

Zelluläre Ersatztherapie  
unter Verwendung von Knochenmarkzellen  
beim Herzinfarkt in der Maus

**Dissertation**

zur  
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Martin Breitbach**

aus Bensberg

Bonn 2007

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Promotionskommission:

Erstgutachter:	Prof. Dr. Bernd K. Fleischmann
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Dieter Fürst
Fachnaher Gutachter:	Prof. Dr. Klaus Willecke
Fachangrenzender Gutachter:	Prof. Dr. Christa E. Müller

Tag der Promotion: 14.06.2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2007

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Mai 2001 bis März 2007 am Institut für Neurophysiologie der Universität zu Köln und am Institut für Physiologie I der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn unter Anleitung von Prof. Dr. Bernd K. Fleischmann.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

J.M. Nygren, S. Jovinge, M. Breitbart, P. Sawen, W. Roell, J. Hescheler, J. Taneera, B.K. Fleischmann, S.E.W. Jacobsen. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nature Medicine*, 2004, 10 (5): 494-501.

E. Kolossov\*, T. Bostani\*, W. Roell\*, M. Breitbart\*, F. Pillekamp, J.M. Nygren, P. Sasse, O. Rubenchik, J.W.U. Fries, D. Wenzel, C. Geisen, Y. Xia, Z.J. Lu, Y.Q. Duan, R. Kettenhofen, S. Jovinge, W. Bloch, H. Bohlen, A. Welz, J. Hescheler, S.E. Jacobsen, B.K. Fleischmann. Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *Journal of Experimental Medicine*, 2006, 203 (10): 2315-2327.

\* Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu den jeweiligen Arbeiten beigetragen

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Arbeit hat bisher noch keiner anderen Prüfungskommission zur Begutachtung vorgelegen.

Martin Breitbach

Bonn, 05. März 2007

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. B. K. Fleischmann für die Überlassung des Promotionsthemas, die Aufnahme an seinem Lehrstuhl und die vertrauensvolle und fruchtbare Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. D. O. Fürst danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Bei Herrn Prof. Dr. J. Hescheler möchte ich mich insbesondere für die Bereitstellung der Laborräume an seinem Institut bedanken.

Bei Prof. Dr. W. Bloch und PD Dr. J. W. U. Fries bedanke ich mich für die ständige Diskussionsbereitschaft und die konstruktiven Anregungen.

Dr. W. Roell, Dr. T. Bostani und Dr. Y. Xia danke ich ganz besonders für die Durchführung der Maus-OPs, M. Ghilav und A. Köster für die Hilfe bei den histologischen Präparaten und L. Mürtz für die Unterstützung bei den Einzelzellklonen.

Vielen Dank auch an J. Nygren, S. Jovinge und S. E. Jacobsen für die gute Kooperation und sonnige Aufenthalte in Schweden.

Bei allen Mitarbeitern sowie ehemaligen Kollegen möchte ich mich für ein nettes Arbeitsklima und die kleinen Freuden im Laboralltag bedanken.

Ebenso danke ich meinen Freunden für Ablenkung und Inspiration fernab der Wissenschaft.

Von ganzem Herzen danke ich Nuria Fornés-Pérez, die mir in den vergangenen Jahren immer zur Seite stand.

Zum Schluß möchte ich noch meinen Eltern danken, die mich immer bedingungslos unterstützt haben.



## Abkürzungen

Abcg2	ATP-Binding Cassette Transporter Typ G2
ALP	Alkalische Phosphatase
Alpha-MHC	Alpha-Myosin Heavy Chain (schwere Myosinkette)
ASMAC	Alpha-Smooth Muscle Aktin (Aktin des glatten Muskels)
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP/NBT	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphat/Nitro Blau Tetrazolium
BMP	Bone Morphogenic Protein
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation (z.B. CD11b, CD34)
DMEM (-HG/-LG)	Dulbeccos Modified Eagle Medium (High/Low Glucose)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpc	days post coitum
EBs	Embryoid Bodies
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure
EPC	Endotheliale Progenitorzellen
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor
HE	Hämatoxilin/Eosin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
ITS supplement	Insulin/Transferrin/Selenite Medium-Supplement
KM	Knochenmark
LAD	Linke Koronararterie (Left Anterior Descending)
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MAPC	Multipotente Adulte Progenitorzellen
MHC	Major Histocompatibility Complex

MSC	Mesenchymale Stammzelle
NSC	Neuronale Stammzelle
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PECAM	Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule
RNA	Ribonukleinsäure
Sca-1	Stem Cell Antigen-1
SCF-1	Stem Cell Factor-1
SDF-1	Stromal cell Derived Factor-1
SP	Side Population
TGF-β3	Transforming Growth Factor Beta 3
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β-D-Galactosid

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Herz-Kreislauf-Erkrankungen .....	1
1.2	Zellersatztherapie .....	2
1.3	Stammzellen .....	6
1.3.1	Embryonale Stammzellen .....	8
1.3.2	Adulte Stammzellen .....	10
1.4	Knochenmarkzellen in der Zellersatztherapie .....	14
1.5	Ziele dieser Arbeit .....	16
2	Material und Methoden .....	17
2.1	Transgene Mäuse .....	17
2.1.1	Organentnahme aus der Maus .....	18
2.1.2	Knochenmarkentnahme .....	19
2.1.3	Gewinnung adulter Kardiomyozyten .....	19
2.1.4	Gewinnung embryonaler Fibroblasten .....	20
2.2	Kultivierung der Zellen .....	21
2.2.1	Passage .....	21
2.2.2	Einfrieren .....	22
2.2.3	Nährzellen .....	22
2.2.4	ES-Zellen .....	23
2.2.5	Differenzierung der ES-Zellen in hängenden Tropfen .....	23
2.2.6	MSCs .....	25
2.2.7	<i>In vitro</i> Differenzierung von MSCs .....	26
2.2.7.1	Differenzierung zu Fettzellen .....	26
2.2.7.2	Differenzierung zu Knochenzellen .....	26
2.2.7.3	Differenzierung zu Knorpelzellen .....	27
2.2.7.4	Differenzierung zu Herzzellen mit 5-Aza-Cytidin .....	28
2.2.7.5	Differenzierung zu Herzzellen in hängenden Tropfen .....	29
2.3	Durchflußzytometrie .....	29
2.3.1	Bestimmung der Rekonstitution im Peripheren Blut .....	29
2.3.2	Charakterisierung der MSCs .....	30
2.4	Operative Techniken .....	31
2.4.1	Vorbereitung der Zellen für die Transplantation .....	31

2.4.2	Kryoinfarkt.....	31
2.4.3	Ligatur der linken Koronararterie (LAD) .....	33
2.4.4	Funktionsmessungen mit dem Linksherzkatheter.....	33
2.4.5	Mobilisierung .....	34
2.5	Gewebeerhaltung und Schnitte .....	34
2.5.1	Fixierung von kultivierten Zellen.....	34
2.5.2	Einbettung von Herzen für Kryoschnitte .....	35
2.5.3	Einbettung von Herzen in Paraffin.....	36
2.5.4	Einbettung in Epoxid-Harz für Semidünnschnitte .....	36
2.6	Färbetechniken .....	38
2.6.1	Histologische Färbungen.....	38
2.6.1.1	Hämatoxilin/Eosin (HE).....	38
2.6.1.2	Van Gieson.....	39
2.6.1.3	Von Kossa .....	40
2.6.1.4	Alkalische Phosphatase (ALP).....	40
2.6.1.5	Alizarin Rot.....	41
2.6.1.6	Ölrot O .....	41
2.6.1.7	Alcian Blau.....	42
2.6.1.8	X-Gal.....	42
2.6.2	Immunhistochemische Färbungen .....	43
2.7	Mikroskopie .....	45
3	Ergebnisse .....	46
3.1	Hämatopoetische Stammzellen und Gesamtknochenmark .....	46
3.1.1	Transplantation in infarzierte Mauserzen.....	46
3.1.2	Integration von direkt injizierten Knochenmarkzellen .....	48
3.1.3	Mobilisierung von Knochenmarkzellen.....	50
3.1.4	Integration von mobilisierten Knochenmarkzellen.....	52
3.1.5	Keine Transdifferenzierung der mobilisierten Knochenmarkzellen..	56
3.1.6	Knochenmark-abgeleitete Herzzellen im Randbereich des Infarktes	57
3.1.7	Knochenmark-abgeleitete Herzzellen entstehen durch Fusion.....	59
3.1.8	Keine Verbesserung der Herzfunktion durch Knochenmarkzellen....	63
3.2	Mesenchymale Stammzellen.....	64
3.2.1	Primärkultur von MSCs .....	64
3.2.2	Charakterisierung der MSCs mittels Durchflußzytometrie.....	66

3.2.3	<i>In vitro</i> Differenzierung der MSCs .....	69
3.2.4	<i>In vitro</i> Differenzierung der MSCs zu Herzzellen .....	72
3.2.5	Transplantation der MSCs in infarzierte Mauserzen .....	78
3.2.6	Keine Transdifferenzierung der transplantierten MSCs .....	81
3.2.7	Transplantierte MSCs bilden Tumor-ähnliche Strukturen .....	82
3.2.8	Transplantierte MSCs generieren Verknöcherungen .....	85
3.2.9	Verknöcherung nach Transplantation von Knochenmarkzellen .....	88
4	Diskussion .....	92
5	Zusammenfassung .....	117
6	Literaturverzeichnis .....	119
7	Liste der Publikationen .....	142
8	Lebenslauf .....	145

# 1 Einleitung

## 1.1 Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen in der heutigen Zeit eine der Haupterkrankungen der modernen Bevölkerung dar. Ursächlich dafür sind neben einer erblichen Veranlagung meist Risikofaktoren wie unausgewogene Ernährung, Bewegungsmangel sowie Belastung und Streß, die dann im Weiteren zu Übergewicht, Fettstoffwechselstörungen, Diabetes mellitus und Bluthochdruck führen können. Eine mögliche Folge ist die Verengung der Blutgefäße durch atherosklerotische Ablagerungen. Sind davon auch die Herzkranzgefäße betroffen, und es kommt zu einem Verschuß der Koronarien aufgrund eines Thrombus, wird das Herz nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt (Ischämie). Ein Herzinfarkt ist die Folge. Aufgrund der hohen metabolischen Aktivität des Herzmuskels wird das Gewebe schon bei einer 30-minütigen Ischämie irreversibel geschädigt. Das resultiert in einem Absterben der Herzzellen innerhalb weniger Stunden, beginnend in den inneren hin zu den äußeren Gewebeschichten. Dabei ist in den meisten Fällen die linke Herzkammer betroffen, die das Blut in den Körperkreislauf pumpt. In dieser liegt ein wesentlich höherer Druck vor als in der rechten Herzkammer, ihre Muskelschicht ist daher dicker, und die dort lokalisierten Herzzellen haben einen höheren Energiebedarf.

Mittels besserer Aufklärung der Bevölkerung und präventiver medikamentöser Maßnahmen bei Risikopatienten wurde die Zahl der Betroffenen in den letzten Jahren reduziert. Aus Interventionsstudien ist bekannt, daß Patienten mit einem erhöhten globalen Risiko in besonderem Maße von einer solchen Behandlung profitieren. Dennoch stellt der Herzinfarkt die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar. Alleine in Deutschland sterben jährlich etwa 65.000 Menschen an den Folgen (Statistisches Bundesamt, 2004), wobei auch die Mortalitätsrate durch eine schnellere medizinische Notversorgung gesenkt wurde. So können innerhalb der entscheidenden ersten Stunde nach dem Infarkt durch die Bereitstellung eines Defibrillators tödliche Arrhythmien verhindert und durch eine Herzkatheterbehandlung der Blutfluß wieder hergestellt werden.

Bei vielen Patienten ist ein solch frühes Eingreifen allerdings nicht möglich. Je nach Lokalisation der Thrombose und der Dauer des Verschlusses kann das zu einem erheblichen Verlust von Herzgewebe und damit zu einer starken Funktionsbeeinträchtigung des Herzens führen. Das geschädigte Areal wird zwar innerhalb weniger Wochen durch die Bildung von fibrotischem Gewebe stabilisiert (Braunwald und Pfeffer, 1991), die starre Narbe kann aber nicht aktiv an der Pumpfunktion des Herzens mitwirken. Dadurch kommt es in dem intakten Gewebe zu einem erhöhten mechanischen Streß (Olivetti et al., 1990), der zu einer kompensatorischen Veränderung der betroffenen Herzzellen im umgebenden Gewebe führt (Cheng et al., 1996). Bei diesem natürlichen Heilungsprozess vergrößern sich die verbliebenen Herzzellen (Hypertrophie). Kurzfristig verbessert dieser Effekt die Herzkraft. Langfristig führt eine Hypertrophie jedoch zur Schwächung des Herzens: die Schlagkraft der Herzzellen ist zwar erhöht, gleichzeitig ist ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber weiterer Belastung jedoch vermindert. Es kommt zur Herzinsuffizienz, der geschwächte Herzmuskel ist nicht mehr in der Lage, das Blut ausreichend durch den Körperkreislauf zu pumpen.

Die Behandlung der Patienten findet momentan nur symptomatisch mit Medikamenten oder unterstützend mittels Bypass-Operationen statt. Die oft notwendige Organtransplantation ist aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von Spenderherzen nur in seltenen Fällen möglich und nicht immer erfolgreich. Das Ein-Jahres-Überleben nach einer Herztransplantation liegt durchschnittlich bei ungefähr 80%, die Fünf-Jahres-Funktionsrate beträgt etwa 67% (Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2004). Aus diesen Gründen ist es unbedingt erforderlich, neue Behandlungsmethoden zu finden, die die Lebensqualität der Patienten nach einem Herzinfarkt möglichst uneingeschränkt wiederherstellen und erhalten.

## **1.2 Zellersatztherapie**

Während verschiedene menschliche Organe wie die Haut oder der Skelettmuskel die Fähigkeit zur Regeneration besitzen, ist das Herz nur bedingt in der Lage, neue Herzzellen zu generieren (Pfeffer und Braunwald, 1990). Adulte Kardiomyozyten sind terminal differenzierte Zellen, die ihre Fähigkeit zur Teilung verloren haben.

Neuere Studien haben allerdings gezeigt, daß auch Herzzellen proliferieren können (Kajstura et al., 1998; Beltrami et al., 2001). Die Anzahl der sich teilenden Kardiomyozyten ist jedoch mit weniger als 1 Promille der im Herzen vorkommenden Zellen sehr gering und dürfte für eine Geweberegeneration nach einem Infarkt keine physiologisch relevante Rolle spielen. Dennoch könnte sich daraus ein therapeutisch wertvoller Ansatz entwickeln, wenn es möglich sein sollte, die proliferierenden Zellen zu identifizieren und die aktivierenden Mechanismen aufzuklären. Es könnte sich dabei um kardiale Stammzellen handeln, die im Falle einer Verletzung zur Vermehrung angeregt werden. In den letzten Jahren wurden verschiedene Populationen von Herzstammzellen beschrieben, die ein solches regeneratives Potential besitzen sollen (Beltrami et al., 2003; Oh et al., 2003; Cai et al., 2003; Martin et al., 2004; Dawn et al., 2005; Laugwitz et al., 2005). Allerdings ist die Existenz dieser Stammzellen *in vivo* fraglich, zumal sie sich in der Expression ihrer Oberflächen-Marker (c-kit, Sca-1, Abcg2, Isl-1) sehr unterscheiden und somit keine einheitliche Zellpopulation darstellen. Auf jeden Fall ist ihre physiologische und pathophysiologische Funktion bisher noch vollkommen ungeklärt.

Neben der Möglichkeit einer Aktivierung körpereigener Regenerationsmechanismen im Herzen können auch Zellen in das Infarktareal eingebracht werden, durch Injektion in das Gewebe oder Applikation über die Koronargefäße. Dadurch wäre es denkbar, die verlorengegangenen Herzzellen direkt zu ersetzen und die Herzfunktion so zu verbessern. Eine solche zelluläre Ersatztherapie wird nicht nur zur Behandlung von Herzinfarktpatienten in Erwägung gezogen, sondern könnte auch bei anderen Krankheiten eine Rolle spielen. Dabei handelt es sich zumeist um degenerative Erkrankungen, bei denen Organe mit limitierter Wiederherstellungsfähigkeit betroffen sind. Diabetes mellitus resultiert aus einem Verlust von Insulin-bildenden Beta-Zellen der Bauchspeicheldrüse. Durch den funktionellen Ersatz dieser Zellen könnten den Patienten lebenslange teure und aufwendige Insulininjektionen erspart bleiben (Nir und Dor, 2005). Auch neuronale Störungen wie Morbus Parkinson könnten durch neue Zellen, in diesem Fall dopaminerge Neuronen, behandelt und geheilt werden (Lindvall und Bjorklund, 2004). Ein weiteres Beispiel ist die Osteoarthritis, bei der die abgenutzten Gelenkknorpel durch neu konstruiertes Gewebe ersetzt werden könnten (Kuo et al., 2006).

Die Anwendungsmöglichkeiten einer zellulären Ersatztherapie sind also vielfältig und nicht nur auf das Herz beschränkt. In jedem Fall ist es unbedingt erforderlich, geeignete Zellpopulationen zu finden, die die verlorengegangenen Zellen adäquat ersetzen und deren Funktion übernehmen können. Dazu sollten diese Zellen (1) in ausreichender Zahl zur Verfügung stehen, (2) gut in dem transplantierten Gewebe anwachsen und bei Bedarf noch weiter proliferieren, und (3) immunverträglich sein und nicht von dem Empfänger abgestoßen werden. Bei der Behandlung von Herzinfarkt-Patienten sollten die Zellen zudem (4) kontraktile Eigenschaften zeigen, um die verminderte Pumpfunktion zu verbessern, (5) mit den nativen Herzzellen elektrisch koppeln, damit eine adäquate Reizweiterleitung stattfinden kann, und (6) die Bildung neuer Gefäße ermöglichen, um eine ausreichende Nährstoff- und Sauerstoff-Versorgung der angewachsenen Zellen zu ermöglichen (Murry et al., 2005).

In der Vergangenheit wurden viele verschiedene Zelltypen in Tiermodellen getestet, um die am besten geeignete Zellpopulation für die Regeneration des geschädigten Herzgewebes zu bestimmen. Eine vielversprechende Zellfraktion stellen embryonale Kardiomyozyten dar, die die benötigten kontraktilen und elektrophysiologischen Eigenschaften aufweisen. Dazu sind diese Zellen noch in der Lage sich zu teilen (Armstrong et al., 2000). Außerdem könnte es von Vorteil sein, daß bei der Gewinnung embryonaler Kardiomyozyten auch andere Zelltypen wie Endothelzellen oder Fibroblasten mit aufgereinigt werden, die im Herzen wichtige Funktionen (Bildung der extrazellulären Matrix und Vaskularisierung) übernehmen (Nag, 1980). Verschiedene Studien an Tiermodellen haben gezeigt, daß transplantierte embryonale Kardiomyozyten in gesunden (Soonpaa et al., 1994; Koh et al., 1995) und infarzierten (Etzion et al., 2001; El Oakley et al., 2001) Herzen anwachsen können und sich im Gewebe zu reifen Herzmuskelzellen entwickeln. Die transplantierten Zellen integrieren dabei in das geschädigte Gewebe unter Ausbildung funktioneller Zell-Zell-Kontakte und führen zu einer Verbesserung der Herzfunktion (Reinecke et al., 1999; Roell et al., 2002).

Allerdings gibt es auch widersprüchliche Studien, nach deren Ergebnissen die Zellen nach der Transplantation abgestorben waren (Watanabe et al., 1998; Zhang et al., 2001) oder nicht zu einem adulten Phänotyp differenzierten (Leor et al., 1996). Diese unterschiedlichen Befunde könnten durch abweichende Methoden bei der Isolation der Zellen und bei den Operationen begründet sein, die vor einem Einsatz in der Klinik standardisiert werden müssten. Darüberhinaus stellt eine mögliche Abstoßung der Zellen durch das Immunsystem der Patienten ein großes Problem dar, da eine syngene Isolation embryonaler Kardiomyozyten nicht möglich ist. Nicht zuletzt ist die Bereitstellung ausreichender Mengen an Zellen aus abgetriebenen Föten oder Fehlgeburten schwierig, da der potentielle Bedarf an Fötalgewebe durch die aktuelle Abtreibungspraxis nicht gedeckt werden kann. In einigen Ländern werden embryonale Zellen dennoch schon zur Behandlung von Patienten mit neuronalen Krankheiten wie Morbus Parkinson (Lindvall et al., 1989; Freed et al., 1990) oder Chorea Huntington (Bachoud-Levi et al., 2000; Freeman et al., 2000) eingesetzt. Unter ethischen Aspekten ist eine solche "verbrauchende" Embryonenforschung allerdings als sehr kritisch zu bewerten und daher in vielen Ländern, darunter auch Deutschland, verboten.

Aufgrund guter Verfügbarkeit aus Muskelbiopsien und der Fähigkeit zur Expansion *in vitro* sind Satellitenzellen aus dem adulten Skelettmuskel eine alternative vielversprechende Zellpopulation zur Behandlung des Herzinfarktes (Chiu et al., 1995). Diese Zellen befinden sich unter der Basallamina am Rand der Muskelfasern und sind für das Wachstum und die Regeneration des Skelettmuskels verantwortlich (Seale und Rudnicki, 2000). Die ersten vielversprechenden Versuche zum Einsatz dieser Zellen in der Herzersatztherapie wurden bereits 1992 an Hunden durchgeführt (Marelli et al., 1992). Es folgten viele weitere Studien, in denen ein gutes Anwachsen der Zellen und eine Funktionsverbesserung des Herzens in verschiedenen Tiermodellen gezeigt wurden (Taylor et al., 1998; Kessler und Byrne, 1999; Hutcheson et al., 2000).

Die anfängliche Annahme, die Satellitenzellen würden im Herzen zu Kardiomyozyten differenzieren, wurde allerdings durch mehrere Studien widerlegt, die stattdessen eine Ausbildung skelettaler Myotuben nachgewiesen haben (Murry et al., 1996; Reinecke und Murry, 2002). Diese Zellen sind zwar auch in der Lage zu kontrahieren und könnten daher aktiv an der Herzarbeit mitwirken. Allerdings

unterscheiden sich die Skelettmuskelzellen in ihrer Funktionsweise deutlich von den Herzmuskelzellen, da sie direkt von afferenten Nervenfasern angeregt werden und ihr elektronisches Potential nicht über Zell-Zell-Kontakte weiterleiten (Reinecke et al., 2000). Eine direkte Kopplung der transplantierten Zellen mit den nativen Kardiomyozyten über Connexine ist daher nicht möglich, was die nötige Erregungsweiterleitung verhindert (Leobon et al., 2003; Rubart et al., 2004) und verstärkt zu einem Auftreten tödlicher Arrhythmien führen kann (El Oakley et al., 2001; Makkar et al., 2003).

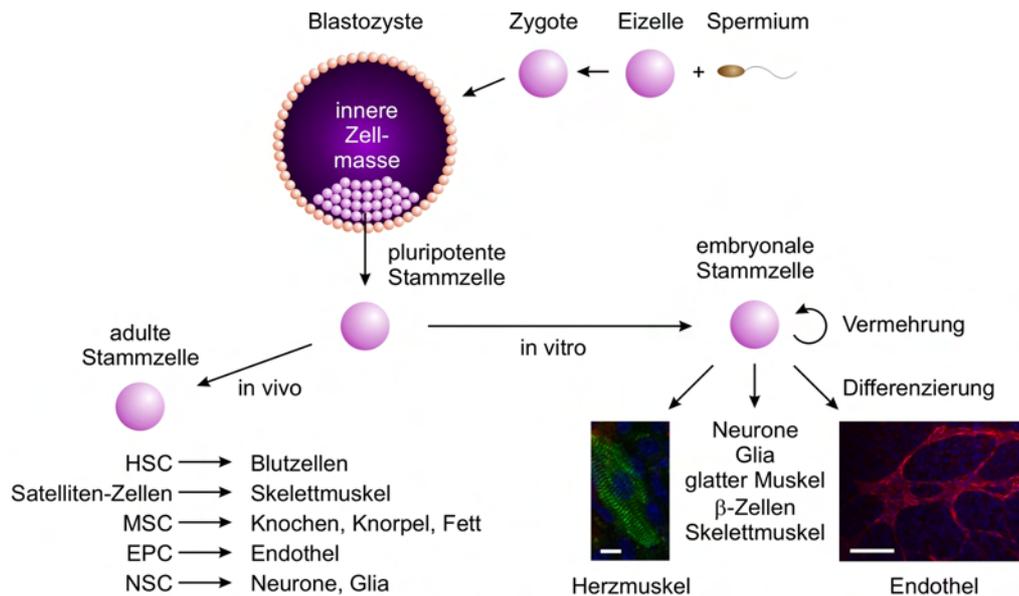
Aufgrund der positiven Befunde im Tiermodell wurden dennoch zahlreiche klinische Studien mit autologen Skelettmuskelzellen am Menschen durchgeführt (Menasche et al., 2001; Menasche et al., 2003; Pagani et al., 2003; Smits et al., 2003; Herreros et al., 2003; Siminiak et al., 2004). In den behandelten Patienten zeigten sich wie schon zuvor im Tiermodell funktionelle Verbesserungen des Herzens wie eine gesteigerte Kontraktilität und erhöhte Ejektionsfraktionen. Allerdings traten auch gehäuft anhaltende ventrikuläre Arrhythmien auf. Aus diesem Grund mußten den Patienten Defibrillatoren eingesetzt werden, die ein tödliches Kammerflimmern verhinderten. Interessanterweise zeigte sich zudem in der weltweit größten klinischen Phase II Studie (MAGIC trial, "Myoblast Autologous Graft in Ischemic Cardiomyopathy", organisiert von MG Biotherapeutics, Ergebnisse nicht veröffentlicht) keine signifikante Funktionsverbesserung nach Injektion von Skelettmuskelzellen bei Herzinfarktpatienten. Diese Blindstudie wurde daher schon nach 97 statt der geplanten 300 Patienten vorzeitig abgebrochen (Homepage MG Biotherapeutics).

### **1.3 Stammzellen**

Neben diesen bereits vordifferenzierten Muskelzellpopulationen versprechen Stammzellen ein großes Potential für die Anwendung in der zellulären Ersatztherapie. Diese Zellen sind dadurch gekennzeichnet, daß sie in der Lage sind, (1) auf unbestimmte Zeit zu proliferieren, (2) sich selbst klonal zu replizieren und (3) sich unter bestimmten Bedingungen zu einem oder mehreren Geweben zu entwickeln (Anderson et al., 2001). Der ausgewachsene Organismus eines Säugetieres besitzt über 200 verschiedene Zelltypen, die sich im Verlauf ihrer Entwicklung spezialisiert haben. Jeder einzelne Zelltyp bildet bestimmte Strukturen aus und erfüllt festgelegte

Aufgaben. Stammzellen haben diese Differenzierung noch nicht durchlaufen, sie sind unspezialisierte Vorläuferzellen. Einzelzellklone dieser Stammzellen sollen in der Lage sein, *in vitro* und vor allem *in vivo* eine gleichmäßige Morphologie auszubilden und zu bestimmten Zelltypen zu differenzieren. Die sogenannte Plastizität der Stammzellen gibt das mögliche Differenzierungspotential an, je nach Reifegrad der Zellen unterscheidet man Toti-, Pluri-, Multi- und Unipotenz.

Die erste Form einer Stammzelle stellt die befruchtete Eizelle dar, die die gesamte Embryogenese durchläuft und aus der sich alle Gewebe und Zellen des entstehenden Körpers entwickeln. Da aus einer befruchteten Eizelle ein kompletter Organismus entstehen kann, das bedeutet auch Zellen der Keimbahn und des Trophoblasten, spricht man von einer totipotenten Stammzelle. Menschliche Embryonen verfügen vermutlich bis zum Achtzell-Stadium über totipotente Stammzellen, die sich jede einzelne als eigenständiges Individuum entwickeln könnte (Kelly, 1977). Je weiter die Differenzierung der Tochterzellen einer Stammzelle voranschreitet, desto eingeschränkter ist ihre Möglichkeit, sich zu jeder beliebigen Zelle zu spezialisieren. Pluripotente Stammzellen, wie die embryonalen Stammzellen, können keine vollständigen Organismen inklusive der Bildung eines Trophoblasten hervorbringen, wohl aber Zellen aus allen drei Keimblättern, dem Endoderm (z.B. Leber, Pankreas), Mesoderm (z.B. Knochenmark, Muskel, Gefäße und Bindegewebe) und Ektoderm (z.B. Haut und Nervengewebe). Weiter differenzierte Stammzellen sind nur noch in der Lage, bestimmte Typen von Zellen zu generieren. Können verschiedene Gewebe eines Keimblatts gebildet werden, spricht man von Multipotenz. Ein Beispiel sind die mesenchymalen Stammzellen, die sich zu verschiedenen mesodermalen Gewebetypen entwickeln können. Unipotente Stammzellen, wie die Satellitenzellen des Skelettmuskels, können schließlich nur noch einen einzigen Zelltyp bilden (siehe Abb. 1).



**Abbildung 1: Ursprung und Entwicklung embryonaler und adulter Stammzellen**

Das Schema demonstriert die Hierarchie der Stammzellen von der Zygote über die embryonalen bis hin zu den adulten Stammzellen. Die immunhistochemischen Färbungen zeigen aus embryonalen Stammzellen differenziertes Herzmuskelgewebe (Balken = 10  $\mu\text{m}$ ) und Endothelzellnetzwerke (Balken = 100  $\mu\text{m}$ ); grün: Alpha-Aktinin (Herzmuskel), rot: PECAM-1 (Endothel). Abkürzungen: HSC: Hämatopoetische Stammzelle, MSC: Mesenchymale Stammzelle, EPC: Endotheliale Vorläuferzelle, NSC: Neurale Stammzelle

### 1.3.1 Embryonale Stammzellen

Die erste embryonale Stammzell-Linie wurde 1981 durch Evans und Kaufman etabliert (Evans und Kaufman, 1981). Den Forschern ist es gelungen, die pluripotenten Stammzellen aus der inneren Zellmasse von Mäuse-Blastozysten zu isolieren und *in vitro* zu kultivieren. Die Blastozyste besteht aus einer Zellschicht, dem Trophoektoderm, aus dem sich später die Plazenta entwickelt, und einer inneren Zellmasse, die zu dem entsprechenden Zeitpunkt aus etwa 200 pluripotenten Stammzellen besteht (vgl. Abb.1).

Diese embryonalen Stamm (ES)-Zellen sind unter geeigneten Kulturbedingungen in der Lage, sich selbst zu regenerieren und dabei ihren undifferenzierten Zustand beizubehalten. Durch die Kultivierung auf Nährzellen (Wachstums-inaktivierte embryonale Fibroblasten) und die Zugabe von leukemia inhibitory factor (LIF) ins Medium können sie so beliebig vermehrt werden. Werden die Kulturbedingungen verändert, beginnen die ES-Zellen spontan zu Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren (Smith, 2001). Die Kultivierung in Aggregaten, sogenannten embryoid

bodies (EBs), führt unter anderem auch zur Bildung von spontan schlagenden Herzzellen (Doetschman et al., 1985; Robbins et al., 1990). Diese Zellen durchlaufen dabei ähnliche Entwicklungsstadien wie embryonale Kardiomyozyten und reifen zu verschiedenen kardialen Zelltypen aus (Maltsev et al., 1993).

1998 ist es Thomson et al. erstmalig gelungen, humane ES-Zellen aus überzähligen Embryonen von In-Vitro-Fertilisationen zu gewinnen (Thomson et al., 1998), die vergleichbare Eigenschaften zu den ES-Zell-Linien aus Mäusen aufweisen. Die humanen ES-Zell-Linien können ebenso wie die Mauszellen für einen unbestimmten Zeitraum im undifferenzierten Zustand kultiviert und expandiert werden (Amit et al., 2000). Nach Injektion der Zellen in immundefiziente Mäuse entstehen Teratome, die aus Zellen aller drei Keimblätter bestehen und die Pluripotenz der humanen ES-Zellen belegen (Reubinoff et al., 2000). In den letzten Jahren ist es verschiedenen Arbeitsgruppen gelungen, humane ES-Zell-Linien *in vitro* zu unterschiedlichen Zelltypen zu differenzieren (Schuldiner et al., 2000; Odorico et al., 2001), darunter auch zu funktionalen Kardiomyozyten (Kehat et al., 2001).

Die gute Vermehrbarkeit und das hohe Differenzierungspotential der ES-Zellen sind wichtige Voraussetzungen für eine Zellersatztherapie. Die Transplantation ES-Zell abgeleiteter Kardiomyozyten ist damit eine vielversprechende Alternative für die Behandlung von Herzinfarkten. Eine klinische Anwendung ist jedoch momentan noch nicht möglich. Neben den ethischen Bedenken, die die Verwendung von embryonalen Zellen immer wieder aufwerfen, existieren auch mechanistische Probleme. Durch die Allogentität der bestehenden humanen ES-Zell-Linien müßte der Empfänger lebenslang immunsupprimiert werden, um Abstoßungsreaktionen gegen die transplantierten Zellen zu vermeiden. Außerdem ist die Entwicklungsrate zu Herzzellen relativ gering, weniger als 5% der differenzierten Zellen zeigen einen kardialen Phänotyp. Die übrigen Zellen entwickeln sich zu anderen Gewebetypen oder bleiben undifferenziert. Die Transplantation solcher undifferenzierter ES-Zellen führt aufgrund der hohen Proliferationsrate und der Pluripotenz der Zellen zur Bildung aggressiver Teratome (Erdo et al., 2003; Kolossov et al., 2006). Daher wurden gentechnische Methoden entwickelt, die eine Isolation reiner Populationen differenzierter Herzzellen ermöglichen. Durch die Expression von Selektionsmarkern unter einem Herz-spezifischen Promotor können Kardiomyozyten aus transfizierten ES-Zellen aufgereinigt (Klug et al., 1996; Zandstra et al., 2003) und für die Transplantation verwendet werden. Im Tiermodell zeigte sich eine stabile Integration

dieser ES-Zell abgeleiteten aufgereinigten Kardiomyozyten im Gewebe, die zu adulten Herzzellen mit funktionellen Eigenschaften differenzierten und eine Verbesserung der Herzfunktion bewirkten (Klug et al., 1996; Kolossov et al., 2006).

### **1.3.2 Adulte Stammzellen**

Auch im adulten Organismus kommen Stammzellen vor. Sie sorgen für die laufende Regeneration bestimmter Gewebe oder die Wiederherstellung nach kleineren Verletzungen. Man findet sie vornehmlich in Geweben, in denen ein hoher Zellumsatz stattfindet, wie im Darm oder im Knochenmark, wo sie die absterbenden Zellen ersetzen. Sie haben wie alle Stammzellen die Fähigkeit, sich selbst zu reproduzieren, im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen sind die adulten in ihrem Differenzierungspotential jedoch eingeschränkt. Sie sind bereits für einen oder mehrere Gewebetypen spezifiziert, wie z.B. hämatopoetische Stammzellen, die für die ständige Erneuerung der verschiedenen Blutzellen sorgen.

Studien in den letzten Jahren haben jedoch gezeigt, daß adulte Stammzellen in der Lage sind, auch zu anderen Zelltypen als den vorprogrammierten zu transdifferenzieren. So konnten Zellen aus dem Knochenmark in Endothel (Asahara et al., 1997), neuronale Zellen (Brazelton et al., 2000; Mezey et al., 2000), Skelettmuskel (Ferrari et al., 1998) und auch Herzmuskel (Jackson et al., 2001) differenziert werden. Diese Plastizität widerspricht dem bisherigen Verständnis der adulten Stammzellen, die nur für die Regeneration der Gewebe verantwortlich sein sollten, in denen sie vorkommen. Darüberhinaus wurden auch Stammzellen in Geweben gefunden, die bis dato als statisch angesehen wurden. Beispielsweise konnten neurale Stammzellen aus dem Gehirn laut dieser Studien in Blut (Bjornson et al., 1999) und andere Zelltypen transdifferenzieren (Clarke et al., 2000).

Einige dieser Forschungsergebnisse wiesen zudem darauf hin, daß das umgebende Milieu bei der Umprogrammierung der Zellen eine wesentliche Rolle spielt. Für die Zellersatztherapie stellt dieses Potential der adulten Stammzellen einen wesentlichen Aspekt dar, da sich die Zellen nach der Transplantation möglicherweise an das jeweilige Gewebe anpassen und dort die entsprechenden spezialisierten Zellen bilden können (Abedi et al., 2004). Viele adulte Stammzellen haben zudem den Vorteil, daß sie aus dem Patienten selbst entnommen werden können, und nach der

Retransplantation daher keine Abstossungsreaktion stattfindet. Zudem sind bislang noch keine Anzeichen dafür gefunden worden, daß diese Zellen Tumore bilden.

Wichtige Erkenntnisse bezüglich der Anwendung adulter Stammzellen in der Herzersatztherapie offenbarte die Autopsie von Herzen verstorbener Transplantationspatienten, denen Organe anders geschlechtlicher Spender verpflanzt wurden. Mithilfe spezieller Färbetechniken wurde daran eine chromosomale Analyse der Zellen im Herzen vorgenommen. Die Studien haben ergeben, daß nach Transplantation von weiblichen Herzen in männliche Empfänger (Quaini et al., 2002; Laflamme et al., 2002; Muller et al., 2002; Bayes-Genis et al., 2002) Herzzellen mit Y-Chromosomen existierten. Diese traten zwar nur in einer sehr geringen Anzahl auf (weniger als 0,1% der Zellen), deuteten jedoch auf eine Beteiligung zirkulierender Zellen aus dem Empfängerorganismus an der Bildung neuer Herzzellen hin. Weiteren Aufschluß über die Herkunft dieser Zellen ergab eine Studie an weiblichen Patienten, die eine Knochenmarktransplantation von männlichen Spendern erhielten (Deb et al., 2003). Auch hier zeigten sich Herzzellen, die ein Y-Chromosom trugen und somit von den transplantierten Knochenmarkzellen abgeleitet sein mußten.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde postuliert, daß Zellen aus dem Knochenmark in der Lage sind, Herzzellen zu generieren. Im Knochenmark befinden sich verschiedene Populationen adulter Stammzellen: die blutbildenden hämatopoetischen Stammzellen (HSCs), die Gefäß-bildenden endothelialen Progenitorzellen (EPCs) sowie die Mesenchym-bildenden mesenchymalen Stammzellen (MSCs). Die Ergebnisse waren daher gut mit der neuen Vorstellung der hohen Plastizität von adulten Stammzellen vereinbar und ein Anzeichen für deren Transdifferenzierung. Somit könnten diese Zellen als alternative Quelle zur Behandlung des Herzinfarktes mittels Zellersatztherapie von großer Bedeutung sein.

Der Arbeitsgruppe um Irving Weissman aus Stanford gelang es erstmals, HSCs aus dem Knochenmark von Mäusen (Spangrude et al., 1988) und Menschen (Baum et al., 1992) zu isolieren. Die Zellen wurden aufgrund von bestimmten Oberflächenproteinen wie CD34, Sca-1 oder Thy1 identifiziert und konnten über spezifische Antikörper gegen diese Marker aufgereinigt werden. Etwa 30 HSCs reichten aus, um das Knochenmark tödlich bestrahlter Mäuse neu zu besiedeln und das gesamte Blutsystem wiederherzustellen (Smith et al., 1991).

Die fortschreitende Charakterisierung der HSCs ermöglichte auch deren Lokalisation im peripheren Blut. Während im Knochenmark etwa eine von 10.000 Zellen eine hämatopoetische Stammzelle darstellt, ist der Anteil der HSCs im Blut noch um eine Zehnerpotenz geringer (Weissman, 2000). Allerdings ist es Forschern gelungen, die Anzahl der zirkulierenden Stammzellen im Blut durch Gabe bestimmter Zytokine wie GM-CSF oder SCF-1 zu erhöhen (Yan et al., 1994; Morrison et al., 1997). Mit dieser Methode ist es inzwischen möglich, Blutkrebs-Patienten vor der Chemotherapie genügend körpereigene Stammzellen aus dem peripheren Blut zu entnehmen, und diese anschließend wieder zu retransplantieren (Negrin et al., 2000). Die bereits weiter oben beschriebene Plastizität adulter Stammzellen konnte auch für die HSCs nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, daß aufgereinigte HSCs nach Transplantation in bestrahlte Mäuse nicht nur neue Blutzellen produzierten, sondern auch Zellen anderer Organe bildeten (Krause et al., 2001). Eine Forschergruppe um Piero Anversa hat 2001 in einem Herzinfarktmodell an Mäusen demonstriert, daß hämatopoetische Vorläuferzellen nach Injektion in das geschädigte Gewebe in der Lage sind, neues Herzgewebe zu bilden (Orlic et al., 2001a). Der Einsatz dieser Zellen ist demzufolge nicht nur in der Krebsbehandlung, sondern auch für regenerative Zelltherapien denkbar (Kondo et al., 2003), beispielsweise auch bei Herzinfarktpatienten. Problematisch ist dabei allerdings die geringe Anzahl dieser Stammzellen im Körper. Um die Aufreinigung ausreichend großer Mengen an HSCs für solche alternativen Therapieansätze zu ermöglichen, wurden daher Protokolle etabliert, mit denen die Zellen *in vitro* kultiviert und angereichert werden können (Van et al., 1994; Moore et al., 1997; Ema et al., 2000), bislang allerdings noch mit unzureichenden Erfolgen.

Die Untersuchungen der hämatopoetischen Stammzellen legten auch den Grundstein für die Entdeckung von endothelialen Vorläuferzellen. HSCs, die anhand der Oberflächenproteine CD34 und VEGFR-2 aufgereinigt wurden, zeigten in einer Studie von Asahara *et al.* in der Kultur einen endothelialen Phänotyp und integrierten *in vivo* in neugebildete Blutgefäße ischämischer Gewebe (Asahara et al., 1997). Weitere Studien bestätigten das Potential dieser Zellen, an der Gefäßbildung mitzuwirken (Bhattacharya et al., 2000). Durch die Entdeckung zusätzlicher Marker ist es mittlerweile möglich, EPCs spezifisch aus dem Knochenmark zu isolieren und *ex vivo* zu kultivieren (Peichev et al., 2000). Die verbesserte Neovaskularisierung

ischämischer Gewebe durch Transplantation aufgereinigter EPCs wurde in verschiedenen Läsionsmodellen nachgewiesen, wie im Skelettmuskel (Kalka et al., 2000), Herzmuskel (Kawamoto et al., 2001) und der Retina (Grant et al., 2002).

Es konnte auch gezeigt werden, daß EPCs aufgrund bestimmter Verletzungen aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf freigesetzt werden (Gill et al., 2001; Shintani et al., 2001) und in die geschädigten Areale einwandern (Asahara et al., 1999). Die Existenz zirkulierender EPCs aus dem Knochenmark *in vivo* wurde erstmalig in Studien an Hunden nachgewiesen, die zuvor eine allogene Knochenmarktransplantation erhielten (Shi et al., 1998). Gefäßimplantate, die in die Aorta dieser Hunde eingesetzt wurden, waren nach 12 Wochen ausschließlich mit Knochenmark-abgeleiteten Endothelzellen besetzt. Diese Untersuchungen belegten die physiologische Bedeutung dieser Zellen in adulten Lebewesen und die mögliche Relevanz für klinische Anwendungen (Isner und Asahara, 1999). Die Anzahl der EPCs im Knochenmark und vor allem im peripheren Blut ist allerdings sehr gering (Raffi et al., 2002).

Eine weitere Stammzellpopulation des Knochenmarks bilden die MSCs, die für die Generierung von Knochen und Bindegewebe verantwortlich sind (Friedenstein et al., 1966). Die MSCs exprimieren eine Reihe von Oberflächenmarkern, allerdings ist keiner spezifisch genug, um die Zellen direkt aus dem Knochenmark aufzureinigen. Die Anreicherung der Zellen geschieht stattdessen *in vitro* über Anheftung an Plastik in der Zellkultur. Während eine Expansion von HSCs oder EPCs außerhalb des Körpers nur bedingt möglich ist, können MSCs *in vitro* kultiviert und um ein Vielfaches vermehrt werden (Bruder et al., 1997). Die Stammzell-Eigenschaften der Zellen (Vermehrbarkeit und Plastizität) bleiben dabei erhalten (Conget und Minguell, 1999). Obwohl nur etwa 1 in 100.000 Knochenmarkzellen eine mesenchymale Stammzelle darstellt (Pittenger et al., 1999), wäre es daher möglich, in wenigen Wochen ausreichend große Zahlen körpereigener MSCs für eine Zelltransplantation zur Verfügung stellen zu können.

Darüberhinaus wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen, daß MSCs ein hohes Differenzierungspotential besitzen. Unter geeigneten Kulturbedingungen können sie *in vitro* zu diversen Zelltypen wie Knochen- (Bruder et al., 1997), Knorpel- (Majumdar et al., 2000), Sehnen- (Awad et al., 1999), Fett- (Prockop, 1997), Nerven- (Woodbury et al., 2000), Endothel- (Oswald et al., 2004) und Muskelzellen

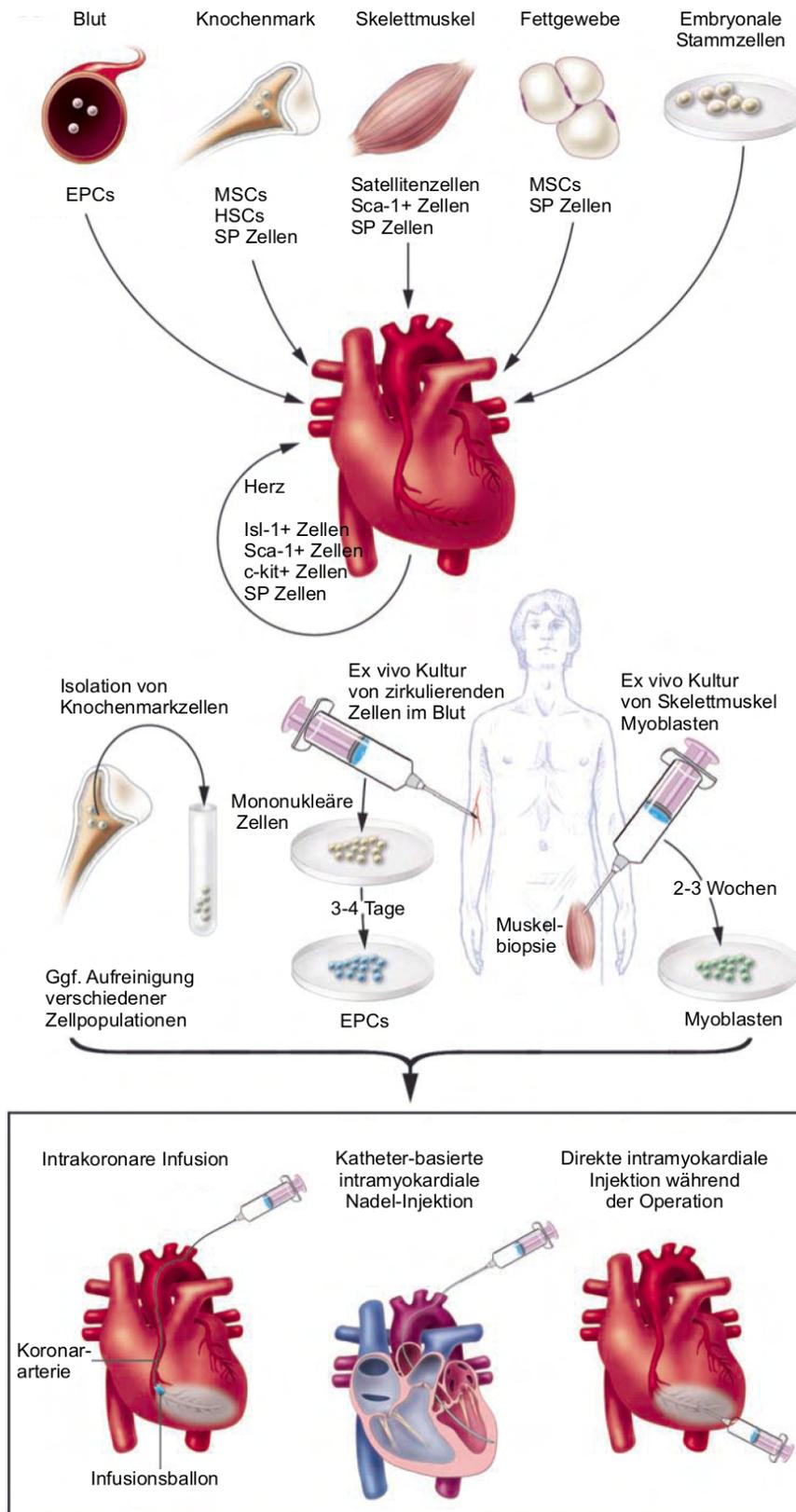
(Wakitani et al., 1995) differenzieren. Diese Plastizität der MSCs konnte auch *in vivo* gezeigt werden. Nach In Uteru-Transplantation bei Schafen (Liechty et al., 2000) und nach systemischer Injektion in Primaten (Devine et al., 2003) zeigte sich eine Integration und Gewebe-spezifische Entwicklung der Zellen in unterschiedlichen Organen. Ähnliche Ergebnisse lieferten Tierstudien an verschiedenen Krankheitsmodellen. Die MSCs waren nach Transplantation in die geschädigten Organe in der Lage, zu Knochenzellen (Pereira et al., 1998), Astrozyten im Gehirn (Kopen et al., 1999) oder auch Kardiomyozyten im Herzen (Toma et al., 2002; Tomita et al., 2002) zu differenzieren.

#### **1.4 Knochenmarkzellen in der Zellersatztherapie**

Aufgrund der vielversprechenden Versuchsergebnisse *in vitro* und im Tiermodell wurden zahlreiche klinische Studien initiiert (vgl. auch Abb. 2), in denen Gesamtknochenmark oder einzelne Teilpopulationen daraus in das Herz von Infarktpatienten appliziert wurden (Strauer et al., 2002; Assmus et al., 2002b; Stamm et al., 2003; Fernandez-Aviles et al., 2004). Nach der Behandlung konnten Verbesserungen der linksventrikulären Funktionsparameter sowie eine Reduktion der Infarktgröße bei den Patienten festgestellt werden, allerdings fehlten in diesen Studien die entsprechenden Kontrollgruppen ohne Zelltherapie.

In einer ersten randomisierten Doppel-Blind-Studie (Wollert et al., 2004) zeigten die mit Knochenmarkzellen behandelten Patienten zwar eine leicht verbesserte Kontraktilität und linksventrikuläre Pumpfunktion, eine signifikante Veränderung der Infarktgröße gegenüber der Kontrollgruppe konnte aber nicht nachgewiesen werden. Das entspricht auch den vor kurzem veröffentlichten Ergebnissen zweier weiterer Blindstudien, in denen weder nach direkter Applikation der Knochenmarkzellen über die Koronararterien (Janssens et al., 2006) noch nach Mobilisierung (Zohnhofer et al., 2006) ein positiver Effekt auf die Linksherzfunktion gefunden werden konnte.

Trotz der widersprüchlichen Befunde werden die klinischen Studien momentan weiter fortgesetzt, da die Möglichkeit einer Funktionsverbesserung besteht, und die Behandlung bislang zumindest kein erhöhtes Risiko für die Patienten darstellte.



