac tissue, which was associated with attenuated remodelling and improved function [12, 23]. However, in non-ischaemic cardiomyopathies like DCM the interaction of SDF-1 with CXCR4 does not seem to be the important driver of migration, because SDF-1 expression was not up-regulated in cardiac tissue of humans and mice with DCM [16, 24].

In our study, G-CSF treatment after pressure-induced LV hypertrophy significantly increased the amount of VLA-4⁺ and c-kit⁺ BMCs in the heart, whereas the number of CXCR4⁺ BMCs remained unchanged. In line with these results, we detected increased mRNA and protein expression of two corresponding homing factors VCAM-1 – the ligand of VLA-4 and SCF – the ligand of c-kit in the hypertrophic heart. Recently, Brunner *et al.*

Fig. 6 Cumulative survival of placebo treated mice with induced cardiac hypertrophy (TAC + placebo), and G-CSF treated mice with induced cardiac hypertrophy (TAC + G-CSF).

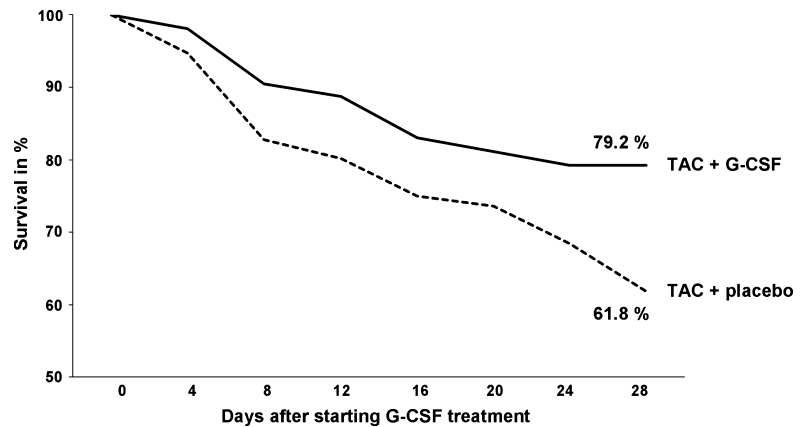
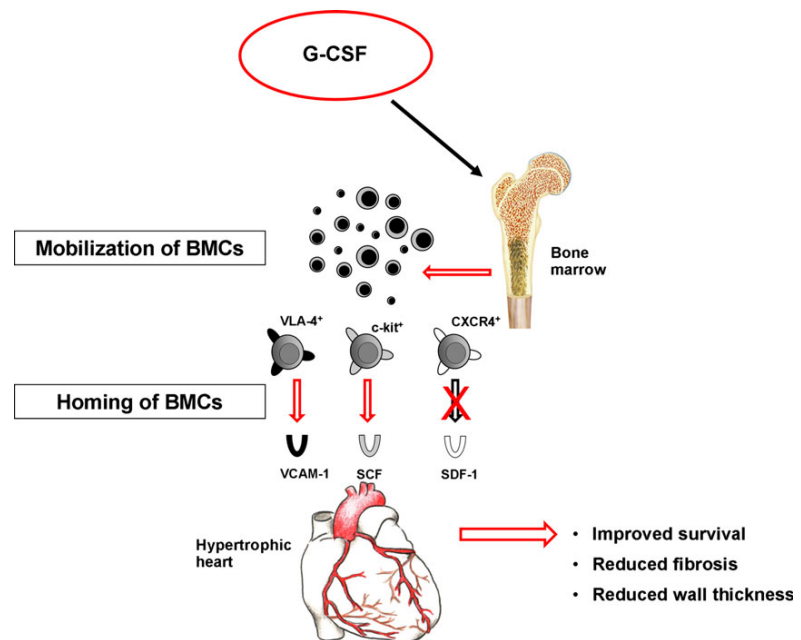


