

Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie am Universitätsklinikum Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. habil. Gustav Steinhoff



# Übertragung Bcl-2-modifizierter MSCs am Koronararterienligatur-Modell der Ratte

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Catharina Neßelmann

geb. am 28.04.1981 in Rostock

Rostock, 14.09.2007

urn:nbn:de:gbv:28-diss2008-0017-7

Dekan: Prof. Dr. med. habil. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. habil. Gustav Steinhoff

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Hermann Reichenspurner

3. Gutachter: PD Dr. med. Christof Stamm

Tag der Verteidigung: 27. Februar 2008

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**

Li W, Ma N, Ong LL, Nesselmann C, Klopsch C, Ladilov Y, Furlani D, Piechaczek C, Moebius JM, Luzow K, Lendlein A, Stamm C, Li RK and Steinhoff G. Bcl-2-engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. *Stem Cells* 2007; 25(8):2118-2127.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1	Akuter Myokardinfarkt – Epidemiologie, Prognose und Therapie . . . .	3
1.2	Stammzellpopulationen und MSCs für die Zelltherapie . . . . .	4
1.3	Bcl-2-Gen-Überexpression als Strategie zum Schutz vor peritrans- plantärem Zelltod bei der Stammzelltransplantation . . . . .	5
1.4	Nichtviraler Gentransfer zur ex vivo-Modifikation von MSCs . . . . .	6
1.5	Zielsetzung . . . . .	8
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>10</b>
2.1	Material . . . . .	10
2.1.1	Stammzellisolierung und Zellkultur . . . . .	10
2.1.2	Transfektionsmaterialien . . . . .	11
2.1.3	Western Blot-Analyse . . . . .	12
2.1.4	In vitro-Assays . . . . .	13
2.1.5	Tierversuch . . . . .	13
2.1.6	Immunzyto- und histochemie, Histologie . . . . .	14
2.2	Polymer-DNA-Transfersystem . . . . .	15
2.2.1	Transformation . . . . .	15
2.2.2	Plasmidpräparation . . . . .	16
2.2.3	DNA-Quantifizierung . . . . .	16
2.2.4	DNA-Gelelektrophorese . . . . .	16
2.2.5	Herstellung der Polymer/DNA-Komplexlösungen . . . . .	16
2.2.6	Gelretardierungsassay . . . . .	17
2.2.7	Luciferase-Assay . . . . .	17
2.2.8	MTT-Assay . . . . .	18
2.3	Isolierung von MSCs . . . . .	19
2.3.1	Bestimmung der Zellzahl . . . . .	19
2.4	Immunzytochemie der MSCs . . . . .	20
2.5	Genetische Modifizierung von MSCs . . . . .	20
2.6	Funktionelle Differenzierung von MSCs in vitro . . . . .	21
2.7	Western Blot-Analyse . . . . .	21
2.8	Apoptose-Assay . . . . .	22
2.9	Detektion der Sekretion von VEGF . . . . .	22
2.10	Markierung der Zellen . . . . .	23
2.11	Tierversuch . . . . .	23

2.11.1	Tiere und Tierhaltung . . . . .	23
2.11.2	Koronararterienligatur . . . . .	24
2.12	Histologische Analyse . . . . .	24
2.13	Quantitative Analyse des Zellüberlebens . . . . .	24
2.14	Bestimmung der Infarktgröße . . . . .	25
2.15	Immunfärbung der Gewebeschnitte . . . . .	25
2.16	Kapillardichte . . . . .	26
2.17	Statistische Auswertung . . . . .	26
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>27</b>
3.1	Charakterisierung von MSCs . . . . .	27
3.2	Evaluierung und Optimierung des PEI600-PSL-5-Gentransfersystems	29
3.3	Bcl-2-Überexpression von genetisch modifizierten MSCs in vitro . . .	33
3.4	Bcl-2-Überexpression bietet MSCs Schutz vor Apoptose in vitro . . .	36
3.5	Parakrine Sekretion unter hypoxischen Bedingungen . . . . .	37
3.6	Schicksal transplanteder Zellen . . . . .	38
3.7	Kapillardichte . . . . .	42
3.8	Ausmaß der Infarktgröße . . . . .	43
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>46</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>52</b>
	<b>Anhang</b>	<b>63</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Akuter Myokardinfarkt – Epidemiologie, Prognose und Therapie

Der hohe Anteil der Herz-Kreislaufkrankungen an der Gesamtmortalität in den westlichen Ländern von 45% ist insbesondere der Koronaren Herzerkrankung (KHK) zuzuschreiben [1]. Laut vom statistischen Bundesamt Deutschland vorgelegten Daten starben im Jahr 2005 337,8 pro 100.000 Einwohner in Deutschland an Kreislaufkrankungen, von denen die häufigsten ischämische Herzkrankheiten waren (40,46%) [2].