**Abbildung 2: Verschiedene Ansätze zur zellulären Ersatztherapie des Herzinfarktes**

Im Tiermodell wurden diverse unterschiedliche Zellpopulationen für eine Therapie des Herzinfarktes untersucht (oben). Bereits in klinischen Studien angewendet wurden bislang unfraktioniertes Knochenmark, endotheliale Vorläuferzellen (EPCs) und Skelettmuskelzellen (mitte). Die Zellen können dabei über verschiedene Verfahren appliziert werden (unten). Schema adaptiert von Dimmeler et al. (Dimmeler et al., 2005).

## 1.5 Ziele dieser Arbeit

Trotz verbesserter Prävention und Fortschritten in der Therapie sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen die Haupttodesursache in unserer Gesellschaft. Der Verlust von funktionalem Muskelgewebe nach einem Herzinfarkt führt zur Narbenbildung und erhöht das Risiko einer Herzinsuffizienz. In den letzten Jahren geriet die zelluläre Ersatztherapie als kausale Behandlungsmethode zur Regeneration des geschädigten Gewebes in den Blickpunkt der medizinischen Forschung. Zahlreiche unterschiedliche Zelltypen wurden in Tierexperimenten und ersten klinischen Studien untersucht (vgl. Abbildung 2).

Die Ergebnisse dieser Studien sind jedoch sehr vielseitig und werden kontrovers diskutiert. Vor allem ist noch nicht geklärt, welcher Mechanismus eine mögliche Funktionsverbesserung bewirkt, und welche Zellpopulation am besten geeignet ist, um das verlorengegangene Herzgewebe wiederherzustellen und die Pumpfunktion des Herzens zu verbessern.

In dieser Arbeit sollte daher das Potential unfraktionierter Zellen und einzelner Zellpopulationen aus dem Knochenmark in einem Herzinfarktmodell an Mäusen untersucht werden. Dazu wurden Primärzellen aus transgenen Mäusen etabliert, die aufgrund verschiedener Reportersysteme eine Detektion der transplantierten Zellen und deren Differenzierung ermöglichen.

Besonderem Interesse galten dabei folgende Fragestellungen:

- (1) Wie hoch ist die Effizienz und Dauer der Integration der transplantierten Zellen in dem geschädigten Gewebe?
- (2) Wie verhalten sich die Zellen nach der Integration in das Gewebe? Differenzieren die Zellen gewebespezifisch zu Herzzellen oder Endothelzellen?
- (3) Resultiert die Behandlung in einer verbesserten Herzfunktion?
- (4) Ist die Behandlung mit Knochenmarkszellen sicher? Gibt es Risiken, die eine klinische Anwendung in Frage stellen könnten?

## 2 Material und Methoden

Die Materialien wurden, wenn nicht anders beschrieben, von folgenden Firmen bezogen:

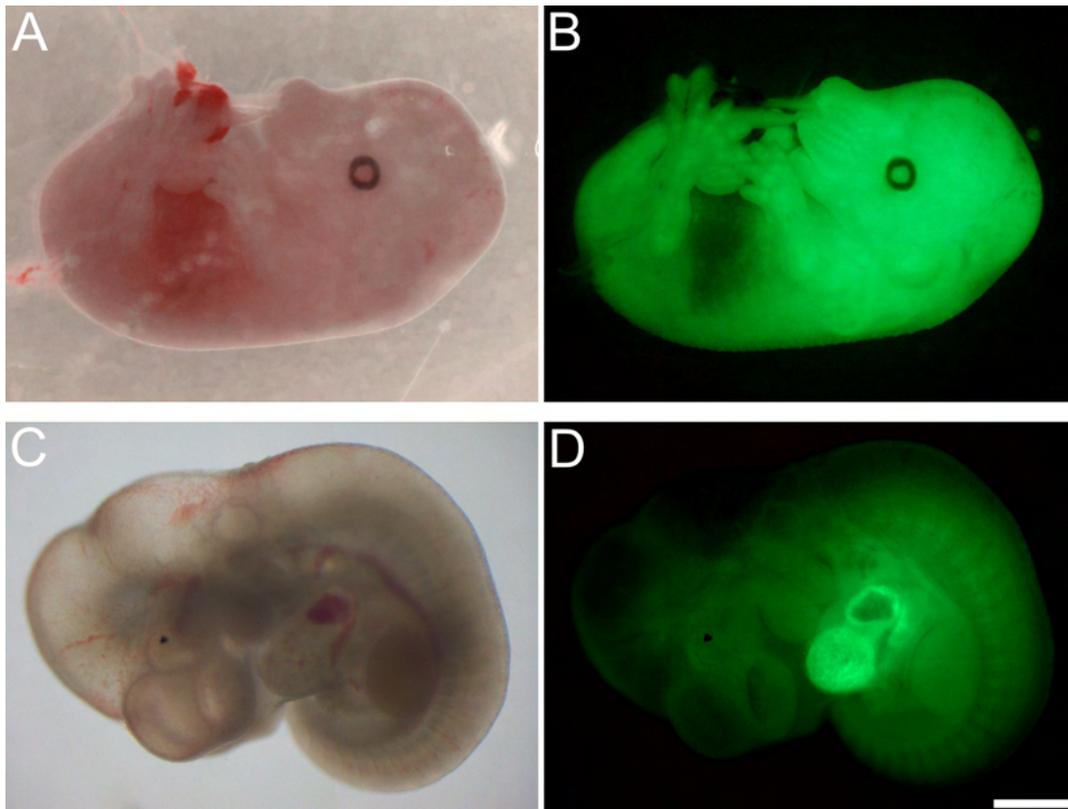
Chemikalien von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland)

Medien und Medienzusätze von Gibco (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

Zellkulturmaterial von Falcon (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland)

### 2.1 Transgene Mäuse

Die Gewinnung primärer Zellen erfolgte zum Teil aus transgenen Mausstämmen auf C57BL/6-Hintergrund, in denen ein Live-Reporter-Gen unter Gewebe-spezifischen Promotoren exprimiert wurde. Das ermöglichte eine Detektion und Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen und war ein wichtiges Hilfsmittel für die Durchführung der Experimente. Das hierbei zumeist verwendete EGFP (enhanced green fluorescent protein) ist ein synthetisch verändertes Fluoreszenzprotein, das ursprünglich der Quallengattung *Aequorea Victoria* entstammt (Chalfie et al., 1994; Heim et al., 1994) und als Live-Reporter verwendet werden kann. Es emittiert bei Anregung durch Fluoreszenzlicht der Wellenlänge 488 nm im grünen Fluoreszenzbereich und kann mit spezifischen Filtern sichtbar gemacht werden. Die Funktionalität der Zellen wird dabei durch die Expression des EGFPs nicht beeinträchtigt. In dieser Studie wurden zwei verschiedene EGFP-Transgene eingesetzt, in denen das Protein muskelspezifisch unter Kontrolle eines Alpha-Aktin-Promotors oder ubiquitär unter Kontrolle eines Beta-Aktin-Promotors exprimiert wurde (Abb. 3). Die Beta-Aktin-EGFP transgenen Mäuse zeigten in nahezu allen Zellen eine starke EGFP-Fluoreszenz (Okabe et al., 1997). Die Alpha-Aktin-EGFP transgenen Mäuse zeigten eine schwache Basis-Aktivität des Promotors in den meisten Geweben, die zu einer niedrigen Hintergrundfluoreszenz führte, und eine sehr hohe EGFP-Expression in Muskel- und Herzzellen (Fleischmann et al., 1998).



### Abbildung 3: Transgene Mausmodelle

Der Mausembryo (14.5 dpc) einer Beta-Aktin-EGFP transgenen Maus (A, Weißlicht; B, Fluoreszenz) zeigt in nahezu allen Zellen starke EGFP-Fluoreszenz (durch die Pigmentierung der Iris und das Blut in der Leber erscheinen diese Bereiche dunkel). In der Alpha-Aktin-EGFP transgenen Maus (C, Weißlicht; D, Fluoreszenz) weisen die meisten Zellen des Embryos (10.5 dpc) nur eine schwache Hintergrundfluoreszenz auf, während sich das Herz deutlich heller darstellt (der Blut-gefüllte Vorhof ist als dunklerer Bereich zu erkennen). Balken: A-B = 160  $\mu\text{m}$ , C-D = 80  $\mu\text{m}$ )

Ein weiterer Reporter, der in dieser Studie benutzt wurde, war die Beta-Galaktosidase aus E-coli-Bakterien, ein durch das LacZ-Gen kodiertes Enzym, das sich durch die Färbung mit X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl  $\beta$ -D-Galactosid) blau anfärben ließ. Der verwendete ROSA26-Mausstamm exprimierte Beta-Galaktosidase in nahezu allen Geweben (Zambrowicz et al., 1997).

#### 2.1.1 Organentnahme aus der Maus

Die Mäuse wurden unter Einhaltung der Tierschutzbestimmungen durch zervikale Dislokation getötet. Dabei wurden Schädel und Halswirbelsäule gegeneinander verschoben und das Rückenmark durchtrennt. Nach dem Töten wurden die Tiere mit 70%igem Ethanol abgesprüht, um Verunreinigungen durch Haare und

Kontaminationen vorzubeugen. Die benötigten Organe wurden möglichst schnell freipräpariert, entnommen und anschließend in PBS auf Eis deponiert.

### 2.1.2 Knochenmarkentnahme

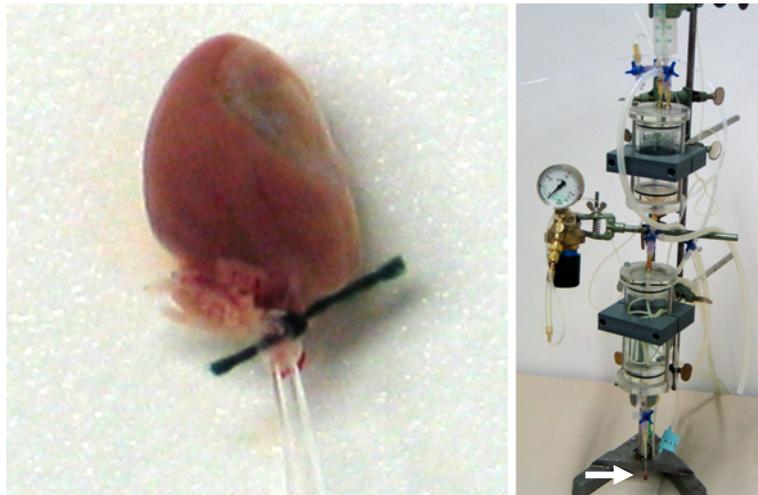
Knochenmark wurde aus adulten, 2-3 Monate alten Mäusen entnommen. Dazu wurde das Fell entlang der Hinterbeine aufgeschnitten und die Ober- und Unterschenkelknochen im Ganzen präpariert. Die Knochen wurden mit der Schere und mit in 70%igen Ethanol getränkten Papiertüchern gründlich von anhängendem Fett- und Muskelgewebe befreit. Dann wurden sie unter einer Sterilbank an beiden Enden aufgeschnitten, und das Knochenmark mit Hilfe einer Spritze und einer 27G-Kanüle mit PBS herausgeschwemmt. Die Knochenmarkzellen wurden durch Einsaugen in die Spritze und anschließendem Ausspülen vereinzelt und zur Entfernung größerer Zellaggregate und Knochensplitter durch ein 70 µm Zellsieb pipettiert. Die Zellen wurden schließlich zentrifugiert (5 Minuten, 300 g) und für die Transplantation vorbereitet oder zur Gewinnung von mesenchymalen oder hämatopoetischen Stammzellen verwendet.

### 2.1.3 Gewinnung adulter Kardiomyozyten

Kalzium-freie Lösung:	135 mmol	Natriumchlorid
	4 mmol	Kaliumchlorid
	1 mmol	Magnesiumchlorid
	5 mmol	HEPES
	10 mmol	D-Glukose
Enzymlösung:	30 ml	Kalzium-freie Lösung
	8 mg	Trypsin (Roche)
	25 mg	Kollagenase L (Sigma)

Die Mäuse wurden 20 Minuten vor der Tötung mit 200 µl Heparin (1000 IE Liquemin N; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) injiziert, um die

Blutgerinnung zu hemmen. Nach dem Töten wurde der Brustkorb oberhalb des Zwerchfells und seitlich geöffnet und das Herz vorsichtig herauspräpariert. Anheftendes Bindegewebe wurde entfernt und die Aorta freigelegt. Eine mit Kalzium-freier Lösung gefüllte Glaskapillare wurde durch die Aorta in den linken Ventrikel eingebracht und mit einem Faden festgebunden. (Abb. 4) Das kannulierte Herz wurde in einer Langendorff-Apparatur befestigt und zuerst mit oxygenierter Kalzium-freier Lösung für 3-5 Minuten bei einem Druck von 70-80 mmHg bei 37°C durchgespült (Abb. 4). Anschließend folgte das Spülen mit frisch angesetzter Enzymlösung bei 37°C für 15-20 Minuten mit einem ansteigenden Druck von anfangs 120 mmHg bis 175 mmHg. Schließlich wurde noch 1-2 Minuten mit Kalzium-freier Lösung gewaschen und danach das Herz von der Apparatur entfernt. Mit zwei Pinzetten wurde das Gewebe vorsichtig zu einer Einzelzellsuspension zerkleinert.



**Abbildung 4: Gewinnung adulter Kardiomyozyten**

Zur enzymatischen Dissoziation adulter Herzzellen wurde das Herz entnommen und eine Glaskapillare mit Kalzium-freier Lösung in den Ventrikel eingeführt und mit einem Faden fixiert (links). Das Herz wurde anschließend in einer Langendorff-Apparatur befestigt (rechts, Pfeil) und mit Enzymlösungen durchspült.

**2.1.4 Gewinnung embryonaler Fibroblasten**

Embryonale Fibroblasten wurden aus Maus-Embryos 13-14 Tage nach der Befruchtung gewonnen und als Nährzellen bei der Kultivierung von embryonalen Stammzellen eingesetzt. Für die Entnahme der Embryos wurde die Bauchhöhle des

Muttertieres geöffnet und die Uterus-Hörner am unteren Ende mit einer Schere abgetrennt. Die Uterus-Hörner mit den Embryos wurden in eine mit PBS gefüllte Plastikschaale überführt, und die Embryos durch das Entfernen der Plazenta und der Fruchtblase einzeln freipräpariert. Dann wurden die Embryos vom Kopf und von allen inneren Organen befreit. Nach grober Zerkleinerung mittels Pinzetten wurden die Gewebe mit 0.125% Trypsin/EDTA verdaut. Das Enzym wurde nach 30 Minuten durch Zugabe von DMEM/15% FCS inaktiviert und das aufgeweichte Gewebe mittels einer Eppendorf-Pipette vorsichtig dissoziiert. Die entstandene Zellsuspension wurde durch ein 70 µm Zellsieb gegeben, um nicht vereinzelt Zellaggregate und Gewebestücke zu entfernen. Schließlich wurde die Zellsuspension 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert, und jeweils 500.000 Zellen auf 10 cm-Zellkulturschalen in DMEM/15% FCS ausplattiert. Nach zwei Tagen wurden die embryonalen Fibroblasten eingefroren und konnten später für die Generierung von Nährzellen wieder aufgetaut werden.

## **2.2 Kultivierung der Zellen**

### **2.2.1 Passage**

Die kultivierten Zellen wurden bei Erreichen einer definierten Dichte von den Zellkulturschalen abgelöst. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Kulturschalen wurden einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 0.125% Trypsin/EDTA bedeckt im Brutschrank bei 37°C 3-5 Minuten inkubiert, bis sich die Zellen ablösten. Das Trypsin wurde anschließend durch Zugabe der doppelten Menge Medium mit FCS inaktiviert, die abgelösten Zellen durch mehrmaliges Pipettieren vereinzelt und in einer Neubauer-Kammer gezählt. Nach Zentrifugation (5 Minuten, 300 g) wurde das Zell-Pellet in Medium aufgenommen und in einer definierten Dichte auf neue Zellkulturschalen ausplattiert.

### 2.2.2 Einfrieren

Einfriermedium:               80% FCS  
  20% DMSO

Zum Einfrieren wurde das Zell-Pellet in normalem Kulturmedium aufgenommen, und die gleiche Menge von eiskaltem Einfriermedium zugesetzt. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde in beschriftete Einfrier-Röhrchen (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) gefüllt. Die Röhrchen wurden in einer Styroporbox bei –80°C über Nacht eingefroren und nach spätestens einer Woche in flüssigem Stickstoff eingelagert.

### 2.2.3 Nährzellen

Nährzell-Medium:               DMEM-HG  
  10-15% FCS  
  2 mM L-Glutamin

Zur Generierung von Nährzellen wurden embryonale Fibroblasten nach dem Auftauen in einer Dichte von 500.000 Zellen pro 10 cm-Zellkulturschale in Nährzell-Medium ausplattiert. Um eine bakterielle Kontamination der primären Zellen auszuschließen, wurden dem Kulturmedium keine Antibiotika hinzugefügt. Das Medium wurde alle 2-3 Tage durch frisches ersetzt, konfluent gewachsene Zellen wurden passagiert und in der oben angegebenen Dichte auf neue Schalen ausplattiert. Nach der dritten Passage wurden die dicht gewachsenen Fibroblasten mit 0.125% Trypsin/EDTA abgelöst und durch hochenergetische Röntgenstrahlen Teilungs-inaktiviert. Die Bestrahlung erfolgte bei einer Einzeldosis von 15 Gy mit einem Abstand (skin source distance, SSD) von 100 cm und einer Dosisrate von 2-3 Gy/min. Die inaktiven Nährzellen wurden eingefroren und bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Herstellung von mit Nährzellen beschichteten Zellkulturschalen wurden die bestrahlten Zellen aufgetaut und in einer Dichte von 15.000/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Am nächsten Tag konnten die Schalen zur Kultivierung von ES-Zellen verwendet werden.

### 2.2.4 ES-Zellen

ES-Zell-Kultur-Medium: DMEM-HG  
 15% FCS  
 2 mM L-Glutamin  
 2 mM Nicht essentielle Aminosäuren  
 100 IU Penicillin  
 100 µg/ml Streptomycin  
 50 pM Beta-Mercaptoethanol  
 100 nM LIF (Chemicon, Hampshire, England)

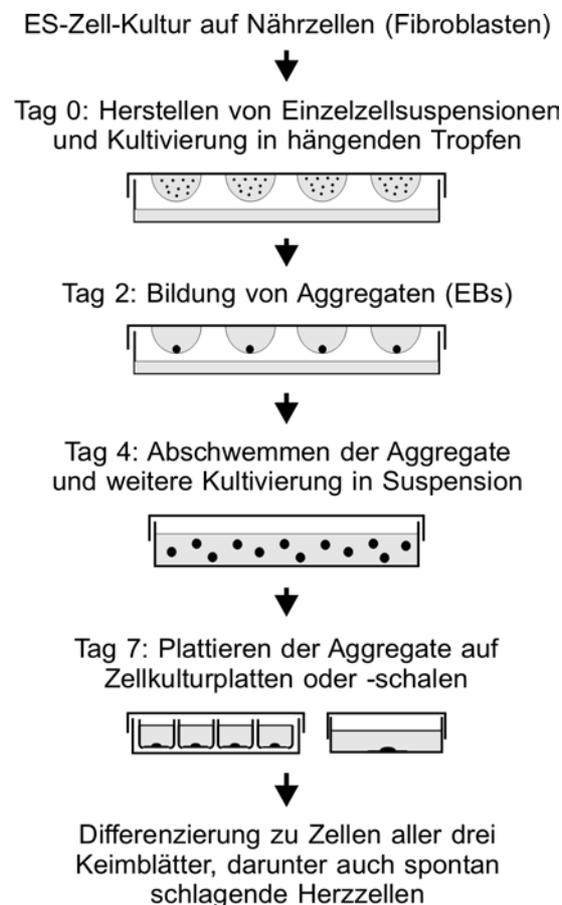
Murine D3 ES-Zellen wurden in ES-Zell-Kultur-Medium auf mit inaktiven Nährzellen beschichteten Zellkulturschalen kultiviert, wobei LIF dem Medium jeweils frisch hinzugegeben wurde. Um eine Differenzierung der embryonalen Stammzellen zu verhindern, durften die einzelnen Kolonien weder zu groß, noch zu dicht aneinander wachsen. Daher wurden die Zellen alle 2-3 Tage passagiert und in einer Dichte von 500/cm<sup>2</sup> auf neue Schalen mit Nährzellen ausplattiert. Bei der Zählung der ES-Zellen war darauf zu achten, daß die Anzahl der eingesetzten Nährzellen von der Gesamtzahl der Zellen abgezogen wurde.

### 2.2.5 Differenzierung der ES-Zellen in hängenden Tropfen

ES-Zell-Differenzierungs-Medium: IMDM  
 20% FCS  
 2 mM L-Glutamin  
 2 mM Nicht essentielle Aminosäuren  
 100 IU Penicillin  
 100 µg/ml Streptomycin  
 50 pM Beta-Mercaptoethanol

Die Differenzierung der ES-Zellen erfolgte nach der Methode der "Hängenden Tropfen". Dazu wurden die ES-Zellen wie beschrieben zu Einzelzellen dissoziiert und in einer Dichte von 20.000 Zellen/ml in ES-Zell-Differenzierungs-Medium

aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 60-80 Tropfen zu jeweils 20  $\mu\text{l}$  auf Deckel von bakteriologischen 10 cm-Schalen aufgetragen und kopfüber auf mit PBS gefüllte Schalen gesetzt. Durch Absinken aufgrund der Schwerkraft sammelten sich die Zellen unten im Tropfen und bildeten Aggregate, die sogenannten EBs (embryoid bodies). Die Zellaggregate wurden nach 2 Tagen abgewaschen und in Differenzierungsmedium weitere 3-7 Tage in Suspension auf bakteriologischen Schalen kultiviert. Dann wurden die EBs auf Zellkultur-beschichtete Schalen oder Lochplatten ausplattiert. Dieses Protokoll führte zur Differenzierung der EBs in Zellen aller drei Keimblätter (Smith, 2001). Die mesodermalen Herzmuskelzellen konnten 8-9 Tage nach dem Ansetzen der Tropfen als spontan schlagende Areale identifiziert werden.



**Abbildung 5: Differenzierung der ES-Zellen in hängenden Tropfen**

Schematische Darstellung der einzelnen Schritte zur Differenzierung von ES-Zellen nach der Methode der hängenden Tropfen.

Zur besseren Visualisierung und zur spezifischen Aufreinigung der differenzierten Herzzellen wurde zudem ein transgener ES-Zell-Klon eingesetzt, in dem der Live-Reporter EGFP und eine Puromycin-Resistenz unter der Kontrolle des herzspezifischen Alpha-MHC-Promotors exprimiert wurden. Die aus diesen ES-Zellen generierten EBs zeigten nach 8-9 Tagen Differenzierung grüne Areale, die kurze Zeit später spontan zu schlagen begannen. Durch die Puromycin-Resistenz der zu Herz differenzierten ES-Zellen war es möglich, diese durch Zugabe von 5-10 µg/ml Puromycin ins Differenzierungsmedium aufzureinigen, da alle undifferenzierten Zellen aufgrund der fehlenden Antibiotika-Resistenz zugrunde gingen.

### 2.2.6 MSCs

MSC-Medium:                   DMEM-HG  
                                      15% FCS  
                                      2 mM L-Glutamin  
                                      100 IU Penicillin  
                                      100 µg/ml Streptomycin

Zur Isolation von MSCs wurde Knochenmark aus Mäusen wie oben beschrieben aufgereinigt und in MSC-Medium komplett auf Zellkulturschalen ausplattiert. Nach drei Tagen wurde das Medium mit den darin befindlichen Zellen abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Durch weitere Mediumwechsel alle 2-3 Tage wurden so die nicht adherent wachsenden Blutzellen entfernt, während die anwachsenden MSCs proliferierten und einzelne Kolonien bildeten. Wenn die Zellkulturschale nahezu dicht mit MSCs bewachsen war, wurden die Zellen passagiert, wie oben beschrieben. Mit dieser Methode wurden initial zwar auch adherent wachsende Monozyten aus dem Knochenmark mit aufgereinigt. Diese konnten allerdings ohne die Zugabe bestimmter Wachstumsfaktoren nicht überleben und sind abgestorben, so daß nach etwa 3 Passagen eine reine MSC-Kultur vorlag.

## 2.2.7 *In vitro* Differenzierung von MSCs

Durch die Zugabe bestimmter Stoffe in das Kulturmedium sollten die MSCs *in vitro* zu unterschiedlichen mesodermalen Zelltypen differenziert werden.

### 2.2.7.1 Differenzierung zu Fettzellen

Basis-Medium:                   DMEM-LG  
   10% FCS  
   2 mM L-Glutamin  
   100 IU Penicillin  
   100 µg/ml Streptomycin

Differenzierungszusätze:   Dexamethason (0.25 µM)  
   Isobutylmethylxanthin (450 µM)  
   Hydrocortison (1.4 µM)  
   Indomethacin (200 µM)  
   Insulin (1.15 µM)

Die MSCs wurden in einer Dichte von 20.000/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Nach Erreichen einer konfluenten Dichte wurden die Differenzierungszusätze hinzugegeben und das komplette Differenzierungsmedium alle 3-4 Tage durch frisches ersetzt. Nach 1-3 Wochen wurde die Differenzierung der Zellen morphologisch und mittels Ölrot O-Färbungen histologisch untersucht.

### 2.2.7.2 Differenzierung zu Knochenzellen

Basis-Medium:                   DMEM-LG  
   10% FCS  
   2 mM L-Glutamin  
   100 IU Penicillin  
   100 µg/ml Streptomycin

Differenzierungszusätze:     Dexamethasone (0.1  $\mu$ M)  
                                   Ascorbinsäure (500  $\mu$ M)  
                                    $\beta$ -Glycerolphosphat (10 mM)

Die MSCs wurden in einer Dichte von 10.000/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Nach Erreichen einer Dichte von ca. 70% wurden die Differenzierungszusätze hinzugegeben und das komplette Differenzierungsmedium alle 2-3 Tage durch frisches ersetzt. Nach 1-3 Wochen wurde die Differenzierung der Zellen morphologisch und mittels von Kossa-, Alizarin Rot- und Alkaliner Phosphatase-Färbungen histologisch untersucht. Zudem wurde ein immunhistochemischer Nachweis der Osteoblastendifferenzierung über einen Antikörper gegen Osteocalcin durchgeführt.

### **2.2.7.3 Differenzierung zu Knorpelzellen**

Basis-Medium:                 DMEM/F-12  
                                   ITS supplement  
                                   2 mM L-Glutamin  
                                   100 IU Penicillin  
                                   100  $\mu$ g/ml Streptomycin

Differenzierungszusätze:     Dexamethasone (0.1  $\mu$ M)  
                                   Ascorbinsäure (500  $\mu$ M)  
                                   Prolin (35 mM)  
                                   Natriumpyruvat (1 mM)  
                                   TGF- $\beta$ 3 (10 ng/ml)

Nach dem Ablösen der MSCs von den Kulturschalen wurden jeweils 250.000 Zellen in 15 ml-Röhrchen abzentrifugiert und das Pellet vorsichtig mit 2 ml Differenzierungsmedium überschichtet. Die Zellen wurden in Pellets inkubiert, wobei die Deckel der Röhrchen zur Gewährleistung des Gasaustauschs nur leicht aufgesetzt wurden. Das Differenzierungsmedium wurde alle 3-4 Tage vorsichtig

durch frisches ersetzt. Nach etwa 3 Wochen wurden die Zellpellets für 30 Minuten in 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert und mit Einbettmedium (Tissue-Tek O.C.T. Compound; Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande) in Isopentan auf Trockeneis bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren (vgl. Kapitel 2.5). Die Differenzierung der MSCs zu Knorpelzellen wurde an Gefrierschnitten durch Alcian-Blau-Färbung histologisch untersucht.

#### 2.2.7.4 Differenzierung zu Herzzellen mit 5-Aza-Cytidin

Basis-Medium:                   IMDM  
  20% FCS  
  2 mM L-Glutamin  
  100 IU Penicillin  
  100  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin

Differenzierungszusätze:    5-Aza-Cytidin (10  $\mu\text{M}$ )  
  5-Aza-2'-deoxycytidin (10  $\mu\text{M}$ )  
  Amphotericin B (270  $\mu\text{M}$ )

Die MSCs wurden in einer Dichte von  $1000/\text{cm}^2$  ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Differenzierungszusätze einzeln oder in Kombination hinzugegeben (vgl. Kapitel 3.2.4, Tabelle 1) und das komplette Differenzierungsmedium für weitere zwei Tage täglich durch frisches ersetzt. Anschließend wurde alle 2-3 Tage frisches Basis-Medium hinzugegeben. Nach mindestens 3 Wochen wurde die Differenzierung der Zellen morphologisch untersucht. Dabei wurden verschiedene Parameter analysiert, eine veränderte langgestreckte Form der Zellen, spontan schlagende Areale sowie im Falle der Alpha-Aktin-EGFP transgenen MSCs eine Zunahme der grünen Fluoreszenz. Zudem wurde ein immunhistochemischer Nachweis der Muskeldifferenzierung über einen Antikörper gegen Alpha-Aktinin durchgeführt.

### **2.2.7.5 Differenzierung zu Herzzellen in hängenden Tropfen**

Die Differenzierung der MSCs in hängenden Tropfen wurde entsprechend dem ES-Zell Protokoll durchgeführt (vgl. Kapitel 3.2.4). Dazu wurden die Zellen gezählt und in einer definierten Dichte (400-4800 Zellen/Tropfen) in Tropfen auf dem Deckel einer bakteriologischen Schale ausplattiert. In einigen Experimenten wurden die MSCs vor dem Einsetzen in hängenden Tropfen wie die ES-Zellen auf Nährzellen kultiviert. In weiteren Ansätzen wurde ein Gemisch aus Alpha-Aktin-EGFP transgenen MSCs und D3-ES-Zellen zur Bildung der Aggregate eingesetzt.

Die Auswertung der Differenzierung erfolgte über den Nachweis spontan schlagender Areale sowie im Falle der Alpha-Aktin-EGFP transgenen MSCs über eine Zunahme der grünen Fluoreszenz.

## **2.3 Durchflußzytometrie**

Für die Durchflußzytometrie wurden Zellsuspensionen mit einer Dichte von  $1-2 \times 10^6$  Zellen/ml hergestellt. Jeweils 90  $\mu$ l der Zellsuspension wurden mit je 10  $\mu$ l einer vorverdünnten Antikörper-Lösung (1:10) gemischt und für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Als Negativkontrollen dienten jeweils Färbungen mit entsprechenden Isotyp-Antikörpern (alle FACS-Antikörper von Pharmingen, wenn nicht anders angegeben). Nach der Färbung wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und abzentrifugiert (5 Minuten, 300 g). Der Überstand wurde abgeschüttet und das Pellet in 500  $\mu$ l PBS/1% FCS aufgenommen. Die Zellen wurden mit einem FACStar, FACScan oder FACSCalibur (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) analysiert, die Auswertung der Meßdaten erfolgte mit dem Programm Cellquest.

### **2.3.1 Bestimmung der Rekonstitution im Peripheren Blut**

Um den Erfolg der Blutrekonstitution nach Knochenmarktransplantationen zu analysieren, wurde den behandelten Mäusen 100  $\mu$ l Blut abgenommen und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Das Blut wurde mit 0.5 ml 2%iger Dextran T-500 Lösung (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) unterschichtet und für

25 Minuten bei 37°C inkubiert. Die obere Phase mit den Zellen wurde abgenommen und in neue Eppendorfgefäße transferiert. Nach einmaligem Waschen mit 1 ml PBS und Zentrifugation (5 Minuten, 300 g) wurde der Überstand verworfen und das Pellet zur Lyse der roten Blutkörperchen in 200 µl kalter NH<sub>4</sub>Cl-Lösung (0.8% NH<sub>4</sub>Cl, 0.1 mM EDTA) aufgenommen. Nach 2 Minuten wurden die Zellen erneut mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt.

Verwendete Antikörper / Endkonzentration:	B220 PE	1:400
	CD4 PE	1:800
	CD8 PE	1:800
	Mac-1 PE	1:800

Der Grad der Rekonstitution ergab sich aus dem Prozentsatz der EGFP-positiven Zellen im peripheren Blut. Die Verteilung der einzelnen Blutzellpopulationen ergab sich aus dem jeweiligen Anteil der entsprechend positiven Marker innerhalb der EGFP-positiven Zellen (B220: B-Zellen, CD4/CD8: T-Zellen, Mac-1: myeloide Zellen, hauptsächlich Monozyten/Makrophagen).

### 2.3.2 Charakterisierung der MSCs

Zur Charakterisierung der MSCs wurde die Expression bestimmter Oberflächen-Antigene mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Dazu wurden die Zellen trypsiniert und die Einzelzellsuspensionen wie oben beschrieben gefärbt.

Verwendete Antikörper / Endkonzentration:	CD45 PE	1:800
	CD11b PE	1:800
	Sca-1 PE	1:200
	CD44	1:200
	CD49e	1:200
	CD106	1:10

Der CD106-Antikörper wurde bereits vorverdünnt von Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

## **2.4 Operative Techniken**

Die operativen Eingriffe in die Mäuse (Kryoinfarkt, LAD-Ligatur und Linksherzkatheter) wurden in Zusammenarbeit mit der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie vorgenommen und unter meiner Assistenz von deren Mitarbeitern durchgeführt.

### **2.4.1 Vorbereitung der Zellen für die Transplantation**

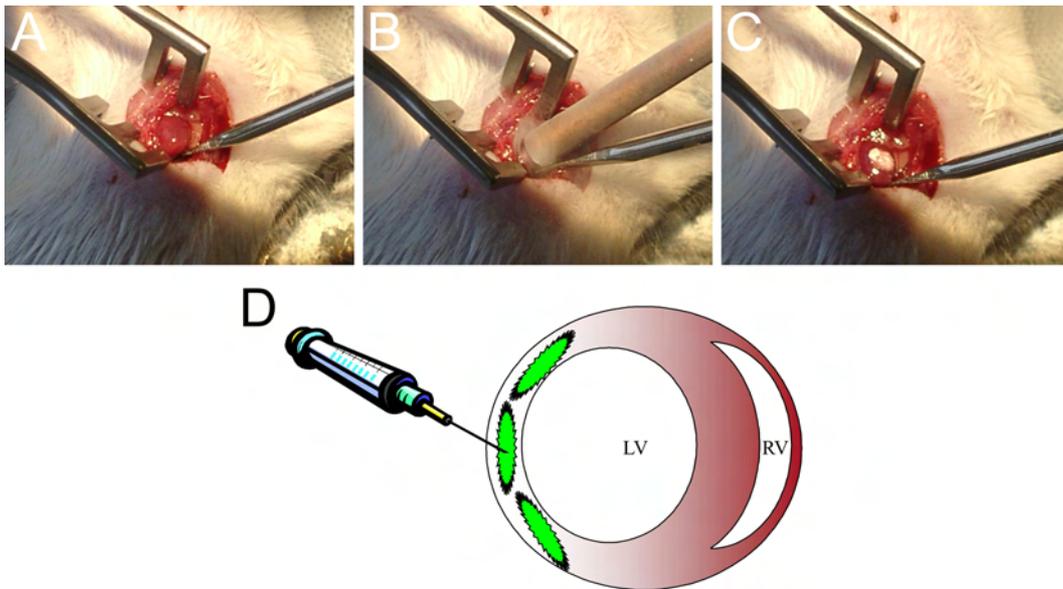
Vor der Transplantation wurden die entsprechenden Zellsuspensionen in einer bestimmten Dichte eingestellt. Die Zelldichte wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dazu wurden die Zellen in einer definierten Verdünnung mit 0.2 % Trypan-Blau in PBS auf die vorbereitete Neubauer-Kammer (Optik Labor) aufgetragen. Die toten Zellen nahmen den Farbstoff auf und unterschieden sich von den lebenden durch ihre Blaufärbung. Die Zellen auf vier 16-Feld-Quadraten wurden unter dem Mikroskop gezählt, und der Mittelwert berechnet. Die Zellzahl (Zellen pro ml) ergab sich aus der Multiplikation des Mittelwertes mit dem Verdünnungsfaktor x 10.000. Um später eine erfolgreiche Injektion der Zellsuspension sicherstellen zu können, wurden die Zellen in einem Gemisch aus 90% PBS und 10% blauer Lebensmittelfarbe (Patentblau V E131, Azorubin E122, Brauns-Heitmann GmbH & Co KG, Warburg, Deutschland) aufgenommen.

### **2.4.2 Kryoinfarkt**

Zur Narkoseinleitung wurde die Maus in eine Betäubungskammer gesetzt und ein Gasgemisch aus gleichen Teilen Sauerstoff und Lachgas mit 4% Isoflurane eingeleitet. Nach etwa 2 Minuten war die Maus eingeschlafen und die Atemfrequenz sichtbar reduziert. Die Maus wurde nun mit einem Beatmungsröhrchen intubiert und für die weitere Dauer der Operation mit 1.2% Isofluran über eine Beatmungsmaschine (Rodent Ventilator Mod. 681, Harvard Apparatus; 0.5 ml Tide, 100/min) weiter begast. Die Maus wurde mit Klebeband auf einer 37°C Wärmeplatte fixiert, und eine Ohrmarkierung angebracht. Der Brustkorb wurde mit 70% Ethanol

desinfiziert und rasiert. Danach wurden ein Antibiotikum (Cefuroxim, 100 mg/kg Körpergewicht) und ein Schmerzmittel (Metamizol, 100 mg/kg Körpergewicht) intramuskulär in den Oberschenkel injiziert. Der Thorax wurde durch einen etwa 1.5 cm breiten Einschnitt zwischen der 2. und 3. Rippe des Brustkorbs geöffnet und mit einem Spreizer aufgespannt. Die Blutgefäße ober- und unterhalb des Schnittes wurden am Brustbein mit 5/0 Ethibond Faden abgebunden und das Brustbein zwischen den abgebundenen Gefäßen mit einer Schere durchtrennt. Mit dem Spreizer wurde der Brustkorb ca. 5 mm geöffnet und das Herz freigelegt. Ein Kupferstempel mit einem definierten Durchmesser (3-5 mm) wurde für ca. 2 Minuten in flüssigen Stickstoff getaucht und spitzennah für 20 Sekunden auf den linken Ventrikel gepreßt. Nach dem Auftauen des gefrorenen Gewebes wurde dieser Vorgang noch zweimal wiederholt. Danach wurde die Isofluran-Konzentration auf 0.8% herabgesetzt und der Spreizer entfernt. Die Injektion erfolgte über eine 10 µl Hamilton-Spritze, an die über einen Polyethylen-Schlauch (Innendurchmesser 0.28 mm; Merck KG, Darmstadt, Deutschland) eine 29G Nadel (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) befestigt war. Die Hamilton-Spritze wurde mit PBS gespült und 5-6 µl der Zellsuspension aufgenommen. Die Nadel wurde in das dunkelrot gefärbte geschädigte Herzgewebe eingeführt und jeweils die Hälfte der Zellen in ca. 1-2 Sekunden in die Mitte und den Randbereich des Infarktes injiziert. Die blaue Lebensmittelfarbe in der Suspension diente dabei als Kontrolle für die Injektion. Die Lachgas-Zufuhr wurde daraufhin unterbrochen und die Isofluran-Konzentration wieder auf 1.2% erhöht.

Schließlich wurden der Brustkorb und die Muskulatur zugenäht, dabei wurde ein Tubus in den Brustkorb eingeführt. In einem weiteren Schritt wurde die Muskulatur zugenäht und schließlich die Haut. Nach dem Zunähen wurden das Blut und die Luft aus dem Brustraum abgesaugt. Der Tubus wurde entfernt und die Beatmungsmaschine ausgeschaltet. Zum Aufwecken wurde die Maus kurzzeitig mit reinem Sauerstoff beatmet und schließlich wieder zurück in den Käfig gesetzt.



#### Abbildung 6: Kryoinfarkt und Zellinjektion

Nach dem Öffnen des Brustkorbs und Freilegen des Herzens wurde das Herz mit Hilfe eines Messlöffels angehoben (A) und ein Stickstoff-gekühlter Kupferstempel spitzennah drei mal für 20 Sekunden auf den linken Ventrikel gepresst (B). Die vereiste Stelle zeigte sich weiß verfärbt (C). Nach dem Auftauen des Gewebes wurden die Zellen über eine Hamilton-Spritze in das geschädigte Gewebe in die Mitte und den Randbereich des Infarktes injiziert (D).

#### 2.4.3 Ligatur der linken Koronararterie (LAD)

Die Vorbereitung der Infarktoperation erfolgte wie bei dem Kryoinfarkt. Nach der Freilegung des Herzens wurde das Perikard vorsichtig aufpräpariert, um die Koronararterien frei zu legen. Ein 8/0 Polypropylen Faden mit spitzzulaufender Nadel, die in U-Form gebracht wurde, wurde 1-3 mm von der Spitze des linken Atriums unter die LAD ("left anterior descending", Ramus interventricularis anterior) geführt. Durch einen Knoten wurde die Koronararterie anschließend abgeschnürt, der Infarkt war durch die Verfärbung des Ventrikels direkt sichtbar. Die Zellinjektion und postoperative Behandlung der Maus wurde wie bei dem Kryoinfarkt durchgeführt.

#### 2.4.4 Funktionsmessungen mit dem Linksherzkatheter

Die hämodynamischen Messungen wurden mit dem Aria-System (Föhr Medical Instruments, Seeheim-Ober Beerbach) in Narkose durchgeführt. Die rechte oder

linke A. carotis communis wurde freipräpariert und ein 1,4F dicker Meßkatheter in die Aorta asc. bzw. in die linke Herzkammer vorgeschoben. Mit Hilfe dieses Katheters konnten sowohl Volumina als auch Drücke ermittelt und somit hämodynamische Änderungen erfaßt werden. Die Messungen erfolgten 7 oder 14 Tage nach Infarzierung. Nach Beendigung der Messungen wurde das Versuchstier durch zervikale Dislokation getötet.

#### **2.4.5 Mobilisierung**

Zur Generierung von Mäusen mit EGFP-positiven Knochenmarkzellen wurden die Empfängertiere tödlich bestrahlt (925 rad), um deren körpereigenes blutbildendes System zu zerstören. Anschließend wurden den bestrahlten Mäusen  $3 \times 10^6$  Gesamtknochenmarkzellen oder 3000 aufgereinigte hämatopoetische Stammzellen (Lin<sup>-</sup>/c-Kit<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>) von EGFP-transgenen Mäusen transplantiert. Die Bestimmung der Rekonstitution erfolgte 4 Wochen nach der Transplantation mittels Durchflußzytometrie von peripherem Blut (vgl. Kapitel 3.1.3, Abb. 10B)

Die Mobilisierung der Knochenmarkzellen erfolgte durch subkutane Injektion einer Zytokin-Lösung (täglich pro Maus 2.5 mg rekombinanter humaner Flt3-Ligand und 2.5 mg rekombinantes murines GM-CSF in PBS/0.02% FCS). Die Injektionen wurden über fünf Tage täglich durchgeführt, beginnend am Tag der Operation.

### **2.5 Gewebeerhaltung und Schnitte**

#### **2.5.1 Fixierung von kultivierten Zellen**

40 g Paraformaldehyd wurden in ca. 900 ml Reinstwasser unter Rühren und Erwärmen auf 60°C für ungefähr eine Stunde gelöst. Anschließend wurde die trübe Lösung mit ca. 1 ml 5 N Natronlauge geklärt. Nach dem Erkalten wurde die Lösung über einen Faltenfilter (Schleicher & Schnell Microscience GmbH, Dassel, Deutschland) filtriert, und 2 PBS-Tabletten (für 1 Liter 0.1 M PBS) zugegeben und

darin aufgelöst. Der pH-Wert wurde mit 1 N Salzsäure auf 7.4 eingestellt und die Lösung mit Reinstwasser auf genau 1 Liter aufgefüllt. Der pH-Wert wurde nochmals kontrolliert und gegebenenfalls nachjustiert. Die 4%ige PFA-Lösung wurde auf 50 ml Röhrchen verteilt und bei -20°C eingefroren und bis zur Verwendung gelagert.

Zur Fixierung von kultivierten Zellen wurden diese kurz mit PBS gewaschen und anschließend mit 4%iger PFA-Lösung bedeckt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und konnten dann für Färbungen verwendet werden.

### **2.5.2 Einbettung von Herzen für Kryoschnitte**

Das Herz wurde wie bei der Gewinnung adulter Kardiomyozyten möglichst schnell aus der Maus entnommen. Unter einer Stereo-Lupe (SMZ 1000, Nikon Corp., Tokyo, Japan; ausgestattet mit einer Fluoreszenzlampe und EGFP-Filtern) wurde die Läsion, und bei Injektion transgener Zellen auch die Fluoreszenz der EGFP-positiven Zellen dokumentiert. Anschließend wurde eine mit PBS gefüllte Glaskapillare durch die Aorta in den linken Ventrikel geschoben und oberhalb der Koronargefäß-Mündungen mit einem Faden fixiert. Mit einer Perfusor-Spritze (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurden die Herzen anschließend durch den linken Ventrikel und die Koronarien zuerst mit 5-10 ml PBS, danach mit 10-15 ml 4% Paraformaldehyd-Lösung in PBS langsam perfundiert und über Nacht in 4% Paraformaldehyd-Lösung bei 4°C gelagert. Die fixierten Herzen wurden dann dreimal für 20 Minuten in PBS gewaschen und zur Entwässerung in eine 20%ige Saccharose-Lösung in PBS überführt. Nach 24 Stunden wurden die fixierten und entwässerten Herzen in kleinen Probenbehältern aus Plastik (Vitlab, Großostheim, Deutschland) mit Einbettmedium (Tissue-Tek O.C.T. Compound; Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande) bedeckt und in Isopentan auf Trockeneis bei -80°C eingefroren und im -80°C-Tiefkühlschrank gelagert.

Die eingefrorenen Herzen wurden mit einem Kryotom (CM 3050S, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) bei Temperaturen von -18 bis -22°C mit einer Dicke von 6-10 µm geschnitten. Jeweils zwei bis vier Schnitte wurden auf einen beschichteten Objektträger (Histobond; Paul Marienfeld GmbH & Ko.KG,

Lauda-Königshofen, Deutschland) aufgezogen, und diese bis zur Färbung bei 4°C gelagert.

### **2.5.3 Einbettung von Herzen in Paraffin**

Für die Einbettung in Paraffin wurden die Herzen mit Zinkformalin perfundiert und über Nacht fixiert. Anschließend wurden die Herzen 1-4 Stunden unter fließend kaltem Leitungswasser gespült und dann einzeln in Einbettkassetten eines Einbettautomaten (STP-120, Microm International GmbH, Walldorf) gestellt. In einem voreingestellten Programm wurde das Gewebe über 16 Stunden durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert (70%, 80%, 90%, 96% und 100% Isopropanol für jeweils 1-2 Stunden, zweimal Xylol für jeweils eine Stunde) und schließlich mit 60°C warmem Paraffin gespült. Danach wurden die Kassetten entnommen und die Herzen mittels einer Ausgußstation (EC-350-1, Microm) in Paraffinblöcke gegossen. Die Aushärtung erfolgte auf einer Kühlplatte (EC-350-2, Microm) bei 7°C für eine Stunde.

Die Paraffinblöcke wurden in einem Mikrotom (SM 2000R, Leica Microsystems GmbH) in einer Dicke von 3-6 mm geschnitten und auf beschichtete Objektträger aufgezogen.

### **2.5.4 Einbettung in Epoxid-Harz für Semidünnschnitte**

Für die Vorbereitung von Semidünnschnitten wurden Stücke der Infarktareale mit den EGFP-positiven Zellen mit einem Skalpell aus dem Herzen ausgeschnitten. Die Gewebestücke wurden mit 4% PFA und 2% Glutaraldehyd in 0.1 M Cacodylatpuffer bei pH 7.2 und 4°C vorfixiert. Nach der Fixierungszeit von 4-24 Stunden wurde das Gewebe in 0.1 M Cacodylatpuffer drei Mal für 10-20 Minuten gewaschen. Anschließend erfolgte eine Nachfixierung für 2-4 Stunden in 2% gepuffertem Osmiumtetroxid. Für den OsO<sub>4</sub>-Puffer wurde 1 g OsO<sub>4</sub> in 25 ml Reinstwasser gelöst (der Lösungsvorgang dauerte mindestens 24 Stunden) und im Verhältnis 1:1 mit 0.1 M Cacodylatpuffer gemischt. Danach wurden die Proben erneut drei Mal für 10-20 Minuten in 0.1 M Cacodylatpuffer gewaschen.

Nach dem Auswaschen wurde das Gewebe in einer Alkoholreihe entwässert und mit Uranylacetat kontrastiert:

50% Ethanol 15-30 Minuten

mit 70% Ethanol auswaschen

2% Uranylacetat in 70% Ethanol, Kontrastierdauer: über Nacht im Kühlschrank.

70% Ethanol 15-30 Minuten

90% Ethanol 10-20 Minuten

100% Ethanol 3 x 10-20 Minuten

Propylenoxid : Ethanol 1:1 2 x 15-30 Minuten

Propylenoxid rein 2 x 15-30 Minuten

Nach dem Entwässern wurden die Proben in mehreren Schritten in Araldit (unter gründlichem Rühren frisch angesetzt aus 2 g Beschleuniger, 50 ml Araldit, 50 ml Härter; dabei dürfen keine Luftbläschen oder Schlieren entstehen) überführt:

Araldit : Propylenoxid 1:1 2-12 Stunden

Araldit : Propylenoxid 3:1 4-24 Stunden bei 4°C

Schließlich wurden die Herzen zwei Stunden im Wärmeschrank bei 40°C in reines Araldit in Gelatinekapseln überführt. Die Polymerisation und Aushärtung erfolgte über 12 Stunden bei 45°C und 48 Stunden bei 60°C im Wärmeschrank.

Zur Anfertigung von Semidünnschnitten wurden die Probenblöckchen auf eine trapezförmige Oberfläche von ca. 1 x 1 mm<sup>2</sup> getrimmt und an einem Ultramikrotom (Leica Reichert Ultracut R; Leica Microsystems GmbH) mit einem Diamantmesser geschnitten. Die 0.5 µm dicken Schnitte wurden auf gelatinisierte Objektträger aufgebracht.

Zur Färbung der Semidünnschnitte wurde Methylenblau oder Toluidinblau verwendet. Diese Farbstoffe führten zu einer differenzierten Anfärbung der verschiedenen Zell- und Faserkomponenten in unterschiedlichen Blautönen. Überschüssiger Farbstoff wurde mit Reinstwasser abgespült. Anschließend wurde das luftgetrocknete Präparat mit Entellan eingedeckt.

## 2.6 Färbetechniken

### 2.6.1 Histologische Färbungen

Die Paraffinschnitte wurden für die Färbungen in einer absteigenden Alkoholreihe entwacht und gewässert:

100% Isopropanol	5 Minuten
100% Isopropanol	5 Minuten
90% Isopropanol	5 Minuten
70% Isopropanol	5 Minuten
Reinstwasser	2 Minuten

Die Kryoschnitte und fixierten Zellen konnten direkt für die histologischen Färbungen verwendet werden.

#### 2.6.1.1 Hämatoxilin/Eosin (HE)

Hämatoxylin ist ein bei niedrigem pH positiv geladener Farbstoff. Er färbt daher negativ geladene basophile Strukturen blau, z.B. die DNA des Kernchromatins, die RNA des endoplasmatischen Retikulums und auch die sauren Glykosaminoglykane des hyalinen Knorpels. Eosin ist ein negativ geladener azidophiler Farbstoff, der zur Gegenfärbung dient. Er färbt alle übrigen Strukturen in verschiedenen Rot-Tönen. Durch die Kombination beider Farbstoffe werden die morphologischen Besonderheiten unterschiedlicher Gewebestrukturen und Zellen besser erkennbar.