Fig. 7 Suggested mechanism of G-CSF-mediated cardioprotection after TAC-induced hypertrophy. G-CSF administration after TAC induces mobilization of stem cells from the BM to the peripheral blood. These stem cells migrate to the hypertrophic heart via the VLA-4/VCAM-1 and c-kit/SCF axes. The interaction of SDF-1 with CXCR4 seems not to be involved in this process.



were able to demonstrate in a murine model of virus-induced DCM that G-CSF-induced VCAM-1/VLA-4 interaction is crucial for the recruitment of circulating BMCs to the myocardium [24]. Notably, they could not detect increased numbers of c-kit⁺ or enhanced expression of SCF, suggesting a different regulation of cytokine profiles after DCM and pressure-induced LV hypertrophy. In contrast to our findings, Szardien *et al.* did not detect significant migration of BMCs 8 weeks after pressure unloading and G-CSF treatment in mice. They used enhanced green fluorescent protein (eGFP)-transgenic mice to track and distinguish the cells of BM origin from sedentary cells in the myocardium [17]. However, two methodological differences might explain the different findings. First, Szardien *et al.* did a debanding 8 weeks after TAC

procedure, which completely changes the cellular composition in the myocardium compared to a chronic pressure overload [25]. Secondly, they did histological analyses 2 weeks after G-CSF pulsing to evaluate a numerical difference in eGFP⁺ cells between study groups. According to previous studies the maximum of mobilization and homing of BMCs occurs early after cytokine treatment [11]. Therefore, they might have missed the peak of cell infiltration within the myocardium.

In accordance with the functional data from Szardien *et al.*, we found a significant preservation of LV function after G-CSF treatment compared to controls. Histologically, there was an attenuated cardiac remodelling reflected by diminished amount of fibrosis. VCAM-1 has been shown to be involved in inflammatory

processes. Recently, it has been demonstrated that VCAM-1/VLA-4 signalling exerts cardioprotective effects through enhanced angiogenesis [26] as well as facilitating survival of cardiomyocytes by activation of Akt, ERK and p38 MAPK [27]. Likewise, G-CSF treatment was able to increase the expression of myocardial anti-apoptotic proteins and decreased TUNEL⁺ nuclei after MI [28]. In this regard, we were interested whether G-CSF affects apoptosis after TAC-induced hypertrophy. Histological analysis of the hypertrophic LV revealed a decreased number of TUNEL⁺ cells reflecting a trend towards diminished apoptosis after G-CSF treatment. Our data also indicate an important role for c-kit⁺ cells, which are attracted by increased SCF protein levels in hypertrophic hearts after G-CSF injections. Fazel *et al.* were able to demonstrate that MI increased the number of c-kit⁺ cells in ischaemic hearts. They used genetic tagging in bone marrow chimeric mice to track these cells back to a bone marrow origin. Intriguingly, the recruited c-kit⁺ cells established a pro-angiogenic milieu in the infarct border zone by increasing VEGF and by reversing the cardiac ratio of angiopoietin-1 to angiopoietin-2 [29]. In this regard, SCF significantly increased matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) mRNA in mouse liver cells [30]. Szardien *et al.* demonstrated that the G-CSF induced degradation of ECM in their model of pressure unloading was caused by an increased activity of both MMP-2 and MMP-9, both physiological enzymes with collagen-degrading properties [31].

In summary, our findings suggest a novel role of G-CSF in regressing fibrosis and preventing heart failure in pressure-induced

cardiac hypertrophy, because of the modulation of cardiac cytokine profiles, which attract beneficial VLA-4⁺ and c-kit⁺ BMCs (Fig. 7). However, it will be the goal of further studies to establish a direct link between cell migration and attenuation of cardiac remodelling after G-CSF treatment in hypertrophic hearts.

Acknowledgements

We thank J. Arcifa for her excellent technical assistance. This work was supported by grants from the Else Kröner-Fresenius-Stiftung and the FöFole Program of LMU Munich.

Conflicts of interest

The authors confirm that there are no conflicts of interest.