Es konnte während der letzten 25 Jahre die Sterblichkeit innerhalb des ersten Monats nach akutem Myokardinfarkt bereits von 25-50% auf deutlich unter 10% durch Verbesserung der Akuttherapie reduziert werden. Konsekutiv steigt jedoch die Zahl der Patienten mit einem durchgemachten Infarkt. Die Drei-Jahres-Mortalität nach einem durchgemachten Myokardinfarkt beträgt knapp 20%. Gegenüber der Normalbevölkerung besteht bei diesen Patienten ein fast achtfach erhöhtes Risiko, an einem kardiovaskulär bedingten Ereignis zu sterben, und das Risiko für einen weiteren Myokardinfarkt ist deutlich erhöht. Bei diesen wiederum ist die Drei-Jahres-Mortalität gegenüber Patienten mit einem ersten Infarkt um 50% erhöht [3].

Myokardiale Infarkt-bedingte Ischämie verursacht eine Nekrose des Herzmuskelgewebes, gefolgt von Infiltration durch Entzündungszellen. Es bildet sich eine Narbe, die zum Verlust der kardialen Funktion, ventrikulärem „Remodeling“ (Umbauprozessen), progressiver Dysfunktion und kongestiver Herz-(Stauungs-)Insuffizienz führt [4, 5]. Diese Prozesse finden meist trotz reperfundierender Therapie aufgrund der zeitlichen Differenz zwischen Koronarokklusion und Reperfusion (Lysetherapie, perkutane Katheterintervention oder Bypass-Operation) statt [6]. Die Postinfarkttherapie schließt neben der Revaskularisation Thrombozytenaggregationshemmer und Antikoagulantien, ACE-Inhibitoren, ATII-Rezeptor-Blocker, Aldosteronantagonisten, Beta-Adrenorezeptor-Antagonisten, Statine und weitere lipidsenkende Medikamente ein. Die Modifikation sogenannter Life-Style-Parameter, wie Adipositas, Rauchen und körperliche Bewegung, die optimierte Behandlung von Hypertonie und Diabetes mellitus, sowie Antiarrhythmika und implantierbare Cardioverter Defibrillatoren ergänzen das therapeutische Spektrum [3]. Letztendlich sind alle genannten Optionen supportiv. Für eine neue Strategie zur kardiomyozytären Regeneration durch Ersatz des irreversibel zerstörten Muskelgewebes als Ursache von Umbau-

vorgängen ist somit der Bedarf vorhanden.