Die Farbstoff-Lösungen wurden vor Gebrauch filtriert, um Artefakte durch nicht gelöste Farbpartikel zu vermeiden.

Protokoll:	1'	Hämatoxylin (Modified Mayer's Hematoxylin, Microm)
	1'	Wasser fließend, lauwarm (normales Leitungswasser)
	1'	Bluing Reagent (Microm)
	1'	Reinstwasser

- 1' Eosin (Eosin G-Lösung 0.5% wässrig), ggf. auch länger
- kurz Reinstwasser (nur eintauchen)

Zur Konservierung der Färbungen wurden die Schnitte entwässert und mit einem Deckglas in Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt:

- Protokoll:
- kurz 70% Isopropanol
  - kurz 90% Isopropanol
  - 5' 100% Isopropanol
  - 5' 100% Isopropanol
  - 5' Xylol (-Ersatz)
  - 5' Xylol (-Ersatz)

Eindecken mit Entellan

### **2.6.1.2 Van Gieson**

Diese Färbung färbt gleichzeitig kollagenes Bindegewebe rot und Muskulatur gelb. Dadurch lassen sich die Infarktareale im Herzen gut darstellen.

Zuerst wurde eine gesättigte Pikrinsäure-Lösung angesetzt, indem zu 1 Liter Reinstwasser so viel Pikrinsäure zugegeben wurde, bis sie sich nicht mehr löste. Diese Lösung wurde am besten schon einige Tage vor Gebrauch angesetzt (die Lösung war nur dann gesättigt, wenn sie über einem Bodensatz stand). Dann wurde eine Säurefuchsin-Lösung aus 1 g Säurefuchsin in 50 ml Reinstwasser hergestellt. Für die fertige Pikrofuchsin-Lösung wurden die 1000 ml gesättigte Pikrinsäure abfiltriert und mit den 50 ml Säurefuchsin-Lösung zu einer Stammlösung vermischt (diese Stammlösung war unbegrenzt haltbar).

Die Pikrofuchsin-Lösung wurde auf die zu färbenden Objektträger aufgetropft und 1-5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgeschleudert, und die Schnitte wurden über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und in Entellan eingedeckt (siehe oben).

### 2.6.1.3 Von Kossa

Die von Kossa-Färbung ist eine spezifische Methode zum Nachweis von kalzifizierter Matrix. Das Kalziumphosphat des Knochens wird dabei durch metallisches Silber ersetzt, die Kalziumeinlagerungen stellten sich dann braunschwarz dar. Als Gegenfärbung wird Kernechtrot verwendet, die Zellkerne färben sich dabei dunkelrot, das Zytoplasma hellrot.

Protokoll: 1' Reinstwasser  
 15' 1% Silbernitrat in Reinstwasser unter starkem Licht  
 kurz Waschen mit Reinstwasser  
 5' 3% Natriumthiosulfat in Reinstwasser  
 kurz Waschen mit Reinstwasser  
 5' Gegenfärbung mit Kernechtrot  
 kurz Waschen mit Reinstwasser

Zur Konservierung der Färbungen wurden die Präparate wie oben beschrieben entwässert und in Entellan eingedeckt.

### 2.6.1.4 Alkalische Phosphatase (ALP)

Die alkalische Phosphatase spielt eine wesentliche Rolle beim Aufbau der Knochen. Osteoblasten benötigen und produzieren große Mengen dieses Enzyms, um Kalzium und Phosphat für den Knochenaufbau aus anderen Verbindungen freizusetzen.

Die verwendete BCIP/NBT-Lösung (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitro blue tetrazolium) wurde von der alkalischen Phosphatase zu einem blauen Präzipitat umgesetzt. Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte über Kernechtrot.

Protokoll: 1' Reinstwasser  
 5' BCIP/NBT (1 Tablette auf 10 ml Reinstwasser, Sigma)  
 kurz Waschen mit Reinstwasser  
 5' Gegenfärbung mit Kernechtrot  
 kurz Waschen mit Reinstwasser

Zur Konservierung der Färbungen wurden die Präparate wie oben beschrieben entwässert und in Entellan eingedeckt.

#### **2.6.1.5 Alizarin Rot**

Alizarinrot bildet Chelatbindungen mit zweiwertigen Kationen und stellt unter anderem Kalziumverbindungen der Knochenmatrix rot dar. Zum Anfärben der Zellkerne in blau wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin vorgenommen.

Die Farbstoff-Lösung wurde durch Zugabe von Ammoniumchlorid auf einen pH-Wert von 4.1-4.3 eingestellt, um eine optimale Darstellung der Kalzium-Chelate zu erzielen.

Protokoll:    1'    Reinstwasser  
              20"    2% Alizarin Rot in Reinstwasser, pH 4.1-4.3  
              Färbelösung abschütteln und restliche trocknen lassen  
              kurz    Waschen mit Reinstwasser  
              1'    Gegenfärbung mit Mayers Hämatoxylin  
              1'    Bläuen unter Leitungswasser  
              kurz    Waschen mit Reinstwasser

Zur Konservierung der Färbungen wurden die Präparate wie oben beschrieben entwässert und in Entellan eingedeckt.

#### **2.6.1.6 Ölrot O**

Der Farbstoff Ölrot O ist lipophil und lagert sich an Fette an. Dadurch wurden die fetthaltigen Vakuolen von Fettzellen leuchtend rot angefärbt. Eine blaue Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit Mayers Hämatoxylin.

Protokoll: 1' Reinstwasser  
15' 0,5% Ölrot O in 60% Isopropanol, gefiltert  
kurz Waschen mit Reinstwasser  
1' Gegenfärbung mit Mayers Hämatoxylin  
1' Bläuen unter Leitungswasser  
kurz Waschen mit Reinstwasser

Zur Konservierung der Färbungen wurden die Präparate wie oben beschrieben entwässert und in Entellan eingedeckt.

### 2.6.1.7 Alcian Blau

Alcian Blau ist ein Kupferfarbstoff, der an die sauren Proteoglykane (Muzine) von Knorpelzellen bindet und diese blau anfärbt.

Protokoll: 1' Reinstwasser  
5' 1% Alcian Blue pH 3.1 (0.5% Essigsäure in Reinstwasser)  
kurz Reinstwasser  
5' Gegenfärbung mit Kernechtrot  
kurz Waschen mit Reinstwasser

Zur Konservierung der Färbungen wurden die Präparate wie oben beschrieben entwässert und in Entellan eingedeckt.

### 2.6.1.8 X-Gal

2x X-Gal-Waschpuffer: 0.2 M Kaliumhydrogenphosphat  
2 mM Magnesiumchlorid  
1.9 g EGTA  
0.2 g Natriumdeoxycholat  
0.4 ml Nonidet P 40  
mit Reinstwasser auf 1 Liter auffüllen

X-Gal-Färbelösung:	250 ml	2x X-Gal-Waschpuffer
	50 ml	100mM Kaliumhexacyanoferrat(III)
	50 ml	100mM Kaliumhexacyanoferrat(II)
	5 ml	50 mg/ml X-Gal in DMSO
	145 ml	Reinstwasser

Durch die Färbung mit X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl  $\beta$ -D-Galactosid) lässt sich das Enzym Beta-Galaktosidase blau anfärben.

Die Objektträger mit den Herzschnitten wurden in X-Gal-Waschpuffer dreimal für jeweils 5 Minuten gewaschen. Danach wurden sie in frisch angesetzter und filtrierter X-Gal-Färbelösung über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger in PBS gewaschen und konnten für kombinierte immunhistochemische Färbungen verwendet werden.

## 2.6.2 Immunhistochemische Färbungen

Die einzelnen zu färbenden Schnitte auf den Objektträgern wurden mit einem Fettstift (PAP-Pen; Labomedic, Bonn, Deutschland) umrandet, um ein Verlaufen der Flüssigkeiten zu verhindern und Antikörper zu sparen, und 20-30 Minuten an der Luft getrocknet. Die Objektträger wurden zwischen den einzelnen Schritten jeweils gründlich mit PBS gewaschen. Während der Inkubationszeiten wurden die Objektträger in einer mit feuchten Tüchern ausgelegten Kammer dunkel aufbewahrt, um ein Austrocknen der Schnitte und ein Bleichen der Fluorochrome zu vermeiden. Nach einer 10-minütigen Permeabilisierung mit 0.5 M Ammoniumchlorid + 0,25% Triton-X in PBS wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit 5% BSA oder 5% Serum (Spezies, von der der zweite Antikörper stammte) in PBS für 60 Minuten blockiert. Die Inkubation mit dem Erst-Antikörper verdünnt in 0.8% BSA oder 0.5% Serum in PBS erfolgte über Nacht bei 4°C (Kühlschrank) oder für 120 Minuten bei Raumtemperatur. Die jeweilige Verdünnung der verwendeten Antikörper sind der unten aufgeführten Liste zu entnehmen. Die Inkubation mit dem Zweit-Antikörper (Fluoreszenz-gekoppelt, verdünnt in PBS) erfolgte für 60 Minuten bei

Raumtemperatur. Für die Färbung der Zellkerne wurden die Schnitte für 20 Minuten mit dem Hoechst-Farbstoff 33342 (1:1000) bei 37°C (im Brutschrank) inkubiert.

Die gut gewaschenen Schnitte wurden mit Eindeckmedium auf Wasserbasis (Polyvinyl alcohol mounting medium with DABCO, antifading; Sigma) unter einem Deckglas (22 x 50 mm) konserviert und dunkel gelagert.

verwendete Erst-Antikörper:

<b>Spezifität</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
PECAM	Ratte IgG	1:800	BD Pharmingen
Connexin 43	Kaninchen IgG	1:400	Biotrend
GFP	Huhn IgY	1:200	Chemicon
cardiac Troponin T	Maus IgG	1:200	Neomarkers
CD45	Ratte IgG	1:400	Neomarkers
Osteocalcin	Ziege IgG	1:200	Santa Cruz
Nkx 2.5	Kaninchen IgG	1:200	Santa Cruz Biotechnology
Alpha-Aktin	Maus IgG	1:400	Sigma Aldrich
Alpha-Aktinin	Maus IgG	1:400	Sigma Aldrich
Alpha-smooth muscle-Aktin	Maus IgG	1:800	Sigma Aldrich

verwendete Zweit-Antikörper:

<b>Spezifität</b>	<b>FL</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Maus IgG	Cy3	donkey	1:400	Jackson ImmunoResearch
Maus IgG	Cy5	donkey	1:400	Jackson ImmunoResearch
Huhn IgY (IgG)	Cy3	donkey	1:200	Jackson ImmunoResearch
Huhn IgY (IgG)	Cy5	donkey	1:200	Jackson ImmunoResearch
Kaninchen IgG	Cy3	donkey	1:400	Jackson ImmunoResearch
Kaninchen IgG	Cy5	donkey	1:400	Jackson ImmunoResearch
Ratte IgG	Cy3	donkey	1:400	Jackson ImmunoResearch
Ratte IgG	Cy5	donkey	1:400	Jackson ImmunoResearch
Ziege IgG	Cy3	donkey	1:400	Jackson ImmunoResearch

## 2.7 Mikroskopie

Folgende Mikroskope wurden für die Arbeit verwendet:

Stereomikroskop Leica MZ 16F (Leica Microsystems GmbH), ausgestattet mit einer Schott KL 1500 LCD 150 Watt Halogen-Kaltlichtquelle und einer HBO103 Fluoreszenzlampe sowie einem FITC-Bandpassfilter. Die Bilder wurden mit einer JenOptik ProgRes C10 plus Kamera (JenOptik AG, Jena, Deutschland) über die beigefügte Software JenOptik ProgRes Capture Pro aufgenommen.

Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 200M mit ApoTome (Carl Zeiss Microimaging, Oberkochen, Deutschland) und einer XBO75 Fluoreszenzlampe sowie Bandpassfiltern für EGFP, Cy3, Cy5 und Hoechst (AHF Analysentechnik AG, Tübingen, Deutschland). Die Bildaufnahmen erfolgten mit einer Zeiss AxioCam MRm über die Zeiss AxioVision Software.

Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 40 CFL mit einer HBO50 Fluoreszenzlampe und Band- und Langpassfiltern für FITC. Die Bildaufnahmen wurden mit einer Canon PowerShot G5 Digitalkamera (Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland) durchgeführt.

Polarisationsmikroskop Olympus BX50 mit Polarisationsfilter Olympus U-POT. Die Aufnahmen erfolgten mit einer Panasonic XC-003P Kamera über die Software Sybex Intervideo, WinDVR3 (Sybex, Köln, Deutschland).

Konfokales Laser-Scanning Mikroskop Zeiss 510 META.

Die Bildbearbeitung erfolgte mit CorelDRAW Graphics Suite (Corel, Unterschleißheim, Deutschland).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Hämatopoetische Stammzellen und Gesamtknochenmark

Studien in den letzten Jahren haben ergeben, daß adulte Stammzellen *in vitro* und *in vivo* in der Lage sind, zu Zellen unterschiedlicher Keimblätter zu differenzieren. Nach Transplantation in bestimmte Organe können sie sich dort Gewebe-spezifisch entwickeln. Orlic et al. haben 2001 in zwei Studien an Mäusen gezeigt, daß hämatopoetische Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in der Lage sind, im infarzierten Herzen anzuwachsen, zu Kardiomyozyten zu differenzieren und damit die Herzfunktion zu verbessern (Orlic et al., 2001a; Orlic et al., 2001b). Obwohl diese Form der Therapie inzwischen auch in klinischen Studien am Menschen praktiziert wird, sind die Resultate allerdings umstritten und die zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht geklärt.

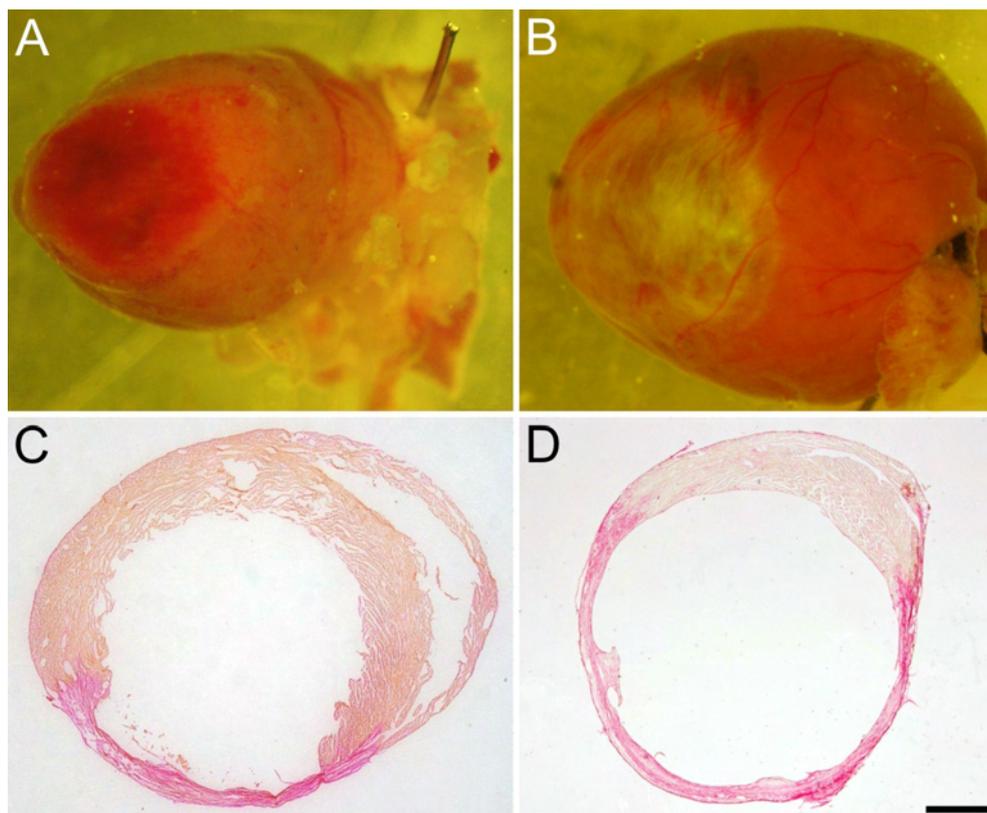
##### 3.1.1 Transplantation in infarzierte Mausherzen

In dieser Studie sollte daher zunächst untersucht werden, ob Knochenmarkzellen in der Lage sind, im Infarktgewebe eines geschädigten Herzens anzuwachsen und zu Herzmuskelzellen zu differenzieren. Dazu wurden unfraktionierte mononukleäre Knochenmarkzellen aus transgenen Mäusen isoliert, in denen das Live-Reportergen EGFP (enhanced green fluorescence protein) unter der Kontrolle eines ubiquitären Beta-Aktin-Promotors exprimiert wird (Beta-Aktin-EGFP transgen) (Okabe et al., 1997). Diese Zellen leuchten durch Anregung mit Fluoreszenzlicht grün, was durch spezifische Exzitations- (Absorptionsmaximum bei  $\lambda=488$  nm) und Emissionsfilter (Emissionsmaximum bei  $\lambda=510$  nm) dargestellt werden konnte.

Als klinisches Modell dienten syngene C57Bl/6-Mäuse, in denen mit zwei unterschiedlichen Methoden Herzinfarkte induziert wurden, durch Kryoläsionen oder Ligaturen der linken Koronararterie (LAD). Beide Modelle hatten transmurale Infarkte des linken Ventrikels zur Folge. Die LAD-Ligaturen reproduzierten eher die natürliche Ursache eines Herzinfarktes, führten jedoch zu starken Größenunterschieden der Läsionen mit teilweise über den ganzen linken Ventrikel

reichenden Infarkten. Die in den Versuchstieren generierten Kryoläsionen induzierten dagegen gut reproduzierbare Infarktgebiete, gekennzeichnet durch eine scharf begrenzte nekrotische Zone. Die Schädigung des Gewebes wurde dabei unmittelbar durch eine Rotfärbung des betroffenen Areals ersichtlich (Abb. 7A).

Das Absterben der Herzzellen induzierte in der Folge einen Umbau der extrazellulären Matrix, der nach etwa einer Woche abgeschlossen war (Roell et al., 2002). Das untergegangene Herzmuskelgewebe wurde dabei durch Bindegewebe ersetzt, das zu einer weißen Färbung der Narbe führte (Abb. 7B). Querschnitte der Herzen zeigten deutlich die Verdünnung der linken Ventrikel-Wand in dem betroffenen Gebiet. Die Narbenbildung im Infarktbereich konnte durch eine van Gieson-Färbung belegt werden (Abb. 7C-D), bei der das zellarme, kollagenfaserreiche Bindegewebe intensiv purpurrot, Muskulatur und Zytoplasma rosa-orange gefärbt erscheint.



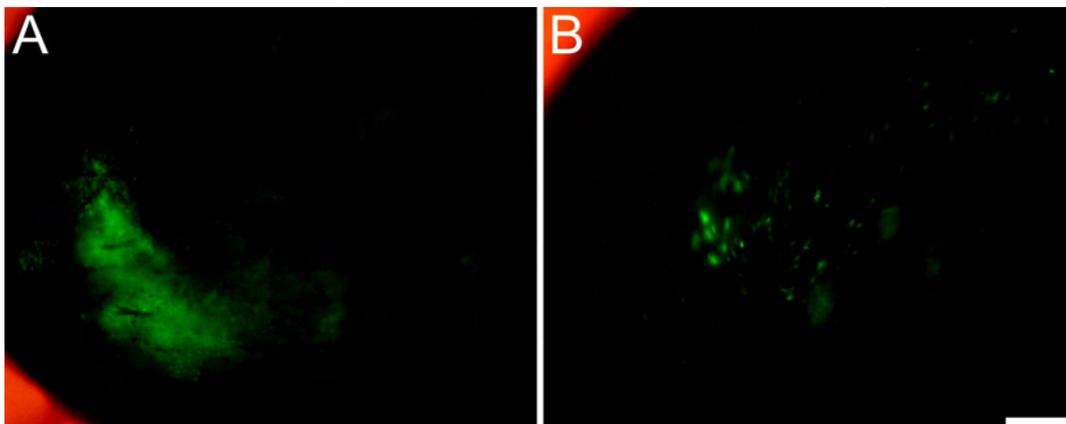
#### Abbildung 7: Infarktmodelle

Kryoinfarziertes Herz 1 Tag nach der Operation, der scharf begrenzte nekrotische Bereich erscheint rot (A). Nach 28 Tagen ist die Läsion vernarbt, der Infarktbereich ist durch das eingelagerte Bindegewebe weißlich verfärbt (B). Van Gieson-Färbung von Herzschnitten 28 Tage nach Läsion durch Kryoinfarkt (C) und LAD-Ligatur (D). Man erkennt den kollagenfaserreichen transmuralen Infarkt (purpurrot), das native unverletzte Gewebe erscheint rosa-orange. Die LAD-Ligatur führte typischerweise zu größeren Infarktarenalen als das Kryomodell. Balken: A = 0,7 mm, B,D = 1 mm, C = 1,2 mm

### 3.1.2 Integration von direkt injizierten Knochenmarkzellen

Den operierten Mäusen wurden  $1 \times 10^6$  Beta-Aktin-EGFP transgene Gesamtknochenmarkzellen direkt in das frisch induzierte Infarktareal und die Randzone der Läsion injiziert. In dieser Population waren etwa 10.000 Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup> Zellen und ca. 100 hochpotente hämatopoetische Stammzellen enthalten (Abkowitz et al., 2002). In den Experimenten konnten in Bezug auf die transplantierten Zellen keine Unterschiede zwischen beiden Infarktmodellen festgestellt werden, daher wird im Folgenden jeweils nur eine repräsentative Abbildung von einem Herzen gezeigt.

Die transplantierten Herzen (n=15) wurden nach 9 oder 28 Tagen entnommen, und unter einer Fluoreszenzlupe die Integration der EGFP-positiven Knochenmarkzellen im Gewebe analysiert. Wie die Abbildungen 8A-B zeigen, war nach 9 Tagen ein großes EGFP-positives Areal in der Infarktzone der Herzen zu sehen (n=6), während die Fluoreszenz in den 28 Tage alten Herzen deutlich nachgelassen hatte (n=9).

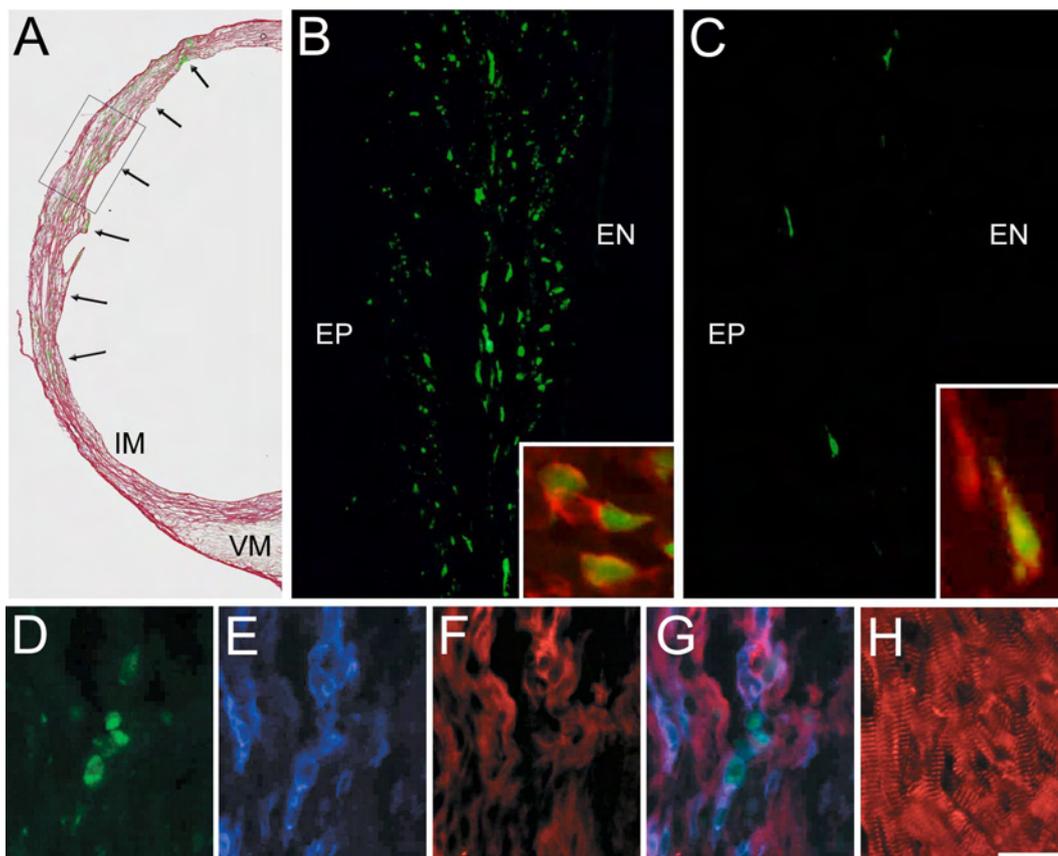


**Abbildung 8: Integration direkt injizierter Knochenmarkzellen im Infarktareal**

Integration EGFP-positiver Knochenmarkzellen (grün) 9 Tage (A) und 28 Tage (B) nach direkter Injektion in kryoinfarzierte Herzen, aufgenommen unter einer Fluoreszenzlupe. Nach 28 Tagen waren nur noch vereinzelt EGFP-positive Knochenmarkzellen im Herzen zu beobachten. Balken: A = 500  $\mu$ m, B = 250  $\mu$ m

Um das Schicksal der transplantierten Zellen zu untersuchen, wurden die Herzen kryokonserviert und Gefrierschnitte angefertigt. Diese belegten ein Anwachsen der Zellen vorwiegend im Infarktbereich, wie kombinierte Fluoreszenzaufnahmen und van Gieson-Färbungen in aufeinanderfolgenden Schnitten belegten. Übereinstimmend mit den makroskopischen Befunden zeigte sich auch in den

Schnitten nach 9 Tagen (Abb. 9A-B) eine wesentlich höhere Anzahl EGFP-positiver Zellen als nach 28 Tagen (Abb. 9C). Zudem waren die EGFP-positiven Zellen auffällig klein und zeigten keinerlei morphologische Ähnlichkeit mit ausdifferenzierten Herzzellen. Zur Bestätigung dieser Beobachtung wurden immunhistochemische Färbungen gegen Herz- und Blut-spezifische Proteine durchgeführt. Das Strukturprotein Alpha-Aktinin ist in den Z-Scheiben von Muskelzellen lokalisiert und zeigt in differenzierten Herzzellen ein typisches Querstreifungsmuster. CD45 ist ein pan-hämatopoetischer Marker, der auf der Oberfläche aller Leukozyten exprimiert wird, auf lymphoiden wie auch auf myeloiden Zellen. Während keine der im Infarktreal angewachsenen EGFP-positiven Zellen das Muskel-spezifische Alpha-Aktinin exprimierte, konnte auf allen der pan-hämatopoetische Marker CD45 nachgewiesen werden (Abb. 9B-C Einsätze, 9D-H). Dieses Ergebnis bestätigte eindeutig den hämatopoetischen Ursprung der angewachsenen Zellen und widersprach der Annahme einer möglichen Transdifferenzierung der Knochenmarkzellen zu Kardiomyozyten.



**Abbildung 9: Injizierte Knochenmarkszellen differenzieren nicht zu Herzzellen**  
Legende siehe Folgeseite

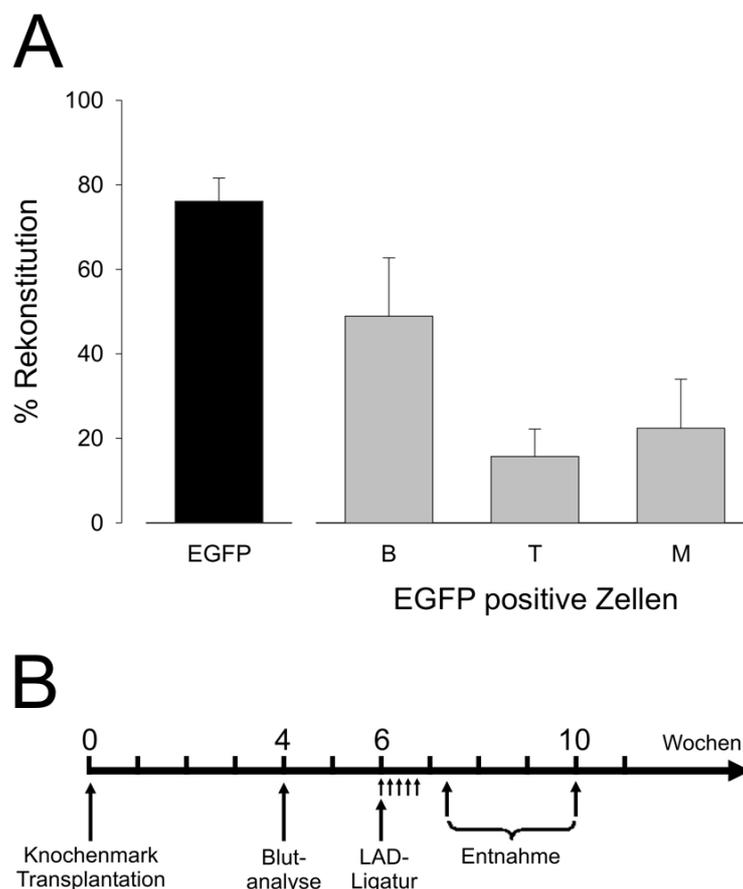
**Abbildung 9: Injizierte Knochenmarkzellen differenzieren nicht zu Herzzellen**

Die EGFP-positiven Knochenmarkzellen (grün, Pfeile) wuchsen hauptsächlich in dem Infarktareal (IM, dunkelrot) an, wie die Überlagerung einer Fluoreszenzaufnahme mit einer van Gieson-Färbung 9 Tage nach der Transplantation zeigte. Im vitalen Myokard (VM, hellrot) waren nur wenige EGFP-positive Zellen (grün) vorhanden (A). Alle grünen Zellen in dem eingerahmten Bereich aus A exprimierten den Blutzellmarker CD45 (rot, Einsatz); EP = Epikard, EN = Endokard (B). Nach 28 Tagen war nur noch eine verminderte Zahl EGFP-positiver Zellen (grün, C) zu beobachten und auch diese exprimierten CD45 (rot, Einsatz). Auch Synchron-Färbungen gegen CD45 (blau, E) und das Muskel-Strukturprotein Alpha-Aktinin (rot, F) ergaben keine Anzeichen für eine Transdifferenzierung der EGFP-positiven Zellen (grün, D) in dem Infarktareal. Die Überlagerung der Bilder D-F stellt die Lokalisation der Antigene dar (G), die transplantierten Zellen exprimierten CD45 und zeigten keine Alpha-Aktinin-Querstreifung. Zum Vergleich eine Positiv-Kontrolle der Alpha-Aktinin-Färbung im vitalen Myokard, die spezifische Querstreifung der Herzzellen ist deutlich zu erkennen (rot, H). Balken: A = 600  $\mu\text{m}$ , B,C = 100  $\mu\text{m}$ , B,C Einsätze = 24  $\mu\text{m}$ , D-H = 60  $\mu\text{m}$

**3.1.3 Mobilisierung von Knochenmarkzellen**

Da die direkte Injektion in das infarzierte Herz nur ein vorübergehendes Anwachsen der Knochenmarkzellen bewirkt hatte, wurde nun ein weiteres Modell getestet, mit dem große Mengen an Stammzellen in das Herz eingebracht werden konnten. Verschiedene Studien haben gezeigt, daß Knochenmarkzellen nach Mobilisierung in den Blutkreislauf spezifisch in das verletzte Organ einwandern können und dort anwachsen (Orlic et al., 2001b; Norol et al., 2003; Bittira et al., 2003; Minatoguchi et al., 2004). In dem Modell wurden den Mäusen sofort nach der Generierung des Infarktes sowie die darauffolgenden 4 Tage die Zytokine GM-CSF und Flt3-Ligand appliziert, was eine massive Freisetzung von hämatopoetischen Zellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut zur Folge hatte (Kronenwett et al., 2000). Die Gabe von Flt3-Ligand förderte dabei explizit die Mobilisierung von hämatopoetischen Stammzellen (Molineux et al., 1997). Um die mobilisierten Zellen aus dem Knochenmark bei einer Beteiligung an der Geweberegeneration in den Herzen analysieren zu können, wurden chimäre Mäuse generiert, in denen die Knochenmarkzellen den Live-Reporter EGFP exprimierten. Dazu wurden die Empfänger-mäuse tödlich bestrahlt und mit Knochenmark von syngenen Beta-Aktin-EGFP transgenen Mäusen transplantiert. Die Bestrahlung mit großer Dosis führte zum Absterben der hämatopoetischen Vorläuferzellen, wodurch das blutbildende System dieser Mäuse zerstört wurde. Die in dem Knochenmark der Spendermäuse enthaltenen Stammzellen konnten diesen Verlust ausgleichen und bewirkten eine langfristige Rekonstitution der Tiere.

Durch Blutanalysen 4 Wochen nach der Knochenmarktransplantation konnte der Erfolg der Behandlung ermittelt werden. Im peripheren Blut der rekonstituierten Mäuse (n=13) wurde mittels Durchflußzytometrie nachgewiesen, daß  $76,1 \pm 5,5\%$  der Blutzellen EGFP-positiv waren und damit von den transplantierten Knochenmarkzellen abstammten. Die Untersuchung der unterschiedlichen Blutzell-Linien mit spezifischen Antikörpern zeigte weiterhin, daß die EGFP-positiven Blutzellen sowohl B-Zellen (B220;  $48,9 \pm 13,8\%$ ) und T-Zellen (CD4/CD8;  $15,7 \pm 6,5\%$ ), als auch myeloide Zellen (Mac-1;  $22,4 \pm 11,6\%$ ) enthielten (Abb. 10A). Vor allem die dauerhafte Neubildung der myeloiden Zellen ist dabei ein klarer Beweis für eine stabile Langzeit-Rekonstitution der bestrahlten Tiere.



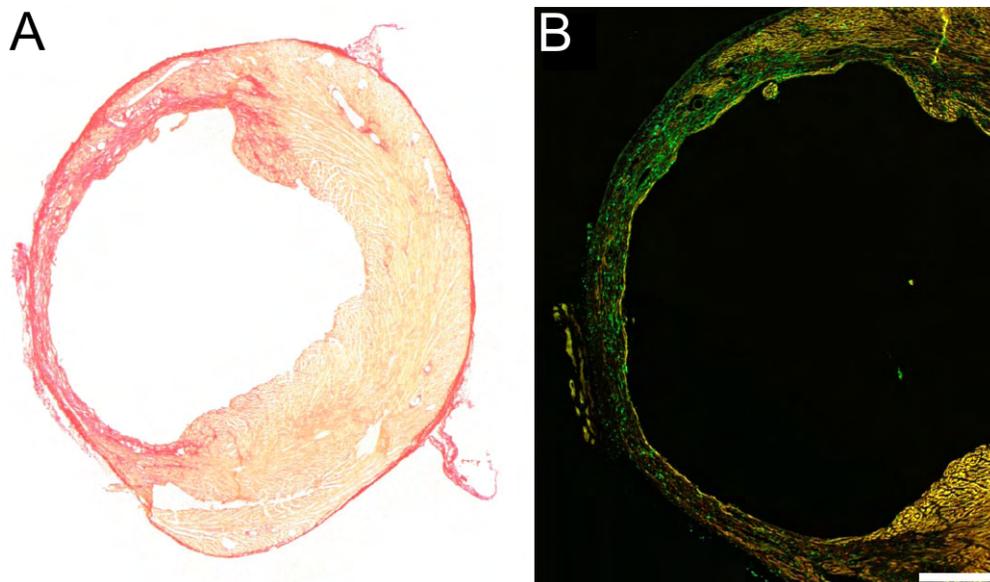
#### Abbildung 10: Rekonstitution der Mäuse

FACS-Analysen des peripheren Blutes von bestrahlten Mäusen 4 Wochen nach der Knochenmarktransplantation zeigten einen hohen Anteil EGFP-positiver Zellen (schwarzer Balken). Die Verteilung der einzelnen Blutzelllinien (graue Balken; B = B-Zellen, T = T-Zellen, M = myeloide Zellen) innerhalb der EGFP-positiven Population belegten eine erfolgreiche Rekonstitution (A). Zeitlicher Ablauf der Experimente, die kleinen Pfeile markieren die Zytokin-Injektionen (B).

Mäuse mit einem Anteil EGFP-positiver Blutzellen von mindestens 70% wurden für die Mobilisierungsexperimente verwendet. 6 Wochen nach der Bestrahlung und erfolgreicher Rekonstitution wurden den Mäusen Herzinfarkte mittels LAD-Ligatur zugefügt und anschließend die Knochenmarkszellen mobilisiert. Nach 9 (n=4) oder 28 (n=9) Tagen wurden die Herzen entnommen und anhand von Gefrierschnitten untersucht (vgl. Abb. 10B).

### 3.1.4 Integration von mobilisierten Knochenmarkszellen

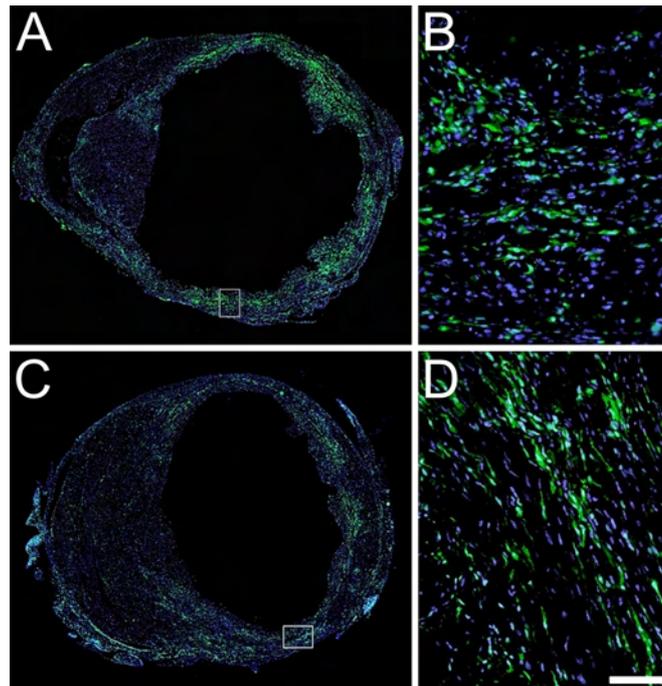
Neun und 28 Tage nach Beginn der Mobilisierung zeigte sich in den untersuchten Herzschnitten eine hohe Anzahl von EGFP-positiven Zellen großflächig über die gesamte Breite der Ventrikelwand verteilt. Dabei waren die Zellen fast ausschließlich in dem infarzierten Areal lokalisiert, wie die im Narbenbereich deutlich verdünnte Herzwand und eine Färbung des fibrotischen Gewebes mit van Gieson belegten (Abb. 11A-B).



#### **Abbildung 11: Integration von mobilisierten Knochenmarkszellen in das Infarktareal**

Die van Gieson-Färbung eines Herzens 28 Tage nach Beginn der Mobilisierung demonstrierte die Narbenbildung in dem infarzierten Bereich der Herzwand (A, rot). Eine Fluoreszenzaufnahme des Folgeschnittes belegte die hohe Anzahl EGFP-positiver Zellen fast ausschließlich in dem Infarktareal. Balken: A = 800 µm, B = 500 µm

Eine Auszählung der Zellen ergab, daß in den 9 Tage alten Infarkten  $48,4 \pm 7,1\%$  (19 Schnitte von 4 Herzen ausgezählt) der mit Hoechst-Farbstoff gefärbten Kerne EGFP-positiven Zellen zugeordnet werden konnten (Abb. 12A-B). Nach 28 Tagen hatte die Zahl der EGFP-positiven Zellen in den Herzen zwar abgenommen, der Infarkt wies aber mit  $28,6 \pm 6,1\%$  (26 Schnitte von 4 Herzen ausgezählt) aller gezählten Kerne dennoch eine hohe Rate an angewachsenen Knochenmarkzellen auf (Abb. 12C-D).

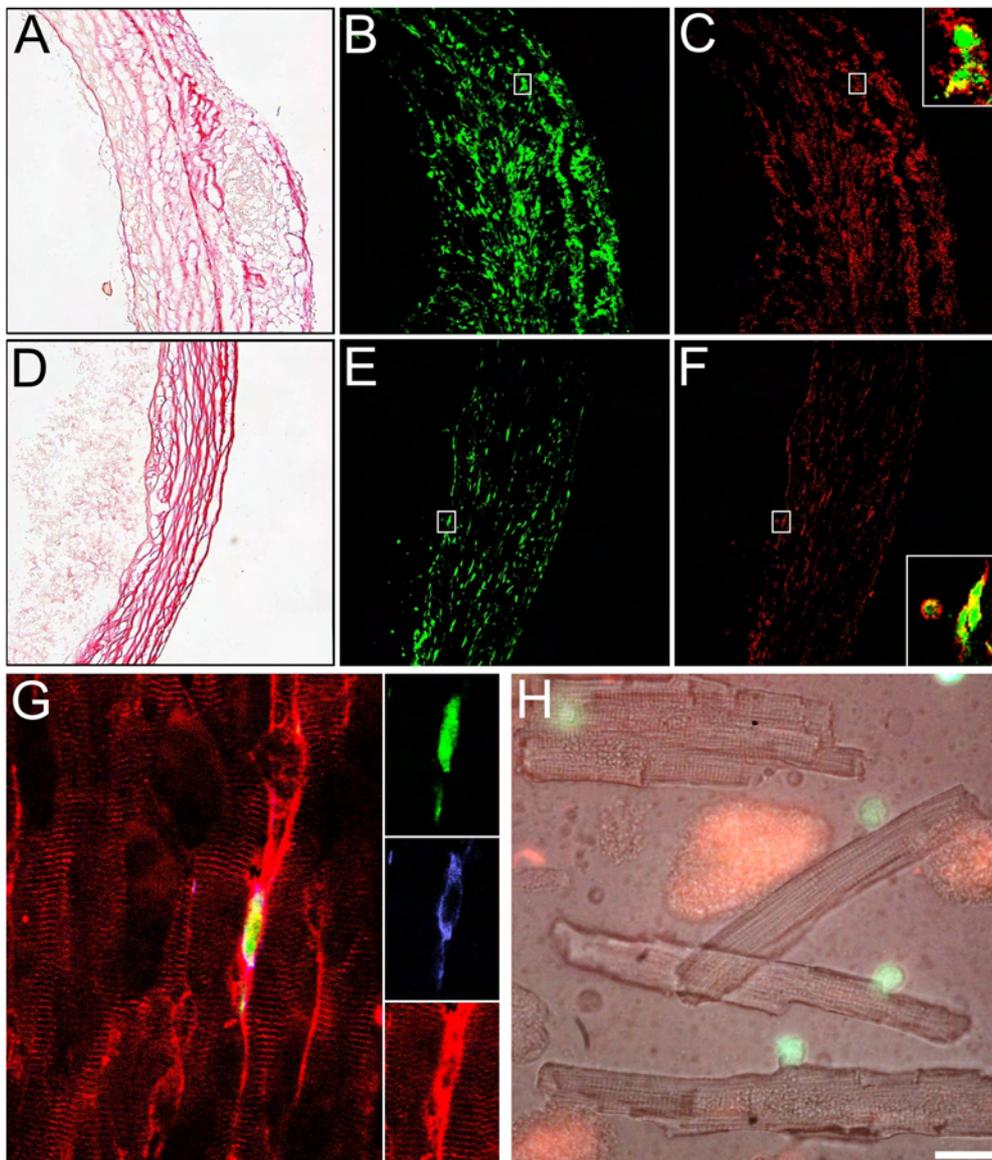


**Abbildung 12: Auszählung der integrierten Zellen nach Mobilisierung**

Infarzierte Herzen 9 Tage (A-B) und 28 Tage (C-D) nach Mobilisierung des Knochenmarks. Durch Anfärben der Zellkerne mit Hoechst-Farbstoff (blau) konnte der Anteil der EGFP-positiven Zellen (grün) im Infarktareal bestimmt werden. Es zeigte sich, daß die Zahl der transplantierten Zellen nach 28 Tagen deutlich reduziert war (von 48,4% auf 28,6%). B und D stellen Vergrößerungen der jeweils eingerahmten Areale aus A und C dar. Balken: A,C = 1 mm, B,D = 80  $\mu\text{m}$

Vergleichbar mit den Befunden aus den direkt injizierten Mäusen besaßen auch die im Herzen angewachsenen EGFP-positiven Zellen in den mobilisierten Mäusen eine Morphologie, die eher an Blut- als an Herzmuskelzellen erinnerte. Immunhistochemische Färbungen der Herzschnitte gegen den hämatopoetischen Marker CD45 belegten, daß es sich bei den in den Infarkt eingewanderten grünen Zellen sowohl nach 9 als auch nach 28 Tagen ausnahmslos um Blutzellen handelte (Abb. 13A-F). Das muskelspezifische Protein Alpha-Aktinin konnte nicht in den EGFP-positiven Zellen nachgewiesen werden, wodurch der hämatopoetische Status

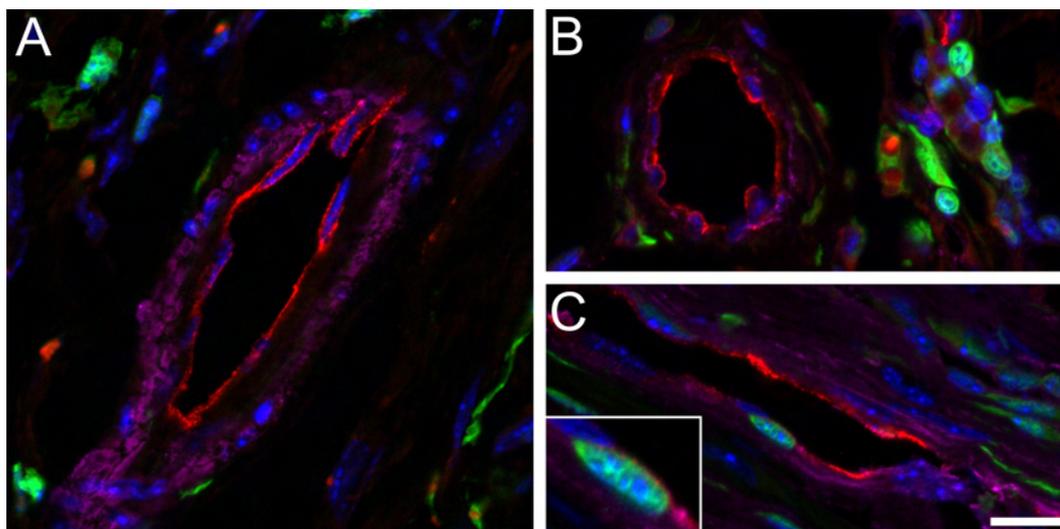
der Zellen unterstrichen und eine mögliche Transdifferenzierung der Knochenmarkszellen zu Herzzellen ausgeschlossen werden konnte (Abb. 13G).



### Abbildung 13: Mobilisierte Knochenmarkszellen differenzieren nicht zu Herzzellen

Sowohl 9 Tage (A-C) als auch 28 Tage (D-F) nach Mobilisierung wiesen alle im Infarktareal (van Gieson-Färbung, A,D) angesiedelten EGFP-positiven Zellen (grün, B,E) den hämatopoetischen Marker CD45 (rot, C,F) auf. Die vergrößerten Ausschnitte in C und F zeigen eine Überlagerung der markierten Areale in B-C bzw. E-F. Die EGFP-positiven Zellen (grün, G oben rechts) exprimierten CD45 (blau, G mitte rechts) und zeigten keine spezifische Alpha-Aktinin-Färbung (rot, G unten rechts), die in den nativen Herzzellen als deutliche Querstreifung zu erkennen war (G, Überlagerungsbild). Isolierte EGFP-positive Zellen (grün) aus einem Herzen 28 Tage nach LAD-Ligatur und Mobilisierung bestätigten die unterschiedliche Morphologie und fehlende Querstreifung im Vergleich zu den Kardiomyozyten (H). Eine Färbung der toten Zellen mit Propidiumjodid (rot) bewies die Vitalität der Einzelzellen nach der Dissoziation. Balken: A,D = 240  $\mu\text{m}$ , B-C, E-F = 150  $\mu\text{m}$ , Einsätze, G = 30  $\mu\text{m}$ , H = 40  $\mu\text{m}$

Damit neben der Betrachtung der Gewebeschnitte auch ein dreidimensionaler Eindruck der Zellen gewonnen werden konnte, wurden 16 mobilisierte Herzen mittels Langendorf-Perfusion mit Verdauungsenzymen zu Einzelzellen dissoziiert. An den Einzelzellen konnte zudem auch mittels elektrophysiologischer Messungen die funktionelle Expression von Ionenkanälen analysiert werden (vergleiche Kolossov et al., 2006). Um Artefakte durch apoptotische oder tote Zellen ausschließen zu können, wurden die Zellen nach der Dissoziation mit Propidiumjodid behandelt. Der Farbstoff konnte nur in geschädigten Zellen die Membran passieren und dort an die DNA binden. Das führte zu einer spezifischen roten Fluoreszenz dieser Zellen, während die vitalen ungefärbt erschienen. Die geringe Größe und fehlende Querstreifung der EGFP-positiven Zellen im Vergleich zu den nativen Kardiomyozyten wurde durch die mikroskopische Betrachtung der Einzelzellen bestätigt (Abb. 13H) und belegte ihren hämatopoetischen Charakter.