Author contribution

B.C.H. and N.L.B: Conception and design, data analysis and interpretation, manuscript writing, final approval of manuscript; A.L., T.Z., U.G., C.K., N.H., R.W., W.M.F., S.M.: Collection and/or assembly of data, final approval of manuscript; S.B.: Conception and design, financial support, manuscript writing, final approval of manuscript. B.C.H. and N.L.B contributed equally to the work.

References

1. Hein S, Arnon E, Kostin S, *et al.* Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation*. 2003; 107: 984–91.
2. Weidemann F, Herrmann S, Stork S, *et al.* Impact of myocardial fibrosis in patients with symptomatic severe aortic stenosis. *Circulation*. 2009; 120: 577–84.
3. Lindman BR, Bonow RO, Otto CM. Current management of calcific aortic stenosis. *Circ Res*. 2013; 113: 223–37.
4. Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest*. 2007; 117: 568–75.
5. Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest*. 2005; 115: 572–83.
6. Steinhauser ML, Lee RT. Cardiovascular regeneration: pushing and pulling on progenitors. *Cell Stem Cell*. 2009; 4: 277–8.
7. Sheikh AY, Huber BC, Narsinh KH, *et al.* *In vivo* functional and transcriptional profiling of bone marrow stem cells after transplantation into ischemic myocardium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012; 32: 92–102.
8. Huber BC, Ransohoff JD, Ransohoff KJ, *et al.* Costimulation-adhesion blockade is superior to cyclosporine A and prednisone immunosuppressive therapy for preventing rejection of differentiated human embryonic stem cells following transplantation. *Stem Cells*. 2013; 31: 2354–63.
9. Deindl E, Zaruba MM, Brunner S, *et al.* G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis. *FASEB J*. 2006; 20: 956–8.
10. Huber BC, Brunner S, Segeth A, *et al.* Parathyroid hormone is a DPP-IV inhibitor and increases SDF-1-driven homing of CXCR4 (+) stem cells into the ischaemic heart. *Cardiovasc Res*. 2011; 90: 529–37.
11. Zaruba MM, Theiss HD, Vallaster M, *et al.* Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction. *Cell Stem Cell*. 2009; 4: 313–23.
12. Zaruba MM, Franz WM. Role of the SDF-1-CXCR4 axis in stem cell-based therapies for ischemic cardiomyopathy. *Expert Opin Biol Ther*. 2010; 10: 321–35.
13. Huber BC, Fischer R, Brunner S, *et al.* Comparison of parathyroid hormone and G-CSF treatment after myocardial infarction on perfusion and stem cell homing. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 298: H1466–71.
14. Honold J, Lehmann R, Assmus B, *et al.* Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) -induced mobilization profoundly impairs functional activities of circulating endothelial progenitor cells in patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation*. 2004; 110: III–279.
15. Engelmann MG, Theiss HD, Hennig-Theiss C, *et al.* Autologous bone marrow stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor after subacute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing late revascularization: final results from the G-CSF-STEMI (Granulocyte Colony-Stimulating Factor ST-Segment Elevation Myocardial Infarction) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48: 1712–21.
16. Theiss HD, David R, Engelmann MG, *et al.* Circulation of CD34⁺ progenitor cell