## 1.2 Stammzellpopulationen und MSCs für die Zelltherapie

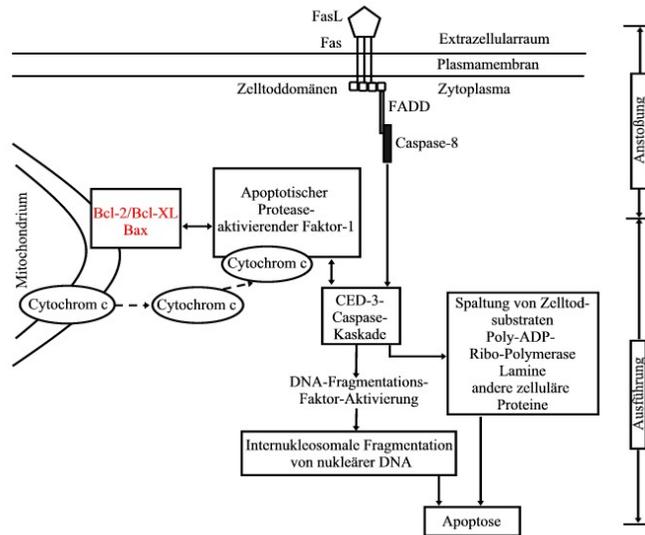
Die Zelltherapie hat sich als vielversprechender therapeutischer Ansatz für eine Restauration der Herzfunktion nach infarktbedingter myokardialer Schädigung entwickelt. Verschiedene Populationen sind potenziell für die kardiale Regeneration geeignet; diese sind fetale myokardiale Gewebe [8], embryonale Stammzellen [9], skeletale Myoblasten [10, 11], Kardiomyozyten [12, 13], glatte Muskelzellen [14, 15], kardiale Stammzellen [16], Stammzellen aus dem Knochenmark [17] und haematopoetische Stammzellen [18]. Ethische Probleme, wie auch ihr tumorigenes Potential limitieren die Anwendung embryonaler Stammzellen (ESC). Beachtliche experimentelle und klinische Nachweise haben gezeigt, dass die Verwendung verschiedener Zelltypen, um nekrotisches Gewebe im Myokardium zu ersetzen, sicher ist und zur Verbesserung der Angiogenese und Herzfunktion beiträgt [19] - [24]. Unter den untersuchten Zelltypen befinden sich mesenchymale Stammzellen (engl.: mesenchymal stem cells, MSCs), selbst-erneuernde klonale Precursor des nichthaematopoetischen Stromas [25]. Ihre Bezeichnung geht auf Arnold I. Caplan zurück, welcher mit seinen Kollegen in langjährigen Arbeiten osteo- und chondrogene Zelllinien aus embryonalen Keimknospen von Hühnerextremitäten isolierte und im weiteren den „mesengenic process“ beschrieb [26]. MSCs können aus dem Knochenmark [27], Fettgewebe [28] und anderem Gewebe, wie Synovia [29], Periost [30], der Zahnwurzel [31], Plazenta [32] und Nabelschnurblut [33], laut rezenter Ergebnisse von da Silva und Kollegen [34] sogar praktisch aus jedem postnatalen Organ und Gewebe, basierend auf ihrer Eigenschaft, an Zellkulturflaschen adhärent zu sein und in vitro zu proliferieren, isoliert werden. MSCs sind Zellen mit multilinearem Potential [35] und können unter geeigneten Bedingungen zu Osteoblasten, Chondrozyten [36], Neuronen [37], Skelettmuskelzellen [38] und Kardiomyozyten [39], [40] differenzieren. Des weiteren haben Studien an humanen MSCs sowie MSCs aus Pavianen und Mäusen deren immunsuppressive Eigenschaften gezeigt [41, 42]. Deshalb erscheinen MSCs zur kardialen Transplantation [20, 43] geeignet. Jedoch ermöglicht die geringe zelluläre Überlebensrate nach Transplantation in das infarzierte Herz innerhalb der ersten wenigen Tage nur eine marginale funktionelle Verbesserung [40, 44]. Somit erscheint es notwendig, die MSCs gegen die aufgrund von Ischämie, Entzündungsreaktion und proapoptotischen Faktoren unwirtliche Umgebung im Herzinfarktareal zu stärken und so die Effizienz der Zelltherapie zu verbessern.

### 1.3 Bcl-2-Gen-Überexpression als Strategie zum Schutz vor peritransplantärem Zelltod bei der Stammzelltransplantation

Ein erheblicher Anteil am Auftreten des peritransplantären Zelltodes bei der Stammzellübertragung wird der Apoptose zugeschrieben [25]. Mangi und Kollegen wiesen ein deutlich gesteigertes Outcome durch Akt-Überexpression nach.

Das 26 kD Bcl-2-Gen gehört zur Bcl-2-Familie und wurde erstmals bei Patienten mit B-Zell-Lymphom (engl.: **B-cell lymphoma**) identifiziert [48]. Es dient als kritischer Regulator bei der Apoptose und agiert Zelltod-inhibierend [46] durch direkte Bindung an den apoptotischen Protease-aktivierenden Faktor 1 (Apaf-1) und/oder die Verhinderung der Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium [49] (Abb. 1.1). Die Lokalisation von Bcl-2 im Mitochondrium legt ebenfalls nahe, dass Bcl-2 Ionenkanäle bildet und zur intrazellulären Homöostase beiträgt [49]. Bei Herzinsuffizienz [50, 51] und im alternden Herz [52] findet sich das Bcl-2-Gen hochreguliert. Es verhält sich schützend vor programmiertem Zelltod von ventrikulären Myozyten [53]. Frühere Studien haben gezeigt, dass Bcl-2 ein Regulator metabolischer Funktionen von Mitochondrien unter ischämischen Bedingungen ist, welcher kardial wie auch neuronal bei Stress Schutz bieten kann [53, 54]. Überexprimiertes Bcl-2 verzögert den Eintritt von Zelltod und vermehrt in gewissem Maße das Zellwachstum während der ersten 48 h der Apoptose [55].