**Abbildung 14: Mobilisierte Zellen sind nicht an der Gefäßneubildung beteiligt**

Größere (A) und kleine (B,C) Gefäße im Infarktareal und der Randzone waren PECAM- (rot, Cy3) und ASMAC-positiv (violett, Cy5), zeigten aber keine EGFP-Fluoreszenz. Vereinzelt konnten transmigrierende EGFP-positive Blutzellen unterhalb der Endothelschicht gefunden werden (C). Balken: A-C = 25  $\mu$ m, Einsatz C = 12.5  $\mu$ m

Um zu ermitteln, ob die mobilisierten Knochenmarkszellen an der Bildung neuer Gefäße beteiligt waren, wurden zusätzliche Immunfärbungen gegen ASMAC (Alpha-Aktin des glatten Muskels) und den Endothelmarker PECAM (Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule) durchgeführt. Größere und kleine

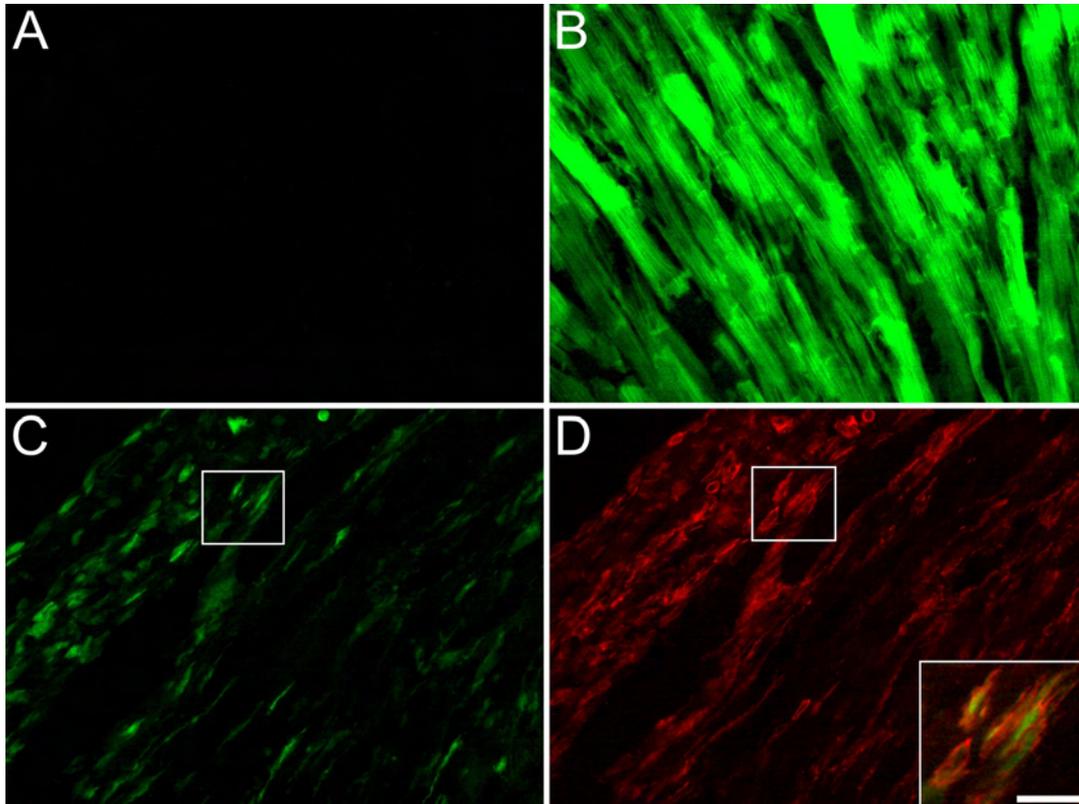
Gefäße in und um die Infarktregion zeigten ein positives Signal mit beiden Färbungen (Abb. 14A-B), die markierten Zellen waren jedoch ausnahmslos EGFP-negativ. Vereinzelt konnten EGFP-positive Zellen im Lumen oder unterhalb der Endothelschicht detektiert werden, diese waren jedoch ASMAC- und PECAM-negativ und stellten transmigrierende hämatopoetische Zellen dar (Abb. 14C).

### **3.1.5 Keine Transdifferenzierung der mobilisierten Knochenmarkzellen**

Um die Beteiligung der Knochenmarkzellen an der Regeneration des infarzierten Herzens genauer untersuchen zu können, wurde ein weiteres Mausmodell verwendet, in dem eine mögliche Transdifferenzierung zu Kardiomyozyten direkt nachgewiesen werden konnte. Dazu wurden bestrahlte Mäuse mit dem syngenem Knochenmark einer transgenen Maus rekonstituiert, in der EGFP unter der Kontrolle eines Alpha-Aktin-Promotors exprimiert wurde (Alpha-Aktin-EGFP transgen). Alpha-Aktin ist ein Protein des Zytoskeletts und wesentlicher Bestandteil des Kontraktionsapparates der Muskelzellen, weshalb es dort in sehr hoher Menge gebildet wird. In anderen Zellen wird Alpha-Aktin nicht oder nur vergleichsweise schwach exprimiert. Die Knochenmarkzellen mit diesem Transgen wiesen dennoch eine geringe grüne Fluoreszenz auf, wahrscheinlich bedingt durch eine schwache unspezifische Basis-Aktivität des Promotors in diesen Zellen. Im Vergleich dazu zeigten Herzzellen jedoch eine wesentlich stärkere EGFP-Fluoreszenz, wodurch sie eindeutig von den Knochenmarkzellen unterschieden werden konnten. Die Basis-Fluoreszenz der Knochenmarkzellen ermöglichte allerdings, die Rekonstitution der Mäuse mittels Durchflußzytometrie zu bestimmen. Nach erfolgreicher Rekonstitution ( $84,4 \pm 4,1\%$ ) wurden die Mäuse ( $n=7$ ) nach dem zuvor beschriebenen Zeitschema (vgl. Abb. 10B) infarziert und mobilisiert, und die Herzen nach 28 Tagen entnommen und anhand von Gefrierschnitten analysiert.

In insgesamt 54 untersuchten Gefrierschnitten der 7 Herzen konnte keine Zelle im Infarktareal gefunden werden, die EGFP in solch hohem Maße exprimiert wie die Herzzellen in diesem Mausmodell (Abb. 15A-B). Durch längere Belichtungszeiten bei der Aufnahme der Bilder (Abb. 15C) konnte mikroskopisch allerdings eine Vielzahl kleiner CD45-positiver Zellen (Abb. 15D) mit einer schwachen EGFP-

Fluoreszenz nachgewiesen werden, vergleichbar mit der des injizierten Knochenmarks. Das war ein sicherer Nachweis dafür, daß die Rekonstitution und Mobilisierung funktioniert hatte, eine Transdifferenzierung der angewachsenen Knochenmarkzellen zu Kardiomyozyten jedoch nicht stattgefunden hatte.



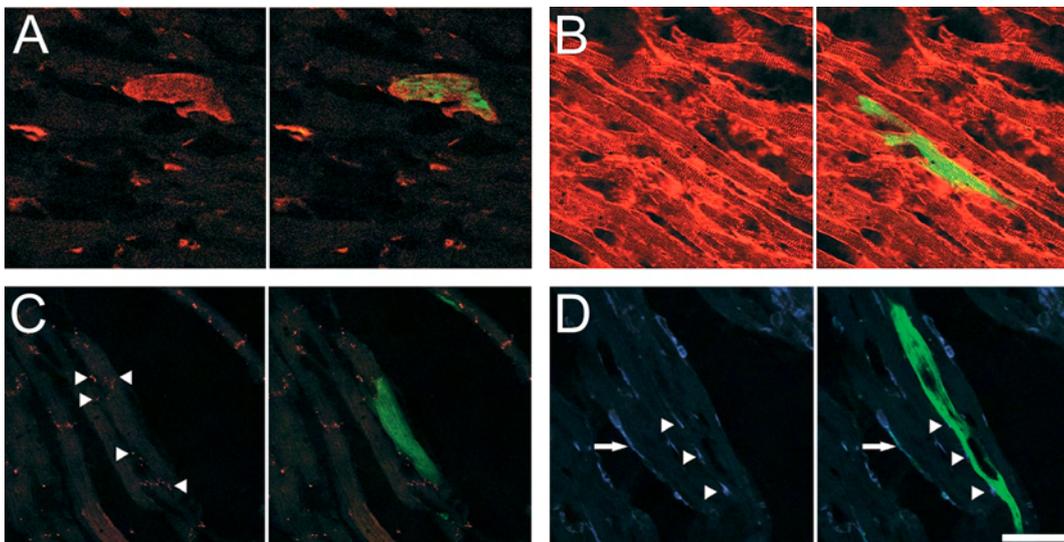
**Abbildung 15: Integration Alpha-Aktin-EGFP transgener Knochenmarkzellen**

Nach erfolgreicher Rekonstitution (86,5%) mit Knochenmarkzellen, die EGFP unter der Kontrolle des muskelspezifischen Alpha-Aktin-Promotors exprimierten, wurden die Mäuse infarziert und mobilisiert. 28 Tage nach der Operation konnten im Infarktareal keine EGFP-positiven Herzzellen gefunden werden (A), aufgenommen mit einer Belichtungszeit, bei der natives Herzgewebe einer Alpha-Aktin-EGFP transgenen Maus deutliche Fluoreszenz zeigte (grün, B). Etwa 20-mal längere Belichtungszeiten demonstrierten das Anwachsen schwach EGFP-positiver Knochenmarkzellen im Infarktbereich (grün, C, gleiches Areal wie in A), die jedoch ausnahmslos CD45 exprimierten (rot, D, der Einsatz zeigt ein Überlagerungsbild des in C und D eingezeichneten Areals). Balken: A-D = 40 µm, Einsatz = 20 µm

### 3.1.6 Knochenmark-abgeleitete Herzzellen im Randbereich des Infarktes

Trotz erfolgreicher Rekonstitution und einer erheblichen Zahl von angewachsenen Knochenmarkzellen nach Mobilisierung wurden keine Anzeichen für eine Transdifferenzierung der Zellen im Infarktareal entdeckt. Überraschenderweise konnten jedoch bei den 28 Tage alten Herzen der mit Knochenmarkzellen

transplantierten Mäuse im Randbereich des Infarktes vereinzelt EGFP-positive Zellen gefunden werden, die sich in ihrer Morphologie klar von den anderen eingewanderten Zellen unterschieden. Diese EGFP-positiven Zellen waren deutlich größer und erinnerten durch ihre langgestreckte Form und ihre Ausrichtung entlang des umliegenden Gewebes an ausdifferenzierte Kardiomyozyten (Abb. 16A-D). Durch immunhistochemische Färbungen gegen EGFP wurde der Ursprung dieser Zellen zweifelsfrei belegt und Autofluoreszenz als Fehlerquelle ausgeschlossen (Abb. 16A). Zudem konnten in diesen Zellen verschiedene kardiale Marker nachgewiesen werden, es zeigte sich eine den nativen Herzzellen entsprechende spezifische Expression dieser Proteine. Neben strukturellen Bestandteilen der Muskelfilamente wie Troponin-T (Abb. 16B) konnte auch das Gap Junction-Protein Connexin 43 nachgewiesen werden (Abb. 16C). Das deutete darauf hin, daß es sich um funktionelle Kardiomyozyten handelte, die in der Lage waren, mit den nativen Herzzellen des umliegenden Gewebes elektrisch zu koppeln. Zudem wurde durch das Fehlen von CD45 auf der Oberfläche der Zellen eindeutig bewiesen, daß es sich nicht um Blutzellen handelte (Abb. 16D). Die mobilisierten Knochenmarkszellen waren demnach an der Bildung dieser Kardiomyozyten beteiligt und hatten ihren hämatopoetischen Charakter verloren.



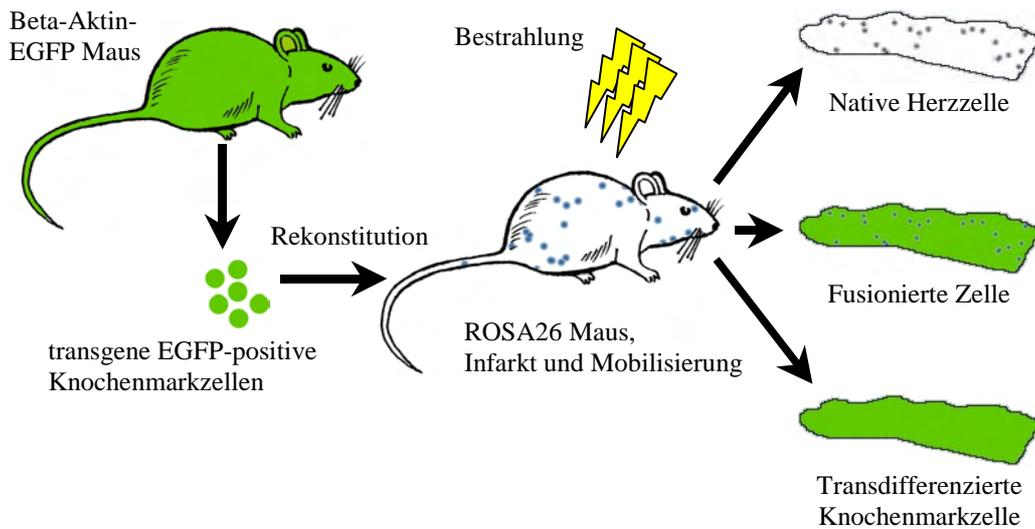
**Abbildung 16: Knochenmark-abgeleitete Kardiomyozyten im Randbereich des Infarktes**  
 Im Randbereich des Infarktes konnten 28 Tage nach der Mobilisierung vereinzelt EGFP-positive (grün, jeweils rechts in den Überlagerungsbildern) Herzzellen gefunden werden. Immunhistochemische Nachweise (rot) von EGFP (A), Troponin-T (B) und Connexin 43 (C, markiert mit Pfeilköpfen) belegten den Ursprung und den kardialen Charakter der Zellen. Zu beachten ist der deutliche Größenunterschied zwischen den EGFP-positiven Kardiomyozyten und der EGFP-positiven Blutzelle (CD45-positiv, D, markiert mit einem Pfeil). Balken: A-D = 60 µm

Die Häufigkeit dieser Phänomene war allerdings äußerst gering, nur 0,75% aller EGFP-positiven Zellen waren Herzzellen. Bezogen auf die durchschnittliche Menge an Kardiomyozyten pro Schnitt entspricht das etwa 0,0065% aller Kardiomyozyten.

### **3.1.7 Knochenmark-abgeleitete Herzzellen entstehen durch Fusion**

Nachdem im Randbereich des Infarktes vereinzelt Knochenmark-abgeleitete Herzmuskelzellen gefunden wurden, sollte nun untersucht werden, welcher Mechanismus der Bildung dieser Zellen zugrunde lag. Verschiedene Arbeitsgruppen hatten in jüngerer Zeit die Theorie aufgestellt, daß viele der durch Transdifferenzierung erklärten Phänomene durch Fusion von adulten Stammzellen mit somatischen Zellen entstanden waren (Ying et al., 2002; Terada et al., 2002), in weiteren Studien wurden Fusionen von Knochenmarkzellen mit Leberzellen nachgewiesen (Vassilopoulos et al., 2003; Wang et al., 2003). Ein entsprechender Vorgang könnte auch zu den Knochenmark-abgeleiteten Kardiomyozyten geführt haben.

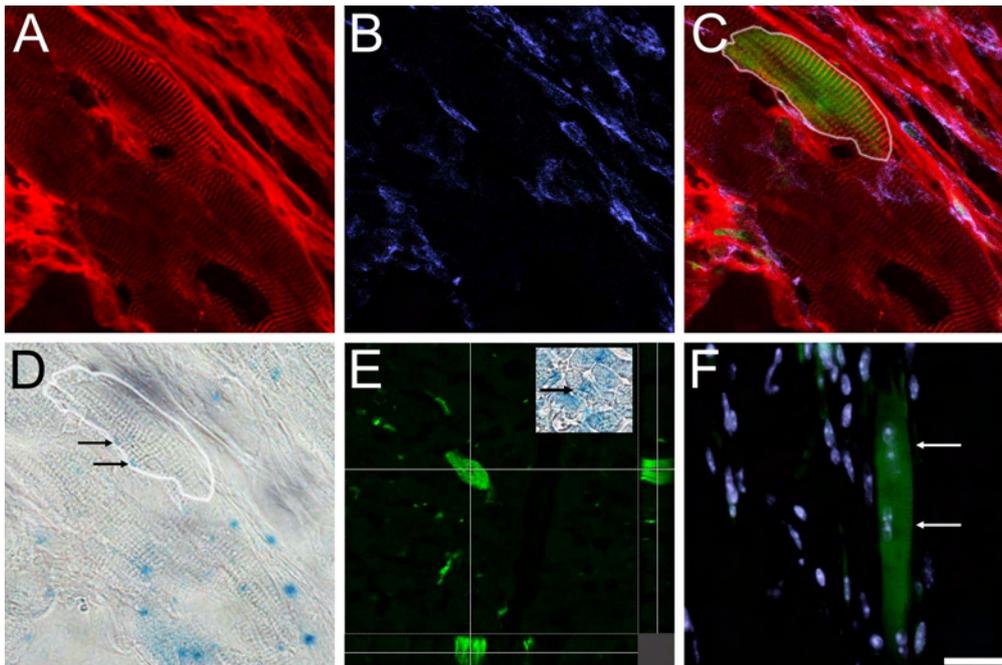
Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden chimäre Mäuse generiert, in denen die Verschmelzung einer Herzzelle mit einer Knochenmarkzelle zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte. Dazu wurden zwei transgene Mausstämme mit unterschiedlichen Reportersystemen verwendet, ROSA26 und Beta-Aktin-EGFP. Die ROSA26-Mäuse exprimierten ubiquitär das Enzym Beta-Galaktosidase, welches in den Zellen durch eine LacZ-Färbung als blaues Präzipitat im Zytoplasma nachgewiesen werden konnte. Diese Mäuse wurden letal bestrahlt und mit EGFP-positiven Knochenmarkzellen von syngenen Beta-Aktin-EGFP transgenen Mäusen rekonstituiert. Durch die Expression nur eines oder beider Reportergene konnte nun die Herkunft der entsprechenden Herzzellen bestimmt werden (Abb. 17).



**Abbildung 17: Nachweis von Transdifferenzierung und Fusion von Knochenmarkzellen**

Zur Unterscheidung der beiden Mechanismen, die zur Entstehung der Knochenmark-abgeleiteten Herzzellen führen konnten, wurde ein chimäres Mausmodell entwickelt. EGFP-positive Knochenmarkzellen (grün) aus einer Beta-Aktin-EGFP transgenen Maus wurden in bestrahlte ROSA26-Mäuse transplantiert. Erfolgreich rekonstituierte Mäuse wurden infarziert und mobilisiert und die Herzen nach 28 Tagen untersucht. Während native Herzzellen nur LacZ-positiv wären (oben rechts, dargestellt durch blaue Punkte), wiesen mit Knochenmarkzellen fusionierte Kardiomyozyten zusätzlich das EGFP-Transgen auf (mitte rechts). Transdifferenzierte Knochenmarkzellen würden nur den grünen Fluoreszenzfarbstoff exprimieren (unten rechts).

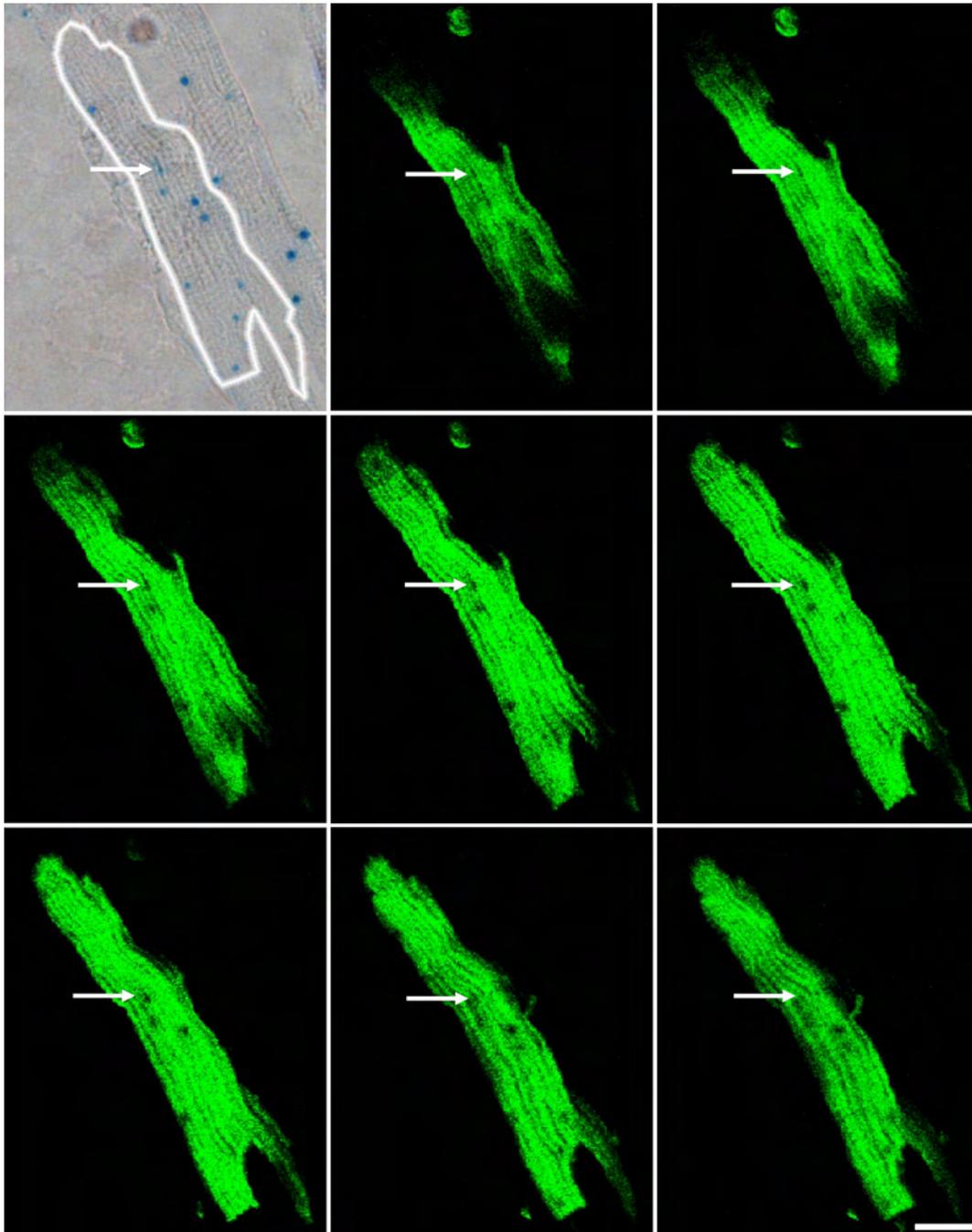
Wie zuvor beschrieben (vgl. Abb. 10B) wurden die erfolgreich rekonstituierten Mäuse infarziert und mobilisiert, und die Herzen nach 28 Tagen entnommen. Erwartungsgemäß fanden sich vereinzelt große langgestreckte EGFP-positive Zellen im Randbereich der Infarkte, die folglich von den transplantierten Knochenmarkzellen abgeleitet sein mußten. Färbungen der Herz- und Blut-spezifischen Proteine Alpha-Aktinin und CD45 bestätigten, daß es sich bei diesen Zellen um Kardiomyozyten handelte (Abb. 18A-C). Durch den Nachweis von Beta-Galaktosidase mittels LacZ-Färbung konnte nun eindeutig belegt werden, daß diese Zellen durch Fusion mit einer nativen Herzzelle generiert wurden (Abb. 18D). Nur durch die Verschmelzung beider Zellen, die jeweils nur ein Reportersystem aufwiesen, konnten Zellen entstehen, die über eine Expression beider Reporter verfügen (vgl. Abb. 17).



**Abbildung 18: Knochenmark-abgeleitete Herzzellen entstehen durch Fusion**

In den ROSA26-Mäusen konnten 28 Tage nach Mobilisierung der EGFP-positiven Knochenmarkszellen grüne Herzzellen im Randbereich des Infarktes lokalisiert werden. Nach immunhistochemischen Färbungen gegen Alpha-Aktinin zeigten die Zellen eine typische Querstreifung (rot, A), der Blutzellmarker CD45 wurde nicht exprimiert (blau, B; C stellt das Überlagerungsbild mit EGFP dar, grün). Eine Durchlichtaufnahme belegte blaue LacZ-Färbung innerhalb dieser Zelle (D, markiert mit Pfeilen). Die dreidimensionale Rekonstruktion einer EGFP-positiven Herzzelle mittels konfokaler Mikroskopie demonstrierte, daß das LacZ-Präzipitat vom EGFP-positiven Zytoplasma eingeschlossen war und somit innerhalb der Zelle lag (E). Alle EGFP-positiven Herzzellen wiesen zudem zwei Zellkerne auf (F, Hoechst-Färbung blau, markiert mit Pfeilen), ein weiterer Hinweis auf Fusion als Entstehungsmechanismus. Balken: A-F = 40 µm

Mit einem konfokalen Mikroskop wurden von den Herzschnitten Z-Stapel aufgenommen, um einen dreidimensionalen Eindruck der EGFP-positiven Zellen zu gewinnen. Diese Aufnahmen zeigten zweifelsfrei, daß die Beta-Galaktosidase im Zytoplasma der Zellen eingeschlossen war, und damit kein Artefakt von Zellen in einer anderen Ebene darstellten (Abb. 18E und 19). Darüberhinaus ist zu bemerken, daß alle analysierten EGFP-positiven Herzzellen zwei Zellkerne aufwiesen (Abb. 18F). Das ist zwar zum Teil auch bei nativen Herzzellen zu beobachten, aber die Ausnahmslosigkeit untermauerte die Theorie der Fusion als Mechanismus zur Bildung dieser Zellen.

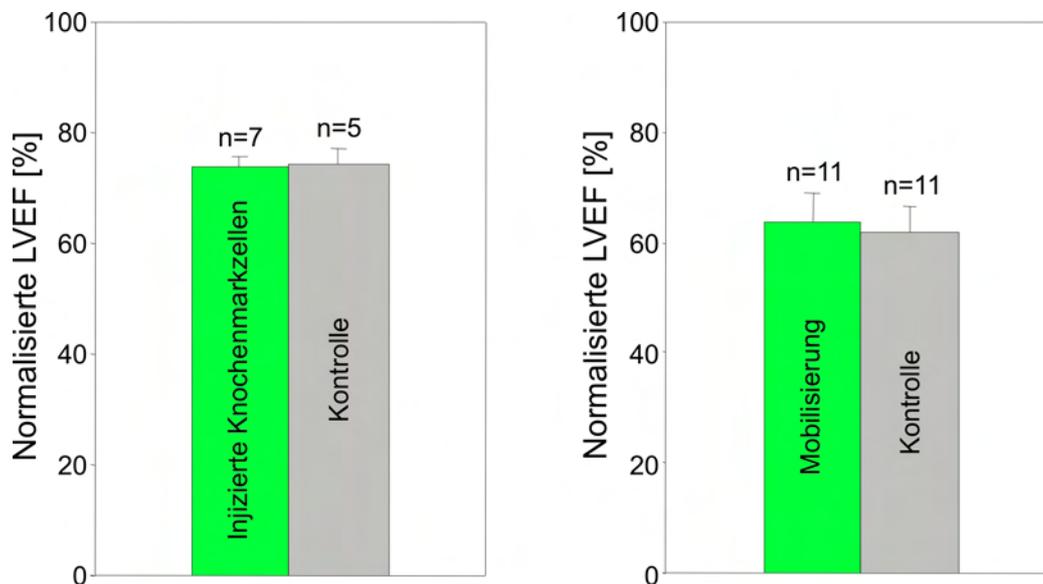


**Abbildung 19: EGFP-positive Herzzellen exprimieren Beta-Galaktosidase**

Mittels konfokaler Mikroskopie wurden Z.-Stapel einer EGFP-positiven Herzzelle aufgenommen. Die blauen LacZ-Präzipitate (vgl. Lichtmikroskopisches Bild oben links) waren in den Fluoreszenz-Bildern (EGFP, grün) ausgespart und erschienen schwarz (eins ist mit einem Pfeil markiert). In den verschiedenen Schichten war klar zu erkennen, daß die Präzipitate vom EGFP-positiven Zytoplasma eingeschlossen waren und in der Zelle lagen. Balken: jeweils 25 µm

### 3.1.8 Keine Verbesserung der Herzfunktion durch Knochenmarkszellen

Die Versuche mit der direkten Injektion sowie Mobilisierung von Zellen aus dem Knochenmark und den darin enthaltenen hämatopoetischen Stammzellen hatten ergeben, daß diese Zellen zwar in das Infarktareal einwanderten und dort in das Gewebe integrierten, aber nicht zu Herzmuskelzellen transdifferenzierten. Die Generierung Knochenmark-abgeleiteter Herzzellen durch Fusion fand zudem nur in einer sehr geringen Zahl statt. Um zu untersuchen, ob die Behandlung mit den Knochenmarkszellen dennoch eine Funktionsverbesserung des Herzens bewirkt, wurden funktionelle Messungen mit einem Linksherzkatheter durchgeführt. Mit dieser Technik ließen sich linksventrikuläre Funktionsparameter wie Schlagvolumen, enddiastolisches Volumen und die Ejektionsfraktion bestimmen. Weder in den direkt mit Knochenmarkszellen injizierten (Signifikanz = 0.95), noch in den mobilisierten Herzen (Signifikanz = 0.77) zeigte sich eine Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (Abb. 20) oder anderer funktioneller Parameter (nicht gezeigt) gegenüber den Kontrollherzen.



**Abbildung 20: Keine Verbesserung der Herzfunktion durch Knochenmarkszellen**

Statistik der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) 3-4 Wochen nach Infarkt und direkter Injektion von Knochenmarkszellen (links) oder Mobilisierung (rechts). Zu beachten ist die reduzierte LVEF in den mobilisierten Mäusen, die wahrscheinlich durch die Bestrahlung der Tiere hervorgerufen wurde.

## 3.2 Mesenchymale Stammzellen

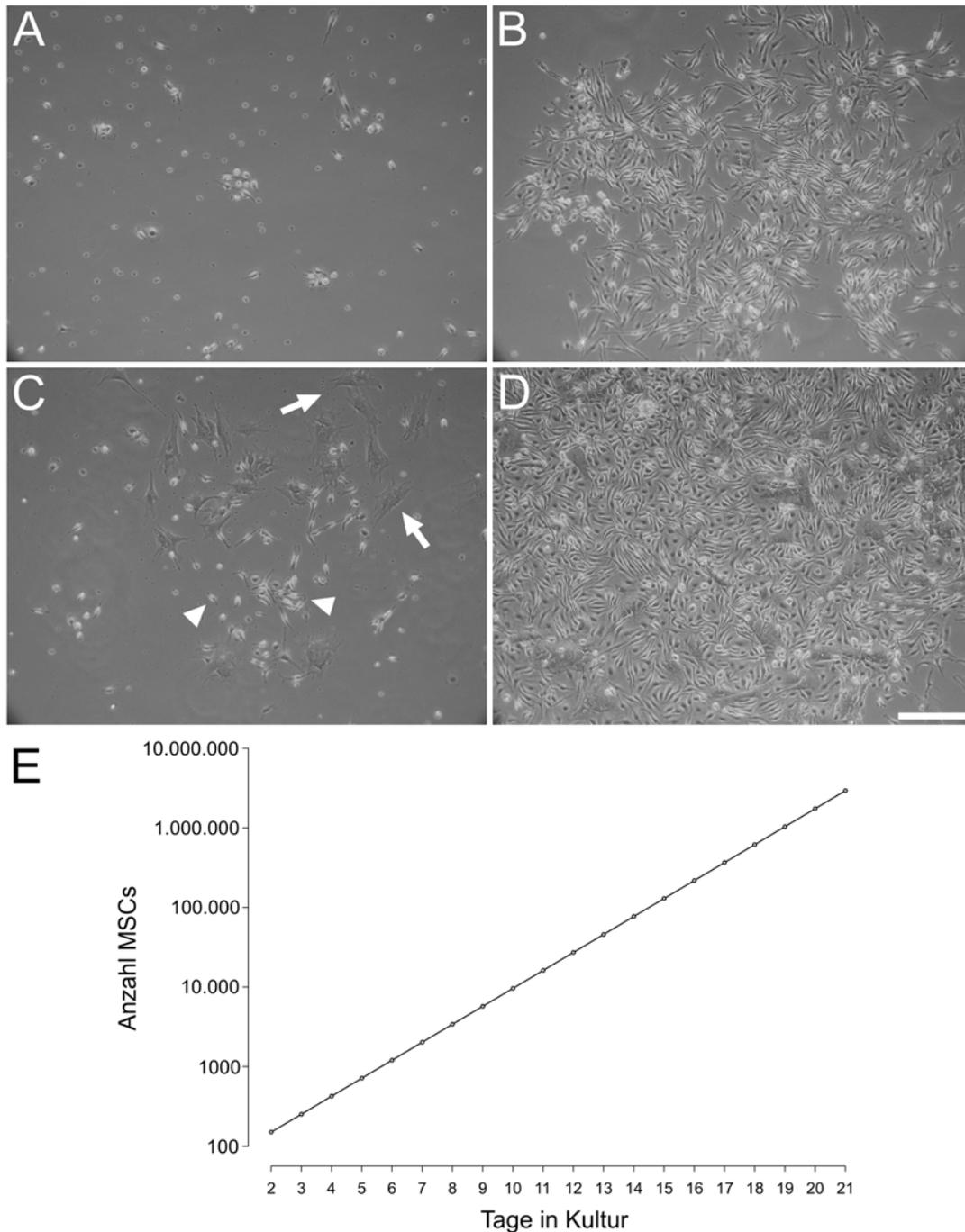
Durch die Mobilisierung mit Zytokinen wurden nur Zellen des hämatopoetischen Systems aus dem Knochenmark ins periphere Blut freigesetzt, nicht aber die Stammzellen des Mesenchyms (Kronenwett et al., 2000). Diese Zellen kommen nur in geringer Anzahl im Knochenmark vor, zeichnen sich aber dadurch aus, daß sie *in vitro* kultiviert und angereichert werden können (Bruder et al., 1997; Minguell et al., 2001). Die mesenchymalen Stammzellen (MSCs) sind zudem in der Lage, in verschiedene Zelltypen zu differenzieren (Pittenger et al., 1999), darunter auch zu Muskelzellen (Makino et al., 1999; Fukuda, 2001).

### 3.2.1 Primärkultur von MSCs

Knochenmark wurde aus transgenen Mäusen isoliert, die den Live-Reporter EGFP unter einem ubiquitär aktiven Beta-Aktin- bzw. einem muskelspezifischen Alpha-Aktin-Promotor exprimierten. Das ermöglichte es, die Zellen nach der Transplantation aufgrund ihrer grünen Fluoreszenz im Gewebe zu detektieren und im Falle des muskelspezifischen Promotors eine mögliche Transdifferenzierung der MSCs zu Herz- oder Muskelzellen feststellen zu können.

Das Knochenmark aus den Hinterbeinknochen (Femur und Tibia) lieferte aus jeder Maus etwa  $75 \times 10^6$  mononukleäre Zellen. Diese wurden in einer Dichte von ca.  $0,5 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf Zellkulturschalen plattiert. Durch regelmäßigen Mediumwechsel wurden die nicht adherent wachsenden Zellen aus der Kultur entfernt, während die an der Plastikschale festgewachsenen MSCs und myeloiden Zellen aus dem Knochenmark erhalten blieben. Da sich die Blutzellen ohne entsprechende Wachstumsfaktoren und Zytokine nicht vermehren konnten, starben diese innerhalb weniger Wochen ab.

So wurde eine Anreicherung der mesenchymalen Stammzellen erzielt, die nach einer kurzen Ruhephase von etwa 2 Tagen zu proliferieren begannen. Nach 5-7 Tagen konnte man erste kleine Kolonien aus wenigen benachbarten Zellen beobachten (Abb. 21A), die sich mit einer Verdoppelungsrate von etwa 32 Stunden exponentiell vermehrten (vgl. Abb. 21E). An Tag 12-14 bestanden die meisten Kolonien somit bereits aus mehreren 100 Zellen (Abb. 21B).



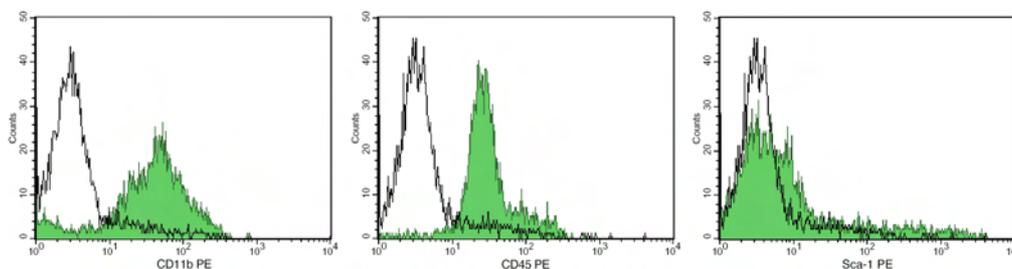
### Abbildung 21: Primärkultur mesenchymaler Stammzellen

Die Abbildungen zeigen den typischen Wachstumsverlauf der MSCs nach Ausplattieren von Knochenmarkszellen auf Plastikkulturschalen. Nach 5-7 Tagen waren erste kleine Kolonien aus wenigen Zellen sichtbar (A), die nach 12-14 Tagen bereits aus mehreren hundert Zellen bestanden (B). Dabei waren vor allem zwei Morphologien zu beobachten, kleine spindelförmige (C, Pfeilspitzen) und größere flächige Zellen (C, Pfeile). Zu beachten sind die kontaminierenden adherenten Zellen (vornehmlich Monozyten), die einzeln wuchsen und keine Kolonien bildeten. Nach etwa 3 Wochen waren die Zellen nahezu konfluent gewachsen und wurden auf neue Schalen passagiert (D). Durch Auszählen der Kolonien und der Zellzahl zu unterschiedlichen Zeitpunkten ergab sich rechnerisch eine ungefähre Verdopplungsrate der MSCs von 32 Stunden. (E) zeigt beispielhaft die Entwicklung der Zellzahl bei einer exponentiellen Vermehrung der Zellen. Aus dem Knochenmark einer Maus konnten somit innerhalb von drei Wochen mehrere Millionen MSCs generiert werden. Balken: A-D = 200  $\mu\text{m}$

Jede Maus führte zu etwa 150 solcher MSC-Kolonien, bei einer Anfangspopulation von  $75 \times 10^6$  Zellen entsprach das einer Häufigkeit von einer mesenchymalen Stammzelle in etwa 500.000 Knochenmarkzellen. Morphologisch zeigten die MSCs eine heterogene Kultur, bestehend aus vorwiegend spindelförmigen und großen flachen, Fibroblasten-ähnlichen Zellen (Abb. 21C). Nach ungefähr 3 Wochen waren die Schalen zu 70-90% bewachsen (Abb. 21D) und die Zahl der Zellen bereits auf mehrere Millionen angestiegen (vgl. Abb. 21E). Diese nahezu konfluent gewachsenen Kulturen wurden passagiert und auf neue Schalen verteilt.

### 3.2.2 Charakterisierung der MSCs mittels Durchflußzytometrie

Nach der zweiten bis dritten Passage waren die verunreinigenden Blutzellen überwachsen und abgestorben und es entstand eine nahezu reine Kultur von MSCs. Die Reinheit der Zellen wurde durch die Analyse spezifischer Oberflächenproteine mittels Durchflußzytometrie analysiert. Zu Beginn der Kultur war eine hohe Kontamination mit CD45/CD11b-positiven myeloiden Blutzellen zu beobachten, die Sca-1-positiven MSCs stellten nur einen kleinen Anteil der Kultur dar (Abb. 22).



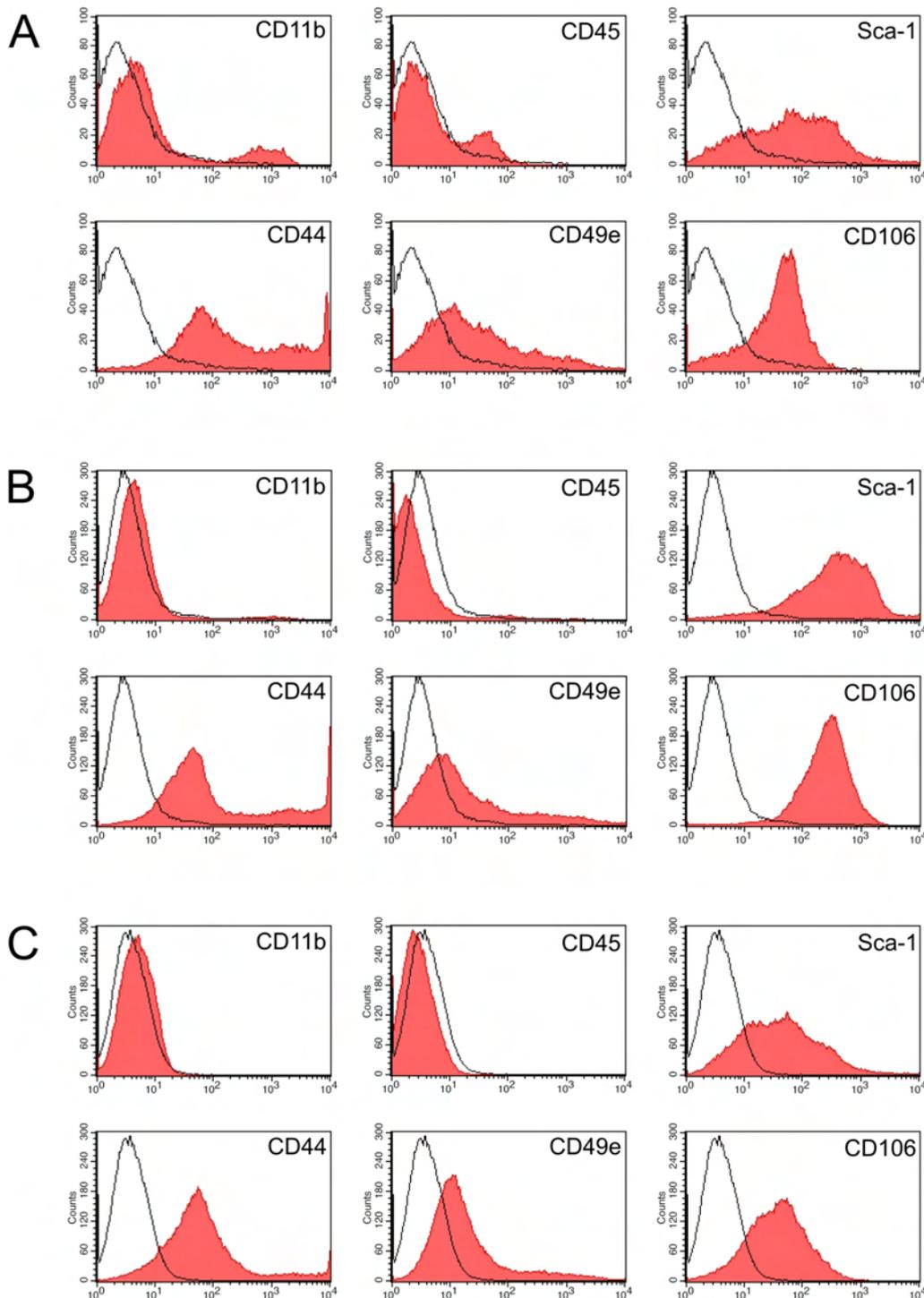
#### Abbildung 22: Zu Beginn verunreinigen myeloide Blutzellen die MSC-Population

Drei Tage nach dem Ausplattieren des Knochenmarks wurden die in Suspension schwimmenden Zellen entfernt und die adherent wachsenden von der Schale gelöst und mit FACS-Antikörpern gegen spezifische Oberflächenantigene markiert. Die durchflußzytometrische Analyse der Zellen ergab eine hohe Zahl an myeloiden Blutzellen (CD11b und CD45 positiv, links und mitte), während nur ein kleiner Anteil das für MSCs typische Stammzellantigen Sca-1 exprimierte (rechts). Die farblose Kurve zeigt die jeweilige Isotypkontrolle, die grün unterlegte Kurve die Antigenexpression.

Da kein spezifisches Antigen auf den MSCs bekannt ist, welches nur diese Zellpopulation charakterisiert, wurde zur Untersuchung der angereicherten Zellen eine Reihe verschiedener Marker verwendet. Ein wichtiger Marker für mesenchymale Stammzellen ist das Stammzell-Antigen 1 (Sca-1), das allerdings

auch auf hämatopoetischen Stammzellen und wenigen Subpopulationen von lymphoiden Zellen exprimiert wird. Das Glykoprotein CD44, ein Rezeptor für Hyaluronsäure, spielt eine Rolle bei der Migration von Zellen und der Hämatopoese und kennzeichnet neben den MSCs auch noch verschiedene Blutzellpopulationen und Epithelzellen. MAPCs (multipotent adult progenitor cells), eine den mesenchymalen Stammzellen ähnliche Stammzellpopulation aus dem Knochenmark, fehlt dieser Marker jedoch (Reyes und Verfaillie, 2001; Jiang et al., 2002), was ihn als wichtiges Unterscheidungskriterium zu diesen Zellen auszeichnet. CD49e, die Alpha-5-Untereinheit des Integrins, ist ebenfalls auf MSCs exprimiert, dient daneben aber auch vielen anderen Zelltypen zur Adhesion an Fibronectin. Ein weiteres Adhensionsmolekül, CD106 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1), ist hauptsächlich auf Endothelzellen zu finden, identifiziert aber ebenfalls die mesenchymalen Stammzellen. Diese und weitere Marker (CD29, CD73, CD105) wurden dazu verwendet, die erhaltenen Zellpopulationen zu charakterisieren und sicherzustellen, daß in der Kultur MSCs angereichert wurden.

Abbildung 23 zeigt drei verschiedene Aufreinigungsansätze mesenchymaler Stammzellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung. Nach zwei Passagen (Abb. 23A) war noch ein kleiner Anteil CD11b- und CD45-positiver Blutzellen nachzuweisen, der Großteil der Zellen exprimierte jedoch für MSCs typische Marker. Die späteren Populationen nach 4 (Abb. 23B) und 9 Passagen (Abb. 23C) waren frei von Blutzellen und zeigten ähnliche Expressionsmuster der Oberflächenproteine. Die Aufreinigung der mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark war demnach gut reproduzierbar und die Zellpopulationen blieben über viele Passagen stabil. Die MSCs konnten zur Lagerung jederzeit eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt wieder in Kultur genommen werden ohne eine sichtbare Veränderung ihrer Morphologie oder Kultivierungseigenschaften. Auch die Expression der Oberflächenproteine blieb nach zwischenzeitlichem Einfrieren vergleichbar (siehe auch Abb. 23C).



**Abbildung 23: Charakterisierung der MSCs mittels Durchflußzytometrie**

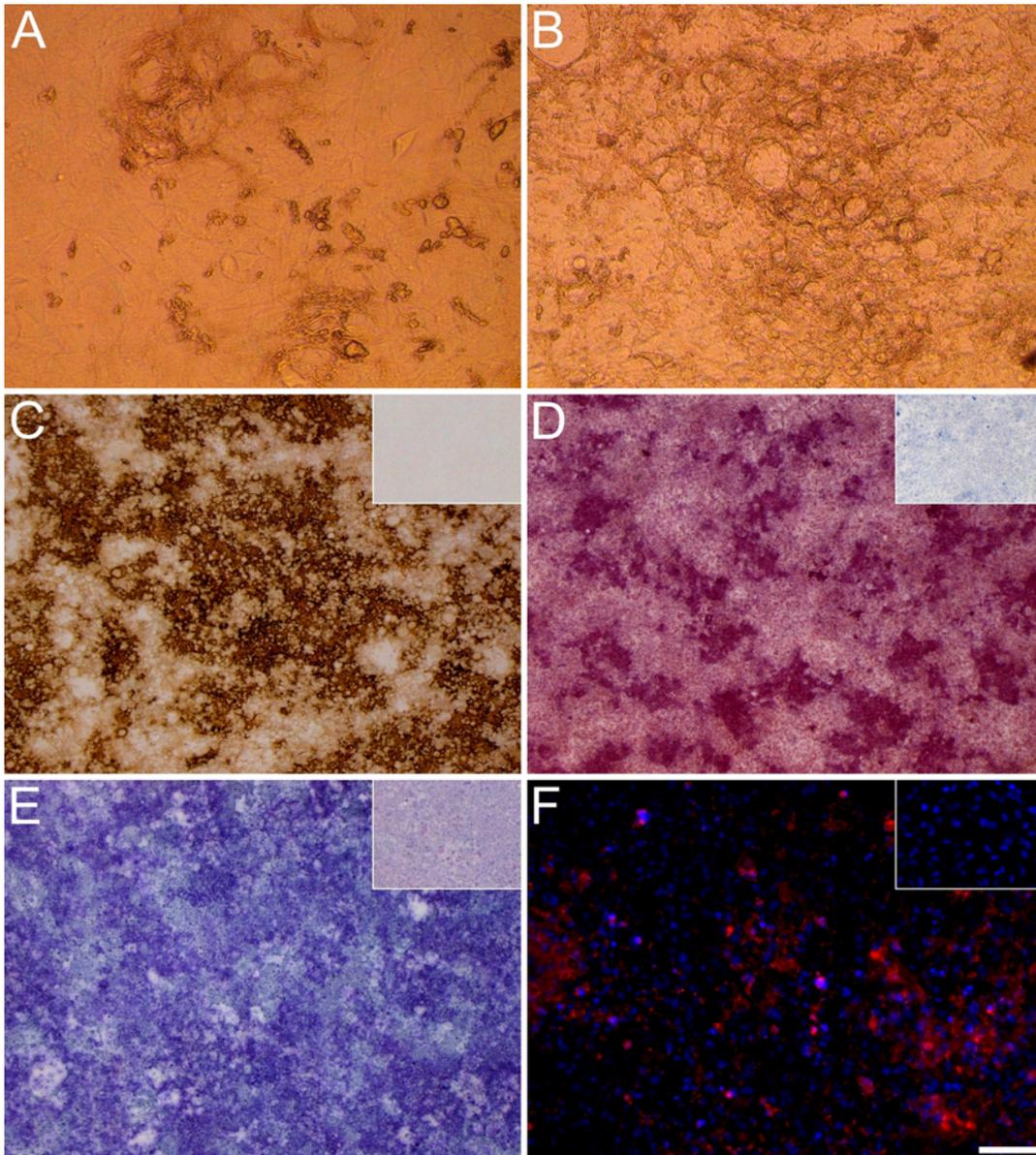
MSCs aus drei verschiedenen Knochenmarksaufreinigungen wurden nach unterschiedlich langer Kultivierung ((A) Passage 2, (B) Passage 4, (C) Passage 9 und zwischenzeitlich eingefroren) mit PE-gekoppelten FACS-Antikörpern markiert und mittels Durchflußzytometrie analysiert. Alle drei MSC-Populationen zeigten ein erwartungsgemäßes Expressionsprofil der untersuchten Antigene, negativ für die Blutzellmarker CD11b und CD45 und positiv für Sca-1, CD44, CD49e und CD106. Die frühe MSC-Population (A) zeigte noch eine Verunreinigung mit myeloiden Zellen (CD11b und CD45 positiv), während die späteren Passagen (B, C) frei von Blutzellen waren. Zu beachten ist auch die Varianz der Antigenexpression innerhalb einer Population, sowie die geringfügigen Unterschiede zwischen den einzelnen Chargen. Beides belegt trotz ihrer Reinheit die Heterogenität der MSC-Populationen. Die farblose Kurve zeigt die jeweilige Isotypkontrolle, die rot unterlegte Kurve die Antigenexpression.

### 3.2.3 *In vitro* Differenzierung der MSCs

Die aufgereinigten Zellpopulationen zeigten in der Kultur alle Eigenschaften von MSCs, Adhäsion an Plastik, schnelle Proliferation, typische Morphologie sowie die Expression spezifischer Oberflächenmarker. Da diese Charakteristika jedoch alle nur phänotypische Aspekte der Zellen beschrieben, sollte nun untersucht werden, ob die kultivierten MSCs auch in der Lage waren, ausdifferenzierte Zellen des Mesenchyms zu generieren. Die Differenzierung der MSCs zu Knochen-, Knorpel- und Fettzellen ist ein entscheidendes funktionelles Kriterium, da es den Stammzellcharakter der Zellen belegt. Um eine solche Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen zu bewirken, wurden diese in einer definierten Dichte mit speziellen Medien kultiviert. Die Differenzierungsmedien enthielten bestimmte Zusätze, die die Bildung des jeweils gewünschten Zelltyps initiieren und fördern sollten.

Bereits eine Woche nach der Kultivierung der MSCs in dem Knochen-Differenzierungsmedium zeigten sich morphologische Veränderungen, es bildeten sich vermehrt Aggregate, in denen sich die Zellen sehr dicht komprimiert zusammenlagerten. Mit zunehmender Dauer bildeten sich zwischen den Zellen und vor allem um die Aggregate herum Ablagerungen (Abb. 24A), die nach etwa 3 Wochen deutliche Knochenstrukturen aufwiesen (Abb. 24B).