- populations in patients with idiopathic dilated and ischaemic cardiomyopathy (DCM and ICM). *Eur Heart J.* 2007; 28: 1258–64.
17. **Szardien S, Nef HM, Voss S, et al.** Regression of cardiac hypertrophy by granulocyte colony-stimulating factor-stimulated interleukin-1beta synthesis. *Eur Heart J.* 2012; 33: 595–605.
 18. **Brunner S, Huber BC, Fischer R, et al.** G-CSF treatment after myocardial infarction: impact on bone marrow-derived vs cardiac progenitor cells. *Exp Hematol.* 2008; 36: 695–702.
 19. **Zaruba MM, Huber BC, Brunner S, et al.** Parathyroid hormone treatment after myocardial infarction promotes cardiac repair by enhanced neovascularization and cell survival. *Cardiovasc Res.* 2008; 77: 722–31.
 20. **Brunner S, Weinberger T, Huber BC, et al.** The cardioprotective effects of parathyroid hormone are independent of endogenous granulocyte-colony stimulating factor release. *Cardiovasc Res.* 2012; 93: 330–9.
 21. **Brunner S, Winogradow J, Huber BC, et al.** Erythropoietin administration after myocardial infarction in mice attenuates ischemic cardiomyopathy associated with enhanced homing of bone marrow-derived progenitor cells via the CXCR-4/SDF-1 axis. *FASEB J.* 2009; 23: 351–61.
 22. **Brunner S, Huber BC, Weinberger T, et al.** Migration of bone marrow-derived cells and improved perfusion after treatment with erythropoietin in a murine model of myocardial infarction. *J Cell Mol Med.* 2012; 16: 152–9.
 23. **Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, et al.** Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet.* 2003; 362: 697–703.
 24. **Brunner S, Theiss HD, Leiss M, et al.** Enhanced stem cell migration mediated by VCAM-1/VLA-4 interaction improves cardiac function in virus-induced dilated cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol.* 2013; 108: 388.
 25. **Perrino C, Naga Prasad SV, Mao L, et al.** Intermittent pressure overload triggers hypertrophy-independent cardiac dysfunction and vascular rarefaction. *J Clin Invest.* 2006; 116: 1547–60.
 26. **Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al.** Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med.* 2001; 7: 430–6.
 27. **Matsuura K, Honda A, Nagai T, et al.** Transplantation of cardiac progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice. *J Clin Invest.* 2009; 119: 2204–17.
 28. **Baldo MP, Davel AP, Damas-Souza DM, et al.** The antiapoptotic effect of granulocyte colony-stimulating factor reduces infarct size and prevents heart failure development in rats. *Cell Physiol Biochem.* 2011; 28: 33–40.
 29. **Fazel S, Cimini M, Chen L, et al.** Cardioprotective c-kit+ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *J Clin Invest.* 2006; 116: 1865–77.
 30. **Meng F, Francis H, Glaser S, et al.** Role of stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor in remodeling during liver regeneration. *Hepatology.* 2012; 55: 209–21.
 31. **Spinale FG.** Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.* 2007; 87: 1285–342.

10 Veröffentlichung II (Todica A et al., 2017)

Monitoring of Cardiac Remodeling in a Mouse Model of Pressure-Overload Left Ventricular Hypertrophy with [18F]FDG MicroPET.

Todica A¹, Beetz NL², Günther L³, Zacherl MJ³, Grabmaier U², Huber B², Bartenstein P³, Brunner S², Lehner S^{3,4}.

1 Department of Nuclear Medicine, University Hospital, LMU Munich, Munich, Germany.

2 Medical Department I-Cardiology, University Hospital, LMU Munich, Munich, Germany.

3 Department of Nuclear Medicine, University Hospital, LMU Munich, Munich, Germany.

4 Ambulatory Healthcare Center Dr. Neumaier & Colleagues, Radiology, Nuclear Medicine, Radiation Therapy, Regensburg, Germany.

Mol Imaging Biol. 2018 Apr;20(2):268-274. doi: 10.1007/s11307-017-1114-6.

11 Literaturverzeichnis

1. Hein S, Arnon E, Kostin S, Schonburg M, Elsasser A, Polyakova V, et al. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation*. 2003;107(7):984-91.
2. Weidemann F, Herrmann S, Stork S, Niemann M, Frantz S, Lange V, et al. Impact of myocardial fibrosis in patients with symptomatic severe aortic stenosis. *Circulation*. 2009;120(7):577-84.
3. Kofflard MJ, Michels M, Krams R, Kliffen M, Geleijnse ML, Ten Cate FJ, et al. Coronary flow reserve in hypertrophic cardiomyopathy: relation with microvascular dysfunction and pathophysiological characteristics. *Netherlands heart journal : monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation*. 2007;15(6):209-15.
4. Lindman BR, Bonow RO, Otto CM. Current management of calcific aortic stenosis. *Circulation research*. 2013;113(2):223-37.
5. Thomsen MM, Lewinter C, Kober L. Varying effects of recommended treatments for heart failure with reduced ejection fraction: meta-analysis of randomized controlled trials in the ESC and ACCF/AHA guidelines. *ESC heart failure*. 2016;3(4):235-44.
6. Roger VL. Epidemiology of heart failure. *Circulation research*. 2013;113(6):646-59.
7. Herztransplantationen. Statistisches Bundesamt. 2015.
8. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European heart journal*. 2012;33(14):1787-847.
9. Peter Branger US. Annual Report 2015. Eurotransplant International Foundation. 2025.
10. Cleveland JC, Jr., Naftel DC, Reece TB, Murray M, Antaki J, Pagani FD, et al. Survival after biventricular assist device implantation: an analysis of the Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support database. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2011;30(8):862-9.
11. Rose EA, Gelijns AC, Moskowitz AJ, Heitjan DF, Stevenson LW, Dembitsky W, et al. Long-term use of a left ventricular assist device for end-stage heart failure. *The New England journal of medicine*. 2001;345(20):1435-43.
12. Starling RC, Naka Y, Boyle AJ, Gonzalez-Stawinski G, John R, Jorde U, et al. Results of the post-U.S. Food and Drug Administration-approval study with a continuous flow left ventricular assist device as a bridge to heart transplantation: a prospective study using the INTERMACS (Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support). *Journal of the American College of Cardiology*. 2011;57(19):1890-8.
13. Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(3):568-75.
14. Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(3):572-83.

15. Steinhauser ML, Lee RT. Cardiovascular regeneration: pushing and pulling on progenitors. *Cell stem cell*. 2009;4(4):277-8.
16. Sheikh AY, Huber BC, Narsinh KH, Spin JM, van der Bogt K, de Almeida PE, et al. In vivo functional and transcriptional profiling of bone marrow stem cells after transplantation into ischemic myocardium. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32(1):92-102.
17. Huber BC, Ransohoff JD, Ransohoff KJ, Riegler J, Ebert A, Kodo K, et al. Costimulation-adhesion blockade is superior to cyclosporine A and prednisone immunosuppressive therapy for preventing rejection of differentiated human embryonic stem cells following transplantation. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2013;31(11):2354-63.
18. Deindl E, Zaruba MM, Brunner S, Huber B, Mehl U, Assmann G, et al. G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20(7):956-8.
19. Huber BC, Brunner S, Segeth A, Nathan P, Fischer R, Zaruba MM, et al. Parathyroid hormone is a DPP-IV inhibitor and increases SDF-1-driven homing of CXCR4(+) stem cells into the ischaemic heart. *Cardiovascular research*. 2011;90(3):529-37.
20. Zaruba MM, Theiss HD, Vallaster M, Mehl U, Brunner S, David R, et al. Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction. *Cell stem cell*. 2009;4(4):313-23.
21. Zwetsloot PP, Vegh AM, Jansen of Lorkeers SJ, van Hout GP, Currie GL, Sena ES, et al. Cardiac Stem Cell Treatment in Myocardial Infarction: A Systematic Review and Meta-Analysis of Preclinical Studies. *Circulation research*. 2016;118(8):1223-32.
22. Zaruba MM, Franz WM. Role of the SDF-1-CXCR4 axis in stem cell-based therapies for ischemic cardiomyopathy. *Expert opinion on biological therapy*. 2010;10(3):321-35.
23. Huber BC, Fischer R, Brunner S, Groebner M, Rischpler C, Segeth A, et al. Comparison of parathyroid hormone and G-CSF treatment after myocardial infarction on perfusion and stem cell homing. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2010;298(5):H1466-71.
24. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002;106(24):3009-17.
25. Engelmann MG, Theiss HD, Hennig-Theiss C, Huber A, Wintersperger BJ, Werle-Ruedinger AE, et al. Autologous bone marrow stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor after subacute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing late revascularization: final results from the G-CSF-STEMI (Granulocyte Colony-Stimulating Factor ST-Segment Elevation Myocardial Infarction) trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48(8):1712-21.
26. Theiss HD, David R, Engelmann MG, Barth A, Schotten K, Naebauer M, et al. Circulation of CD34+ progenitor cell populations in patients with idiopathic dilated and ischaemic cardiomyopathy (DCM and ICM). *European heart journal*. 2007;28(10):1258-64.
27. Szardien S, Nef HM, Voss S, Troidl C, Liebetrau C, Hoffmann J, et al. Regression of cardiac hypertrophy by granulocyte colony-stimulating factor-stimulated interleukin-1beta synthesis. *European heart journal*. 2012;33(5):595-605.