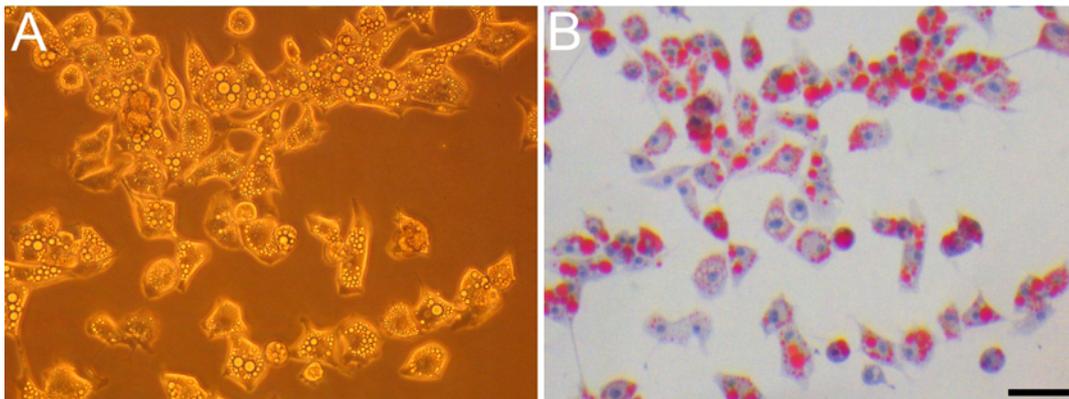
Zum Nachweis der Verknöcherung wurden histologische Färbungen an den kultivierten MSCs durchgeführt. Bei der von Kossa-Färbung, einer sehr spezifischen Methode zum Nachweis von kalzifizierter Matrix, wurde das Kalzium in den Karbonaten und Phosphaten der Knochen gegen Silberionen ausgetauscht und anschließend zu metallischem Silber reduziert, die Kalziumeinlagerungen stellten sich dann braun-schwarz dar. Alizarinrot bildete Chelatbindungen mit zweiwertigen Kationen und wies Kalzium durch eine rote Färbung nach. Mit beiden Färbemethoden konnten eindeutig Kalzifizierungen demonstriert werden (Abb. 24C-D). Darüberhinaus wurden histochemisch alkalische Phosphatase und mittels Immunfärbungen Osteocalcin, zwei für Osteoblasten spezifische Proteine, nachgewiesen (Abb. 24E-F). Damit wurde eindeutig gezeigt, daß eine Differenzierung der MSCs zu Knochenzellen induziert werden konnte.



#### Abbildung 24: *In vitro* Differenzierung der MSCs zu Knochenzellen

10 Tage nach Kultivierung der MSCs in Knochen-Differenzierungsmedium konnte man knotenförmige Aggregate und erste Ablagerungen zwischen den Zellen beobachten (A). Nach 3 Wochen hatten sich die Ablagerungen verdichtet und zeigten eine Knochen-typische Trabekelstruktur (B). Zu diesem Zeitpunkt wurden die MSCs fixiert und die Knochendifferenzierung durch spezifische Färbungen nachgewiesen (identische Kontrollfärbungen an undifferenzierten MSCs als Einsätze). Durch von Kossa- (C, braun-schwarz) und Alizarinrot-Färbung (D, rot; Gegenfärbung mit Hämatoxylin blau) konnten massive Kalkablagerungen demonstriert werden. Der Nachweis von alkalischer Phosphatase (E, dunkelblau) und Osteocalcin (F, rot; Kernfärbung mit Hoechst blau) belegte die Differenzierung der MSCs zu Osteoblasten. Balken: A-B = 150  $\mu\text{m}$ , C-E = 540  $\mu\text{m}$ , F = 100  $\mu\text{m}$

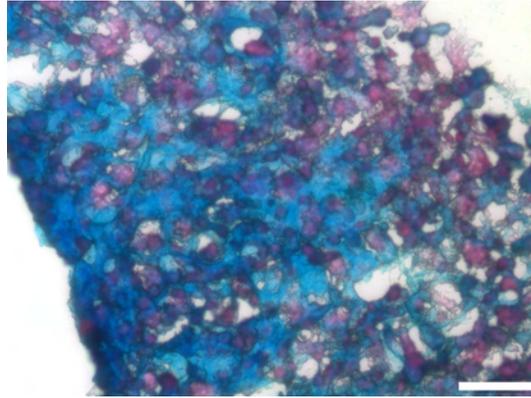
Die Kultivierung der MSCs in dem Fett-Differenzierungsmedium führte bereits nach wenigen Tagen zu einer morphologischen Veränderung der Zellen. Einige der MSCs nahmen eine rundliche Gestalt an und begannen, kleine Vakuolen im Zytoplasma auszubilden. Mit der Dauer der Kultivierung wurden die Zellen sehr fragil und lösten sich von dem Untergrund ab, sodaß nach zwei bis drei Wochen nur noch wenige Zellen auf der Plastikschaale zu finden waren. Diese zeigten jedoch eine für Fettzellen typische polygone Form und eingelagerte Vakuolen (Abb. 25A). Der Nachweis von Triglyceriden in den Vakuolen erfolgte durch den fettlöslichen Farbstoff Ölrot, der die Lipide rot anfärbte (Abb. 25B). Dadurch wurde zweifelsfrei gezeigt, daß die in der Kultur angereicherten MSC auch zu Fettzellen differenziert werden konnten.



**Abbildung 25: *In vitro* Differenzierung der MSCs zu Fettzellen**

Nach drei Wochen Kultivierung in Fett-Differenzierungsmedium zeigten die MSCs eine typische Morphologie von Fettzellen mit der Ausbildung zyttoplasmatischer Vakuolen (A). Durch Ölrot konnten die eingelagerten Fette in den Vakuolen nachgewiesen werden (rot, B; Gegenfärbung mit Hämatoxylin blau). Balken: A-B = 80 µm

Die Differenzierung der MSCs zu Knorpel konnte nicht anhand morphologischer Veränderungen direkt unter dem Mikroskop verfolgt werden, da die Zellen als Pellets in dem Knorpel-Differenzierungsmedium kultiviert wurden. Nach vier Wochen wurden die Zellaggregate daher in Einfriermedium eingedeckt und am Kryotom geschnitten. Die sauren Proteoglykane der Knorpelzellen konnten durch Alcian Blau-Färbung in den Schnittpräparaten dargestellt werden (Abb. 26). Damit wurde nachgewiesen, dass die kultivierten MSCs unter geeigneten Bedingungen zu Knorpelzellen differenzieren konnten.



**Abbildung 26: *In vitro* Differenzierung der MSCs zu Knorpelzellen**

Nach vier Wochen Kultivierung in Knorpel-Differenzierungsmedium wurden die MSC-Pellets geschnitten. Durch Färbung mit Alcian Blau konnten die sauren Muzine des Knorpels nachgewiesen werden (blau; Gegenfärbung mit Kernechtrot). Balken = 500  $\mu\text{m}$

### 3.2.4 *In vitro* Differenzierung der MSCs zu Herzzellen

Während die Differenzierung zu Knochen-, Knorpel- und Fettzellen in der Literatur oft beschrieben wurden und typische Eigenschaften der MSCs darstellen, ist die Bildung von Muskelzellen und speziell Herzmuskelzellen weniger gut belegt. Aus diesem Grund sollte nun getestet werden, ob die Zellen *in vitro* zu Kardiomyozyten differenziert werden konnten. Für eine Zellersatztherapie am Herzen ist es von großer Bedeutung, daß die eingebrachten Zellen funktionelle Aufgaben der Kardiomyozyten übernehmen, vor allem Kontraktion und elektrische Kopplung. Auch für die klinische Anwendung könnte es daher von Vorteil sein, die MSCs bereits in Kultur zu einer myogenen Entwicklung anzuregen, um die Integration und die Reifung der Zellen nach Transplantation *in vivo* zu lenken und damit positiv zu beeinflussen.

Um die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen zu Herzzellen direkt darstellen zu können, wurden MSCs von transgenen Mäusen generiert, die EGFP unter Kontrolle eines Alpha-Aktin-Promotors exprimierten. Im Falle einer Transformation zu Kardiomyozyten würde in diesen Zellen der muskelspezifische Promotor aktiviert und die EGFP-Produktion in Gang gesetzt. Unter Fluoreszenzlicht wären diese Zellen dann mit spezifischen Filtern zu erkennen und eindeutig von den undifferenzierten MSCs zu unterscheiden.

Zur Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen zu Herzzellen *in vitro* wurden verschiedene Ansätze durchgeführt. Experimente anderer Arbeitsgruppen hatten gezeigt, daß Zugabe von 5-Aza-Cytidin in das Kulturmedium eine Transformation der MSCs zu Muskelzellen bewirken kann (Wakitani et al., 1995; Makino et al., 1999; Fukuda, 2001). 5-Aza-Cytidin induziert eine Demethylierung der DNA und kann dadurch eine Reaktivierung stumm geschalteter Gene auslösen. So konnte eine embryonale Fibroblasten-Linie der Ratte nach Zugabe der Substanz Myotuben, Adipozyten und Chondrozyten entwickeln (Konieczny und Emerson, Jr., 1984).

In verschiedenen Ansätzen (n=13) wurde daher versucht, eine Differenzierung der MSCs zu Muskelzellen zu induzieren. Dabei wurden unterschiedliche Konditionen getestet, indem einzelne Parameter wie Zelldichte, Zeitpunkt der Zugabe und Passagezahl variiert wurden (vgl. Tab. 1).

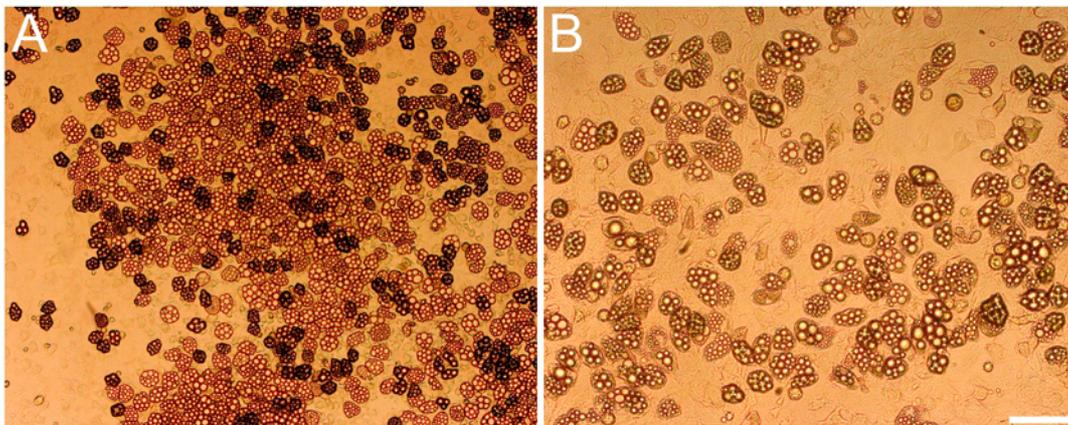
#	Passage	Zelldichte	Zusätze
1	P0, Tag 5	sehr kleine Kolonien	5-Aza
2	P0, Tag 5	sehr kleine Kolonien	5-Aza/doAza + Amphotericin B
3	P0, Tag 13	einzelne Kolonien, <5%	5-Aza
4	P0, Tag 20	nahezu konfluent, ca. 80%	5-Aza
5	P0, Tag 28	konfluent, 100%	5-Aza
6	P1, Tag 35	nahezu konfluent, ca. 80%	5-Aza + Amphotericin B
7	P2, Tag 46	nahezu konfluent, ca. 80%	5-Aza + Amphotericin B
8	P3, Tag 61	nahezu konfluent, ca. 80%	5-Aza/doAza + Amphotericin B
9	P2, aufgetaut	nahezu konfluent, ca. 80%	5-Aza/doAza + Amphotericin B
10	P9, aufgetaut	20000 Z/cm <sup>2</sup>	5-Aza
11	P9, aufgetaut	5000/10000/20000 Z/cm <sup>2</sup>	5-Aza/doAza + Amphotericin B
12	P10, aufgetaut	5000/10000/20000 Z/cm <sup>2</sup>	5-Aza/doAza + Amphotericin B
13	P11, aufgetaut	5000/10000/20000 Z/cm <sup>2</sup>	5-Aza/doAza + Amphotericin B

**Tabelle 1: *In vitro* Differenzierung der MSCs zu Herzzellen mit 5-Azacytidin**

Gezeigt sind die verschiedenen Ansätze (erste Spalte), mit denen eine Differenzierung der MSCs zu Herzzellen induziert werden sollte. Die zweite Spalte gibt an, wie oft die Zellen passagiert wurden und wie lange sie bereits in der Kultur gehalten wurden. Die dritte Spalte zeigt, bei welcher Zelldichte die Substanz zugegeben wurde. Die vierte Spalte nennt die im Medium verwendeten Zusätze, es wurde entweder 5-Aza-Cytidin (5-Aza) oder 5-Aza-2'-deoxycytidin (doAza) verwendet, Amphotericin B wurde dem Medium zusätzlich beigelegt.

Weder bei frühen Zellpopulationen (ab Tag 5 der Kultivierung), noch bei späteren Passagen (bis Passage 11) konnte jedoch eine morphologische Veränderung der MSCs wie die Bildung von Muskelfasern oder spontanes Schlagen der Zellen gezeigt werden. Darüberhinaus war auch keine Zunahme der grünen Fluoreszenz in den Zellen zu beobachten, eine Differenzierung zu Muskelzellen konnte in diesen Ansätzen daher ausgeschlossen werden.

Auch die Zugabe von Amphotericin B ins Medium (n=8) und die Verwendung von 5-Aza-2'-deoxycytidin (n=6) führte nicht zu einer Bildung von Herzzellen. Beides wurde in anderen Studien verwendet, um MSCs zu myeloiden Zellen zu differenzieren oder die Differenzierung zu Muskelzellen zu steigern (Phinney et al., 1999; Bittira et al., 2002). In einem der Ansätze (#8, Passage 3) hatten sich 45 Tage nach Zugabe von 5-Aza-2'-deoxycytidin Fettzellen mit typischer Vakuolenformation gebildet (Abb. 27). Es konnten jedoch auch hier keine EGFP-positiven oder morphologisch typischen Herzzellen gefunden werden.

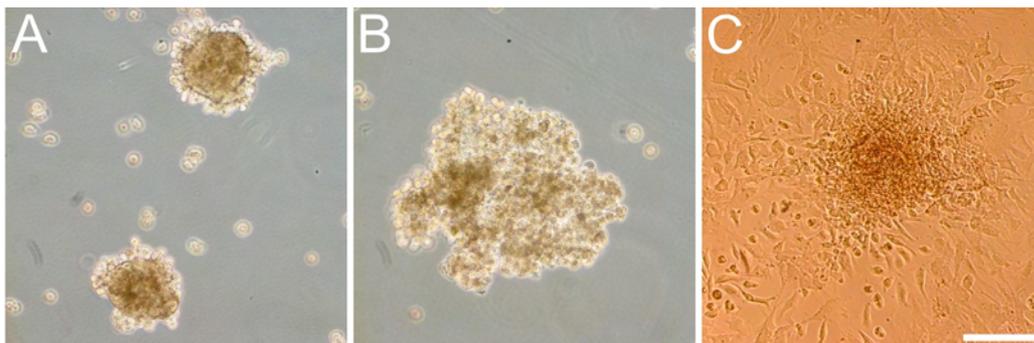


**Abbildung 27: *In vitro* Differenzierung der MSCs mit 5-Aza-2'-deoxycytidin**

Nach Kultivierung von 61 Tage alten MSCs (Passage 3) in Medium mit 5-Aza-2'-deoxycytidin und Amphotericin B konnten 45 Tage nach Zugabe der Substanzen Areale beobachtet werden, in denen sich runde bis polygonale Fettzellen mit zytoplasmatischen Vakuolen gebildet hatten. Eine Differenzierung der MSCs zu Herzzellen wurde jedoch nicht gefunden. Balken: A = 100  $\mu\text{m}$ , B = 50  $\mu\text{m}$

Da eine Differenzierung der MSCs zu Herzzellen durch das Kultivierungsprotokoll mit 5-Aza-Cytidin nicht erfolgreich war, und die Verwendung dieser epigenetisch wirksamen Substanz für klinische Zwecke generell bedenklich ist, wurde ein anderer Ansatz durchgeführt, um eine Transdifferenzierung der Zellen zu bewirken. Aus

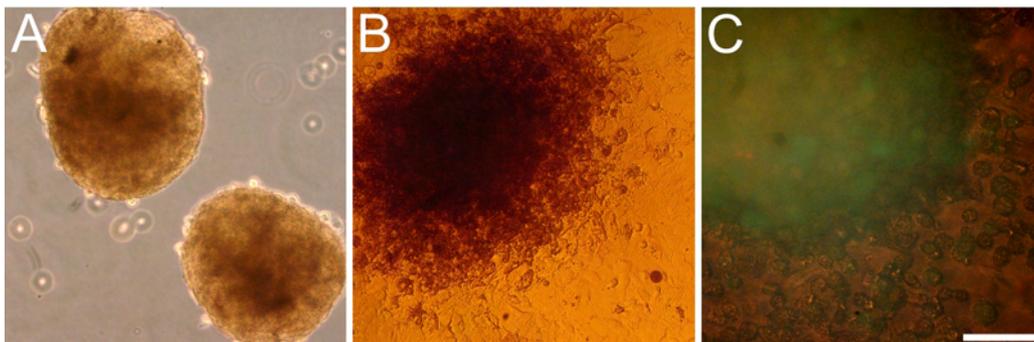
Studien mit embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) ist bekannt, daß durch die Bildung von Zellaggregaten, sogenannten embryoid bodies (EBs), eine Differenzierung der Zellen eingeleitet werden kann (Smith, 2001). Die engen Zellkontakte und die in den EBs vorliegenden Bedingungen führen dabei zur Reifung der undifferenzierten ES-Zellen, unter anderem auch zu Herzzellen (Robbins et al., 1990). Die MSCs wurden entsprechend gängiger ES-Zell-Protokolle in hängenden Tropfen kultiviert, mit 400 Zellen pro Tropfen. Überraschenderweise konnten in keinem der Ansätze (n=4) Zellaggregate gefunden werden. Da die MSCs eine deutlich geringere Teilungsrate aufwiesen als embryonale Stammzellen, wurden in einem weiteren Experiment größere Zellzahlen pro Tropfen eingesetzt, um die finale Größe der Aggregate zu erhöhen. Doch auch mit 1600 und 4800 MSCs (n=2) zeigten sich nur wenige kleine Aggregate mit einem Durchmesser von etwa 150  $\mu\text{m}$  in den hängenden Tropfen (Abb. 28A), zum Teil konnten auch nur lockere Zellverbände beobachtet werden (Abb. 28B). In Suspension waren diese Zellzusammenschlüsse meist instabil und zerfielen innerhalb weniger Tage. Nach dem Plattieren auf Gewebekulturschalen wuchsen Zellen aus dem Zellhaufen heraus (Abb. 28C), die jedoch keine Anzeichen einer Differenzierung zu Herzzellen zeigten, weder eine Veränderung der Morphologie, noch eine Zunahme der EGFP-Fluoreszenz oder spontanes Schlagen. Zum Teil proliferierten die Zellen auch nur begrenzt und starben nach kurzer Kultivierungszeit ab.



**Abbildung 28: *In vitro* Differenzierung von MSCs in Zellaggregaten**

Die Kultivierung der MSCs in hängenden Tropfen mit jeweils 4800 Zellen resultierte in kleinen lockeren Aggregaten (A), die sehr instabil waren und leicht zerfielen. Das zeigte sich auch an vielen schwimmenden Einzelzellen und kleineren Zusammenschlüssen, zudem bildeten sich teilweise nur fragile flächige Zellverbände aus (B). Nach Plattieren der Zellaggregate adherierten diese an der Plastikoberfläche der Kulturschalen und fibroblastenähnliche Zellen wuchsen aus dem Zellhaufen heraus (C, 3 Tage nach Ausplattieren). Es konnten jedoch auch nach mehreren Wochen weder morphologische Anzeichen für eine Muskeldifferenzierung, noch schlagende Areale oder eine auffällige EGFP-Fluoreszenz einzelner Zellen beobachtet werden. Balken: A-C = 150  $\mu\text{m}$

In den ES-Zell-Suspensionen sind neben den Stammzellen auch Nährzellen aus der vorhergegangenen Kultur enthalten. Da diese das Wachstumsverhalten der Stammzellen in den EBs vor allem durch die Bildung von Matrixkomponenten beeinflussen könnten, wurden die MSCs in einem weiteren Versuch zuerst auf inaktiven Nährzellen kultiviert und gemeinsam mit diesen in hängenden Tropfen oder in Massenkultur inkubiert (400 MSCs pro Tropfen mit etwa dem gleichen Anteil an inaktiven Feederzellen, n=3; Massenkultur, n=2). Durch die Zugabe der Feederzellen konnten größere und stabilere Zellverbände von über 250  $\mu\text{m}$  Durchmesser generiert werden, vor allem die in der Massenkultur gebildeten Aggregate zeigten eine kompakte Struktur, die durch glatte Ränder gekennzeichnet war (Abb. 29A). Nach dem Ausplattieren hefteten sich die Zellhaufen an der Plastikschale an und einzelne Zellen wuchsen heraus und proliferierten (Abb. 29B). Allerdings zeigten sich auch in diesen Ansätzen keine schlagenden oder deutlich EGFP-positiven Zellen (Abb. 29C).

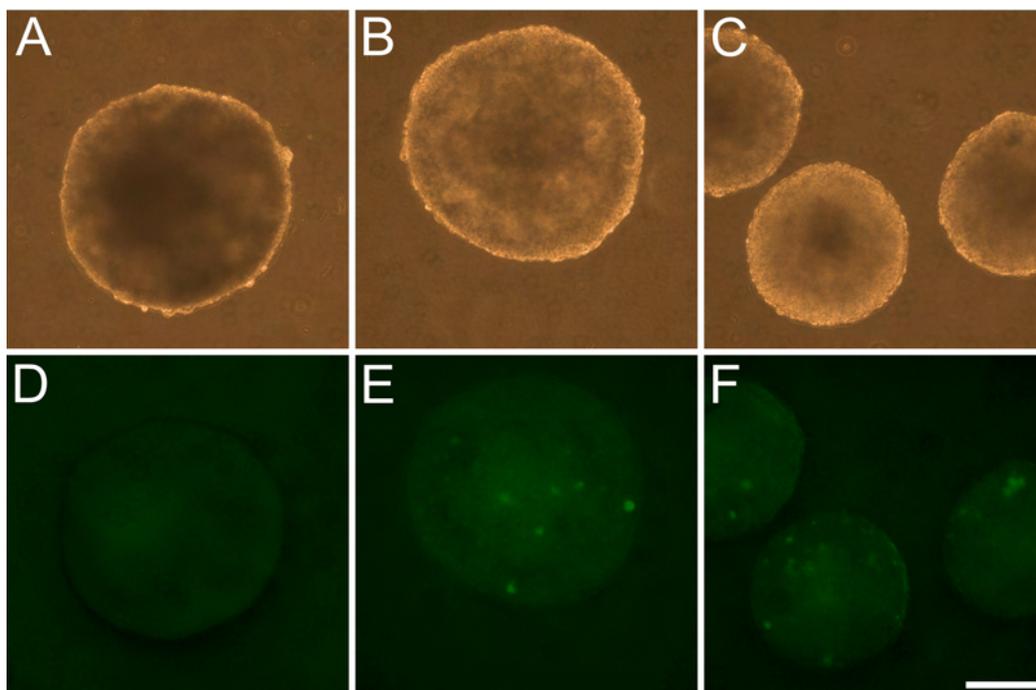


**Abbildung 29: *In vitro* Differenzierung von MSCs in Zellaggregaten mit Feederzellen**

Nach Kultivierung der MSCs auf inaktiven Feederzellen wurden diese gemeinsam in hängenden Tropfen inkubiert. Die daraus resultierenden Zellaggregate waren deutlich größer als die aus reinen MSCs (A). Die kompaktere Form und die glatte Oberfläche gaben darüberhinaus die höhere Stabilität dieser Zusammenschlüsse wieder. Nach dem Ausplattieren setzten sich die Aggregate an der Kulturschale fest, und Zellen wuchsen heraus (B, Tag 7 nach Ausplattieren), aber es konnten keine schlagenden Zellen oder eine Zunahme der EGFP-Fluoreszenz gesehen werden (C, Tag 15 nach Ausplattieren; Überlagerung einer Durchlichtaufnahme mit einem Fluoreszenzbild zur Darstellung von EGFP, grün). Balken: A-B = 150  $\mu\text{m}$ , C = 75  $\mu\text{m}$

Schließlich wurde untersucht, ob durch die Kokultivierung mit ES-Zellen in hängenden Tropfen die MSCs zum Wachstum in Zellaggregaten und zu einer Differenzierung angeregt werden konnten. Dazu wurden Beta-Aktin-EGFP transgene MSCs mit Wildtyp-D3-ES-Zellen in verschiedenen Mengenverhältnissen (20%, 50%, 80% MSCs) gemischt und in hängenden Tropfen kultiviert. Wie die

Abbildungen 30A-C zeigen, konnten mit dieser Methode zwar sehr große und stabile Zellaggregate generiert werden, die Bildung von EGFP-positiven Herzzellen in schlagenden Arealen war jedoch nicht nachzuweisen. Der deutlich kleinere Durchmesser der Aggregate mit einem hohen Anteil an MSCs deutete darauf hin, daß die Größe der Zellzusammenschlüsse hauptsächlich durch die stark proliferierenden ES-Zellen bestimmt wurde. Der Nachweis der grünen Fluoreszenz bestätigte, daß in den Aggregaten mit wenigen MSCs keine und selbst bei einem Anteil von 80% nur einzelne EGFP-positiven Zellen zu finden waren, der Großteil der Zellmasse bestand demnach aus EGFP-negativen ES-Zellen (Abb. 30D-F).



**Abbildung 30: *In vitro* Differenzierung von MSCs in Zellaggregaten mit ES-Zellen**

EGFP-positive MSCs wurden mit Wildtyp-ES-Zellen in unterschiedlichen Mengenverhältnissen in hängenden Tropfen kultiviert. Es ergaben sich in allen Fällen große und stabile Zellaggregate (Durchlichtaufnahmen A-C). Auffällig war jedoch der kleinere Durchmesser der Zusammenschlüsse mit einem geringen Anteil an ES-Zellen (A, D: 20% MSCs; B, E: 50% MSCs; C, F: 80% MSCs), ein Hinweis darauf, daß diese für die Größe entscheidend waren. Aufnahmen unter Fluoreszenzlicht bestätigten, daß die Aggregate hauptsächlich aus EGFP-negativen ES-Zellen bestanden, während grün fluoreszierende MSCs nur vereinzelt zu erkennen waren (D-F). Die Bildung von EGFP-positiven schlagenden Arealen mit MSC-abgeleiteten Herzzellen war zudem nicht zu beobachten. Balken: A-F = 150  $\mu$ m

Folglich konnten durch die Formung von Zellaggregaten mit der Methode der hängenden Tropfen oder in der Massenkultur, durch die in embryonalen Stammzellen eine Differenzierung induziert werden kann, keine Herzzellen aus den

mesenchymalen Stammzellen generiert werden. Durch die Kokultivierung mit Feederzellen oder ES-Zellen wurde zwar die Formung der Aggregate verbessert, ein myogenes Entwicklungspotential der MSCs war aber nicht nachzuweisen.

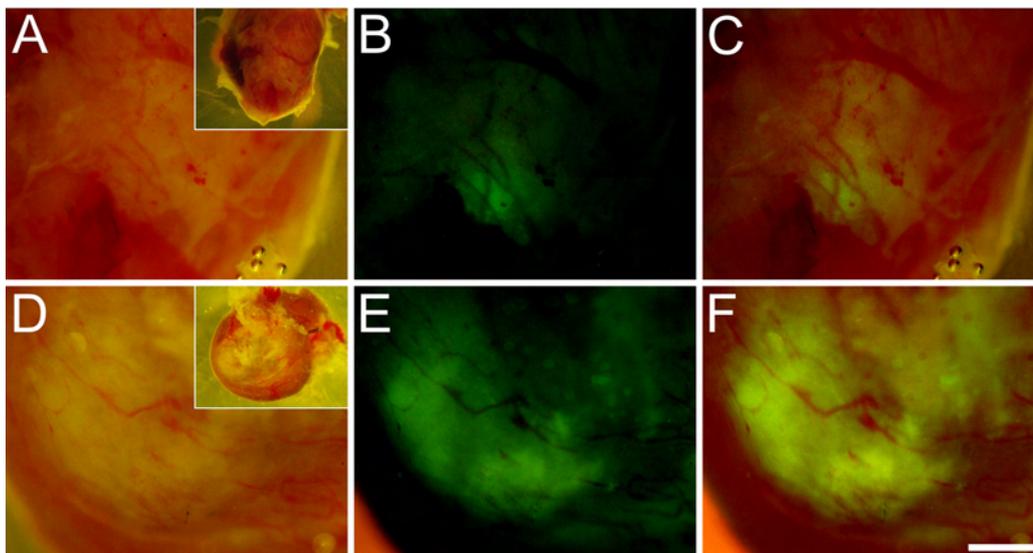
### 3.2.5 Transplantation der MSCs in infarzierte Maus Herzen

Studien mit adulten Stammzellen hatten ergeben, daß sich diese nach Transplantation in bestimmte Organe gewebespezifisch entwickeln können (Abedi et al., 2004). Nachdem eine *in vitro* Differenzierung der MSCs zu Herzzellen nicht induziert werden konnte, sollte daher nun *in vivo* untersucht werden, ob die gewebeeigenen Signalstoffe im Herzen eine Transdifferenzierung der MSCs auslösen konnten.

Die Kultivierung der MSCs hatte gezeigt, daß die Zellen ohne Veränderung ihres undifferenzierten Zustandes in nahezu beliebiger Zahl zu expandieren waren. Das bedeutete einen erheblichen Vorteil der MSCs gegenüber anderen Zelltypen, bei denen die eingeschränkte Ausbeute eine starke Limitierung ihrer Anwendbarkeit für die zelluläre Ersatztherapie darstellt. Denn um eine Regeneration des geschädigten Gewebes zu bewirken, müssen große Zellzahlen transplantiert werden. Um herauszufinden, inwieweit MSCs in der Lage sind, eine solche Geweberegeneration zu bewirken, wurden Transplantationsexperimente an infarzierten Maus Herzen durchgeführt.

Da sie einen sehr einfachen Nachweis der Transdifferenzierung angewachsener Stammzellen ermöglichten, wurden zunächst Alpha-Aktin-EGFP transgene MSCs für die Transplantation verwendet. Als Empfängertiere dienten syngene Mäuse, denen Kryoinfarkte am linken Herzventrikel zugefügt wurden. Direkt anschließend wurden jeweils 100.000-200.000 MSCs (Passage 1-9) in die Infarktzone und den Randbereich der Läsion injiziert (n=19). Die Herzen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Operation (10-84 Tage, Median=24 Tage) entnommen und makroskopisch unter einer Fluoreszenzlupe nach grün fluoreszierenden Zellen untersucht. In 79% der Herzen (n=15) konnten keine EGFP-positiven Areale gefunden werden, nur in wenigen (n=4) war in kleinen Teilbereichen des Infarktes eine leichte Hintergrundfluoreszenz zu erkennen (Abb. 31), wie sie aufgrund einer gewissen Unspezifität des Promotors auch in undifferenzierten MSCs zu finden war

(vgl. Kapitel 3.1.5). Davon waren 3 der Herzen mit Zellen der ersten Passage transplantiert worden, in denen folglich noch ein erheblicher Anteil Blutzellen enthalten war (vgl. Kapitel 3.2.2). Zudem war in diesen Herzen die Implantationsdauer vergleichsweise kurz (10, 10 und 24 Tage), sodaß es sich um einen inflammatorischen Prozeß der kontaminierenden myeloiden Zellen gehandelt haben könnte (Abb. 31A-C). Mit einer reinen MSC-Population (Passage 6) konnte nur in einem Herzen (28 Tage nach Transplantation) eine schwache EGFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 31D-F).



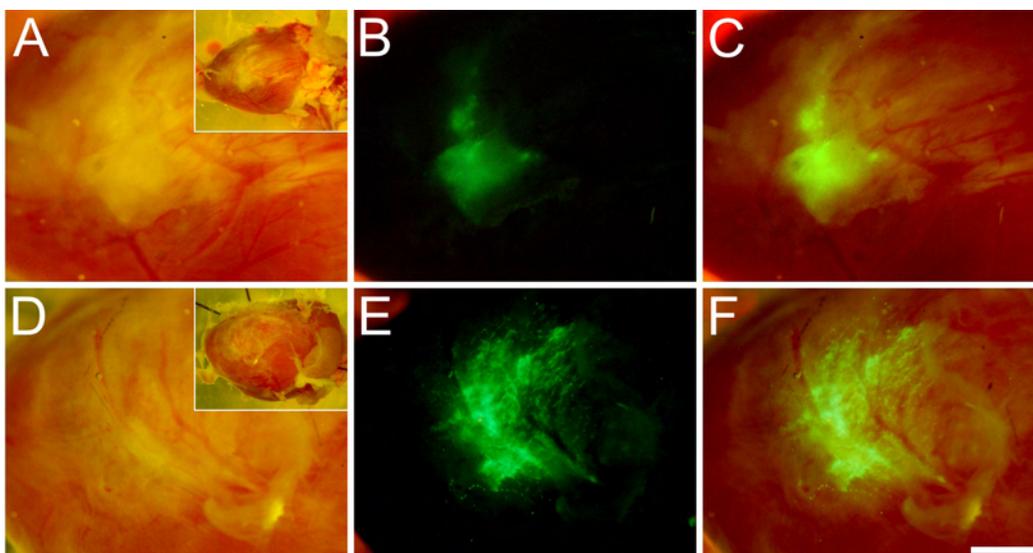
**Abbildung 31: Transplantation von Alpha-Aktin-EGFP transgenen MSCs**

Die Transplantation von MSCs, in denen EGFP unter dem Muskel-spezifischen Alpha-Aktin-Promotor exprimiert wurde, ermöglichte die direkte Detektion einer Transdifferenzierung der eingebrachten Zellen. A und D zeigen Auflichtaufnahmen des Infarktareals entnommener Herzen, eine Gesamtansicht der Herzen ist als Einsatz angefügt. B und E zeigen das jeweils gleiche Areal, aufgenommen unter Fluoreszenzlicht. C und F zeigen Überlagerungen der Auflicht- und Fluoreszenzaufnahmen. In drei Herzen mit sehr frühen MSC-Kulturen (Passage 1) zeigte sich ein kleines Areal mit schwacher EGFP-Fluoreszenz (A-C, 10 Tage nach Injektion der Zellen). Mit einer reinen MSC-Population (Passage 6) konnte nur in einem Herzen eine Integration der Zellen nachgewiesen werden (D-F, 28 Tage nach Transplantation). Auch hier zeigte sich jedoch nur eine schwache Fluoreszenz, differenzierte Herzzellen würden durch eine helle grüne Farbe hervorstechen. Zudem konnten auch in Gefrierschnitten der Herzen keine stark EGFP-positiven Zellen gefunden werden. Balken: A-C = 500  $\mu$ m, D-F = 300  $\mu$ m, Einsätze A,D = 5 mm

Um auszuschließen, daß makroskopisch einzelne transdifferenzierte Zellen übersehen wurden, wurden die Herzen kryokonserviert und Gefrierschnitte angefertigt. Auch bei genauer mikroskopischer Untersuchung der Schnitte konnten jedoch keine grünen Zellen in den Herzen gefunden werden, eine Transdifferenzierung zu Kardiomyozyten hatte demnach nicht stattgefunden.

Da keine EGFP-positiven differenzierten MSCs im Herzen gefunden werden konnten, sollte eine erfolgreiche Integration der Zellen sichergestellt werden. Daher wurden als nächstes Beta-Aktin-EGFP transgene MSCs in die infarzierten Mausherzen injiziert. Diese Zellen wiesen auch im undifferenzierten Zustand starke EGFP-Fluoreszenz auf und waren bei einem erfolgreichen Anwachsen im Herzen in jedem Fall nachweisbar. In kryoinfarzierte Mäuse (n=50) wurden 100.000-200.000 Beta-Aktin-EGFP transgene MSCs (Passage 3-11) transplantiert und die Herzen nach 7 bis 132 Tagen (Median=28 Tage) entnommen.

In 86% der Herzen war EGFP-Fluoreszenz makroskopisch im Bereich des Infarktareals erkennbar, die MSCs waren folglich in der Lage, in der nekrotischen Zone anzuwachsen. EGFP-positive Bereiche konnten bis zu 84 Tage nach der Transplantation in den Herzen nachgewiesen werden (Abb. 32A-C), ein Zeichen für ein dauerhaftes Anwachsen der mesenchymalen Stammzellen in dem geschädigten Gewebe. Zum Teil zeigten sich auswachsende MSCs im Randbereich der Injektionsstellen, die die Vitalität der Zellen und die stabile Integration belegten (Abb. 32D-F). Um das Schicksal dieser Zellen genauer zu untersuchen, wurden Kryoschnitte dieser Herzen angefertigt und analysiert.

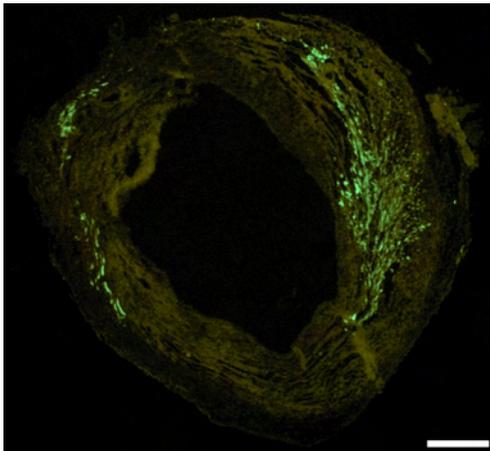


**Abbildung 32: Transplantation von Beta-Aktin-EGFP transgenen MSCs**

Durch die Transplantation von Beta-Aktin-EGFP transgenen MSCs konnten die injizierten Zellen leicht detektiert und ihr Verhalten im Herzgewebe analysiert werden. EGFP-Fluoreszenz über einen Zeitraum von bis zu 12 Wochen nach Injektion der Zellen belegte eine stabile Langzeit-Integration in den Herzen (A-C, 84 Tage nach Transplantation der Zellen, Passage 8). Ein Auswachsen der MSCs im Bereich des Infarktes demonstrierte die Vitalität der Zellen (D-F, 29 Tage nach Transplantation der Zellen, Passage 3). Balken: A-F = 500 µm, Einsätze A,D = 5 mm

### 3.2.6 Keine Transdifferenzierung der transplantierten MSCs

Analog zu den makroskopischen Befunden demonstrierten auch die Querschnitte der transplantierten Herzen die hohe Zahl der angewachsenen MSCs im Gewebe. Die EGFP-positiven Zellen füllten große Bereiche des Infarktareals und der Randzone des Infarktes aus (Abb. 33) und zeigten zum Teil eine langgestreckte Morphologie, jedoch keine auffallende Querstreifung.



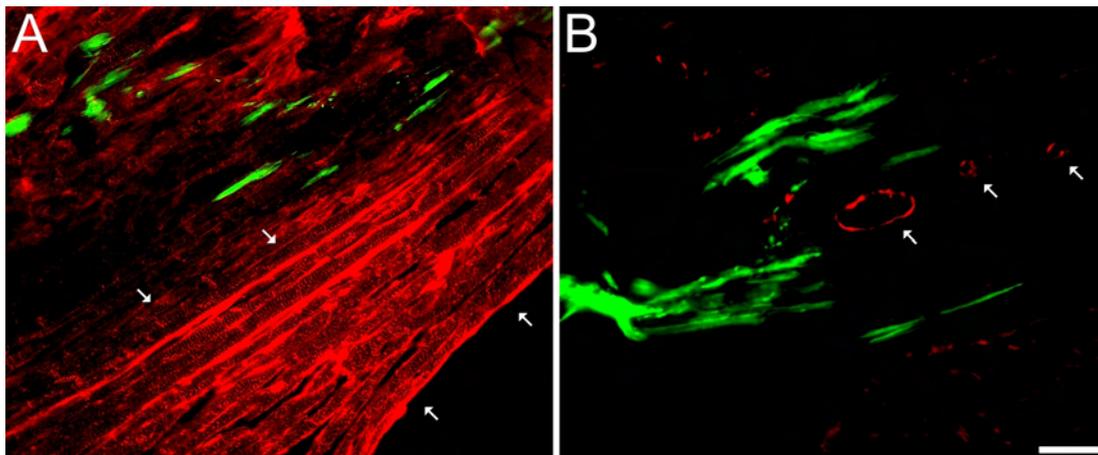
**Abbildung 33: Integration der MSCs**

In Gefrierschnitten der mit MSCs transplantierten Herzen bestätigte sich das gute Anwachsen der EGFP-positiven Zellen (grün, Autofluoreszenz nativer Herzzellen dunkelgelb). 7 Tage nach Injektion der Zellen (Passage 4) war ein großflächiges Anwachsen der Zellen im Infarktbereich und der Randzone des Infarktes zu erkennen (der dargestellte Schnitt zeigt eine Herzspitzen-nahe Ebene etwa 300  $\mu\text{m}$  unterhalb des Infarktareals). Zu beachten ist die zum Teil langgestreckte Gestalt der Zellen, die sich in die Gewebestruktur integrierten. Balken: 400  $\mu\text{m}$

Um genauer zu untersuchen, ob die MSCs zu Herzzellen differenziert waren, wurden immunhistochemische Färbungen gegen das muskelspezifische Strukturprotein Alpha-Aktinin durchgeführt. Während die nativen Herzzellen außerhalb des Infarktgebietes eine deutliche Querstreifung aufwiesen, war in den EGFP-positiven MSCs keine Färbung der Muskelfilamente erkennbar (Abb. 34A).

Neben neu gebildeten Herzzellen, die eine aktive Kontraktilität des regenerierten Gewebes gewährleisten würden, könnten auch andere Zelltypen eine Wiederherstellung der Herzfunktion begünstigen. Die Neubildung von Gefäßen und die damit verbesserte Durchblutung und Nährstoffversorgung des Infarktgebietes könnte bestehende Herzzellen in der nekrotischen Zone erhalten und die Narbenbildung positiv beeinflussen. Daher wurde anhand von immunhistochemischen Färbungen gegen PECAM untersucht, ob eine Neovaskularisierung des Infarktgewebes durch Transdifferenzierung der MSCs in Endothelzellen stattgefunden hatte. PECAM (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) ist ein Membranprotein, das konstitutiv in Endothelzellen exprimiert wird und als Botenstoff an der Angiogenese beteiligt ist. Das Endothel vorhandener

nativer Gefäße im Randbereich des Infarktes zeigte eine deutliche Färbung, was die Spezifität des Antikörpers belegte. Die transplantierten EGFP-positiven Zellen wiesen den Marker dagegen nicht auf und konnten auch keinen gefäßartigen Strukturen zugeordnet werden (Abb. 34B). In manchen Fällen konnten allerdings im Bereich der angewachsenen MSCs vermehrt kleine Gefäße beobachtet werden, möglicherweise ein Hinweis auf einen passiven Effekt, durch den die eingebrachten Zellen zu einer verbesserten Neovaskularisierung geführt haben könnten.



#### Abbildung 34: Keine Differenzierung der transplantierten MSCs zu Herz oder Endothel

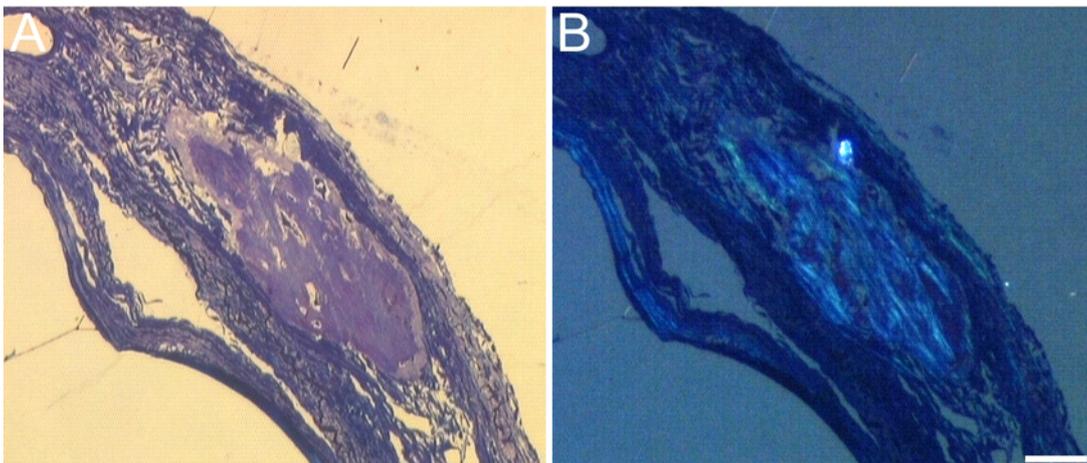
Durch immunhistochemische Färbungen der Gefrierschnitte sollte eine mögliche Differenzierung der transplantierten MSCs zu Herz- oder Endothelzellen analysiert werden. Dargestellt sind Regionen im Randbereich eines Infarktes 42 Tage nach Injektion von 100.000 MSCs (Passage 8). Die Färbung des Muskelproteins Alpha-Aktinin (A, rot) ergab eine typische Querstreifung der nativen Herzzellen (Pfeile), während die EGFP-positiven MSCs (grün) nicht durch den Antikörper markiert wurden. Ein Nachweis von Endothelzellen mit gegen PECAM gerichteten Antikörpern zeigte eine Färbung der Gefäße (B, rot, Pfeile), die EGFP-positiven MSCs (grün) wiesen jedoch keine PECAM-Expression auf und konnten keinen Gefäßstrukturen zugeordnet werden. Balken: A-B = 50 µm

Die Färbungen der Herzschnitte demonstrierten somit eindeutig, daß eine Transdifferenzierung der mesenchymalen Stammzellen zu Kardiomyozyten oder Endothelzellen nach Transplantation in das infarzierte Herz nicht stattgefunden hatte.

### 3.2.7 Transplantierte MSCs bilden Tumor-ähnliche Strukturen

Da die Kryoschnitte und immunhistochemischen Färbungen keinen Aufschluß über das Schicksal der angewachsenen MSCs geben konnten, wurden zur weiteren Charakterisierung der Zellen Semidünnschnitte von MSC-transplantierten Herzen

angefertigt. Diese ermöglichten eine bessere Konservierung des Gewebes und ein höheres Auflösungsvermögen unter dem Lichtmikroskop, wodurch anhand der Morphologie das Schicksal der angewachsenen Zellen aufgeklärt werden sollte. Überraschenderweise zeigten sich nach histologischen Färbungen der Schnitte mit Methylen-Blau in einigen Herzen eingekapselte Tumor-ähnliche Gebilde, die zum Teil die gesamte Breite der Herzwand ausfüllten (Abb. 35A). Diese Bereiche waren gekennzeichnet durch amorphe Strukturen, deren Form an die Ausbildung von Verknorpelungen oder heterotopen Verknöcherungen weicher Gewebe erinnerten. Daher wurden die Proben unter einem Polarisationsmikroskop analysiert, das es ermöglichte, mineralische Ablagerungen durch ein farbiges Leuchten identifizieren zu können. Tatsächlich schimmerten die Areale mit den amorphen Strukturen gelblich-blau (Abb. 35B), ein typisches Anzeichen für eine Kalzifizierung des Gewebes.

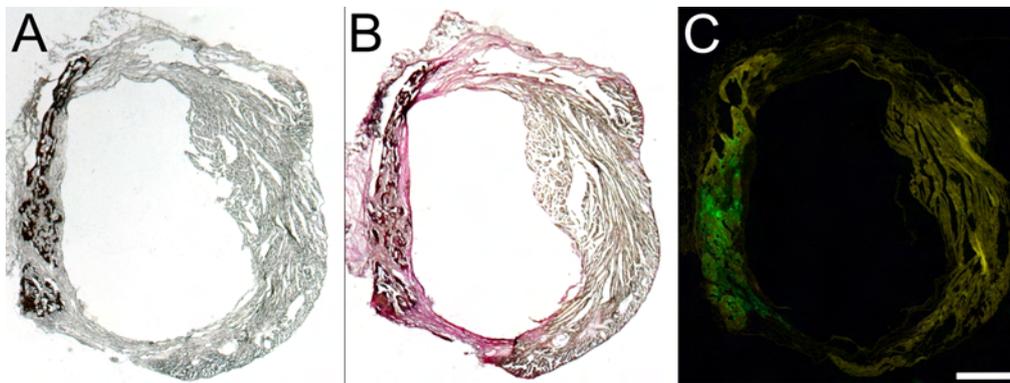


**Abbildung 35: Transplantierte MSCs bilden Tumor-ähnliche Strukturen**

Zur Charakterisierung der angewachsenen MSCs wurden Semidünnschnitte von einigen transplantierten Herzen angefertigt. Histologische Färbungen des Gewebes mit Methylenblau offenbarten in mehreren der Herzen Tumor-artige Einkapselungen im Bereich des Infarktes, die teilweise die gesamte Breite der Herzwand ausfüllten (A, dargestellt ist ein mit 200.000 MSCs (Passage 3) transplantiertes Herz 29 Tage nach der Operation). Da die amorphe Struktur dieser Gebilde an Verknöcherungen erinnerte, wurden die Schnitte unter dem Polarisationsmikroskop betrachtet (B). Das gelblich-blaue Leuchten der auffälligen Areale belegte die Einlagerung von Mineralien in das Gewebe, ein Hinweis auf Kalzifizierungen. Balken: A-B = 160  $\mu$ m

Um die Kalzifizierungen zweifelsfrei nachzuweisen, wurden die Kryoschnitte aller mit MSCs transplantierten Herzen mittels einer von Kossa-Färbung histologisch untersucht. In fast 50% der Herzen (n=41) wurden von Kossa-positive Areale gefunden (Abb. 36A). Konform mit den Tumor-ähnlichen Strukturen in den

Semidünnschnitten füllten diese teilweise die gesamte Breite der infarzierten Herzwand aus. Die Größe der Kalzifizierungen schien dabei mit der Dauer der Transplantation zuzunehmen. Durch eine Gegenfärbung des fibrotischen Gewebes nach van Gieson konnte gezeigt werden, daß die Kalzifizierungen auf die Infarktgebiete begrenzt waren (Abb. 36B). In den gefärbten Schnitten war ein direkter Nachweis der transplantierten Zellen durch EGFP nicht mehr möglich, da die Silberablagerungen die Fluoreszenz überdeckten und das Protein zudem durch die Fixierung in Alkohol denaturierte. In Folgeschnitten zeigte sich jedoch klar, daß die kalzifizierten Bereiche denen mit den angewachsenen EGFP-positiven MSCs entsprachen (Abb. 36C). Das sprach für die Annahme, daß die Kalzifizierungen durch die transplantierten Zellen und nicht durch den Infarkt selbst generiert wurden.