28. Elias MF, Sullivan LM, Elias PK, D'Agostino RB, Sr., Wolf PA, Seshadri S, et al. Left ventricular mass, blood pressure, and lowered cognitive performance in the Framingham offspring. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2007;49(3):439-45.
29. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *The New England journal of medicine*. 1990;322(22):1561-6.
30. Spirito P, Bellone P, Harris KM, Bernabo P, Bruzzi P, Maron BJ. Magnitude of left ventricular hypertrophy and risk of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. *The New England journal of medicine*. 2000;342(24):1778-85.
31. Lovic D, Narayan P, Pittaras A, Faselis C, Doumas M, Kokkinos P. Left ventricular hypertrophy in athletes and hypertensive patients. *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn)*. 2017;19(4):413-7.
32. Shimizu I, Minamino T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2016;97:245-62.
33. Shimizu I, Minamino T, Toko H, Okada S, Ikeda H, Yasuda N, et al. Excessive cardiac insulin signaling exacerbates systolic dysfunction induced by pressure overload in rodents. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(5):1506-14.
34. Paulus WJ, Tschope C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(4):263-71.
35. Ganau A, Devereux RB, Roman MJ, de Simone G, Pickering TG, Saba PS, et al. Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 1992;19(7):1550-8.
36. Weeks KL, McMullen JR. The athlete's heart vs. the failing heart: can signaling explain the two distinct outcomes? *Physiology (Bethesda, Md)*. 2011;26(2):97-105.
37. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2014;71(4):549-74.
38. Fang L, Murphy AJ, Dart AM. A Clinical Perspective of Anti-Fibrotic Therapies for Cardiovascular Disease. *Frontiers in pharmacology*. 2017;8:186.
39. Perez Del Villar C, Savvatis K, Lopez B, Kasner M, Martinez-Legazpi P, Yotti R, et al. Impact of acute hypertension transients on diastolic function in patients with heart failure with preserved ejection fraction. *Cardiovascular research*. 2017.
40. Mohammed SF, Hussain S, Mirzoyev SA, Edwards WD, Maleszewski JJ, Redfield MM. Coronary microvascular rarefaction and myocardial fibrosis in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation*. 2015;131(6):550-9.
41. Kane GC, Karon BL, Mahoney DW, Redfield MM, Roger VL, Burnett JC, Jr., et al. Progression of left ventricular diastolic dysfunction and risk of heart failure. *Jama*. 2011;306(8):856-63.
42. Senni M, Paulus WJ, Gavazzi A, Fraser AG, Diez J, Solomon SD, et al. New strategies for heart failure with preserved ejection fraction: the importance of targeted therapies for heart failure phenotypes. *European heart journal*. 2014;35(40):2797-815.
43. Aoki T, Fukumoto Y, Sugimura K, Oikawa M, Satoh K, Nakano M, et al. Prognostic impact of myocardial interstitial fibrosis in non-ischemic heart failure. -Comparison between

preserved and reduced ejection fraction heart failure. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2011;75(11):2605-13.

44. Tschope C, Post H. Latent ischaemia as a trigger for a circulus vitiosus of inflammation, fibrosis, and stiffness in HFPEF. *European journal of heart failure*. 2015;17(12):1210-2.

45. Plaksej R, Kosmala W, Frantz S, Herrmann S, Niemann M, Stork S, et al. Relation of circulating markers of fibrosis and progression of left and right ventricular dysfunction in hypertensive patients with heart failure. *Journal of hypertension*. 2009;27(12):2483-91.

46. Consoli C, Gatta L, Iellamo F, Molinari F, Rosano GM, Marlier LN. Severity of left ventricular dysfunction in heart failure patients affects the degree of serum-induced cardiomyocyte apoptosis. Importance of inflammatory response and metabolism. *International journal of cardiology*. 2013;167(6):2859-66.

47. Mammarella A, Paradiso M, Basili S, De Matteis A, Cardarello CM, Di Franco M, et al. Morphologic left ventricular patterns and prevalence of high-grade ventricular arrhythmias in the normotensive and hypertensive elderly. *Advances in therapy*. 2000;17(5):222-9.

48. Rai V, Sharma P, Agrawal S, Agrawal DK. Relevance of mouse models of cardiac fibrosis and hypertrophy in cardiac research. *Molecular and cellular biochemistry*. 2017;424(1-2):123-45.

49. Zhong M, Alonso CE, Taegtmeyer H, Kundu BK. Quantitative PET imaging detects early metabolic remodeling in a mouse model of pressure-overload left ventricular hypertrophy in vivo. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2013;54(4):609-15.

50. Coelho-Filho OR, Shah RV, Neilan TG, Mitchell R, Moreno H, Jr., Kwong R, et al. Cardiac magnetic resonance assessment of interstitial myocardial fibrosis and cardiomyocyte hypertrophy in hypertensive mice treated with spironolactone. *Journal of the American Heart Association*. 2014;3(3):e000790.

51. Armstrong AC, Gidding S, Gjesdal O, Wu C, Bluemke DA, Lima JA. LV mass assessed by echocardiography and CMR, cardiovascular outcomes, and medical practice. *JACC Cardiovascular imaging*. 2012;5(8):837-48.

52. Rackley CE, Dodge HT, Coble YD, Jr., Hay RE. A METHOD FOR DETERMINING LEFT VENTRICULAR MASS IN MAN. *Circulation*. 1964;29:666-71.

53. Yamaoka O, Yabe T, Okada M, Endoh S, Nakamura Y, Mitsunami K, et al. Evaluation of left ventricular mass: comparison of ultrafast computed tomography, magnetic resonance imaging, and contrast left ventriculography. *American heart journal*. 1993;126(6):1372-9.

54. Wolk MJ, Bailey SR, Doherty JU, Douglas PS, Hendel RC, Kramer CM, et al. ACCF/AHA/ASE/ASNC/HFSA/HRS/SCAI/SCCT/SCMR/STS 2013 multimodality appropriate use criteria for the detection and risk assessment of stable ischemic heart disease: a report of the American College of Cardiology Foundation Appropriate Use Criteria Task Force, American Heart Association, American Society of Echocardiography, American Society of Nuclear Cardiology, Heart Failure Society of America, Heart Rhythm Society, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Cardiovascular Computed Tomography, Society for Cardiovascular Magnetic Resonance, and Society of Thoracic Surgeons. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;63(4):380-406.

55. Bravo PE, Di Carli MF, Dorbala S. Role of PET to evaluate coronary microvascular dysfunction in non-ischemic cardiomyopathies. *Heart failure reviews*. 2017;22(4):455-64.