**Abbildung 36: Transplantierte MSCs führen zu Kalzifizierungen des Herzgewebes**

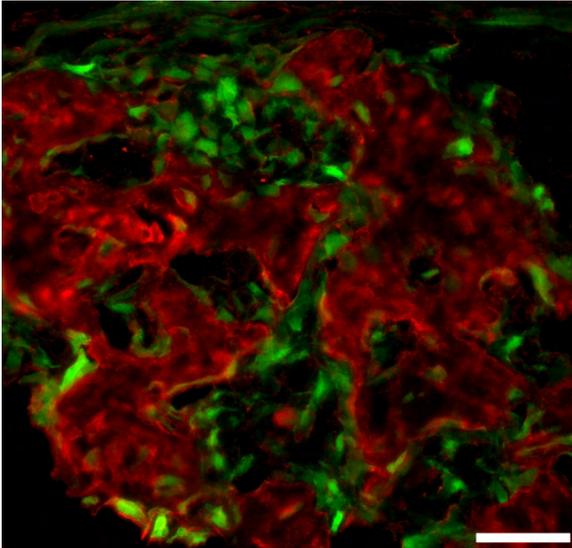
Von Kossa-Färbungen der Gefrierschnitte von transplantierten Herzen bestätigten die Kalzifizierungen des Herzgewebes nach Injektion der MSCs (A, Kalkablagerungen schwarz gefärbt). Gegenfärbungen nach van Gieson zeigten, daß die kalzifizierten Areale auf das Infarktgebiet beschränkt waren (B, Kalkablagerungen braun-schwarz, fibrotisches Narbengewebe dunkelrot, intaktes Muskelgewebe orange-braun). Durch Fluoreszenzmikroskopie konnten EGFP-positive MSCs in den entsprechenden Bereichen nachgewiesen werden (C, EGFP grün, Hintergrundfluoreszenz nativer Muskelzellen gelb). Die Bilder zeigen drei benachbarte Schnitte eines mit 100.000 MSCs (Passage 6) transplantierten Herzens 29 Tage nach der Operation. Balken: A-C = 1 mm

Zudem wurden in den Kontrollgruppen, in denen anstelle von Zellen nur die Trägersubstanz in die Infarkte injiziert wurde, keine Kalzifizierungen oder andere auffällige histologische Veränderungen gefunden (n=24, Median=18 Tage). Die Bildung dieser Strukturen wurde demnach durch die eingebrachten Zellen ausgelöst. Um zweifelsfrei zu bestätigen, daß die Knochenbildung von den MSCs induziert wurde, und nicht eine allgemeine Reaktion jeglicher Zellen auf das Milieu des

umliegenden Gewebes nach einer direkten Injektion in den Herzinfarkt darstellte, wurden als weitere Kontrolle fötale Fibroblasten in geschädigte Mausherzen injiziert. Die Fibroblasten wurden aus 14.5 Tage alten EGFP-positiven Föten einer Beta-Aktin-EGFP-transgenen Maus gewonnen und konnten daher anhand ihrer grünen Fluoreszenz detektiert werden. Jeweils 200.000 Fibroblasten wurden in kryoinfarzierte Mausherzen injiziert und die Herzen analysiert (n=5, Median=56 Tage). Es zeigte sich eine Integration der Zellen in den infarzierten Arealen, die Untersuchung der Herzen anhand von Färbungen an Kryoschnitten zeigte jedoch weder tumoröse Veränderungen noch Kalzifizierungen des Gewebes. Eine pathologische Veränderung alleine aufgrund der direkten Injektion von Zellen in das infarzierte Gewebe konnte demnach ausgeschlossen werden.

### 3.2.8 Transplantierte MSCs generieren Verknöcherungen

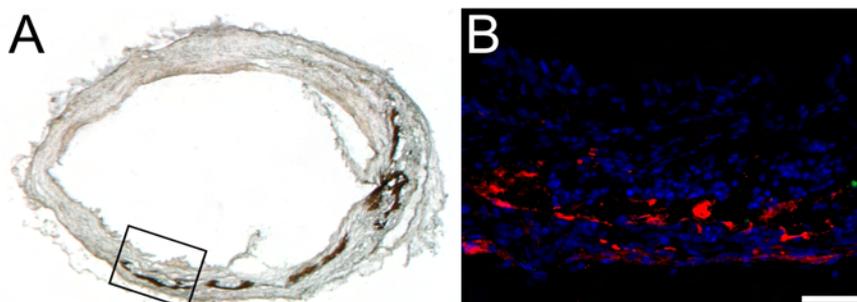
In nekrotischen Geweben, beispielsweise auch in den betroffenen Bereichen nach einem Herzinfarkt, können in geringer Zahl heterotope Kalzifizierungen von weichem Gewebe auftreten (Bloom und Peric-Golia, 1989; Mullens et al., 2006). Die vorangegangenen Versuche haben zwar eindeutig bewiesen, daß die Kalzifizierungen ausschließlich in den mit Zellen injizierten Herzen und nicht in den Kontrollen zu finden waren, und demnach nicht allein durch den Infarkt verursacht wurden, dennoch sollte ihr Ursprung noch genauer analysiert werden. Da die MSCs *in vitro* nachweislich zu Knochenzellen differenzieren konnten, sollte nun untersucht werden, ob die Kalkablagerungen durch eine Verknöcherung des Gewebes generiert wurden. Dazu wurden immunohistochemische Färbungen gegen Osteocalcin durchgeführt, ein Knochen-spezifisches Nichtkollagenprotein der Osteoblasten, das beim Knochenaufbau eine wichtige Funktion spielt. Diese Versuche zeigten, daß die im Infarktareal angewachsenen transplantierten MSCs komplett von Osteocalcin-positiven Knochenstrukturen umgeben waren (Abb. 37). Das belegte, daß es sich nicht um Kalkablagerungen nekrotischer Zellen in das Gewebe handelte, sondern daß durch die injizierten MSCs eine Knochenbildung im Herzgewebe induziert wurde.



**Abbildung 37: Verknöcherung des Herzgewebes nach Transplantation von MSCs**

Immunhistochemische Färbungen gegen Osteocalcin (rot) demonstrierten, daß die injizierten EGFP-positiven MSCs (grün) in den kalzifizierten Arealen (dargestellt ist ein Ausschnitt des Herzens aus Abbildung 26) komplett von Knochenstrukturen umgeben waren. Die Kalkablagerungen wurden demnach durch Verknöcherungen des Gewebes induziert. Balken = 50 µm

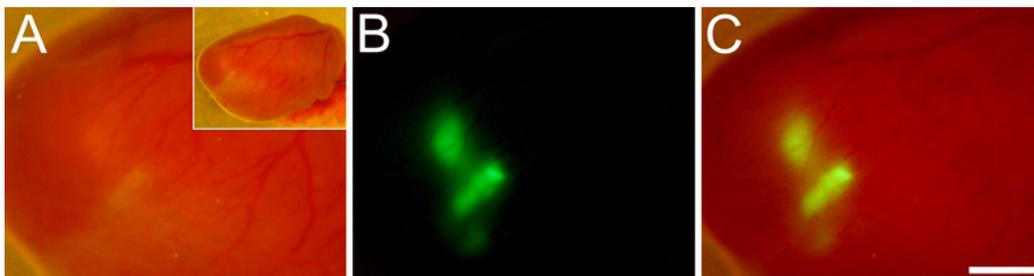
Da der Kryoinfarkt eine nicht physiologische Gewebeschädigung darstellt, könnten die dabei freigesetzten Stoffe in der nekrotischen Umgebung die Generierung von Knochen durch die MSCs auslösen. Um diese künstlichen Bedingungen als Ursache der Verknöcherungen ausschließen, wurden die Transplantationsexperimente zusätzlich mit einem anderen Herzinfarkt-Modell durchgeführt, der Ligatur der linken Koronararterie (LAD). Auch in diesem Infarktmodell (n=5) konnten jedoch Kalzifizierungen (Abb. 38A) und Verknöcherungen (Abb. 38B) des Gewebes in den Gefrierschnitten der Herzen nachgewiesen werden.



**Abbildung 38: Verknöcherung des Herzgewebes nach Transplantation von MSCs, LAD**

Auch in den durch LAD-Ligatur infarzierten Herzen konnten nach Transplantation von MSCs (100.000 Zellen, Passage 5) Kalzifizierungen mittels von Kossa-Färbung der Gefrierschnitte nachgewiesen werden (A, 28 Tage nach Operation). Immunhistochemische Färbungen gegen Osteocalcin (B, rot) demonstrierten Verknöcherungen als Ursache der Kalkablagerungen. Gezeigt ist der in (A) markierte Bildausschnitt, zur Orientierung wurde zusätzlich eine Kernfärbung mit Hoechst dargestellt (blau). Balken: A = 600 µm, B = 100 µm

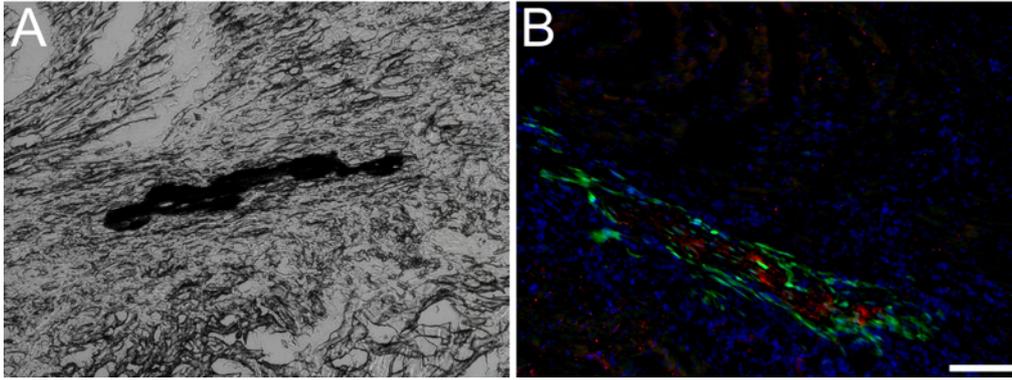
Als nächstes wurde untersucht, ob für die Knochenbildung durch die MSCs im Herzen eine Gewebeschädigung vorliegen muß, oder ob die Zellen auch in intaktem Herzgewebe zu Verknöcherungen führen. Dazu wurden 120.000 Beta-Aktin-EGFP-positive MSCs in den nicht infarzierten linken Ventrikel gesunder Mäuse injiziert und die Herzen untersucht (n=6, Median=27 Tage). Es zeigte sich eine stabile Integration der Zellen, allerdings ausschließlich in der Nähe der Injektionsstellen und ohne sichtbares Auswachsen in das gesunde Gewebe (Abb. 39A-C).



**Abbildung 39: Transplantation von MSCs in nicht infarzierte Herzen**

Nach Transplantation der MSCs in nicht infarzierte Herzen konnten angewachsene EGFP-positive Zellen unter der Fluoreszenzlupe nachgewiesen werden. Das A beschränkte sich jedoch eng auf die Injektionskanäle (21 Tage nach Injektion von 2x 60.000 Zellen) und zeigte keine Ausbreitung in das umliegende Gewebe. Balken: A-C = 500 µm, Einsatz A = 5 mm

An Kryoschnitten der Herzen wurden von Kossa- und Osteocalcin-Färbungen durchgeführt, um Kalzifizierungen und Verknöcherungen zu belegen (Abb. 40A-B). Auch in dem nicht infarzierten Herzgewebe konnten solche Veränderungen gefunden werden, die aber im Vergleich mit den infarzierten Herzen deutlich kleiner waren. Zudem deutete die Verteilung der Zellen und der daraus resultierenden Verknöcherungen auf eine enge Begrenzung auf den Injektionskanal hin. Die zerstörte Gewebestruktur und die hohe Anzahl an Zellkernen in den betroffenen Arealen bekräftigten die Annahme, daß durch das Einführen der Injektionsnadel eine Verletzung des Gewebes induziert und das Eindringen inflammatorischer Zellen ausgelöst wurden. Da sich die Kalzifizierungen und Verknöcherungen nicht in das umliegende intakte Herzgewebe ausbreiteten, schien sich dieser Prozeß wie bei den infarzierten Herzen auf die geschädigten Bereiche zu beschränken.



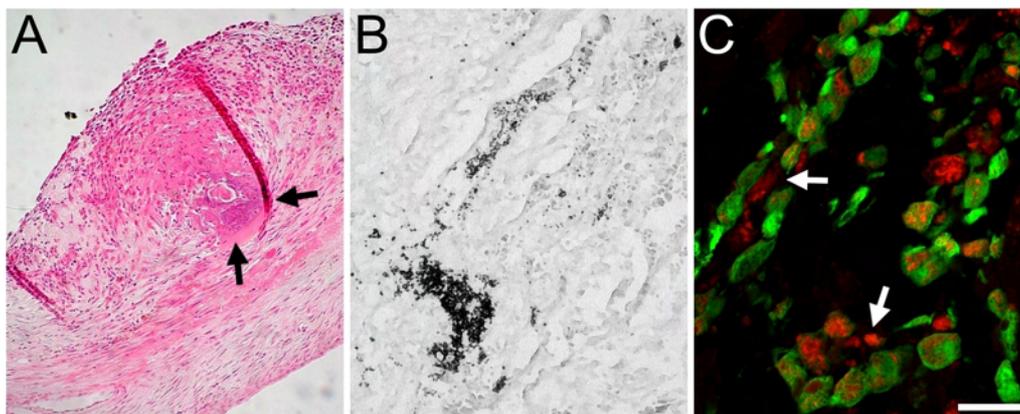
**Abbildung 40: Verknöcherungen beschränken sich auf den Bereich des Injektionskanals**  
 Nach Transplantation der MSCs in nicht infarzierte Herzen konnten Kalzifizierungen mittels von Kossa-Färbung nachgewiesen werden (A, schwarz). Immunhistochemische Färbungen gegen Osteocalcin (B, stark rot; Autofluoreszenz des nativen Gewebes schwach rot) im Folgeschnitt demonstrierten, daß die Kalkablagerungen mit einer Knochenbildung durch die EGFP-positiven MSCs (grün) einhergingen. Zu beachten sind die zerstörte Gewebestruktur im Bereich der Kalzifizierung (A) sowie die große Anzahl an Zellen im Bereich der angewachsenen MSCs (B, Hoechst-Kernfärbung blau). Beides deutete auf eine Verletzung durch das Eindringen der Nadel im Bereich des Injektionskanals hin. Das Anwachsen der Zellen und die Verknöcherung schienen sich demnach auf geschädigte Gebiete zu beschränken. Balken: A-B = 100 µm

### 3.2.9 Verknöcherung nach Transplantation von Knochenmarkzellen

Die Transplantation von MSCs in das infarzierte Herz hatte eindeutig gezeigt, daß diese Zellen nicht dem umgebenden Gewebe entsprechend zu Herzzellen, sondern zu Knochenzellen differenzierten. Da die resultierende Verknöcherung des Herzgewebes zu schwerwiegenden Problemen bei Patienten führen kann, wie Arrhythmien oder Perforation der Ventrikelwand, waren diese Befunde vor allem in Bezug auf klinische Studien besonders kritisch zu bewerten. Während klinische Studien für Zellersatztherapien mit MSCs erst am Anfang stehen (Chen et al., 2004), wird die Behandlung von Herzinfarktpatienten mit Gesamtknochenmark bereits häufig durchgeführt (Murry et al., 2005; Laflamme und Murry, 2005). Diese Knochenmarkzellen beinhalten, insofern sie nicht für bestimmte Zellpopulationen selektiert wurden, auch einen kleinen Anteil an MSCs (etwa 1 in 500.000 Zellen, vgl. auch Kapitel 3.2.1).

Daher wurde nun untersucht, ob nach Transplantation mit Gesamtknochenmarkzellen ebenfalls Verknöcherungen in den Herzen auftreten. Dazu wurden  $1-5 \times 10^6$  unselektierte Beta-Aktin-EGFP transgene Knochenmarkzellen in infarzierte Herzen syngener Mäuse injiziert, und die Herzen nach unterschiedlichen Zeiträumen zur

weiteren Untersuchung entnommen ( $n=46$ , Median=18 Tage). Die Analyse anhand von Gefrier- und Paraffinschnitten zeigte in 13% der transplantierten Herzen ( $n=6$ ) Tumor-ähnliche Strukturen. Der bläuliche Farbton dieser Strukturen nach HE-Färbung deutete auf knorpelige Veränderungen der Herzwand hin (Abb. 41A). In drei der Herzen konnte bereits eine Kalzifizierung dieser Areale mittels von Kossa-Färbung nachgewiesen werden (Abb. 41B). Immunfärbungen gegen Osteocalcin zeigten zudem, daß es sich dabei um Verknöcherungen handelte. In einem früh entnommenen Herzen, das bereits 13 Tage nach der Injektion der Knochenmarkzellen analysiert wurde, konnte Osteocalcin im Zytoplasma der EGFP-positiven Zellen lokalisiert werden (Abb. 41C). Das zeigte zweifelsfrei, daß die transplantierten Zellen das Knochenprotein produzierten und für die Knochenbildung verantwortlich waren.

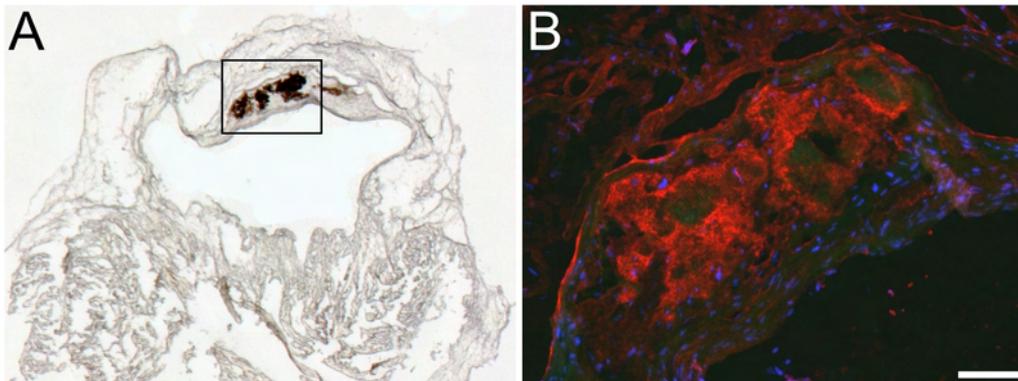


**Abbildung 41: Knochenbildung nach Transplantation von Gesamtknochenmarkzellen**

HE-Färbungen der Herzschnitte nach Transplantation von Gesamtknochenmarkzellen zeigten Tumor-ähnliche Gebilde im Bereich des Infarktes (A, 18 Tage nach Injektion von  $3 \times 10^6$  Zellen). Die bläuliche Färbung und die strukturelle Formation dieser Areale deuteten auf ein frühes Stadium einer Verknorpelung hin (Pfeile). Durch von Kossa-Färbungen konnten teilweise Kalzifizierungen der auffälligen Areale demonstriert werden (B, 13 Tage nach Injektion von  $5 \times 10^6$  Zellen). Der immunhistochemische Nachweis von Osteocalcin (C, rot; benachbarter Schnitt des in (B) verwendeten) in den kalzifizierten Bereichen belegte eine beginnende Knochenbildung der EGFP-positiven Zellen (grün). Die Expression des Knochenproteins innerhalb der Zellen bewies eindeutig, daß diese für die Knochenproduktion verantwortlich waren. Zudem konnten zwischen den Zellen bereits Einlagerungen des Osteocalcins in die umgebende Matrix festgestellt werden (Pfeile). Balken: A = 160  $\mu\text{m}$ , B = 40  $\mu\text{m}$ , C = 25  $\mu\text{m}$

In einem Herzen wurde nach sehr langer Transplantationszeit (369 Tage) ein Areal mit massiven, fast transmuralen Kalkablagerungen gefunden (Abb. 42A). Eine Osteocalcin-Färbung bestätigte auch hier die Verknöcherung des Herzens, die transplantierten Knochenmarkzellen konnten zu diesem späten Zeitpunkt allerdings

nicht mehr nachgewiesen werden. Eine leichte grüne Fluoreszenz deutete jedoch auf Reste EGFP-positiver Zellen hin (Abb. 42B).

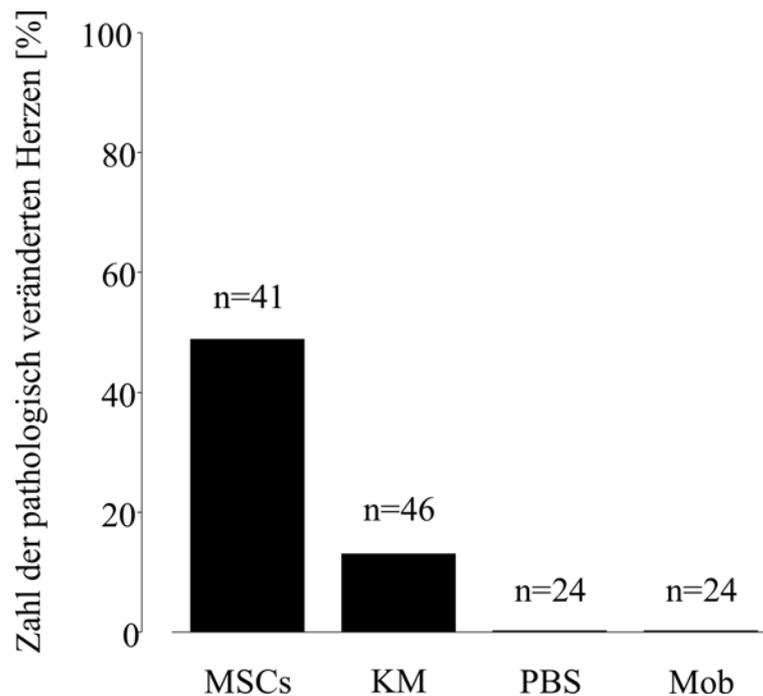


**Abbildung 42: Verknöcherung nach Transplantation von Knochenmark**

In einem Herzen konnten nach sehr langer Transplantationszeit mittels von Kossa-Färbung massive Kalzifizierungen im Infarktbereich nachgewiesen werden (A, 369 Tage nach Injektion von  $3 \times 10^6$  Gesamtknochenmarkzellen). Eine Osteocalcin-Färbung im Folgeschnitt belegte die Verknöcherung des Areals (B, rot). EGFP-positive Zellen konnten nicht mehr nachgewiesen werden, es zeigte sich nur eine schwache Hintergrundfluoreszenz, die auf eingegangene Zellen hinweisen könnte (grün, Hoechst-Kernfärbung blau). Balken: A = 600  $\mu\text{m}$ , B = 120  $\mu\text{m}$

Die Transplantationsexperimente mit Knochenmarkzellen haben gezeigt, daß die Injektion dieser Zellen in infarzierte Herzen Verkalkungen und Verknöcherungen des geschädigten Gewebes zur Folge haben können, und daher für klinische Anwendungen ein hohes Risiko darstellen. Die vorangegangenen Versuche mit MSCs wiesen darauf hin, daß diese im Knochenmark enthaltene Stammzellpopulation für die Knochenbildung verantwortlich war. Um das experimentell zu belegen, wurde nun eine andere Methode gewählt, um explizit nur Zellen des hämatopoetischen Systems in die Herzen einzubringen. Dazu wurden die Empfängermäuse tödlich bestrahlt und mit Beta-Aktin-EGFP transgenen Knochenmarkzellen rekonstituiert (vgl. Kapitel 3.1.3). Nach erfolgreicher Rekonstitution wurden den Mäusen Infarkte mittels Kryoläsionen (n=3) oder LAD-Ligaturen (n=21) zugefügt. Die Freisetzung der hämatopoetischen Zellen aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf erfolgte durch Mobilisierung mit GM-CSF und Flt3-Ligand, wobei die mesenchymalen Stammzellen durch die Applikation dieser Zytokine nicht ausgeschwemmt wurden (Kronenwett et al., 2000). Die Herzen wurden 28 Tage nach der Operation entnommen und anhand von Gefrierschnitten analysiert. Wie schon in Kapitel 3.1.3 an dem Querschnitt eines mobilisierten Herzens gezeigt wurde (vgl. Abb. 11 und 12), wanderten große Mengen an EGFP-

positiven Zellen in die Wand des Ventrikels ein und konnten dort anwachsen. Die Lokalisation der Zellen beschränkte sich dabei hauptsächlich auf das Infarktareal. Histologische Untersuchungen der Herzschnitte mittels HE- und von Kossa-Färbungen sowie immunhistochemische Färbungen gegen Osteocalcin zeigten weder tumorartige Veränderungen noch Kalzifizierungen oder Verknöcherungen der Herzen (Abb. 43).



**Abbildung 43: Statistik der pathologisch veränderten Herzen nach Transplantation**

Gezeigt ist eine Übersicht der tumorös veränderten Herzen nach Transplantation von MSCs (20 von 41), Gesamtknochenmark (KM; 6 von 46), PBS (0 von 24) und nach Mobilisierung (Mob; 0 von 24). Für die Statistik gewertet wurden nur Herzen, die frühestens 13 Tage nach der Operation entnommen und untersucht wurden, und in denen eine Integration EGFP-positiver Zellen gefunden wurde (ausgenommen die Kontrollherzen, in die anstelle der Zellen nur PBS injiziert wurde). Da die EGFP-Fluoreszenz besonders in den mit Knochenmark transplantierten Herzen nach 4-5 Wochen deutlich abnahm, wurden nach Tag 35 entnommene Herzen generell in die Statistik mit einbezogen.

Dadurch konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden, daß von den hämatopoetischen Zellen aus dem Knochenmark, im klaren Gegensatz zu den MSCs oder Gesamtknochenmarkzellen, kein Risiko hinsichtlich der Generierung von Knochen bei einer Zellersatztherapie des Herzens ausgeht.

#### 4 Diskussion

In dieser Arbeit sollte das Potential adulter Knochenmarkzellen, speziell hämatopoetischer (HSC) und mesenchymaler (MSC) Stammzellen, zur Regeneration des Herzens nach einem Infarkt untersucht werden. Von besonderem Interesse war dabei das Schicksal der Zellen nach der Transplantation in das geschädigte Gewebe. Es zeigte sich, daß die Knochenmarkzellen nur vorübergehend in dem Infarktareal integrierten und überlebten. Zudem wurde zweifelsfrei nachgewiesen, daß keine Transdifferenzierung der transplantierten Zellen zu Kardiomyozyten oder Endothelzellen stattgefunden hatte. Nach Mobilisierung der Knochenmarkzellen konnten im Randbereich des Infarktes sehr vereinzelt Knochenmark-abgeleitete Kardiomyozyten gefunden werden, diese resultierten jedoch ausschließlich aus Fusionen mit nativen Herzzellen. Die Transplantation mesenchymaler Stammzellen als aufgereinigte Zellpopulation oder als Fraktion im Gesamtknochenmark führte überraschenderweise zu eventuell gesundheitsgefährdenden Verknöcherungen des Herzgewebes.

Diese Befunde stellen die biologische Grundlage und die Sicherheit der zellulären Ersatztherapie beim Herzinfarkt in Frage, zumal keine Funktionsverbesserungen nach direkter Injektion oder Mobilisierung von Knochenmarkzellen festgestellt werden konnten.

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, daß Knochenmarkzellen nach einer direkten Transplantation in infarzierte Mäuser Herzen in dem geschädigten Gewebe integrieren. Durch das in den eingebrachten Zellen exprimierte EGFP konnte die Integration in das Gewebe sowohl makroskopisch am ganzen Herzen als auch mikroskopisch in Gefrierschnitten direkt belegt werden, wodurch Artefakte aufgrund sekundärer Nachweismethoden vermieden werden konnten. Es gibt zwar Hinweise darauf, daß aufgrund transgener EGFP-Expression in Mäusen eine Veränderung der Herzzellen auftreten kann (Huang et al., 2000), in zahlreichen Studien aus unserer und anderen Arbeitsgruppen unter Verwendung dieses Reportersystems wurde aber keine Beeinflussung der hier untersuchten Knochenmarkzellen beschrieben. Durch die Entnahme und Untersuchung der Herzen zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten, 9 und 28 Tage nach der Operation, zeigte sich, daß die Menge der transplantierten Zellen in den Infarktarealen bereits nach vier Wochen deutlich reduziert war. Die

Abnahme der Zahl angewachsener Zellen nach längerer Transplantationszeit wurde auch in einer anderen Studie an Schafen berichtet, in der Knochenmarkzellen in den Infarkt injiziert und zwei Monate später die Herzen analysiert wurden (Bel et al., 2003). Es ist bekannt, daß nur etwa 10% der in das Gewebe injizierten Zellen lokal anwachsen, während der Großteil in den Kreislauf gelangt oder wieder aus dem Injektionskanal austritt (Muller-Ehmsen et al., 2002). Diese Prozesse laufen jedoch unmittelbar nach der Applikation der Zellen ab und konnten für den Rückgang nach mehr als einer Woche nicht verantwortlich gemacht werden. Ein weiterer Verlust der angewachsenen Zellen kann durch die Ausschüttung schädlicher Stoffwechselprodukte nekrotischer Zellen und die mangelnde Nährstoffversorgung im Infarktareal hervorgerufen werden, die zum Absterben der eingebrachten Zellen führt. Die Injektion von neonatalen Kardiomyozyten in infarzierte Rattenherzen hat gezeigt, daß etwa 90% der transplantierten Herzzellen, hauptsächlich verursacht durch die ischämischen Bedingungen im Infarkt, in Apoptose gehen und sterben (Zhang et al., 2001). Allerdings sind auch diese Vorgänge nach 4-7 Tagen abgeschlossen und konnten aufgrund der massiven Integration der Knochenmarkzellen nach 9 Tagen als Ursache für das spätere Verschwinden ausgeschlossen werden.

Während Orlic et al. bereits nach 9 Tagen eine Transdifferenzierung der eingebrachten Zellen zu Kardiomyozyten nachgewiesen hatten (Orlic et al., 2001a), konnte aufgrund der hier gezeigten Versuche eine solche Entwicklung der Knochenmarkzellen ausgeschlossen werden, da diese weiterhin Blutzellmarker, nicht aber kardiale Proteine exprimierten. Zudem waren die Zellen sehr klein und zeigten eine hohe Kern-Plasma-Ratio, die typische Form von Blutzellen. Um auszuschließen, daß die unterschiedlichen Resultate auf der Wahl der eingebrachten Zellen beruhten, wurden weitere Experimente mit aufgereinigten Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup> Zellen aus dem Knochenmark durchgeführt, doch auch nach Transplantation dieser Blutvorläuferzellen konnten keine Anzeichen für eine Transdifferenzierung oder für eine Langzeit-Integration im Herzen gefunden werden.

Nach einem Herzinfarkt werden in dem betroffenen Gebiet eine Reihe zellulärer und molekularer Mechanismen in Gang gesetzt, um eine bestmögliche Funktionalität des Organs zu erhalten. Ein entscheidender Faktor ist dabei die Stabilisierung des Infarktareals, die hauptsächlich durch den Umbau der extrazellulären Matrix gewährleistet wird (Jugdutt et al., 1996; Lutgens et al., 1999). Die Aktivierung dieses

Prozesses geschieht durch die Freisetzung verschiedener Botenstoffe und inflammatorische Reaktionen, an denen vor allem die myeloiden Blutzellen maßgeblich beteiligt sind (Ren et al., 2003; Nian et al., 2004). Nach ein bis zwei Wochen ist die primäre Geweberegeneration im Maus- und Rattenmodell weitestgehend abgeschlossen und die Beteiligung der inflammatorischen Zellen nimmt ab. Daher ist es denkbar, daß die nur vorübergehend im Infarktgebiet angewachsenen EGFP-positiven Knochenmarkzellen inflammatorischer Natur waren und an den natürlichen Entzündungs- und Heilungsprozessen des geschädigten Herzens mitwirkten. Das würde den hämatopoetischen Charakter der Zellen und auch deren Rückgang mit der Dauer der Implantation erklären.

Um die Zellen längerfristig in das Infarktreal einzubringen und die Anzahl der HSCs zu vergrößern, wurde ein weiterer Ansatz verwendet, und zwar die Mobilisierung hämatopoetischer Zellen und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark mittels der Zytokine GM-CSF und Flt3-Ligand. Diese Methode wird heute hauptsächlich bei der Stammzelltransplantation zur Therapie maligner Erkrankungen wie Leukämien oder Lymphomen in der Klinik eingesetzt (Kronenwett et al., 2000). Es ist bekannt, daß durch GM-CSF neben reifen Monozyten und Granulozyten auch myeloide Vorläufer und hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark ausgeschwemmt werden (Lund-Johansen et al., 1999; Abkowitz et al., 2003), die eine Langzeit-Rekonstitution des Blutsystems gewährleisten können. Bei der Autopsie weiblicher Patienten, denen Knochenmarkzellen von männlichen Spendern transplantiert wurden, konnten in den Herzen Kardiomyozyten mit Y-Chromosomen nachgewiesen werden (Deb et al., 2003). Das wurde so gedeutet, daß Zellen aus dem Knochenmark an der Bildung von Herzmuskelzellen beteiligt waren. Weitere Hinweise für diese Theorie lieferten Studien an männlichen Patienten, denen weibliche Spenderherzen eingepflanzt wurden (Quaini et al., 2002; Laflamme et al., 2002; Muller et al., 2002; Bayes-Genis et al., 2002). Auch in diesen Organen wurden Herzzellen mit Y-Chromosom gefunden, die folglich aus peripheren nativen Zellen der Empfänger entstanden sein mußten, vermutlich aus dem Blut oder dem Knochenmark. Die Nachweismethode zur Darstellung der Y-Chromosome ist allerdings relativ anfällig für Fehler. Da sich im Herzen immer auch zirkulierende und transmigrierende Blutzellen befinden, kann das Signal auch von einer solchen Zelle stammen und als Herzzelle fehlinterpretiert werden. Dennoch gaben diese

Ergebnisse Grund zu der Annahme, daß eine Mobilisierung der Knochenmarkzellen nach einem Herzinfarkt zu ähnlichen Resultaten führen könnte und eine Neubildung der verlorengegangenen Herzzellen ermöglicht. Entsprechende Untersuchungen an Mäusen, die nach Induktion eines Infarktes Zytokine zur Mobilisierung der Knochenmarkzellen appliziert bekamen, ergaben eine signifikante Verbesserung der Geweberegeneration und linksventrikulären Funktion (Orlic et al., 2001b). Auch in Ratten (Askari et al., 2003; Sugano et al., 2005) und Schweinen (Iwanaga et al., 2004) konnte eine Funktionsverbesserung der infarzierten Herzen nach Gabe von G-CSF nachgewiesen werden. Die Mechanismen und Ursachen dieser positiven Befunde waren allerdings unklar, zudem konnten diese Resultate in anderen Studien nicht reproduziert werden (Norol et al., 2003; Deten et al., 2005).

Die hier durchgeführten Experimente an infarzierten Mäusen haben gezeigt, daß nach Applikation von GM-CSF und Flt3-Ligand Knochenmarkzellen in das periphere Blut ausgeschwemmt wurden und gezielt in den Herzinfarkt einwanderten. Die hauptsächliche Lokalisation der EGFP-positiven Zellen im geschädigten Areal und Übergangsbereich wurde wahrscheinlich durch die Freisetzung von spezifischen Botenstoffen induziert, die auch für die Aktivierung der inflammatorischen Zellen verantwortlich sind. Die Expression solcher Zytokine wie SDF-1 wird nach einer Gewebeläsion kurzfristig hochreguliert und sorgt für ein zielgerichtetes Einwandern der Zellen in die erforderlichen Areale (Askari et al., 2003; Penn et al., 2004). Die Zahl der im Infarktareal angewachsenen Zellen war nach der Mobilisierung wesentlich höher als in den direkt injizierten Herzen, vor allem nach 4 Wochen konnten noch erheblich mehr Zellen nachgewiesen werden. Die Morphologie entsprach jedoch auch in diesem Modell eher der von hämatopoetischen als der von kardialen Zellen, was wiederum durch immunhistochemische Färbungen gegen CD45 und Alpha-Aktinin bestätigt wurde. Die unterschiedliche Gestalt der kleinen runden EGFP-positiven Zellen und der großen langgestreckten Kardiomyozyten wurde nach Dissoziation der Herzen auch auf Einzelzellebene zweifelsfrei belegt, eine Transdifferenzierung hatte also nicht stattgefunden.

Diese Ergebnisse wurden noch durch ein weiteres Mausmodell untermauert, in dem die mobilisierten Mäuse zuvor mit Knochenmarkzellen rekonstituiert wurden, in denen EGFP unter der Kontrolle eines Alpha-Aktin Promotors exprimiert wurde

(Fleischmann et al., 1998). Alpha-Aktin wird spezifisch in Muskelzellen produziert, allerdings zeigte sich auch in den Knochenmarkzellen eine geringe Hintergrundfluoreszenz. Diese war wahrscheinlich dadurch bedingt, daß ein minimales Promotor-Element verwendet wurde, welches nicht alle regulatorischen Elemente des Gens beinhaltet, und daher auch in anderen Zellen eine geringe Basisaktivität besaß. Durch die schwache EGFP-Fluoreszenz war es möglich, die Alpha-Aktin-EGFP transgenen Knochenmarkzellen von den Wildtyp-Zellen durchflußzytometrisch zu unterscheiden und damit eine stabile Rekonstitution der Mäuse nach der Knochenmarktransplantation zu belegen. Zudem konnte in den Herzen der infarzierten und mobilisierten Mäuse unter einem Fluoreszenzmikroskop mit sehr langen Belichtungszeiten die Integration der Knochenmarkzellen im Infarktareal demonstriert werden. Im Vergleich dazu exprimierten embryonale und adulte Herzzellen der Alpha-Aktin-EGFP transgenen Mäuse deutlich mehr EGFP und erschienen unter dem Fluoreszenzmikroskop um ein Vielfaches heller (Kolossoff et al., 1998). Im Falle einer Differenzierung der mobilisierten Knochenmarkzellen zu Kardiomyozyten hätte das Reporter-gen demnach aktiviert und das EGFP-Signal sichtbar zunehmen müssen. Trotz der massiven Zahl an Zellen konnten jedoch in keinem der Herzen stark EGFP-positive Herzzellen im Infarktareal gefunden werden. Die von anderen Forschergruppen berichteten Verbesserungen der linksventrikulären Funktion nach Mobilisierung wurden demzufolge nicht durch neu gebildete kontraktile Herzzellen begründet, sondern mußten andere Ursachen haben. Durch die Gabe der Zytokine wurden hauptsächlich myeloide Zellen in das Blut ausgeschwemmt, die auch für den Umbau und die Stabilisierung des Infarktareals von entscheidender Bedeutung sind. Die vorliegenden Experimente haben eindeutig gezeigt, daß eine massive Integration solcher hämatopoetischen Zellen im Infarktareal induziert wurde, wodurch die Reparaturprozesse des Gewebes beschleunigt und verbessert worden sein könnten. In verschiedenen Studien wurden solche Mechanismen beschrieben, dabei war die Infarktgröße in den mobilisierten Tieren gegenüber den Kontrollgruppen durch den erhöhten Abbau des nekrotischen Gewebes und den Erhalt apoptotischer Zellen und kleiner Gefäße signifikant reduziert worden (Minatoguchi et al., 2004; Iwanaga et al., 2004; Ohtsuka et al., 2004). Allerdings zeigten die hämodynamischen Messungen in der vorliegenden Arbeit keinerlei Verbesserung der linksventrikulären Herzfunktion. Das entspricht auch den vor kurzem veröffentlichten Ergebnissen zweier klinischer Blindstudien, in

denen weder nach direkter Applikation der Knochenmarkzellen über die Koronararterien (Janssens et al., 2006) noch nach Mobilisierung (Zohlhofer et al., 2006) ein positiver Effekt auf die Linksherzfunktion gefunden werden konnte.

Die verwendeten Modelle und Nachweismethoden haben eindeutig bewiesen, daß weder nach direkter Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen oder Gesamtknochenmark ins Herz, noch nach massiver und längerfristiger Integration durch Mobilisierung, Anzeichen für eine gewebespezifische Transdifferenzierung der hämatopoetischen Zellen im Infarkt gefunden werden konnten. Im Randgebiet des Infarktes dagegen wurden in allen Herzen der mobilisierten Mäuse vereinzelte EGFP-positive Zellen lokalisiert, die morphologisch ventrikulären Herzzellen entsprachen. Diese großen langgestreckten Zellen exprimierten darüberhinaus verschiedene Herz-spezifische Proteine, während der Blutzellmarker CD45 nicht auf ihnen nachzuweisen war, ein deutlicher Beleg ihres kardialen Charakters. Besonders der Nachweis des Glanzstreifen-Proteins Connexin 43 auf diesen Knochenmark-abgeleiteten Zellen zeigte ihren kardialen Charakter. Für die schnelle Weiterleitung der elektrischen Signale und die daraus resultierende synchrone Depolarisierung und mechanische Kontraktion des Herzens ist die Ausbildung dieser Zell-Zell-Kontakte unabdingbar. Das Fehlen und die veränderte Verteilung der Glanzstreifen nach einem Herzinfarkt ist eine Ursache der gehäuft auftretenden Herzrhythmusstörungen bei den Patienten (Peters et al., 1997; Matsushita et al., 1999). Auch in der Zellersatztherapie ist es wichtig, daß die ins Herz eingebrachten Zellen in der Lage sind, mit dem umliegenden Gewebe elektrisch zu koppeln, um aktiv an der Kontraktion teilzunehmen und Arrhythmien zu vermeiden. Durch die Formung des Narbengewebes ist die elektrische Kopplung zwischen den transplantierten und den nativen Zellen allerdings oft unterbrochen und eine Ausbildung von Glanzstreifen nicht möglich (Reinecke et al., 1999). Vor allem bei der Transplantation von Skelettmyoblasten (Menasche et al., 2001; Rajnoch et al., 2001) wurden vermehrt Arrhythmien festgestellt (Menasche et al., 2003), wahrscheinlich bedingt durch die grundlegend verschiedene physiologische Funktionsweise dieser Zellen. Das Aktionspotential der Skelettmuskelzellen ist sehr viel kürzer als das der Herzmuskelzellen, zudem wird die Kontraktion im Skelettmuskel direkt durch Nervenfasern gesteuert und es findet keine Kopplung zwischen den einzelnen Muskelzellen statt. Die Expression von Connexin 43 auf den EGFP-positiven

Knochenmark-abgeleiteten Zellen in der Randzone des Infarktes zeigte daher, daß es sich dabei um funktionelle Kardiomyozyten handelte, die in der Lage waren, mit den umliegenden nativen Herzzellen elektrisch zu koppeln.

Die ursprüngliche Annahme und Grundlage für die klinischen Studien ist die Transdifferenzierung der in den Infarkt eingebrachten Zellen zu Kardiomyozyten. Die fehlende Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse und die teilweise unzureichenden Nachweismethoden führten jedoch zu kontroversen Diskussionen über die vermeintliche Plastizität der Stammzellen. Um die Transdifferenzierung eines Zelltyps zu einem anderen sicher zu belegen, müßte (1) die Ausgangspopulation klar definiert und im besten Fall klonaler Natur sein, (2) eine Veränderung der Zelleigenschaften aufgrund einer vorangegangenen Kultivierung ausgeschlossen werden, (3) die Umformung in einer signifikanten Zahl der Zellen stattfinden und (4) der Phänotyp der konvertierten Zelle auch auf funktioneller Ebene demonstriert werden (Anderson et al., 2001). In einer aufwendigen Studie zeigten Wagers et al., daß einzelne EGFP-positive HSCs zwar in der Lage waren, das komplette Blutsystem in bestrahlten Mäusen wiederherzustellen, aber selbst nach neun Monaten nicht an der Bildung anderer Zelltypen beteiligt waren (Wagers et al., 2002). In einem parabiotischen Modell mit einer EGFP-positiven und einer EGFP-negativen Maus wurde dieser Befund noch bekräftigt.

Jüngere Studien haben gezeigt, daß vielen der durch Differenzierung erklärten Phänomene auch ein anderer Mechanismus zugrunde liegen könnte, die Fusion der transplantierten Zellen mit den nativen Zellen (Wagers und Weissman, 2004). Zellfusionen sind an verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen in Säugetieren beteiligt (Chen und Olson, 2005). Untersuchungen solcher Vorgänge bei Stammzellen haben demonstriert, daß es bei der Kokultivierung von ES-Zellen mit neuronalen Zellen (Ying et al., 2002) oder Knochenmarkzellen (Terada et al., 2002) ebenfalls zu solchen Verschmelzungen kommen kann. Das Potential von Knochenmarkzellen, mit somatischen Zellen zu fusionieren, wurde auch in anderen Geweben beobachtet. An leberkranken Mäusen wurde nachgewiesen, daß transplantierte Knochenmarkzellen keine neuen Leberzellen durch Transdifferenzierung bildeten, sondern mit bestehenden Hepatozyten fusionierten (Vassilopoulos et al., 2003; Wang et al., 2003). Ähnliche Ergebnisse lieferte die Transplantation von HSCs in Toxin-geschädigte Skelettmuskeln (Camargo et al.,

2003). Dabei wurde gezeigt, daß die von den Knochenmark-Stammzellen abgeleiteten Muskelzellen durch Fusion inflammatorischer myeloider Zellen mit regenerierenden Fasern entstanden waren. Diese Resultate wiesen darauf hin, daß dieser Vorgang einen natürlichen Prozeß im Rahmen einer physiologischen oder pathologischen Gewebeerneuerung nach Schädigung darstellte. Eine weitere Studie mit rekonstituierten Mäusen hatte gezeigt, daß Knochenmarkzellen zudem auch mit Purkinje-Neuronen und Herzzellen fusionieren können (Alvarez-Dolado et al., 2003). In dieser Studie wurden zwar keine direkten Verletzungen der Organe induziert, vor der Rekonstitution der Empfängertiere wurden diese jedoch tödlich bestrahlt, was eine Schädigung der nativen Zellen und dadurch eine Anteilnahme der Knochenmarkzellen an der Regeneration der Gewebe veranlaßt haben könnte. Unsere Arbeitsgruppe hat diesbezüglich Daten, die belegen, daß eine Verletzung vorliegen muß, um Fusionen von Knochenmarkzellen mit verschiedenen Gewebetypen (Herzzellen, Skelettmuskelzellen, Leberzellen, Purkinje-Neuronen) zu induzieren. In einem Rekonstitutionsmodell, in dem die Empfängertiere nicht bestrahlt werden müssen, bleiben solche Fusionsereignisse aus (Nygren et al., Manuskript in Vorbereitung).

In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Kombination zweier transgener Mausstämmen zweifelsfrei gezeigt, daß die Knochenmark-abgeleiteten Kardiomyozyten im Randbereich der Läsion durch Fusion einer nativen und einer transplantierten Zelle entstanden waren, und nicht durch Transdifferenzierung, wie in früheren Studien angenommen (Jackson et al., 2001; Agbulut et al., 2003). Das verwendete Modellsystem basierte darauf, in den transplantierten Knochenmarkzellen und dem nativen Herzen unterschiedliche Reportergene zu exprimieren, so daß der Ursprung der EGFP-positiven Herzzellen genau untersucht werden konnte. Der Nachweis von LacZ durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie belegte eindeutig, daß in allen EGFP-positiven Herzzellen sowohl das Transgen der Knochenmarkzellen als auch das der nativen Herzzellen exprimiert wurde, und demnach eine Fusion beider Zellen stattgefunden haben mußte. Unterstützt wurde dieses Ergebnis dadurch, daß die fusionierten Zellen ausnahmslos zwei Kerne besaßen. Die geringe Häufigkeit dieser Fusionsereignisse von 0,75% aller EGFP-positiven Zellen und 0,0065% aller Kardiomyozyten war vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen, in denen Fusion nachgewiesen wurde (Alvarez-Dolado et al., 2003; Murry et al., 2004). Auch die chimären Herzzellen

nach der Transplantation von andersgeschlechtlichen Spenderorganen (Laflamme et al., 2002; Muller et al., 2002; Deb et al., 2003; Hocht-Zeisberg et al., 2004) und die Knochenmark-abgeleiteten Herzzellen in weiteren Transplantationsstudien (Jackson et al., 2001; Agbulut et al., 2003) wurden in ähnlich niedriger Zahl gefunden, ein Hinweis darauf, daß auch dort Fusionen und keine Transdifferenzierung für diese Befunde verantwortlich waren.

Die Lokalisation der fusionierten Zellen in dem Randbereich der Läsion ist dadurch zu erklären, daß im Infarktareal nur sehr wenige oder keine Kardiomyozyten als mögliche Fusionspartner vorhanden sind, da diese in der nekrotischen Zone schnell absterben. Es ist vorstellbar, daß geschädigte Herzzellen in der Umgebung des Infarktes durch die Fusion vor der endgültigen Zerstörung bewahrt werden. Die andauernde Expression der grünen Fluoreszenz zeigt, daß der Kern der Knochenmarkzellen nach der Fusion weiterhin aktiv bleibt, wodurch auch eine gentherapeutische Anwendung vorstellbar ist, bei der ein bestehender Gendefekt durch die Fusion mit einer gesunden Knochenmarkzelle behoben werden könnte (Melo et al., 2004). Eine neuere Studie an einem Kardiomyopathie-/Muskeldystrophie-Modell in Mäusen, denen das Muskelprotein Delta-Sarkoglykan fehlt, hatte allerdings ergeben, daß nach Transplantation von Knochenmarkstammzellen zwar davon abgeleitete fusionierte Zellen im Herzen und im Skelettmuskel gefunden werden konnten, diese aber keine oder nur sehr geringe Expression des Muskelproteins aufwiesen (Lapidos et al., 2004; Wernig et al., 2005). Da Sarkoglykan in den Knochenmarkzellen nicht exprimiert wird, könnte dies darauf hindeuten, daß deren Kern zwar aktiv bleibt, durch die Muskelzellen jedoch nicht so umprogrammiert wird, daß er muskelspezifische Gene aktiviert.

Zusammenfassend konnte in den beschriebenen Experimenten klar demonstriert werden, daß trotz der hohen Zahl an angewachsenen Zellen nach direkter Transplantation oder Mobilisierung von Knochenmarkzellen im Herzinfarkt deren Integration nur vorübergehend und hämatopoetischer Natur war, und keine Knochenmark-abgeleiteten Kardiomyozyten in dem geschädigten Areal gefunden werden konnten. Im Randbereich des Infarktes konnten zwar vereinzelt Herzzellen gefunden werden, die allerdings nicht wie zuvor angenommen durch Transdifferenzierung der eingebrachten Zellen, sondern durch Fusion der Knochenmarkzellen entstanden waren. Aufgrund der nur sehr geringen Anzahl der

Fusionsereignisse und der beschränkten räumlichen Verteilung ausschließlich in der Randzone des Infarktareals scheint es zudem fraglich, ob daraus eine Verbesserung der Herzfunktion, insbesondere der Pumpfunktion, resultieren kann. Eine solche Verbesserung der ventrikulären Funktionsparameter nach Applikation von Knochenmarkzellen wurde sowohl im Tiermodell (Kocher et al., 2001; Orlic et al., 2001a; Orlic et al., 2001b) als auch in klinischen Studien an Patienten (Strauer et al., 2002; Assmus et al., 2002a; Assmus et al., 2002b; Stamm et al., 2003; Wollert et al., 2004) berichtet. Die Basis für die klinischen Studien bildete dabei die Hypothese, daß die eingebrachten Knochenmarkzellen im Herzen gewebespezifisch zu Kardiomyozyten differenzieren (Orlic et al., 2001a; Orlic et al., 2001b). Dieser Befund stützte sich jedoch ausschließlich auf indirekte Nachweismethoden mittels Immunfluoreszenz. Das birgt gerade in Geweben mit sehr hoher Autofluoreszenz, wie dem Skelett- oder Herzmuskel, die Gefahr einer Fehlinterpretation von Fluoreszenzsignalen (Jackson et al., 2004). Zudem kann es im nekrotischen Infarktareal zu einer hohen Hintergrundfluoreszenz durch unspezifische Bindung der Antikörper kommen.