56. Chivu-Economescu M, Rubach M. Hematopoietic Stem Cells Therapies. *Current stem cell research & therapy*. 2017;12(2):124-33.
57. Baldo MP, Davel AP, Damas-Souza DM, Nicoletti-Carvalho JE, Bordin S, Carvalho HF, et al. The antiapoptotic effect of granulocyte colony-stimulating factor reduces infarct size and prevents heart failure development in rats. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2011;28(1):33-40.
58. Gross L, Theiss HD, Grabmaier U, Adrion C, Mansmann U, Sohn HY, et al. Combined therapy with sitagliptin plus granulocyte-colony stimulating factor in patients with acute myocardial infarction - Long-term results of the SITAGRAMI trial. *International journal of cardiology*. 2016;215:441-5.
59. Brunner S, Weinberger T, Huber BC, Segeth A, Zaruba MM, Theiss HD, et al. The cardioprotective effects of parathyroid hormone are independent of endogenous granulocyte-colony stimulating factor release. *Cardiovascular research*. 2012;93(2):330-9.
60. Brunner S, Winogradow J, Huber BC, Zaruba MM, Fischer R, David R, et al. Erythropoietin administration after myocardial infarction in mice attenuates ischemic cardiomyopathy associated with enhanced homing of bone marrow-derived progenitor cells via the CXCR-4/SDF-1 axis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2009;23(2):351-61.
61. Kim HK, De La Luz Sierra M, Williams CK, Gulino AV, Tosato G. G-CSF down-regulation of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells. *Blood*. 2006;108(3):812-20.
62. Honold J, Lehmann R, Heeschen C, Walter DH, Assmus B, Sasaki K, et al. Effects of granulocyte colony stimulating factor on functional activities of endothelial progenitor cells in patients with chronic ischemic heart disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26(10):2238-43.
63. Brunner S, Theiss HD, Leiss M, Grabmaier U, Grabmeier J, Huber B, et al. Enhanced stem cell migration mediated by VCAM-1/VLA-4 interaction improves cardiac function in virus-induced dilated cardiomyopathy. *Basic research in cardiology*. 2013;108(6):388.

12 Danksagung

Für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und Supervision bedanke ich mich als Erstes bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Stefan Brunner. Insbesondere die enge Verknüpfung von seinen wissenschaftlichen Fragestellungen mit klinisch relevanten Themen entfachte mein Interesse für die Forschung. Auf seine Unterstützung, Ratschläge und wissenschaftliche Expertise konnte ich mich jederzeit verlassen. Die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe hat mir die Möglichkeit gegeben, wissenschaftliches Denken zu erlernen, Vorträge zu halten und erste Publikationen zu schreiben und veröffentlichen. Darüber hinaus hat seine Begeisterung für die experimentelle und klinische Kardiologie einen großen Teil für die Entscheidung meines eigenen Berufseinstieges beigetragen.

Dem ehemaligen Leiter der Arbeitsgruppe „Kardiale Stammzellen“ Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Franz danke ich für die sehr freundliche und motivierende Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Die vorliegende Promotion wurde mit einer wissenschaftlichen Ausbildung und finanziellen Förderung des Programms „Förderung von Forschung und Lehre – FöFoLe“ der Ludwig-Maximilians-Universität München begleitet. Für die exzellente Organisation des Promotionsstudienganges „Systembiologische Medizin“ danke ich besonders Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Jürgen Heesemann.

Von ganzem Herzen danke ich für die großartige wissenschaftliche Mitbetreuung Frau Dr. rer. nat. Alexandra Laskowski und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Bruno Huber. Sie haben mich in die Grundlagen der experimentellen Forschung, die Erhebung und Analyse von Daten herangeführt und somit meine ersten Veröffentlichungen ermöglicht.

Die wissenschaftlichen Projekte erfolgten in engen und fruchtbaren Kooperationen mit den Kollegen der Nuklearmedizin und Tierpathologie. Mein Dank gilt hier vor allem Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Andrei Todica und Frau Priv.-Doz. Dr. med. vet. Nadja Herbach.

Außerordentlich bedanken möchte ich mich zudem bei Frau Judith Arcifa, die mit Ihrer höchsten medizinisch-technischen Expertise, Freundlichkeit und Freude am wissenschaftlichen Arbeiten für die Arbeitsgruppe unentbehrlich ist.

Meiner Familie und Seyd danke ich für die Unterstützung und Motivation bei der Durchführung der Promotion.

13 Lebenslauf

Der Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen nicht veröffentlicht.