In der vorliegenden Studie wurden die Zellen und ihre Differenzierung zu Kardiomyozyten daher mittels geeigneter genetischer Modelle direkt nachgewiesen. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten (publiziert in Nygren et al., 2004), sowie zwei zeitgleich dazu veröffentlichten Studien, widerlegten die Hypothese der Transdifferenzierung eindeutig (vgl. Kommentar von Chien, 2004). In der ersten Studie konnte weder nach direkter Injektion EGFP-positiver Blutvorläuferzellen in das infarzierte Mausherz, noch in einem parabiotischen Modell eine Beteiligung der hämatopoetischen Zellen an der Bildung neuer Kardiomyozyten gefunden werden (Balsam et al., 2004). In der zweiten Studie wurde in zwei unterschiedlichen transgenen Mausmodellen gezeigt, daß hämatopoetische Vorläuferzellen nur in einer sehr geringen Zahl (2-4 Zellen pro Herz) Kardiomyozyten generierten (Murry et al., 2004). Diese wenigen Blutzell-abgeleiteten Herzzellen können mit den in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Fusionsereignissen erklärt werden.

Auch wenn die ursprüngliche Annahme der Transdifferenzierung von Knochenmarkzellen widerlegt wurde, ist es dennoch möglich, daß die Transplantation der Zellen eine Verbesserung der Herzfunktion durch indirekte Mechanismen bewirken kann. Die bessere Erhaltung der den Infarkt umgebenden

Zellen und der veränderte Umbau des geschädigten Gewebes und der extrazellulären Matrix durch inflammatorisch wirksame Zellen könnten zu einer verminderten Infarktgröße beitragen, wie es von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben wurde (Kocher et al., 2001; Orlic et al., 2001b; Strauer et al., 2002). Die Bewertung der Infarktgrößen ist bei Kleintieren allerdings schwierig, da das geschädigte Areal je nach Beschaffenheit des Herzens und dem Ausmaß der Ischämie innerhalb der untersuchten Gruppen und Kontrollgruppen sehr großen Schwankungen unterworfen ist. Vor allem mit dem in Nagern verwendeten Ligaturmodell der linken Koronararterie variiert die Größe des betroffenen Bereichs erheblich und ist daher schlecht vergleichbar. Eine weitere mögliche Ursache einer verbesserten Herzfunktion nach Transplantation oder Mobilisierung von Knochenmarkzellen ist die Freisetzung parakriner Mediatoren, die zu einer verstärkten Aktivierung anderer Zellen wie kardialer (Beltrami et al., 2003; Oh et al., 2003; Laugwitz et al., 2005) oder endothelialer (Takahashi et al., 1999; Shintani et al., 2001) Vorläuferzellen führen. Ein wichtiger Aspekt zukünftiger Forschung wird daher die weitere Untersuchung der einer Funktionsverbesserung zugrundeliegenden Mechanismen darstellen.

Da in dieser Arbeit zweifelsfrei belegt wurde, daß die hämatopoetischen Zellen und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark nach Transplantation in infarziertes Herzgewebe nicht zu Kardiomyozyten differenzierten, und Fusionen mit nativen Herzzellen nur in sehr geringer Zahl zu beobachten waren, wurde zusätzlich auch das Potential einer aus dem Knochenmark aufgereinigten Population mesenchymaler Stammzellen untersucht. Diese Zellen sind während der Embryogenese und im adulten Organismus für die Bildung mesenchymaler Gewebe, vornehmlich Knochen und Knorpel verantwortlich (Caplan, 1991; Bruder et al., 1994; Majumdar et al., 2000). Verschiedene Studien haben gezeigt, daß sie darüberhinaus auch in der Lage sind, zu anderen mesodermalen Zelltypen wie Fett-, Endothel- und Muskelzellen zu differenzieren (Prockop, 1997; Pittenger et al., 1999; Phinney et al., 1999; Oswald et al., 2004). Ferner gibt es auch Hinweise darauf, daß die MSCs zu Zellen anderer Keimblätter wie Astrozyten (Kopen et al., 1999) und Neuronen (Woodbury et al., 2000) reifen können.

Ein großer Vorteil der MSCs liegt darin, daß sie leicht aus dem Knochenmark zu isolieren und *in vitro* anzureichern sind, sodaß die für klinische Studien nötigen hohen Zellzahlen keine Einschränkung ihrer Anwendbarkeit darstellen (Bruder et al., 1997; Pittenger und Martin, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere MSC-Populationen aus Mäusen aufgereinigt und in Kultur genommen. Die Wachstumseigenschaften und Morphologie der Zellen waren dabei gut reproduzierbar und deckten sich mit den in der Literatur beschriebenen Daten (Conget und Minguell, 1999; Tropel et al., 2004). Die MSCs exprimieren eine Vielzahl unterschiedlicher Oberflächenproteine, ein individueller Marker für die MSCs ist jedoch nicht bekannt. Die Reinheit der Stammzellpopulationen mußte daher durch die Kombination verschiedener Marker analysiert werden, zumal die anfängliche Kultur durch andere adherente Knochenmarkzellen, hauptsächlich myeloide Blutzellen, kontaminiert war. Wie die durchflußzytometrischen Untersuchungen der Zellen gezeigt haben, waren alle MSC-Populationen nach 2-3 Passagen frei von Blutzellen und exprimierten ein typisches Set von Oberflächenantigenen (Conget und Minguell, 1999; Deans und Moseley, 2000; Minguell et al., 2001). Das Antigenprofil, die Morphologie und die Kultivierungseigenschaften der Zellen zeigten, daß es sich um reine Populationen von mesenchymalen Stammzellen handelte.

Zwischen und auch innerhalb der einzelnen Populationen konnte jedoch eine gewisse Variabilität der Expression bestimmter Oberflächenmarker festgestellt werden, ein Zeichen dafür, daß die MSCs eine heterogene Kultur darstellten. Das wurde auch durch die verschiedenartige Morphologie einzelner Zellen deutlich, die von einer schmalen spindelförmigen bis zu einer großen polygonalen Gestalt reichte. Diese unterschiedlichen Erscheinungsformen wurden auch an Einzelzellklonen beschrieben, die untereinander starke Divergenzen zeigten, aber auch innerhalb ein und desselben Klons (Dormady et al., 2001). Colter *et al.* haben die MSCs nach ihrer unterschiedlichen Größe und Granularität aufgeteilt und festgestellt, daß sich die unterschiedlichen Zelltypen in ihrer Teilungsaktivität und Markerexpression unterscheiden (Colter et al., 2000). Eine unterschiedliche Expression der Oberflächenproteine Sca-1 und CD90.2 wurde auch an Einzelzellklonen nachgewiesen, die aus der gleichen MSC-Population isoliert wurden (Meirelles und Nardi, 2003). Da zudem auch Abweichungen der charakteristischen Marker zwischen unterschiedlichen Mausstämmen (Peister et al., 2004) und Spezies

(Javazon et al., 2001) existieren, ist es kaum möglich, die MSCs nur aufgrund ihrer phänotypischen Eigenschaften zu charakterisieren. Daher wurde zusätzlich auch die Funktionalität der kultivierten Knochenmarkzellen untersucht, ob diese in der Lage waren, zu den für MSCs typischen Zelltypen zu differenzieren.

Der klassische Differenzierungsweg von kultivierten MSCs ist der zu Knochenzellen (Bruder et al., 1994). Durch die Zugabe spezifischer Substanzen ins Kulturmedium können in den Zellen gezielt Stoffwechselwege und Entwicklungskaskaden der Osteogenese aktiviert werden (Gronthos et al., 1994; Jaiswal et al., 1997). Bereits nach wenigen Wochen konnten Kalkablagerungen und eine Erhöhung der Alkalinen Phosphatase-Aktivität in den behandelten Zellkulturen gefunden werden, klare Anzeichen einer Knochendifferenzierung. Der Nachweis des Osteoblastenspezifischen Proteins Osteocalcin (Hauschka, 1986) in den Zellen bestätigte die Differenzierung zu Knochenzellen. Auch die Generierung von Fettzellen und Knorpelzellen ist ein typisches Merkmal der MSCs (Pittenger et al., 1999) und konnte durch spezifische Medienzusätze induziert werden. Die kultivierten Zellen erfüllten somit neben den phänotypischen Kriterien auch die klassischen funktionellen Eigenschaften von MSCs, sodaß diese Populationen für weitere Experimente eingesetzt werden konnten.

Um auch das Differenzierungspotential der MSCs zu Herzzellen *in vitro* zu untersuchen, wurden die Zellen mit 5-Aza-Cytidin behandelt, einer DNA demethylierenden Substanz, die die Aktivierung herzspezifischer Gene und eine entsprechende Entwicklung der Zellen induzieren sollte. Entgegen der Befunde aus anderen Studien (Wakitani et al., 1995; Makino et al., 1999; Fukuda, 2001; Xu et al., 2004) konnte jedoch keine Differenzierung zu Muskelzellen beobachtet werden, obwohl unterschiedliche Ansätze zu verschiedenen Zeitpunkten der MSC-Kultur durchgeführt wurden. Auch andere Forschergruppen konnten das Differenzierungsprotokoll nicht reproduzieren (Phinney et al., 1999; Hill et al., 2003). Phinney et al. stellten die Vermutung auf, daß die Differenzierung in den genannten Studien nicht durch das 5-Aza-Cytidin bewirkt wurde, sondern durch das dem Medium in allen Differenzierungsansätzen zugesetzte Amphotericin B. Dieses bewährte Antimykotikum wird unter anderem in elektrophysiologischen Messungen (Perforated Patch) eingesetzt, um Poren in der Zellmembran zu bilden (Rae et al., 1991). Diese führen zu einer Durchlässigkeit von monovalenten Kationen und

verursachen einen intrazellulären Kalziumanstieg (Cohen et al., 1990), der wiederum eine Herzdifferenzierung begünstigen könnte. Doch auch durch die Zugabe von Amphotericin B ins Medium oder die Verwendung des bioaktiven Metaboliten 5-Aza-2-Deoxycytidin (Bittira et al., 2002) konnten keine Muskelzellen generiert werden. Auch das von den ES-Zellen abgeleitete Protokoll der hängenden Tropfen (Wobus et al., 1991; Boheler et al., 2002) führte nicht zu einer Differenzierung der MSCs zu Herzzellen. Überraschenderweise konnten in den Ansätzen alleine mit MSCs keine Zellaggregate gebildet werden, und die Kokultivierung mit ES-Zellen zeigte deutlich, daß die mesenchymalen Stammzellen in den Aggregaten nicht oder nur in sehr geringem Maße proliferierten.

Ein grundlegendes Problem dieser Versuche war die fehlende Spezifität der verwendeten Protokolle. Mit der Methode der hängenden Tropfen wird in ES-Zellen eine Differenzierung zu Zellen aller drei Keimblätter initiiert, Herzzellen bilden nur einen kleinen Anteil der gesamten Zellmasse (Hescheler et al., 1997; Kolossov et al., 1998). Möglicherweise begünstigte diese Kultivierungsmethode in den MSCs eine andere Entwicklungsrichtung, beispielsweise ist es nach entsprechenden Differenzierungsprotokollen für die Bildung von Chondrozyten erforderlich, die Zellen in Aggregaten zu kultivieren (Johnstone et al., 1998; Majumdar et al., 2000). Der eingesetzte Wirkstoff 5-Azacytidin hat eine allgemeine Demethylierung der DNA zur Folge und greift ebenfalls ungerichtet alle möglichen Gene sich teilender Zellen an. Daher geschieht eine Aktivierung herzspezifischer Genloki nur zufällig und wahrscheinlich nur in einer geringen Zahl der Zellen. Die mangelnde Spezifität wurde auch bei der ursprünglichen Charakterisierung an einer embryonalen Fibroblasten-Linie der Ratte berichtet, die sich nach Zugabe von 5-Aza-Cytidin zu Myotuben, Adipozyten und Chondrozyten entwickelte (Constantinides et al., 1977; Konieczny und Emerson, Jr., 1984). Dieser variable und willkürliche Mechanismus wurde zudem durch die Entstehung von Fettzellen in einem der Ansätze deutlich.

Da die MSCs eine heterogene Zellkultur darstellen, ist es denkbar, daß nicht alle Zellen ein myogenes Differenzierungspotential besitzen. Auch die Entwicklung zu Fettzellen und Knorpelzellen ist in den MSCs limitiert, nur ein Teil der Zellen kann sich in diese Richtung entwickeln (Beresford et al., 1992). Es gibt darüberhinaus Hinweise darauf, daß die MSCs mit zunehmender Dauer der Kultivierung diese multipotenten Eigenschaften verlieren (Zhang et al., 2005). Eine Veränderung der

Plastizität der mesenchymalen Stammzellen wurde auch schon in einer anderen Studie berichtet, in der Einzelzellklone zu Knochen-, Knorpel, und Fettzellen differenziert wurden (Muraglia et al., 2000). Nur 17% der Zellen entwickelten sich zu allen drei Zelltypen, 80% konnten Knochen- und Knorpelzellen hervorbringen und 3% besaßen alleine das Potential zur Knochenbildung. Durch Zugabe von Fibroblasten-Wachstumsfaktor konnte die Zahl der tripotenten Zellen auf 34% gesteigert werden, ein Zeichen dafür, daß die Kultivierung der MSCs bei der Erhaltung der Multipotenz eine entscheidende Rolle spielt. Pittenger et al. haben in Einzelzellklonen ebenfalls nur ein Drittel mit einer tripotenten Differenzierungskapazität gefunden (Pittenger et al., 1999). Ähnliche Ergebnisse konnten auch in unserm Labor mit MSC-Einzelzellklonen erzielt werden. Während eine Differenzierung zu Knochen in fast allen Klonen möglich war, konnten Fett- und Knorpelentwicklung nur in einem Teil der Zellen induziert werden (Daten nicht gezeigt). Diese und andere Untersuchungen deuteten darauf hin, daß sich die mesenchymalen Stammzellen in der *in vitro* Kultur entsprechend einem Hierarchie-Modell spezifizieren und nach und nach ihre verschiedenen Differenzierungsmöglichkeiten einbüßen (DiGirolamo et al., 1999; Minguell et al., 2001; Baksh et al., 2004). Die schlechte Reproduzierbarkeit der Differenzierung von MSCs zu mesodermalen Gewebetypen wie Muskeln, Sehnen oder Endothel oder zu ektodermalen Zellen des Nervensystems könnte dadurch zu erklären sein, daß diese Entwicklungspotentiale dabei vergleichsweise früh verloren gehen. Andererseits wurden die meistens dieser Phänomene nur auf der Basis phänotypischer Kriterien oder der Expression bestimmter Gene belegt, funktionelle Kriterien der differenzierten Zelltypen wurden nicht untersucht. Das könnte auch zu Fehlinterpretationen in Bezug auf das Stammzellpotential geführt haben, wie es bei der Entwicklung neuronaler Zellen gezeigt wurde (Bertani et al., 2005).

Einen interessanten Aspekt hinsichtlich des Differenzierungspotentials der MSC lieferte die Entdeckung einer verwandten Zellpopulation, der multipotenten adulten Progenitorzellen (MAPCs) (Reyes et al., 2001; Reyes und Verfaillie, 2001; Verfaillie et al., 2003). Diese Zellen werden wie MSCs aus dem Knochenmark gewonnen und durch Adhäsion auf Kulturschalen isoliert. Lediglich die Kultivierungsbedingungen wurden bei diesen Zellen in mehreren Punkten verändert, wie eine sehr geringe Plattierungsdichte, die Verwendung eines Serum-freien Mediums sowie der Zusatz

bestimmter Wachstumsfaktoren. Das führte zur Anreicherung der MAPCs, die auch phänotypisch viele Charakteristika der MSCs besitzen, sich allerdings in der Expression einzelner Marker, wie CD44, CD106 und der MHC-Moleküle, unterscheiden (Reyes et al., 2001). Bei den MAPCs wurde neben der Differenzierung zu Knochen-, Knorpel- und Fettzellen auch das Potential zur Bildung anderer Zellen aller drei Keimblätter gefunden, Muskel, Endothel, Neuroektoderm und Hepatozyten (Jiang et al., 2002; Zhao et al., 2002; Schwartz et al., 2002; Reyes et al., 2002; Jiang et al., 2003). Neben der *in vitro* Differenzierung konnte nach Transplantation einzelner MAPCs in Blastozysten auch die Generierung gewebetypischer Zellen *in vivo* nachgewiesen werden, eine Eigenschaft, die bis dahin nur bei pluripotenten ES- oder EC-Zellen gezeigt werden konnte. Die vielen Gemeinsamkeiten der MAPCs mit den MSCs lassen vermuten, daß es sich bei diesen Zellen um eine sehr frühe undifferenzierte Subpopulation der MSCs handelt (Reyes und Verfaillie, 2001), die unter normalen Kulturbedingungen verloren geht. Dies kann durch Veränderung der Zellen aufgrund der Kultivierung oder durch Überwachsen durch andere MSC-Populationen geschehen, unterstützt aber die Theorie des Hierarchie-Modells, nach dem das Differenzierungspotential der Zellen mit der Zeit verloren geht.

Da aufgrund des Fehlens spezifischer Marker weder für die MSCs noch für die MAPCs ein direkter Nachweis *in vivo* möglich ist, kann nicht geklärt werden, ob schon im Knochenmark verschiedene Stammzellpopulationen mit unterschiedlichen Differenzierungseigenschaften existieren, oder diese erst durch die Kultivierung entstehen. Die Studien mit MSCs geben jedoch viele Anhaltspunkte dafür, daß durch die Anreicherung der Zellen *in vitro* bestimmte Eigenschaften, unter anderem auch ihr Differenzierungspotential, verändert werden. Auch andere für therapeutische Zwecke wichtige Merkmale können durch die Kultivierung beeinflusst werden, wie das Einwandern und Anwachsen in dem geschädigten Gewebe (Rombouts und Ploemacher, 2003; Vacanti et al., 2005). Zudem besteht das Risiko einer Entartung der MSCs, es gibt Hinweise auf spontane Transformationen nach Langzeit-Kultivierung der Zellen über 4-5 Monate (Rubio et al., 2005). Um die für die klinische Verwendung der MSCs ausreichenden Zellzahlen zu erhalten, ist es jedoch unabdingbar, die Zellen *in vitro* zu expandieren. Daher ist es in Zukunft dringend erforderlich, das Verhalten und die Veränderung der MSCs *in vitro* genauer zu untersuchen und Aufreinigungs- und Kultivierungsprotokolle zu entwickeln, die eine Anreicherung möglichst undifferenzierter Stammzellen ermöglichen.

Da eine Differenzierung zu Kardiomyozyten *in vitro* nicht nachgewiesen werden konnte, sollte als nächstes *in vivo* untersucht werden, ob mesenchymale Stammzellen nach Transplantation in einen Herzinfarkt bei Mäusen in dem geschädigten Gewebe anwachsen können, und inwieweit sie imstande sind, an einer Geweberegeneration teilzunehmen. Der Großteil der mit MSCs injizierten Herzen zeigte in dem infarzierten Areal ein massives Anwachsen der transplantierten Zellen, welches im Gegensatz zu den Beobachtungen bei der Behandlung mit Gesamtknochenmark und hämatopoetischen Zellen über einen langen Zeitraum bis zu 84 Tage nach der Operation nachzuweisen war. Die mesenchymalen Stammzellen waren demnach in der Lage, trotz der Inflammation und der nekrotischen Bedingungen stabil in dem geschädigten Gewebe anzuwachsen. Zum Teil konnte darüberhinaus ein Auswachsen der mesenchymalen Stammzellen im Infarktareal und ein Einwachsen in das gesunde Herzgewebe beobachtet werden, was auf eine Proliferation der Zellen nach der Transplantation hindeutete. Im Vergleich zu den hämatopoetischen Zellen waren die angewachsenen MSCs deutlich größer und richteten sich entlang der bestehenden Gewebestruktur aus. Eine Transdifferenzierung zu Herzzellen oder Endothelzellen konnte jedoch auch mit diesen Zellen in keinem der Herzen nachgewiesen werden. Das steht im Widerspruch zu anderen Untersuchungen, in denen nach Transplantation in infarzierte Herzen von MSCs abgeleitete Herz- (Wang et al., 2000; Tomita et al., 2002) und Endothelzellen (Chen et al., 2003; Davani et al., 2003) gefunden wurden. In einem Teil dieser Arbeiten wurden die Zellen vor der Transplantation allerdings mit 5-Aza-Cytidin und/oder Amphotericin kultiviert, wodurch eine Konditionierung bewirkt worden sein könnte. Das wurde in einer Studie mit unbehandelten und 5-Aza-Cytidin-behandelten MSCs bestätigt, in der nur die vorbehandelten Stammzellen Kardiomyozyten gebildet hatten (Bittira et al., 2002). Der Einsatz dieser epigenetisch wirksamen Substanz in klinischen Studien ist jedoch problematisch, da die Demethylierung der DNA auch eine Aktivierung von Tumorgenen zur Folge haben könnte, die eine Transformation der Zellen verursacht (Rainier und Feinberg, 1988). Zudem wurde in keiner der Studien untersucht, ob die Stammzell-abgeleiteten Herzzellen durch Fusion entstanden waren, oder ob tatsächlich eine Differenzierung der MSCs stattgefunden hatte. Darüberhinaus zeigten die transplantierten Zellen oftmals zwar die Expression bestimmter Muskelmarker, erinnerten morphologisch jedoch mehr an glatte Muskelzellen oder

Fibroblasten. Ausgereifte Kardiomyozyten mit vollständiger Organisation der Sarkomerstruktur und Glanzstreifen konnten dagegen nicht nachgewiesen werden (Wang et al., 2001; Shake et al., 2002; Nagaya et al., 2004). Ein weiteres Problem der genannten Studien stellte die Markierung der transplantierten Zellen dar, da diese nur indirekt durch transiente Transfektionen mit einem Reporter-gen oder durch Kernfärbungen durchgeführt wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden MSCs aus transgenen Mäusen eingesetzt, die durch stabile Expression von EGFP eine direkte Visualisierung der Zellen erlaubten und mögliche Fehlerquellen bei der Beurteilung der Transplantationsergebnisse minimierten. Vor allem die Verwendung der Alpha-Aktin-EGFP transgenen MSCs zeigte dabei eindeutig, daß eine Differenzierung zu Muskelzellen nicht stattgefunden hatte.

Neuere Studien deuten darauf hin, daß die mit mesenchymalen Stammzellen transplantierten Herzen zwar eine Funktionsverbesserung zeigen, diese jedoch wie auch bei den hämatopoetischen Vorläuferzellen durch andere Mechanismen als Transdifferenzierung hervorgerufen wird. Die beschriebene Neovaskularisierung der infarzierten Herzen scheint eher durch parakrine Effekte begründet zu sein als durch eine aktive Teilnahme der MSCs an der Bildung neuer Gefäße (Chen et al., 2003; Nagaya et al., 2005; Gneocchi et al., 2005). Diese Theorie deckt sich auch mit den Beobachtungen bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Herzen, daß den EGFP-positiven MSCs zwar keine Endothelstrukturen zugeordnet werden konnten, in der Nähe der transplantierten Zellen jedoch vermehrt kleine Gefäße gefunden wurden. Es ist bekannt, daß MSCs in der Lage sind, eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen zu generieren (Haynesworth et al., 1996; Majumdar et al., 1998). Genexpressionsanalysen von MSCs und entsprechende Proteinnachweise haben die Produktion einer Reihe unterschiedlich wirkender gefäßbildender Substanzen belegt, die unter hypoxischen Bedingungen zum Teil noch deutlich gesteigert wurde (Kinnaird et al., 2004). Die daraus resultierende angiogene Wirkung wurde außerdem noch in einem Ischämie-Modell an den Hinterbeinen von Mäusen bestätigt. Auch der Umbau des Infarktgewebes könnte durch die im Herzen angewachsenen MSCs positiv beeinflußt werden, was eine im Vergleich zu den Kontrollgruppen verdickte Ventrikelwand und reduzierte Dilatation der Herzkammer erklären würde (Tomita et al., 2002; Shake et al., 2002). Wie andere Studien gezeigt haben, führt der verminderte Einbau von Kollagenfasern in

das geschädigte Gewebe nach Transplantation von MSCs zu einer weniger steifen Narbe und damit zu einer besseren Dehnbarkeit und Funktionalität des Ventrikels (Mangi et al., 2003; Xu et al., 2005).

Da trotz der stabilen Integration keine Differenzierung der MSCs zu Herz- oder Endothelzellen beobachtet werden konnte, wurden zur genaueren Untersuchung der transplantierten Herzen Semidünnschnitte angefertigt. Nach der histologischen Färbung dieser Gewebe wurden interessanterweise Tumor-artige Gebilde in den Infarktarenalen gefunden, die sich teilweise über die gesamte Breite der Ventrikelwand erstreckten. Das war insofern überraschend, da in keiner der vorangegangenen Studien mit MSCs von vergleichbaren Auffälligkeiten berichtet wurde. Das Schicksal dieser Stammzellen nach der Transplantation in geschädigte Herzen war zwar, wie oben beschrieben, nicht einwandfrei geklärt, die allgemeine These war jedoch, daß dieser Therapieansatz eine Funktionsverbesserung bewirken kann und vor allem risikolos ist (Pittenger und Martin, 2004; Baksh et al., 2004). Der einzige Zwischenfall wurde nach intrakoronarer Applikation von MSCs in gesunde Herzen von Hunden beschrieben, die eine Woche nach der Injektion Mikroinfarkte mit fibrotischen Veränderungen des Gewebes und infiltrierenden Makrophagen in den Arealen mit angewachsenen Zellen zeigten (Vulliet et al., 2004). Das könnte allerdings auf die Größe und die starke Adhäsionsfähigkeit der Zellen zurückzuführen sein, die zu einer Verstopfung der kleinen Kapillaren geführt haben könnten (Gao et al., 2001; Barbash et al., 2003). Die Tumor-artigen Veränderungen nach direkter Injektion der Zellen in das Infarktgebiet waren dadurch jedoch nicht zu erklären. Die geringe Zellularität und Anhäufung von amorphem Material innerhalb dieser Strukturen erinnerten an heterotope Verkalkungen weicher Gewebe, die in nekrotischen Geweben nach Verletzungen durch interzelluläre Anhäufung von Kalzium entstehen können. Die Kalzifizierungen wurden unter dem Polarisationsmikroskop und durch histologische Färbungen bestätigt. Es wurde gezeigt, daß diese Veränderungen nur in dem Infarktareal und nur im Bereich der angewachsenen MSCs aufgetreten sind, ein Hinweis darauf, daß die Zellen für die Bildung dieser Strukturen verantwortlich waren. Zudem konnten in den Kontrollherzen, in denen anstelle der Zellen nur die Trägerflüssigkeit PBS injiziert wurde, keine Kalzifizierungen gefunden werden. Das bewies, daß nicht die durch den Infarkt induzierte Nekrose für diesen Vorgang verantwortlich war. Da der

induzierte Kryoinfarkt zu Vereisungen des Gewebes führt, und heterotope Verkalkungen in seltenen Fällen als Folge von Temperaturschäden auftreten können, wurden die Transplantationen auch in LAD-Läsionen durchgeführt. Auch in diesen Herzen wurden jedoch nach Injektion der MSCs Kalzifizierungen beobachtet. Ähnliche Befunde wurden in einer anderen Studie nach Injektion von Gesamtknochenmarkzellen in Herzinfarkte bei der Ratte berichtet (Yoon et al., 2004). In diesen Herzen wurden in der Randzone der Läsionen Kalkablagerungen in den Bereichen mit transplantierten Zellen festgestellt, es wurde jedoch nicht untersucht, inwieweit die Zellen für diese verantwortlich waren.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher weitere Experimente zur Klärung der Zellpopulation und der zugrundeliegenden Mechanismen durchgeführt. Um den Ursprung der Kalzifizierungen zu klären, wurden Immunfärbungen gegen Osteocalcin benutzt. In allen Herzen, in denen solche Ablagerungen gefunden wurden, konnten diese Areale mit dem Knochen-spezifischen Marker angefärbt werden, ein klarer Beweis für Ossifikationen als Ursache dieser pathologischen Veränderungen. Die transplantierten MSCs waren inmitten dieser Knochenstrukturen einzementiert, was vermuten ließ, daß sie das Knochenmaterial produziert hatten. In den vorangegangenen *in vitro* Versuchen wurde gezeigt, daß die MSC unter geeigneten Bedingungen in der Lage waren, zu Knochenzellen zu differenzieren und große Mengen an Kalzium abzulagern. Um auszuschließen, daß die *in vivo* gefundenen Verknöcherungen durch die Entartung einer bestimmten MSC-Population verursacht wurden, die bereits auf die Knochenentwicklung vorprogrammiert war, wurden mehrere Chargen von MSCs aus verschiedenen Mäusen generiert und für die Transplantationsexperimente verwendet. Alle drei Zellpopulationen führten zu Kalzifizierungen und Verknöcherungen des Infarktgewebes, was einem atypischen Verhalten einer einzelnen Zellpräparation widersprach. Zudem wurden die MSC-Populationen zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur, zwischen Passage 3 und 9, eingesetzt. Eine Transformation oder Vordifferenzierung der Zellen hätte demnach schon in einem sehr frühen Abschnitt der Kultivierung stattfinden müssen. Obwohl die MSCs auch nach mehreren Passagen noch ein vergleichbares Markerprofil zeigten, und Immunfärbungen der Kulturen *in vitro* kein Osteocalcin nachweisen konnten, schien das Ausmaß der verknöcherten Strukturen mit der Anzahl der Passagen zuzunehmen, ein Hinweis darauf, daß durch die Dauer der Kultivierung eine Subpopulation der MSCs mit

einem hohem osteogenen Potential angereichert worden sein könnte. Das entspricht dem nach den Erkenntnissen aus *in vitro* Untersuchungen aufgestellten Hierarchiemodell (Pittenger et al., 1999; Muraglia et al., 2000; Baksh et al., 2004), nach dem die ursprüngliche Plastizität der MSCs in Richtung einer unipotenten Knochenvorläuferzelle verloren geht.

Da eine *in vitro* Expansion der MSCs für klinische Zwecke aber unverzichtbar ist, stellt der Einsatz dieser Zellen in der Herzersatztherapie ein hohes Risiko dar. Zudem wird die biologische Grundlage der Behandlungsmethode, eine gewebespezifische Differenzierung der transplantierten Zellen, noch weiter in Frage gestellt. Während bisher auch ohne den Nachweis einer Transdifferenzierung zumindest eine Gefährdung der Patienten ausgeschlossen wurde, könnte eine Verknöcherung des Herzens fatale Folgen haben. Durch die verhärtete Ventrikelwand ergibt sich eine verminderte diastolische Füllmenge und Abnahme der Pumpleistung, das gebildete Knochengewebe stört die Signalleitung und kann zu Arrhythmien führen, und schließlich könnte es zur Perforation der Herzwand kommen. Aufgrund dieser Risiken ist es dringend erforderlich, die Realisierung klinischer Studien neu zu überdenken. In China läuft bereits eine erste klinische Studie, in der Herzinfarktpatienten mit einer für MSCs angereicherten Zellpopulation aus dem Knochenmark behandelt werden (Chen et al., 2004), in den USA ist eine weitere Studie geplant (Laflamme und Murry, 2005). Aufgrund der Feststellung, daß die Kalzifizierungen in den hier gezeigten Experimenten im Mausmodell mit der Dauer der Transplantationszeit zunahmten, könnte ein entsprechend langsamer Verlauf der Komplikationen auch bei den behandelten Patienten zu erwarten sein.

Da die Verknöcherungen ausschließlich auf die Infarktareale begrenzt waren, wurde das Schicksal der mesenchymalen Stammzellen auch nach Transplantation in nicht infarzierte Herzen analysiert. Entgegen einer Studie, in der MSCs nach Injektion in unversehrte Mauserzen angewachsen und zu Herzzellen differenziert waren (Toma et al., 2002), konnten in den hier untersuchten Herzen keine transplantierten Zellen in dem vitalen Gewebe gefunden werden. Dieser Unterschied könnte allerdings darauf zurückzuführen sein, daß es sich in der genannten Studie um eine Xenotransplantation von humanen MSCs gehandelt hatte, deren Verhalten in einer fremden Spezies vollkommen andere Mechanismen zugrundeliegen könnten. In dem hier verwendeten syngenem Mausmodell war zwar auch ein Teil der MSCs

angewachsen, allerdings nur entlang des Injektionskanals, der wiederum eine Verletzung darstellte. Das wurde durch die zerstörte Gewebestruktur und die Infiltration inflammatorischer Zellen demonstriert. Auch in diesen Herzen wurden Kalzifizierungen und Verknöcherungen in der direkten Umgebung der angewachsenen MSCs gefunden, die sich jedoch ebenfalls nicht in das intakte Herzgewebe ausbreiteten. Diese Befunde sprachen dafür, daß in dem geschädigten Gewebe Stoffe freigesetzt werden, die die MSCs zu einer Knochendifferenzierung anregen. Diese Faktoren können direkt durch nekrotische Herzzellen oder indirekt durch inflammatorische Zellen sezerniert werden, und auch eine direkte Interaktion mit den MSCs könnte eine Rolle spielen. Die molekularen Mechanismen, die eine Differenzierung der MSCs regulieren, sind komplex und nur unvollständig geklärt. Bei der Entwicklung zu reifen Osteoblasten durchlaufen die Zellen mehrere Stadien, nach der Proliferation der Knochenvorläuferzellen erfolgt die Ablagerung einer kollagenen Matrix und die Expression alkalischer Phosphatase und schließlich die Mineralisierung (Owen et al., 1990; Beck, Jr. et al., 2000). Dieser Prozeß wird durch eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Matrixmolekülen sequentiell gesteuert (Qi et al., 2003).

Eine Gruppe von Faktoren, die bei der Osteogenese eine entscheidende Rolle spielen, sind die knochenmorphogenen Proteine (BMPs) (Wozney, 1992). In mehreren Studien wurde bereits gezeigt, daß eine Überexpression des Wachstumsfaktors BMP-2 zu einer gesteigerten Osteogenese mesenchymaler Zell-Linien und Stammzellen führt (Rickard et al., 1994; Chang et al., 2004; Kadowaki et al., 2004). Desweiteren gibt es Anzeichen dafür, daß BMP-2 bei der Apoptose von Kardiomyozyten nach Schädigungen des Herzgewebes involviert ist und von den Myofibroblasten vermehrt produziert wird (Izumi et al., 2001; Behfar et al., 2002). Ein anderes Beispiel für einen osteogenen Faktor im Herzen ist die Cyclooxygenase-2. Dieser Entzündungsmediator scheint die Knochendifferenzierung mesenchymaler Stammzellen über eine BMP-2 vermittelte Signalkaskade zu beeinflussen (Zhang et al., 2002) und wird nach einem Herzinfarkt in den apoptotischen Kardiomyozyten hochreguliert (Abbate et al., 2004). In beiden Fällen findet sich eine Überschneidung der am Remodeling des Herzens und der Differenzierung der MSCs beteiligten Faktoren, das Zusammenspiel dieser beiden Prozesse im Infarktareal könnte die osteogene Differenzierung in den MSCs auslösen und eine Verknöcherung in die Wege leiten.

Während die klinischen Studien mit MSCs gerade erst angefangen haben oder noch in Planung sind (Laflamme und Murry, 2005), wurden bereits zahlreiche Infarktpatienten mit Gesamtknochenmark oder hämatopoetischen Vorläuferzellen behandelt (Strauer et al., 2002; Assmus et al., 2002b; Stamm et al., 2003; Wollert et al., 2004). Da in den mononukleären Knochenmarkzellen auch eine geringe Anzahl von MSCs enthalten ist, stellte sich die Frage, inwieweit diese Zellfraktion nach Transplantation in infarzierte Herzen ein Risiko für eine Verknöcherung darstellt. Erstaunlicherweise wurden auch nach der Injektion von frisch isolierten Gesamtknochenmarkzellen in Kryo- und LAD-Infarkte pathologisch veränderte Herzen gefunden, allerdings war der Vorgang zeitlich verzögert und das Ausmaß deutlich geringer. Durch den langsameren Verlauf der Osteogenese war es in diesen Organen möglich, die verschiedenen Stadien der Knochendifferenzierung nachzuverfolgen (Owen et al., 1990). In mehreren Herzen wurden tumoröse Strukturen in der Herzwand lokalisiert, die in histologischen Färbungen Anzeichen für eine angehende Knorpel- und Knochenbildung aufzeigten. Hierbei könnte es sich um sehr frühe Stadien der Osteogenese gehandelt haben, die durch Proliferation der Knochenvorläuferzellen gekennzeichnet ist, die sich jedoch noch nicht in der Ablagerung von kalzifizierter Matrix oder Expression von Osteocalcin manifestiert. Ein Herz zeigte dagegen eine beginnende Kalzifizierung, besonders bemerkenswert war hierbei vor allem der Nachweis von Osteocalcin im Zytoplasma der EGFP-positiven Zellen, ein deutlicher Beweis dafür, daß diese zu Osteoblasten differenzierten und für die Bildung der Knochenmatrix verantwortlich waren (Stein und Lian, 1993). In zwei weiteren Herzen schließlich wurden massive Verknöcherungen gefunden, vor allem in einem nach sehr langer Transplantationszeit von über einem Jahr entnommenen Organ waren die starken transmuralen Kalkablagerungen mit den Befunden aus den mit MSCs injizierten Herzen vergleichbar. Diese Ergebnisse wiesen eindrucksvoll nach, daß die Transplantation von Knochenmarkzellen in infarzierte Herzen ein erhebliches Risiko für eine Knochenentwicklung in dem geschädigten Gewebe darstellte, und ließen vermuten, daß die Population der mesenchymalen Stammzellen für die Osteogenese verantwortlich war. Das erklärte auch den langsameren Verlauf der pathologischen Veränderungen im Vergleich zu den mit aufgereinigten MSCs behandelten Herzen, da die MSCs in den Gesamtknochenmarkzellen nur in einer deutlich geringeren Zahl

vorhanden waren und zudem noch keine Anreicherung bestimmter Zellpopulationen durch Kultivierung stattgefunden hatte.

Um endgültig zu klären, ob die MSC-Population der Ursprung der Verknöcherungen war, wurden Mäuse mit EGFP-positiven Knochenmarkzellen rekonstituiert, und nach Generierung von Kryo- und LAD-Infarkten selektiv die hämatopoetischen Zellen mobilisiert (Kronenwett et al., 2000). Das führte zu einem starken Einwandern und Anwachsen hämatopoetischer Zellen und Vorläuferzellen in dem Infarktareal, wie bereits im ersten Teil dieser Arbeit nachgewiesen wurde. In keiner der mobilisierten Mäuse konnte allerdings eine tumoröse Veränderung, Kalzifizierung oder Verknöcherung des Herzgewebes festgestellt werden, ein klarer Beweis dafür, daß die MSCs die Knochenbildung verursacht hatten.

Diese Befunde sind insofern nicht überraschend, da die MSCs bekanntermaßen ein hohes osteogenes Potential besitzen. Das am besten beschriebene Anwendungsgebiet für den Einsatz dieser Zellen ist aus diesem Grund auch die Reparatur von Knochen. In verschiedenen Studien an Tiermodellen wurden MSCs bereits angewendet, um Knochendefekte zu heilen (Pereira et al., 1998; Bruder et al., 1998; Richards et al., 1999). Zudem gibt es auch klinische Studien, in denen allogene MSCs bei der Behandlung von Osteogenesis Imperfecta bei Kindern eingesetzt wurden (Horwitz et al., 1999; Horwitz et al., 2001). Hinweise darauf, daß MSCs auch natürlicherweise an der Knochenbildung im Körper maßgeblich beteiligt sind, liefern die Befunde von einer Sca-1 defizienten Maus. Der fehlende Stammzellmarker spielt bei der Selbsterneuerung der MSCs eine entscheidende Rolle, und seine Abwesenheit manifestiert sich bei den Mäusen in einer zunehmenden Osteoporose im Alter (Bonyadi et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde die grundlegende Basis der zellulären Therapie, die Gewebe-spezifische Differenzierung der transplantierten Stammzellen, in verschiedenen Experimenten widerlegt. Das umgebende Milieu im Infarktgewebe alleine reicht demnach nicht aus, um eine Herzdifferenzierung der Knochenmarkzellen zu initiieren. Zudem haben die Ergebnisse gezeigt, daß die Behandlungsmethode erhebliche Risiken birgt. Eine Stammzellpopulation des Knochenmarks, die mesenchymalen Stammzellen, führte in einer hohen Zahl der Versuche zu Verknocherungen im Myokard. Diese potentiell schädlichen Strukturen könnten Arrhythmien und unter Umständen sogar Perforationen der Herzwand induzieren. Auf jeden Fall ist davon auszugehen, daß sich die Herzfunktion durch die eingeschränkte Dehnbarkeit und Motilität des Knochengewebes weiter verschlechtert.

Da bislang zumindest angenommen wurde, daß diese Form der Behandlung ohne Risiko für die Patienten ist, gehen die klinischen Versuche weiter. Nach den Erkenntnissen aus dieser Studie sollten zumindest die Nachsorgeuntersuchungen dieser und früherer Patienten erheblich verstärkt werden. Mittels moderner bildgebender Verfahren in der Medizin lassen sich eventuelle Gewebeveränderungen früh darstellen, so daß bei Bedarf noch rechtzeitig eingegriffen werden könnte und vor allem weitere Transplantationen verhindert werden könnten.

Die Vorgänge, die bei der Heilung des Herzinfarktes und der Entwicklung der Stammzellen eine Rolle spielen, sind komplex. Eine Verbesserung der Herzfunktion durch die transplantierten Zellen ist jedoch auch ohne eine Differenzierung zu Herzzellen möglich, beispielsweise durch passive Effekte wie die Freisetzung parakriner Faktoren oder ein verändertes Remodeling des Herzens. Daher bedarf es weiterer Studien, um die grundlegenden Mechanismen aufzuklären und standardisierte Methoden zu entwickeln, die eine erfolgreiche Anwendung der zellulären Herzersatztherapie am Patienten risikolos ermöglichen. Idealerweise können parakrine Faktoren gefunden werden, die eine verbesserte Regeneration des Herzens nach dem Infarkt bewirken. Durch die gezielte Applikation dieser definierten Moleküle könnte das unsichere Black-Box-Modell der Zell-Transplantation dann in Zukunft umgangen werden.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das Potential adulter Knochenmarkzellen, speziell hämatopoetischer (HSC) und mesenchymaler (MSC) Stammzellen, für eine Gewebeersatztherapie des Herzinfarktes untersucht. Durch die Verwendung direkter Nachweismethoden mittels transgener Mausmodelle wurde eine eindeutige Detektion der transplantierten Zellen und deren Differenzierung zu Kardiomyozyten ermöglicht. Dabei konnten wichtige neue Erkenntnisse über die Mechanismen und Risiken einer Zellersatztherapie mit Knochenmark-abgeleiteten Zellen gewonnen werden.

Es zeigte sich, daß die Knochenmarkzellen nur vorübergehend in dem Infarktareal überlebten. Allerdings konnte eine massivere und längerfristige Integration, wie sie für klinische Anwendungen unabdingbar ist, durch die Methode der Mobilisierung etabliert werden.

Dennoch wurde im Gewebe und auf Einzelzellebene belegt, daß eine Differenzierung der Knochenmarkzellen zu Kardiomyozyten oder Endothelzellen nicht stattgefunden hatte, sondern die Zellen ihren hämatopoetischen Charakter behielten. Zudem wurden keine Anzeichen für eine Verbesserung der linksventrikulären Herzfunktion nach direkter Injektion oder Mobilisierung von Knochenmarkzellen gefunden. Diese Befunde stellen die Basis für eine zelluläre Ersatztherapie am Herzen in Frage.

Vereinzelt wurden Knochenmark-abgeleitete Kardiomyozyten im Randbereich des Infarktes detektiert. Durch die gleichzeitige Verwendung zweier transgener Mausstämme konnte hier zweifelsfrei demonstriert werden, daß diese Zellen ausnahmslos durch Fusion einer nativen mit einer transplantierten Zelle entstanden waren. Durch diese Erkenntnisse über den biologischen Mechanismus können viele kontrovers diskutierte Differenzierungsstudien erklärt werden.

Ein überraschender und für die Klinik bedeutender Befund dieser Studie war die Entdeckung massiver Kalkablagerungen in den Infarktarealen nach Transplantation von Gesamtknochenmark und mesenchymalen Stammzellen. Als Ursache dieser Kalzifizierungen wurde eine Knochenbildung durch die Differenzierung der eingebrachten Zellen zu Osteoblasten immunhistochemisch nachgewiesen. Die

Verwendung unterschiedlicher Zellpopulationen und vor allem die Mobilisierungsexperimente, in denen hämatopoetische, nicht aber mesenchymale Zellen in das periphere Blut freigesetzt wurden, identifizierten eindeutig die MSCs als die dafür verantwortliche Zellfraktion.

Das umgebende Milieu im Infarktgewebe reicht alleine demnach nicht aus, um eine Herzdifferenzierung der Knochenmarkzellen zu initiieren. Vielmehr entwickeln sich die transplantierten Zellen gemäß ihrer natürlichen Bestimmung zu Blut- und Knochenzellen. Das birgt zumindest im Falle einer Transplantation mesenchymaler Stammzellen erhebliche Risiken für die Patienten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen somit die biologische Grundlage und die Sicherheit einer zellulären Ersatztherapie des Herzinfarktes mit Knochenmark-abgeleiteten Zellen in Frage. Besonders in Anbetracht einer fehlenden Funktionsverbesserung ist die weitere klinische Anwendung dieser Behandlungsmethode zumindest zweifelhaft.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abbate, A, Santini, D, Biondi-Zoccai, GG, Scarpa, S, Vasaturo, F, Liuzzo, G, Bussani, R, Silvestri, F, Baldi, F, Crea, F, Biasucci, LM und Baldi, A. 2004. Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) expression at the site of recent myocardial infarction: friend or foe? *Heart* 90(4): 440-443.
- Abedi, M, Greer, DA, Colvin, GA, Demers, DA, Dooner, MS, Harpel, JA, Pimentel, J, Menon, MK und Quesenberry, PJ. 2004. Tissue injury in marrow transdifferentiation. *Blood Cells Mol Dis* 32(1): 42-46.
- Abkowitz, JL, Catlin, SN, McCallie, MT und Gutter, P. 2002. Evidence that the number of hematopoietic stem cells per animal is conserved in mammals. *Blood* 100(7): 2665-2667.
- Abkowitz, JL, Robinson, AE, Kale, S, Long, MW und Chen, J. 2003. Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure. *Blood* 102(4): 1249-1253.
- Agbulut, O, Menot, ML, Li, Z, Marotte, F, Paulin, D, Hagege, AA, Chomienne, C, Samuel, JL und Menasche, P. 2003. Temporal patterns of bone marrow cell differentiation following transplantation in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 58(2): 451-459.
- Alvarez-Dolado, M, Pardal, R, Garcia-Verdugo, JM, Fike, JR, Lee, HO, Pfeffer, K, Lois, C, Morrison, SJ und Alvarez-Buylla, A. 2003. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425(6961): 968-973.
- Amit, M, Carpenter, MK, Inokuma, MS, Chiu, CP, Harris, CP, Waknitz, MA, Itskovitz-Eldor, J und Thomson, JA. 2000. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 227(2): 271-278.
- Anderson, DJ, Gage, FH und Weissman, IL. 2001. Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med* 7(4): 393-395.
- Armstrong, MT, Lee, DY und Armstrong, PB. 2000. Regulation of proliferation of the fetal myocardium. *Dev Dyn* 219(2): 226-236.
- Asahara, T, Masuda, H, Takahashi, T, Kalka, C, Pastore, C, Silver, M, Kearne, M, Magner, M und Isner, JM. 1999. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85(3): 221-228.
- Asahara, T, Murohara, T, Sullivan, A, Silver, M, van der, ZR, Li, T, Witzenbichler, B, Schatteman, G und Isner, JM. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275(5302): 964-967.

- Askari, AT, Unzek, S, Popovic, ZB, Goldman, CK, Forudi, F, Kiedrowski, M, Rovner, A, Ellis, SG, Thomas, JD, DiCorleto, PE, Topol, EJ und Penn, MS. 2003. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 362(9385): 697-703.
- Assmus, B, Schachinger, V, Teupe, C, Britten, M, Lehmann, R, Dobert, N, Grunwald, F, Aicher, A, Urbich, C, Martin, H, Hoelzer, D, Dimmeler, S und Zeiher, AM. 2002b. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 106(24): 3009-3017.
- Assmus, B, Schachinger, V, Teupe, C, Britten, M, Lehmann, R, Dobert, N, Grunwald, F, Aicher, A, Urbich, C, Martin, H, Hoelzer, D, Dimmeler, S und Zeiher, AM. 2002a. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 106(24): 3009-3017.
- Awad, HA, Butler, DL, Boivin, GP, Smith, FN, Malaviya, P, Huibregtse, B und Caplan, AI. 1999. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng* 5(3): 267-277.
- Bachoud-Levi, A, Bourdet, C, Brugieres, P, Nguyen, JP, Grandmougin, T, Haddad, B, Jeny, R, Bartolomeo, P, Boisse, MF, Barba, GD, Degos, JD, Ergis, AM, Lefaucheur, JP, Lisovski, F, Pailhous, E, Remy, P, Palfi, S, Defer, GL, Cesaro, P, Hantraye, P und Peschanski, M. 2000. Safety and tolerability assessment of intrastriatal neural allografts in five patients with Huntington's disease. *Exp Neurol* 161(1): 194-202.
- Baksh, D, Song, L und Tuan, RS. 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 8(3): 301-316.
- Balsam, LB, Wagers, AJ, Christensen, JL, Kofidis, T, Weissman, IL und Robbins, RC. 2004. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 428(6983): 668-673.
- Barbash, IM, Chouraqui, P, Baron, J, Feinberg, MS, Etzion, S, Tessone, A, Miller, L, Guetta, E, Zipori, D, Kedes, LH, Kloner, RA und Leor, J. 2003. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 108(7): 863-868.
- Baum, CM, Weissman, IL, Tsukamoto, AS, Buckle, AM und Peault, B. 1992. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(7): 2804-2808.
- Bayes-Genis, A, Salido, M, Sole, RF, Puig, M, Brossa, V, Camprecios, M, Corominas, JM, Marinoso, ML, Baro, T, Vela, MC, Serrano, S, Padro, JM, Bayes de, LA und Cinca, J. 2002. Host cell-derived cardiomyocytes in sex-mismatch cardiac allografts. *Cardiovasc Res* 56(3): 404-410.

- Beck, GR, Jr., Zerler, B und Moran, E. 2000. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(15): 8352-8357.
- Behfar, A, Zingman, LV, Hodgson, DM, Rauzier, JM, Kane, GC, Terzic, A und Puceat, M. 2002. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *FASEB J* 16(12): 1558-1566.
- Bel, A, Messas, E, Agbulut, O, Richard, P, Samuel, JL, Bruneval, P, Hagege, AA und Menasche, P. 2003. Transplantation of autologous fresh bone marrow into infarcted myocardium: a word of caution. *Circulation* 108 Suppl 1: II247-II252.
- Beltrami, AP, Barlucchi, L, Torella, D, Baker, M, Limana, F, Chimenti, S, Kasahara, H, Rota, M, Musso, E, Urbanek, K, Leri, A, Kajstura, J, Nadal-Ginard, B und Anversa, P. 2003. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114(6): 763-776.
- Beltrami, AP, Urbanek, K, Kajstura, J, Yan, SM, Finato, N, Bussani, R, Nadal-Ginard, B, Silvestri, F, Leri, A, Beltrami, CA und Anversa, P. 2001. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 344(23): 1750-1757.
- Beresford, JN, Bennett, JH, Devlin, C, Leboy, PS und Owen, ME. 1992. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci* 102 ( Pt 2): 341-351.
- Bertani, N, Malatesta, P, Volpi, G, Sonogo, P und Perris, R. 2005. Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited: analysis by immunostaining, time-lapse video and microarray. *J Cell Sci* 118(Pt 17): 3925-3936.
- Bhattacharya, V, McSweeney, PA, Shi, Q, Bruno, B, Ishida, A, Nash, R, Storb, RF, Sauvage, LR, Hammond, WP und Wu, MH. 2000. Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34(+) bone marrow cells. *Blood* 95(2): 581-585.
- Bittira, B, Kuang, JQ, Al-Khalidi, A, Shum-Tim, D und Chiu, RC. 2002. In vitro preprogramming of marrow stromal cells for myocardial regeneration. *Ann Thorac Surg* 74(4): 1154-1159.
- Bittira, B, Shum-Tim, D, Al-Khalidi, A und Chiu, RC. 2003. Mobilization and homing of bone marrow stromal cells in myocardial infarction. *Eur J Cardiothorac Surg* 24(3): 393-398.
- Bjornson, CR, Rietze, RL, Reynolds, BA, Magli, MC und Vescovi, AL. 1999. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283(5401): 534-537.
- Bloom, S und Peric-Golia, L. 1989. Geographic variation in the incidence of myocardial calcification associated with acute myocardial infarction. *Hum Pathol* 20(8): 726-731.

- Boheler, KR, Czyz, J, Tweedie, D, Yang, HT, Anisimov, SV und Wobus, AM. 2002. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res* 91(3): 189-201.
- Bonyadi, M, Waldman, SD, Liu, D, Aubin, JE, Grynepas, MD und Stanford, WL. 2003. Mesenchymal progenitor self-renewal deficiency leads to age-dependent osteoporosis in Sca-1/Ly-6A null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10): 5840-5845.
- Braunwald, E und Pfeffer, MA. 1991. Ventricular enlargement and remodeling following acute myocardial infarction: mechanisms and management. *Am J Cardiol* 68(14): 1D-6D.
- Brazelton, TR, Rossi, FM, Keshet, GI und Blau, HM. 2000. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290(5497): 1775-1779.
- Bruder, SP, Fink, DJ und Caplan, AI. 1994. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* 56(3): 283-294.
- Bruder, SP, Jaiswal, N und Haynesworth, SE. 1997. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64(2): 278-294.
- Bruder, SP, Jaiswal, N, Ricalton, NS, Mosca, JD, Kraus, KH und Kadiyala, S. 1998. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res* (355 Suppl): S247-S256.
- Cai, CL, Liang, X, Shi, Y, Chu, PH, Pfaff, SL, Chen, J und Evans, S. 2003. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell* 5(6): 877-889.
- Camargo, FD, Green, R, Capetanaki, Y, Jackson, KA und Goodell, MA. 2003. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat Med* 9(12): 1520-1527.
- Caplan, AI. 1991. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9(5): 641-650.
- Chalfie, M, Tu, Y, Euskirchen, G, Ward, WW und Prasher, DC. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263(5148): 802-805.
- Chang, SC, Chuang, H, Chen, YR, Yang, LC, Chen, JK, Mardini, S, Chung, HY, Lu, YL, Ma, WC und Lou, J. 2004. Cranial repair using BMP-2 gene engineered bone marrow stromal cells. *J Surg Res* 119(1): 85-91.
- Chen, EH und Olson, EN. 2005. Unveiling the mechanisms of cell-cell fusion. *Science* 308(5720): 369-373.

- Chen, J, Zhang, ZG, Li, Y, Wang, L, Xu, YX, Gautam, SC, Lu, M, Zhu, Z und Chopp, M. 2003. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ Res* 92(6): 692-699.
- Chen, SL, Fang, WW, Ye, F, Liu, YH, Qian, J, Shan, SJ, Zhang, JJ, Chunhua, RZ, Liao, LM, Lin, S und Sun, JP. 2004. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 94(1): 92-95.
- Cheng, W, Kajstura, J, Nitahara, JA, Li, B, Reiss, K, Liu, Y, Clark, WA, Krajewski, S, Reed, JC, Olivetti, G und Anversa, P. 1996. Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. *Exp Cell Res* 226(2): 316-327.
- Chien, KR. 2004. Stem cells: lost in translation. *Nature* 428(6983): 607-608.
- Chiu, RC, Zibaitis, A und Kao, RL. 1995. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg* 60(1): 12-18.
- Clarke, DL, Johansson, CB, Wilbertz, J, Veress, B, Nilsson, E, Karlstrom, H, Lendahl, U und Frisen, J. 2000. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 288(5471): 1660-1663.
- Cohen, BE, Benaim, G, Ruiz, MC und Michelangeli, F. 1990. Increased calcium permeability is not responsible for the rapid lethal effects of amphotericin B on *Leishmania* sp. *FEBS Lett* 259(2): 286-288.
- Colter, DC, Class, R, DiGirolamo, CM und Prockop, DJ. 2000. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7): 3213-3218.
- Conget, PA und Minguell, JJ. 1999. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 181(1): 67-73.
- Constantinides, PG, Jones, PA und Gevers, W. 1977. Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. *Nature* 267(5609): 364-366.
- Davani, S, Marandin, A, Mersin, N, Royer, B, Kantelip, B, Herve, P, Etievent, JP und Kantelip, JP. 2003. Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. *Circulation* 108 Suppl 1: II253-II258.
- Dawn, B, Stein, AB, Urbanek, K, Rota, M, Whang, B, Rastaldo, R, Torella, D, Tang, XL, Rezazadeh, A, Kajstura, J, Leri, A, Hunt, G, Varma, J, Prabhu, SD, Anversa, P und Bolli, R. 2005. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(10): 3766-3771.
- Deans, RJ und Moseley, AB. 2000. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 28(8): 875-884.

- Deb, A, Wang, S, Skelding, KA, Miller, D, Simper, D und Caplice, NM. 2003. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation* 107(9): 1247-1249.
- Deten, A, Volz, HC, Clamors, S, Leiblein, S, Briest, W, Marx, G und Zimmer, HG. 2005. Hematopoietic stem cells do not repair the infarcted mouse heart. *Cardiovasc Res* 65(1): 52-63.
- Devine, SM, Cobbs, C, Jennings, M, Bartholomew, A und Hoffman, R. 2003. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* 101(8): 2999-3001.
- DiGirolamo, CM, Stokes, D, Colter, D, Phinney, DG, Class, R und Prockop, DJ. 1999. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 107(2): 275-281.
- Dimmeler, S, Zeiher, AM und Schneider, MD. 2005. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest* 115(3): 572-583.
- Doetschman, TC, Eistetter, H, Katz, M, Schmidt, W und Kemler, R. 1985. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 87: 27-45.
- Dormady, SP, Bashayan, O, Dougherty, R, Zhang, XM und Basch, RS. 2001. Immortalized multipotential mesenchymal cells and the hematopoietic microenvironment. *J Hematother Stem Cell Res* 10(1): 125-140.
- El Oakley, RM, Ooi, OC, Bongso, A und Yacoub, MH. 2001. Myocyte transplantation for myocardial repair: a few good cells can mend a broken heart. *Ann Thorac Surg* 71(5): 1724-1733.
- Ema, H, Takano, H, Sudo, K und Nakauchi, H. 2000. In vitro self-renewal division of hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 192(9): 1281-1288.
- Erdo, F, Buhrle, C, Blunk, J, Hoehn, M, Xia, Y, Fleischmann, B, Focking, M, Kustermann, E, Kolossov, E, Hescheler, J, Hossmann, KA und Trapp, T. 2003. Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 23(7): 780-785.
- Etzion, S, Battler, A, Barbash, IM, Cagnano, E, Zarin, P, Granot, Y, Kedes, LH, Kloner, RA und Leor, J. 2001. Influence of embryonic cardiomyocyte transplantation on the progression of heart failure in a rat model of extensive myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 33(7): 1321-1330.
- Evans, MJ und Kaufman, MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292(5819): 154-156.

- Fernandez-Aviles, F, San Roman, JA, Garcia-Frade, J, Fernandez, ME, Penarrubia, MJ, de la, FL, Gomez-Bueno, M, Cantalapiedra, A, Fernandez, J, Gutierrez, O, Sanchez, PL, Hernandez, C, Sanz, R, Garcia-Sancho, J und Sanchez, A. 2004. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res* 95(7): 742-748.
- Ferrari, G, Cusella-De, AG, Coletta, M, Paolucci, E, Stornaiuolo, A, Cossu, G und Mavilio, F. 1998. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279(5356): 1528-1530.
- Fleischmann, M, Bloch, W, Kolossov, E, Andressen, C, Muller, M, Brem, G, Hescheler, J, Addicks, K und Fleischmann, BK. 1998. Cardiac specific expression of the green fluorescent protein during early murine embryonic development. *FEBS Lett* 440(3): 370-376.
- Freed, CR, Breeze, RE, Rosenberg, NL, Schneck, SA, Wells, TH, Barrett, JN, Grafton, ST, Huang, SC, Eidelberg, D und Rottenberg, DA. 1990. Transplantation of human fetal dopamine cells for Parkinson's disease. Results at 1 year. *Arch Neurol* 47(5): 505-512.
- Freeman, TB, Cicchetti, F, Hauser, RA, Deacon, TW, Li, XJ, Hersch, SM, Nauert, GM, Sanberg, PR, Kordower, JH, Saporta, S und Isacson, O. 2000. Transplanted fetal striatum in Huntington's disease: phenotypic development and lack of pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25): 13877-13882.
- Friedenstein, AJ, Piatetzky-Shapiro, II und Petrakova, KV. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 16(3): 381-390.
- Fukuda, K. 2001. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artif Organs* 25(3): 187-193.
- Gao, J, Dennis, JE, Muzic, RF, Lundberg, M und Caplan, AI. 2001. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 169(1): 12-20.
- Gill, M, Dias, S, Hattori, K, Rivera, ML, Hicklin, D, Witte, L, Girardi, L, Yurt, R, Himel, H und Rafii, S. 2001. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)/AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res* 88(2): 167-174.
- Gnecchi, M, He, H, Liang, OD, Melo, LG, Morello, F, Mu, H, Noiseux, N, Zhang, L, Pratt, RE, Ingwall, JS und Dzau, VJ. 2005. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* 11(4): 367-368.
- Grant, MB, May, WS, Caballero, S, Brown, GA, Guthrie, SM, Mames, RN, Byrne, BJ, Vaught, T, Spoerri, PE, Peck, AB und Scott, EW. 2002. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 8(6): 607-612.

- Gronthos, S, Graves, SE, Ohta, S und Simmons, PJ. 1994. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 84(12): 4164-4173.
- Hauschka, PV. 1986. Osteocalcin: the vitamin K-dependent Ca<sup>2+</sup>-binding protein of bone matrix. *Haemostasis* 16(3-4): 258-272.
- Haynesworth, SE, Baber, MA und Caplan, AI. 1996. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* 166(3): 585-592.
- Heim, R, Prasher, DC und Tsien, RY. 1994. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(26): 12501-12504.
- Herrerros, J, Prosper, F, Perez, A, Gavira, JJ, Garcia-Velloso, MJ, Barba, J, Sanchez, PL, Canizo, C, Rabago, G, Marti-Climent, JM, Hernandez, M, Lopez-Holgado, N, Gonzalez-Santos, JM, Martin-Luengo, C und Alegria, E. 2003. Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 24(22): 2012-2020.
- Hescheler, J, Fleischmann, BK, Lentini, S, Maltsev, VA, Rohwedel, J, Wobus, AM und Addicks, K. 1997. Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res* 36(2): 149-162.
- Hill, JM, Dick, AJ, Raman, VK, Thompson, RB, Yu, ZX, Hinds, KA, Pessanha, BS, Guttman, MA, Varney, TR, Martin, BJ, Dunbar, CE, McVeigh, ER und Lederman, RJ. 2003. Serial cardiac magnetic resonance imaging of injected mesenchymal stem cells. *Circulation* 108(8): 1009-1014.
- Hocht-Zeisberg, E, Kahnert, H, Guan, K, Wulf, G, Hemmerlein, B, Schlott, T, Tenderich, G, Korfer, R, Raute-Kreinsen, U und Hasenfuss, G. 2004. Cellular repopulation of myocardial infarction in patients with sex-mismatched heart transplantation. *Eur Heart J* 25(9): 749-758.
- Horwitz, EM, Prockop, DJ, Fitzpatrick, LA, Koo, WW, Gordon, PL, Neel, M, Sussman, M, Orchard, P, Marx, JC, Pyeritz, RE und Brenner, MK. 1999. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 5(3): 309-313.
- Horwitz, EM, Prockop, DJ, Gordon, PL, Koo, WW, Fitzpatrick, LA, Neel, MD, McCarville, ME, Orchard, PJ, Pyeritz, RE und Brenner, MK. 2001. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood* 97(5): 1227-1231.
- Huang, WY, Aramburu, J, Douglas, PS und Izumo, S. 2000. Transgenic expression of green fluorescence protein can cause dilated cardiomyopathy. *Nat Med* 6(5): 482-483.

- Hutcheson, KA, Atkins, BZ, Hueman, MT, Hopkins, MB, Glower, DD und Taylor, DA. 2000. Comparison of benefits on myocardial performance of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and fibroblasts. *Cell Transplant* 9(3): 359-368.
- Isner, JM und Asahara, T. 1999. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 103(9): 1231-1236.
- Iwanaga, K, Takano, H, Ohtsuka, M, Hasegawa, H, Zou, Y, Qin, Y, Odaka, K, Hiroshima, K, Tadokoro, H und Komuro, I. 2004. Effects of G-CSF on cardiac remodeling after acute myocardial infarction in swine. *Biochem Biophys Res Commun* 325(4): 1353-1359.
- Izumi, M, Fujio, Y, Kunisada, K, Negoro, S, Tone, E, Funamoto, M, Osugi, T, Oshima, Y, Nakaoka, Y, Kishimoto, T, Yamauchi-Takahara, K und Hirota, H. 2001. Bone morphogenetic protein-2 inhibits serum deprivation-induced apoptosis of neonatal cardiac myocytes through activation of the Smad1 pathway. *J Biol Chem* 276(33): 31133-31141.
- Jackson, KA, Majka, SM, Wang, H, Pocius, J, Hartley, CJ, Majesky, MW, Entman, ML, Michael, LH, Hirschi, KK und Goodell, MA. 2001. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107(11): 1395-1402.
- Jackson, KA, Snyder, DS und Goodell, MA. 2004. Skeletal muscle fiber-specific green autofluorescence: potential for stem cell engraftment artifacts. *Stem Cells* 22(2): 180-187.
- Jaiswal, N, Haynesworth, SE, Caplan, AI und Bruder, SP. 1997. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64(2): 295-312.
- Janssens, S, Dubois, C, Bogaert, J, Theunissen, K, Deroose, C, Desmet, W, Kalantzi, M, Herbots, L, Sinnaeve, P, Dens, J, Maertens, J, Rademakers, F, Dymarkowski, S, Gheysens, O, Van, CJ, Bormans, G, Nuyts, J, Belmans, A, Mortelmans, L, Boogaerts, M und Van de, WF. 2006. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 367(9505): 113-121.
- Javazon, EH, Colter, DC, Schwarz, EJ und Prockop, DJ. 2001. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells* 19(3): 219-225.
- Jiang, Y, Henderson, D, Blackstad, M, Chen, A, Miller, RF und Verfaillie, CM. 2003. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1: 11854-11860.
- Jiang, Y, Jahagirdar, BN, Reinhardt, RL, Schwartz, RE, Keene, CD, Ortiz-Gonzalez, XR, Reyes, M, Lenvik, T, Lund, T, Blackstad, M, Du, J, Aldrich, S, Lisberg, A, Low, WC, Largaespada, DA und Verfaillie, CM. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418(6893): 41-49.

- Johnstone, B, Hering, TM, Caplan, AI, Goldberg, VM und Yoo, JU. 1998. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238(1): 265-272.
- Jugdutt, BI, Joljart, MJ und Khan, MI. 1996. Rate of collagen deposition during healing and ventricular remodeling after myocardial infarction in rat and dog models. *Circulation* 94(1): 94-101.
- Kadowaki, A, Tsukazaki, T, Hirata, K, Shibata, Y, Okubo, Y, Bessho, K, Komori, T, Yoshida, N und Yamaguchi, A. 2004. Isolation and characterization of a mesenchymal cell line that differentiates into osteoblasts in response to BMP-2 from calvariae of GFP transgenic mice. *Bone* 34(6): 993-1003.
- Kajstura, J, Leri, A, Finato, N, Di, LC, Beltrami, CA und Anversa, P. 1998. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(15): 8801-8805.
- Kalka, C, Masuda, H, Takahashi, T, Kalka-Moll, WM, Silver, M, Kearney, M, Li, T, Isner, JM und Asahara, T. 2000. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7): 3422-3427.
- Kawamoto, A, Gwon, HC, Iwaguro, H, Yamaguchi, JI, Uchida, S, Masuda, H, Silver, M, Ma, H, Kearney, M, Isner, JM und Asahara, T. 2001. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 103(5): 634-637.
- Kehat, I, Kenyagin-Karsenti, D, Snir, M, Segev, H, Amit, M, Gepstein, A, Livne, E, Binah, O, Itskovitz-Eldor, J und Gepstein, L. 2001. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 108(3): 407-414.
- Kelly, SJ. 1977. Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. *J Exp Zool* 200(3): 365-376.
- Kessler, PD und Byrne, BJ. 1999. Myoblast cell grafting into heart muscle: cellular biology and potential applications. *Annu Rev Physiol* 61: 219-242.
- Kinnaird, T, Stabile, E, Burnett, MS, Shou, M, Lee, CW, Barr, S, Fuchs, S und Epstein, SE. 2004. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 109(12): 1543-1549.
- Klug, MG, Soonpaa, MH, Koh, GY und Field, LJ. 1996. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 98(1): 216-224.
- Kocher, AA, Schuster, MD, Szabolcs, MJ, Takuma, S, Burkhoff, D, Wang, J, Homma, S, Edwards, NM und Itescu, S. 2001. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 7(4): 430-436.

- Koh, GY, Soonpaa, MH, Klug, MG, Pride, HP, Cooper, BJ, Zipes, DP und Field, LJ. 1995. Stable fetal cardiomyocyte grafts in the hearts of dystrophic mice and dogs. *J Clin Invest* 96(4): 2034-2042.
- Kolossov, E, Bostani, T, Roell, W, Breitbart, M, Pillekamp, F, Nygren, JM, Sasse, P, Rubenchik, O, Fries, JW, Wenzel, D, Geisen, C, Xia, Y, Lu, Z, Duan, Y, Kettenhofen, R, Jovinge, S, Bloch, W, Bohlen, H, Welz, A, Hescheler, J, Jacobsen, SE und Fleischmann, BK. 2006. Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *J Exp Med* 203(10): 2315-2327.
- Kolossov, E, Fleischmann, BK, Liu, Q, Bloch, W, Viatchenko-Karpinski, S, Manzke, O, Ji, GJ, Bohlen, H, Addicks, K und Hescheler, J. 1998. Functional characteristics of ES cell-derived cardiac precursor cells identified by tissue-specific expression of the green fluorescent protein. *J Cell Biol* 143(7): 2045-2056.
- Kondo, M, Wagers, AJ, Manz, MG, Prohaska, SS, Scherer, DC, Beilhack, GF, Shizuru, JA und Weissman, IL. 2003. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol* 21: 759-806.
- Konieczny, SF und Emerson, CP, Jr. 1984. 5-Azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineages from 10T1/2 cells: evidence for regulatory genes controlling determination. *Cell* 38(3): 791-800.
- Kopen, GC, Prockop, DJ und Phinney, DG. 1999. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(19): 10711-10716.
- Krause, DS, Theise, ND, Collector, MI, Henegariu, O, Hwang, S, Gardner, R, Neutzel, S und Sharkis, SJ. 2001. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105(3): 369-377.
- Kronenwett, R, Martin, S und Haas, R. 2000. The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells. *Stem Cells* 18(5): 320-330.
- Kuo, CK, Li, WJ, Mauck, RL und Tuan, RS. 2006. Cartilage tissue engineering: its potential and uses. *Curr Opin Rheumatol* 18(1): 64-73.
- Laflamme, MA und Murry, CE. 2005. Regenerating the heart. *Nat Biotechnol* 23(7): 845-856.
- Laflamme, MA, Myerson, D, Saffitz, JE und Murry, CE. 2002. Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. *Circ Res* 90(6): 634-640.

- Lapidos, KA, Chen, YE, Earley, JU, Heydemann, A, Huber, JM, Chien, M, Ma, A und McNally, EM. 2004. Transplanted hematopoietic stem cells demonstrate impaired sarcoglycan expression after engraftment into cardiac and skeletal muscle. *J Clin Invest* 114(11): 1577-1585.
- Laugwitz, KL, Moretti, A, Lam, J, Gruber, P, Chen, Y, Woodard, S, Lin, LZ, Cai, CL, Lu, MM, Reth, M, Platoshyn, O, Yuan, JX, Evans, S und Chien, KR. 2005. Postnatal is11+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 433(7026): 647-653.
- Leobon, B, Garcin, I, Menasche, P, Vilquin, JT, Audinat, E und Charpak, S. 2003. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(13): 7808-7811.
- Leor, J, Patterson, M, Quinones, MJ, Kedes, LH und Kloner, RA. 1996. Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium? *Circulation* 94(9 Suppl): II332-II336.
- Liechty, KW, MacKenzie, TC, Shaaban, AF, Radu, A, Moseley, AM, Deans, R, Marshak, DR und Flake, AW. 2000. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 6(11): 1282-1286.
- Lindvall, O und Bjorklund, A. 2004. Cell therapy in Parkinson's disease. *NeuroRx* 1(4): 382-393.
- Lindvall, O, Rehnström, S, Brundin, P, Gustavii, B, Astedt, B, Widner, H, Lindholm, T, Bjorklund, A, Leenders, KL, Rothwell, JC und . 1989. Human fetal dopamine neurons grafted into the striatum in two patients with severe Parkinson's disease. A detailed account of methodology and a 6-month follow-up. *Arch Neurol* 46(6): 615-631.
- Lund-Johansen, F, Houck, D, Hoffman, R, Davis, K und Olweus, J. 1999. Primitive human hematopoietic progenitor cells express receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Exp Hematol* 27(4): 762-772.
- Lutgens, E, Daemen, MJ, de Muinck, ED, Debets, J, Leenders, P und Smits, JF. 1999. Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes. *Cardiovasc Res* 41(3): 586-593.
- Majumdar, MK, Banks, V, Peluso, DP und Morris, EA. 2000. Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells. *J Cell Physiol* 185(1): 98-106.
- Majumdar, MK, Thiede, MA, Mosca, JD, Moorman, M und Gerson, SL. 1998. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 176(1): 57-66.

- Makino, S, Fukuda, K, Miyoshi, S, Konishi, F, Kodama, H, Pan, J, Sano, M, Takahashi, T, Hori, S, Abe, H, Hata, J, Umezawa, A und Ogawa, S. 1999. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 103(5): 697-705.
- Makkar, RR, Lill, M und Chen, PS. 2003. Stem cell therapy for myocardial repair: is it arrhythmogenic? *J Am Coll Cardiol* 42(12): 2070-2072.
- Maltsev, VA, Rohwedel, J, Hescheler, J und Wobus, AM. 1993. Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev* 44(1): 41-50.
- Mangi, AA, Noiseux, N, Kong, D, He, H, Rezvani, M, Ingwall, JS und Dzau, VJ. 2003. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med* 9(9): 1195-1201.
- Marelli, D, Desrosiers, C, el-Alfy, M, Kao, RL und Chiu, RC. 1992. Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell Transplant* 1(6): 383-390.
- Martin, CM, Meeson, AP, Robertson, SM, Hawke, TJ, Richardson, JA, Bates, S, Goetsch, SC, Gallardo, TD und Garry, DJ. 2004. Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol* 265(1): 262-275.
- Matsushita, T, Oyamada, M, Kurata, H, Masuda, S, Takahashi, A, Emmoto, T, Shiraishi, I, Wada, Y, Oka, T und Takamatsu, T. 1999. Formation of cell junctions between grafted and host cardiomyocytes at the border zone of rat myocardial infarction. *Circulation* 100(19 Suppl): II262-II268.
- Meirelles, LS und Nardi, NB. 2003. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol* 123(4): 702-711.
- Melo, LG, Pachori, AS, Kong, D, Gneccchi, M, Wang, K, Pratt, RE und Dzau, VJ. 2004. Gene and cell-based therapies for heart disease. *FASEB J* 18(6): 648-663.
- Menasche, P, Hagege, AA, Scorsin, M, Pouzet, B, Desnos, M, Duboc, D, Schwartz, K, Vilquin, JT und Marolleau, JP. 2001. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 357(9252): 279-280.
- Menasche, P, Hagege, AA, Vilquin, JT, Desnos, M, Abergel, E, Pouzet, B, Bel, A, Sarateanu, S, Scorsin, M, Schwartz, K, Bruneval, P, Benbunan, M, Marolleau, JP und Duboc, D. 2003. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 41(7): 1078-1083.
- Mezey, E, Chandross, KJ, Harta, G, Maki, RA und McKercher, SR. 2000. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290(5497): 1779-1782.

- Minatoguchi, S, Takemura, G, Chen, XH, Wang, N, Uno, Y, Koda, M, Arai, M, Misao, Y, Lu, C, Suzuki, K, Goto, K, Komada, A, Takahashi, T, Kosai, K, Fujiwara, T und Fujiwara, H. 2004. Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation* 109(21): 2572-2580.
- Minguell, JJ, Erices, A und Conget, P. 2001. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 226(6): 507-520.
- Molineux, G, McCrea, C, Yan, XQ, Kerzic, P und McNiece, I. 1997. Flt-3 ligand synergizes with granulocyte colony-stimulating factor to increase neutrophil numbers and to mobilize peripheral blood stem cells with long-term repopulating potential. *Blood* 89(11): 3998-4004.
- Moore, KA, Ema, H und Lemischka, IR. 1997. In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells. *Blood* 89(12): 4337-4347.
- Morrison, SJ, Wright, DE und Weissman, IL. 1997. Cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor induces hematopoietic stem cells to proliferate prior to mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(5): 1908-1913.
- Mullens, W, Keyser, JD und Droogne, W. 2006. Images in cardiology. Myocardial calcification: a rare cause of diastolic dysfunction. *Heart* 92(2): 195.
- Muller, P, Pfeiffer, P, Koglin, J, Schafers, HJ, Seeland, U, Janzen, I, Urbschat, S und Bohm, M. 2002. Cardiomyocytes of noncardiac origin in myocardial biopsies of human transplanted hearts. *Circulation* 106(1): 31-35.
- Muller-Ehmsen, J, Whittaker, P, Kloner, RA, Dow, JS, Sakoda, T, Long, TI, Laird, PW und Kedes, L. 2002. Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 34(2): 107-116.
- Muraglia, A, Cancedda, R und Quarto, R. 2000. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 113 ( Pt 7): 1161-1166.
- Murry, CE, Field, LJ und Menasche, P. 2005. Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point. *Circulation* 112(20): 3174-3183.
- Murry, CE, Soonpaa, MH, Reinecke, H, Nakajima, H, Nakajima, HO, Rubart, M, Pasumarthi, KB, Virag, JI, Bartelmez, SH, Poppa, V, Bradford, G, Dowell, JD, Williams, DA und Field, LJ. 2004. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428(6983): 664-668.
- Murry, CE, Wiseman, RW, Schwartz, SM und Hauschka, SD. 1996. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 98(11): 2512-2523.

- Nag, AC. 1980. Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios* 28(109): 41-61.
- Nagaya, N, Fujii, T, Iwase, T, Ohgushi, H, Itoh, T, Uematsu, M, Yamagishi, M, Mori, H, Kangawa, K und Kitamura, S. 2004. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287(6): H2670-H2676.
- Nagaya, N, Kangawa, K, Itoh, T, Iwase, T, Murakami, S, Miyahara, Y, Fujii, T, Uematsu, M, Ohgushi, H, Yamagishi, M, Tokudome, T, Mori, H, Miyatake, K und Kitamura, S. 2005. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 112(8): 1128-1135.
- Negrin, RS, Atkinson, K, Leemhuis, T, Hanania, E, Juttner, C, Tierney, K, Hu, WW, Johnston, LJ, Shizurn, JA, Stockerl-Goldstein, KE, Blume, KG, Weissman, IL, Bower, S, Baynes, R, Dansey, R, Karanes, C, Peters, W und Klein, J. 2000. Transplantation of highly purified CD34+Thy-1+ hematopoietic stem cells in patients with metastatic breast cancer. *Biol Blood Marrow Transplant* 6(3): 262-271.
- Nian, M, Lee, P, Khaper, N und Liu, P. 2004. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* 94(12): 1543-1553.
- Nir, T und Dor, Y. 2005. How to make pancreatic beta cells--prospects for cell therapy in diabetes. *Curr Opin Biotechnol* 16(5): 524-529.
- Norol, F, Merlet, P, Isnard, R, Sebillon, P, Bonnet, N, Cailliot, C, Carrion, C, Ribeiro, M, Charlotte, F, Pradeau, P, Mayol, JF, Peinnequin, A, Drouet, M, Safsafi, K, Vernant, JP und Herodin, F. 2003. Influence of mobilized stem cells on myocardial infarct repair in a nonhuman primate model. *Blood* 102(13): 4361-4368.
- Nygren, JM, Jovinge, S, Breitbach, M, Sawen, P, Roll, W, Hescheler, J, Taneera, J, Fleischmann, BK und Jacobsen, SE. 2004. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 10(5): 494-501.
- Odorico, JS, Kaufman, DS und Thomson, JA. 2001. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 19(3): 193-204.
- Oh, H, Bradfute, SB, Gallardo, TD, Nakamura, T, Gaussin, V, Mishina, Y, Pocius, J, Michael, LH, Behringer, RR, Garry, DJ, Entman, ML und Schneider, MD. 2003. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(21): 12313-12318.
- Ohtsuka, M, Takano, H, Zou, Y, Toko, H, Akazawa, H, Qin, Y, Suzuki, M, Hasegawa, H, Nakaya, H und Komuro, I. 2004. Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization. *FASEB J* 18(7): 851-853.

- Okabe, M, Ikawa, M, Kominami, K, Nakanishi, T und Nishimune, Y. 1997. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407(3): 313-319.
- Olivetti, G, Capasso, JM, Sonnenblick, EH und Anversa, P. 1990. Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats. *Circ Res* 67(1): 23-34.
- Orlic, D, Kajstura, J, Chimenti, S, Jakoniuk, I, Anderson, SM, Li, B, Pickel, J, McKay, R, Nadal-Ginard, B, Bodine, DM, Leri, A und Anversa, P. 2001a. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410(6829): 701-705.
- Orlic, D, Kajstura, J, Chimenti, S, Limana, F, Jakoniuk, I, Quaini, F, Nadal-Ginard, B, Bodine, DM, Leri, A und Anversa, P. 2001b. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18): 10344-10349.
- Oswald, J, Boxberger, S, Jorgensen, B, Feldmann, S, Ehniger, G, Bornhauser, M und Werner, C. 2004. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 22(3): 377-384.
- Owen, TA, Aronow, M, Shalhoub, V, Barone, LM, Wilming, L, Tassinari, MS, Kennedy, MB, Pockwinse, S, Lian, JB und Stein, GS. 1990. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 143(3): 420-430.
- Pagani, FD, DerSimonian, H, Zawadzka, A, Wetzel, K, Edge, AS, Jacoby, DB, Dinsmore, JH, Wright, S, Aretz, TH, Eisen, HJ und Aaronson, KD. 2003. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol* 41(5): 879-888.
- Peichev, M, Naiyer, AJ, Pereira, D, Zhu, Z, Lane, WJ, Williams, M, Oz, MC, Hicklin, DJ, Witte, L, Moore, MA und Rafii, S. 2000. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95(3): 952-958.
- Peister, A, Mellad, JA, Larson, BL, Hall, BM, Gibson, LF und Prockop, DJ. 2004. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* 103(5): 1662-1668.
- Penn, MS, Zhang, M, Deglurkar, I und Topol, EJ. 2004. Role of stem cell homing in myocardial regeneration. *Int J Cardiol* 95 Suppl 1: S23-S25.
- Pereira, RF, O'Hara, MD, Laptev, AV, Halford, KW, Pollard, MD, Class, R, Simon, D, Livezey, K und Prockop, DJ. 1998. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(3): 1142-1147.

- Peters, NS, Coromilas, J, Severs, NJ und Wit, AL. 1997. Disturbed connexin43 gap junction distribution correlates with the location of reentrant circuits in the epicardial border zone of healing canine infarcts that cause ventricular tachycardia. *Circulation* 95(4): 988-996.
- Pfeffer, MA und Braunwald, E. 1990. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 81(4): 1161-1172.
- Phinney, DG, Kopen, G, Isaacson, RL und Prockop, DJ. 1999. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem* 72(4): 570-585.
- Pittenger, MF, Mackay, AM, Beck, SC, Jaiswal, RK, Douglas, R, Mosca, JD, Moorman, MA, Simonetti, DW, Craig, S und Marshak, DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411): 143-147.
- Pittenger, MF und Martin, BJ. 2004. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 95(1): 9-20.
- Prockop, DJ. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276(5309): 71-74.
- Qi, H, Aguiar, DJ, Williams, SM, La, PA, Pan, W und Verfaillie, CM. 2003. Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(6): 3305-3310.
- Quaini, F, Urbanek, K, Beltrami, AP, Finato, N, Beltrami, CA, Nadal-Ginard, B, Kajstura, J, Leri, A und Anversa, P. 2002. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 346(1): 5-15.
- Rae, J, Cooper, K, Gates, P und Watsky, M. 1991. Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *J Neurosci Methods* 37(1): 15-26.
- Rafii, S, Heissig, B und Hattori, K. 2002. Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors. *Gene Ther* 9(10): 631-641.
- Rainier, S und Feinberg, AP. 1988. Capture and characterization of 5-aza-2'-deoxycytidine-treated C3H/10T1/2 cells prior to transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(17): 6384-6388.
- Rajnoch, C, Chachques, JC, Berrebi, A, Bruneval, P, Benoit, MO und Carpentier, A. 2001. Cellular therapy reverses myocardial dysfunction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 121(5): 871-878.
- Reinecke, H, MacDonald, GH, Hauschka, SD und Murry, CE. 2000. Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *J Cell Biol* 149(3): 731-740.

- Reinecke, H und Murry, CE. 2002. Taking the death toll after cardiomyocyte grafting: a reminder of the importance of quantitative biology. *J Mol Cell Cardiol* 34(3): 251-253.
- Reinecke, H, Zhang, M, Bartosek, T und Murry, CE. 1999. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. *Circulation* 100(2): 193-202.
- Ren, G, Dewald, O und Frangogiannis, NG. 2003. Inflammatory mechanisms in myocardial infarction. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2(3): 242-256.
- Reubinoff, BE, Pera, MF, Fong, CY, Trounson, A und Bongso, A. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18(4): 399-404.
- Reyes, M, Dudek, A, Jahagirdar, B, Koodie, L, Marker, PH und Verfaillie, CM. 2002. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 109(3): 337-346.
- Reyes, M, Lund, T, Lenvik, T, Aguiar, D, Koodie, L und Verfaillie, CM. 2001. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98(9): 2615-2625.
- Reyes, M und Verfaillie, CM. 2001. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 938: 231-233.
- Richards, M, Huibregtse, BA, Caplan, AI, Goulet, JA und Goldstein, SA. 1999. Marrow-derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction. *J Orthop Res* 17(6): 900-908.
- Rickard, DJ, Sullivan, TA, Shenker, BJ, Leboy, PS und Kazhdan, I. 1994. Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol* 161(1): 218-228.
- Robbins, J, Gulick, J, Sanchez, A, Howles, P und Doetschman, T. 1990. Mouse embryonic stem cells express the cardiac myosin heavy chain genes during development in vitro. *J Biol Chem* 265(20): 11905-11909.
- Roell, W, Lu, ZJ, Bloch, W, Siedner, S, Tiemann, K, Xia, Y, Stoecker, E, Fleischmann, M, Bohlen, H, Stehle, R, Kolossov, E, Brem, G, Addicks, K, Pfitzer, G, Welz, A, Hescheler, J und Fleischmann, BK. 2002. Cellular cardiomyoplasty improves survival after myocardial injury. *Circulation* 105(20): 2435-2441.
- Rombouts, WJ und Ploemacher, RE. 2003. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia* 17(1): 160-170.
- Rubart, M, Soonpaa, MH, Nakajima, H und Field, LJ. 2004. Spontaneous and evoked intracellular calcium transients in donor-derived myocytes following intracardiac myoblast transplantation. *J Clin Invest* 114(6): 775-783.

- Rubio, D, Garcia-Castro, J, Martin, MC, de la, FR, Cigudosa, JC, Lloyd, AC und Bernad, A. 2005. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 65(8): 3035-3039.
- Schuldiner, M, Yanuka, O, Itskovitz-Eldor, J, Melton, DA und Benvenisty, N. 2000. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(21): 11307-11312.
- Schwartz, RE, Reyes, M, Koodie, L, Jiang, Y, Blackstad, M, Lund, T, Lenvik, T, Johnson, S, Hu, WS und Verfaillie, CM. 2002. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 109(10): 1291-1302.
- Seale, P und Rudnicki, MA. 2000. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 218(2): 115-124.
- Shake, JG, Gruber, PJ, Baumgartner, WA, Senechal, G, Meyers, J, Redmond, JM, Pittenger, MF und Martin, BJ. 2002. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 73(6): 1919-1925.
- Shi, Q, Rafii, S, Wu, MH, Wijelath, ES, Yu, C, Ishida, A, Fujita, Y, Kothari, S, Mohle, R, Sauvage, LR, Moore, MA, Storb, RF und Hammond, WP. 1998. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92(2): 362-367.
- Shintani, S, Murohara, T, Ikeda, H, Ueno, T, Honma, T, Katoh, A, Sasaki, K, Shimada, T, Oike, Y und Imaizumi, T. 2001. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 103(23): 2776-2779.
- Siminiak, T, Kalawski, R, Fiszer, D, Jerzykowska, O, Rzezniczak, J, Rozwadowska, N und Kurpisz, M. 2004. Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J* 148(3): 531-537.
- Smith, AG. 2001. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 435-462.
- Smith, LG, Weissman, IL und Heimfeld, S. 1991. Clonal analysis of hematopoietic stem-cell differentiation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(7): 2788-2792.
- Smits, PC, van Geuns, RJ, Poldermans, D, Bountiukos, M, Onderwater, EE, Lee, CH, Maat, AP und Serruys, PW. 2003. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J Am Coll Cardiol* 42(12): 2063-2069.
- Soonpaa, MH, Koh, GY, Klug, MG und Field, LJ. 1994. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science* 264(5155): 98-101.

- Spangrude, GJ, Heimfeld, S und Weissman, IL. 1988. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241(4861): 58-62.
- Stamm, C, Westphal, B, Kleine, HD, Petzsch, M, Kittner, C, Klinge, H, Schumichen, C, Nienaber, CA, Freund, M und Steinhoff, G. 2003. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 361(9351): 45-46.
- Stein, GS und Lian, JB. 1993. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev* 14(4): 424-442.
- Strauer, BE, Brehm, M, Zeus, T, Kostering, M, Hernandez, A, Sorg, RV, Kogler, G und Wernet, P. 2002. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 106(15): 1913-1918.
- Sugano, Y, Anzai, T, Yoshikawa, T, Maekawa, Y, Kohno, T, Mahara, K, Naito, K und Ogawa, S. 2005. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates early ventricular expansion after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 65(2): 446-456.
- Takahashi, T, Kalka, C, Masuda, H, Chen, D, Silver, M, Kearney, M, Magner, M, Isner, JM und Asahara, T. 1999. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5(4): 434-438.
- Taylor, DA, Atkins, BZ, Hungspreugs, P, Jones, TR, Reedy, MC, Hutcheson, KA, Glower, DD und Kraus, WE. 1998. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 4(8): 929-933.
- Terada, N, Hamazaki, T, Oka, M, Hoki, M, Mastalerz, DM, Nakano, Y, Meyer, EM, Morel, L, Petersen, BE und Scott, EW. 2002. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416(6880): 542-545.
- Thomson, JA, Itskovitz-Eldor, J, Shapiro, SS, Waknitz, MA, Swiergiel, JJ, Marshall, VS und Jones, JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391): 1145-1147.
- Toma, C, Pittenger, MF, Cahill, KS, Byrne, BJ und Kessler, PD. 2002. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105(1): 93-98.
- Tomita, S, Mickle, DA, Weisel, RD, Jia, ZQ, Tumiati, LC, Allidina, Y, Liu, P und Li, RK. 2002. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 123(6): 1132-1140.
- Tropel, P, Noel, D, Platet, N, Legrand, P, Benabid, AL und Berger, F. 2004. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res* 295(2): 395-406.

- Vacanti, V, Kong, E, Suzuki, G, Sato, K, Canty, JM und Lee, T. 2005. Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. *J Cell Physiol* 205(2): 194-201.
- Van, ZG, Rummel, SA, Koller, MR, Larson, DB, Drubachevsky, I, Palsson, M und Emerson, SG. 1994. Expansion in bioreactors of human progenitor populations from cord blood and mobilized peripheral blood. *Blood Cells* 20(2-3): 482-490.
- Vassilopoulos, G, Wang, PR und Russell, DW. 2003. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 422(6934): 901-904.
- Verfaillie, CM, Schwartz, R, Reyes, M und Jiang, Y. 2003. Unexpected potential of adult stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 996: 231-234.
- Vulliet, PR, Greeley, M, Halloran, SM, MacDonald, KA und Kittleson, MD. 2004. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet* 363(9411): 783-784.
- Wagers, AJ, Sherwood, RI, Christensen, JL und Weissman, IL. 2002. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297(5590): 2256-2259.
- Wagers, AJ und Weissman, IL. 2004. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116(5): 639-648.
- Wakitani, S, Saito, T und Caplan, AI. 1995. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 18(12): 1417-1426.
- Wang, JS, Shum-Tim, D, Chedrawy, E und Chiu, RC. 2001. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg* 122(4): 699-705.
- Wang, JS, Shum-Tim, D, Galipeau, J, Chedrawy, E, Eliopoulos, N und Chiu, RC. 2000. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg* 120(5): 999-1005.
- Wang, X, Willenbring, H, Akkari, Y, Torimaru, Y, Foster, M, Al-Dhalimy, M, Lagasse, E, Finegold, M, Olson, S und Grompe, M. 2003. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422(6934): 897-901.
- Watanabe, E, Smith, DM, Jr., Delcarpio, JB, Sun, J, Smart, FW, Van, MC, Jr. und Claycomb, WC. 1998. Cardiomyocyte transplantation in a porcine myocardial infarction model. *Cell Transplant* 7(3): 239-246.
- Weissman, IL. 2000. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100(1): 157-168.

- Wernig, G, Janzen, V, Schafer, R, Zweyer, M, Knauf, U, Hoegemeier, O, Mundegar, RR, Garbe, S, Stier, S, Franz, T, Wernig, M und Wernig, A. 2005. The vast majority of bone-marrow-derived cells integrated into mdx muscle fibers are silent despite long-term engraftment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(33): 11852-11857.
- Wobus, AM, Wallukat, G und Hescheler, J. 1991. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca<sup>2+</sup> channel blockers. *Differentiation* 48(3): 173-182.
- Wollert, KC, Meyer, GP, Lotz, J, Ringes-Lichtenberg, S, Lippolt, P, Breidenbach, C, Fichtner, S, Korte, T, Hornig, B, Messinger, D, Arseniev, L, Hertenstein, B, Ganser, A und Drexler, H. 2004. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 364(9429): 141-148.
- Woodbury, D, Schwarz, EJ, Prockop, DJ und Black, IB. 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61(4): 364-370.
- Wozney, JM. 1992. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* 32(2): 160-167.
- Xu, W, Zhang, X, Qian, H, Zhu, W, Sun, X, Hu, J, Zhou, H und Chen, Y. 2004. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp Biol Med (Maywood)* 229(7): 623-631.
- Xu, X, Xu, Z, Xu, Y und Cui, G. 2005. Effects of mesenchymal stem cell transplantation on extracellular matrix after myocardial infarction in rats. *Coron Artery Dis* 16(4): 245-255.
- Yan, XQ, Briddell, R, Hartley, C, Stoney, G, Samal, B und McNiece, I. 1994. Mobilization of long-term hematopoietic reconstituting cells in mice by the combination of stem cell factor plus granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 84(3): 795-799.
- Ying, QL, Nichols, J, Evans, EP und Smith, AG. 2002. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416(6880): 545-548.
- Yoon, YS, Park, JS, Tkebuchava, T, Luedeman, C und Losordo, DW. 2004. Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction. *Circulation* 109(25): 3154-3157.
- Zambrowicz, BP, Imamoto, A, Fiering, S, Herzenberg, LA, Kerr, WG und Soriano, P. 1997. Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(8): 3789-3794.
- Zandstra, PW, Bauwens, C, Yin, T, Liu, Q, Schiller, H, Zweigerdt, R, Pasumarthi, KB und Field, LJ. 2003. Scalable production of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Tissue Eng* 9(4): 767-778.

- Zhang, FB, Li, L, Fang, B, Zhu, DL, Yang, HT und Gao, PJ. 2005. Passage-restricted differentiation potential of mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 336(3): 784-792.
- Zhang, M, Methot, D, Poppa, V, Fujio, Y, Walsh, K und Murry, CE. 2001. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *J Mol Cell Cardiol* 33(5): 907-921.
- Zhang, X, Schwarz, EM, Young, DA, Puzas, JE, Rosier, RN und O'Keefe, RJ. 2002. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *J Clin Invest* 109(11): 1405-1415.
- Zhao, LR, Duan, WM, Reyes, M, Keene, CD, Verfaillie, CM und Low, WC. 2002. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 174(1): 11-20.
- Zohnhofer, D, Ott, I, Mehilli, J, Schomig, K, Michalk, F, Ibrahim, T, Meisetschlager, G, von, WJ, Bollwein, H, Seyfarth, M, Dirschinger, J, Schmitt, C, Schwaiger, M, Kastrati, A und Schomig, A. 2006. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA* 295(9): 1003-1010.

## 7 Liste der Publikationen

### Poster-Abstracts:

W. Roell, Y. Duan, Z. Lu, R. Kettenhofen, O. Rubenchik, T. Hashemi, Y. Xia, M. Breitbart, P. Sasse, J. Hescheler, H. Bohlen, B.K. Fleischmann. Cardiac subtypes relevance, engrafting and teratomas potential as major challenges for ES cell derived cardiomyocytes transplantation. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2004, 227: U206-U206 123

J.M. Nygren, S. Stott, K. Liuba, M. Breitbart, W. Röhl, B.K. Fleischmann, D. Kirik, A. Bjorklund, S.E.W. Jacobsen. Adult bone marrow-derived cell fusion with cardiomyocytes and purkinje neurons in response to irradiation but not in steady state. Blood, 2004, 104 (11): 980A-980A 3604

M. Breitbart, T. Hashemi, W. Roell, Y. Xia, O. Dewald, J. Hescheler, H. Bohlen, A. Welz, W. Bloch, B.K. Fleischmann. Mesenchymal stem cells engraft into the infarcted heart but do not transdifferentiate into cardiomyocytes. Pflügers Archiv European Journal of Physiology, 2005, 449, Suppl.1: S123-S123 P18-9

J.M. Nygren, K. Liuba, S. Stott, M. Breitbart, S. Jovinge, W. Röhl, D. Kirik, B.K. Fleischmann, A. Bjorklund, S.E.W. Jacobsen. Lymphocytes contribute to non-hematopoietic cell lineages during development. Experimental Hematology, 2005, 33 (7), Suppl.1: 111-111 280

M.U. Becher, P. Sasse, M. Breitbart, S. Garbe, D.O. Fürst, B.K. Fleischmann. The effect of irradiation on the subsequent growth of satellite cells in vitro. Nova Acta Leopoldina, 2006, 95(352): 102-102

M. Breitbart, T. Hashemi, W. Roell, Y. Xia, O. Dewald, J.M. Nygren, J.W.U. Fries, H. Bohlen, S.E.W. Jacobsen, J. Hescheler, A. Welz, W. Bloch, B. K. Fleischmann. MSCs lack tissue-restricted differentiation after transplantation into the infarcted heart. Nova Acta Leopoldina, 2006, 95(352): 107-107

Vorträge:

Embryonic or Adult stem cells? A view from the “bench side”

Forum Engelberg 26-28 March 2003, Stem Cells – Hopes & Ethical Conflicts

Publikationen:

J.M. Nygren, S. Jovinge, M. Breitbart, P. Sawen, W. Roell, J. Hescheler, J. Taneera, B.K. Fleischmann, S.E.W. Jacobsen. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nature Medicine*, 2004, 10 (5): 494-501.

E. Küstermann\*, W. Roell\*, M. Breitbart, S. Wecker, D. Wiedermann, C. Buehrle, A. Welz, J. Hescheler, B.K. Fleischmann, M. Hoehn. Stem cell implantation in ischemic mouse heart: a high-resolution magnetic resonance imaging investigation. *NMR in Biomedicine*, 2005, 18 (6): 362-370.

E. Kolossov\*, T. Bostani\*, W. Roell\*, M. Breitbart\*, F. Pillekamp, J.M. Nygren, P. Sasse, O. Rubenchik, J.W.U. Fries, D. Wenzel, C. Geisen, Y. Xia, Z.J. Lu, Y.Q. Duan, R. Kettenhofen, S. Jovinge, W. Bloch, H. Bohlen, A. Welz, J. Hescheler, S.E. Jacobsen, B.K. Fleischmann. Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *Journal of Experimental Medicine*, 2006, 203 (10): 2315-2327.

M. Breitbart\*, P. Sasse\*, D. Wenzel\*, B.K. Fleischmann. Stammzellen - biologische und molekulare Grundlagen. *Cardiovasc*, 2006, 6 (6): 22-24.

W. Roell\*, T. Lewalter\*, B. Choi, Y.N. Tallini, T. Bostani, U. Becher, P. Sasse, S. Hwang, R. Doran, M. Breitbart, S. Reining, B. Gabris, A. Welz, G. Salama, J.W. Schrickel, M.I. Kotlikoff, B.K. Fleischmann. Engraftment of electrically coupled cells prevents post -infarct cardiac arrhythmias. Manuskript in Revision.

M. Breitbach\*, T. Bostani\*, W. Roell\*, Y. Xia, O. Dewald, J.M. Nygren, J.W.U. Fries, K. Tiemann, H. Bohlen, S.E.W. Jacobsen, J. Hescheler, A. Welz, W. Bloch, B. K. Fleischmann. Adult mesenchymal stem cells differentiate into bone after transplantation into heart post-myocardial infarction. Manuskript in Revision.

P. Sasse, M. Fleischmann, W. Röhl, E. Gustafsson, T. Bostani, Y. Fan, T. Kolbe, M. Breitbach, K. Addicks, A. Welz, G. Brem, J. Hescheler, R. Fässler, B.K. Fleischmann, W. Bloch. Perlecan is critical for heart stability. Manuskript eingereicht.

J.M. Nygren, K. Liuba\*, S. Stott\*, M. Breitbach\*, S. Jovinge, W. Röhl, D. Kirik, B.K. Fleischmann, A. Bjorklund, S.E.W. Jacobsen. Lymphocyte contribution to non-hematopoietic cell lineages during development. Manuskript in Vorbereitung.

\* Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu den jeweiligen Arbeiten beigetragen

## 8 Lebenslauf