Bcl-2-defiziente Mäuse zeigen Abnormalitäten eines Zelltod-Repressors in spezifischen Zellen [56]. Protektive Effekte von Bcl-2 für Erkrankungszustände am Herzen sind in früheren Arbeiten belegt worden [53, 57]. Interessanterweise verbesserte die Überexpression von Bcl-2 in transgenen Mäusen die Herzfunktion und inhibierte die Apoptose von Kardiomyozyten [58].



**Abbildung 1.1** Signalwege der Apoptose. Modifiziert nach Hetts [49]. Anstoßung: Der Zelltodligand FasL bindet an den Zelltodrezeptor Fas und initiiert damit intrazelluläre Signale. Das Adapter-Protein FADD bindet an Fas und auch an Caspase 8 (= FLICE). Ausführung: Die Aktivierung von Caspase-8 führt zur Aktivierung anderer Caspasen. Die Caspasen spalten untereinander inaktive Procaspase-Precursor in aktive Caspasen, das Zelltodsignal amplifizierend. Aktive Caspasen medieren die Umsetzung des Zelltods, indem sie die Polyadenosin-2-Phosphat-Ribopolymerase, nukleäre Lamine und andere zelluläre Proteine spalten und den DNA-Fragmentations-Faktor aktiviert. Modulation apoptotischer Signale: bei einigen Zelltypen wird Cytochrom c von Mitochondrien abgegeben, die die Aktivierung von Apaf-1 erlaubt und so auch zur Caspase-Aktivierung führt; Bcl-2 supprimiert Apoptose, indem es mit Apaf-1 interagiert und/oder die mitochondriale Permeabilität reguliert. FADD = engl.: Fas associated death domain protein, FLICE = engl.: FADD-like Interleukin 1 $\beta$ -Converting Enzym, Apaf-1 = Apoptotische Protease-aktivierender Faktor-1.

An zur Bcl-2-Überexpression modifizierten Brustkrebszellen wurde unter Hypoxie eine stark erhöhte Expression von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und verstärkte in vivo-Angiogenese nachgewiesen [59]. Angiogenese ist der Prozess der Neuformation von Kapillaren aus bereits existierenden Blutgefäßen [60]. VEGF, ein Tumor-assoziiertes Zytokin, das die endotheliale Zellproliferation stimuliert [61, 62, 63], gilt als kritischer Mediator bei der Angiogenese.

#### 1.4 Nichtviraler Gentransfer zur ex vivo-Modifikation von MSCs

Das für diese Arbeit zur Übertragung von Bcl-2 in die mesenchymalen Stammzellen verwendete Vektorsystem Poly(ethylenimine)-grafted-poly(aspartic acid)-co-lysine (PEI600-PSL5) stellt eine Weiterentwicklung des Polymers Polyethylenimin (PEI)

dar. Virale Genübertragungssysteme sind im Gegensatz zu diesen nicht-viralen Vektorsystemen mit einigen Sicherheitsbedenken behaftet, wie immunogenes Potential oder Schäden in funktionierenden Genen durch den stabilen Einbau des Virusgenoms in das Wirtsgenom [64, 65].

Polyethylenimin ist ein Kunststoff, der in der Haarwaschmittelproduktion, Papierindustrie und Wasserreinigung eingesetzt wurde. Als potentieller DNA-Vektor ist PEI erstmals von Boussif und Kollegen [66] beschrieben worden.

Der rezent entwickelte Vektor PEI600-PSL-5 wird durch thermale Polykondensation von Asparaginsäure und Lysin unter reduziertem Druck hergestellt. An das Grundgerüst wird niedrigmolekulares verzweigtes Polyethylenimin gebunden [67].

In Gegenwart von PEI kondensiert DNA aus einer losen Ringform zu einer kompakten Struktur. Der Prozess der Kondensierung von DNA ist kinetisch bedingt und vollzieht sich durch Fältelung und Bündelung der DNA. Die Komplexierung zu Polymer/DNA-Partikeln beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem kationischen Polymer und der anionischen DNA. Diese sogenannten Polyplexe besitzen eine Größe von 20-40 nm [68] und eine stark positive Oberflächenladung, angegeben durch das Zeta-Potential (29,2 - 37 mV) [69]. PEI600-PSL5-DNA-Komplexe haben eine Größe von 150-170 nm [67].

Für Polymer/DNA-Komplexe wird das N/P-Verhältnis als Maß des Ionengewichts angegeben. N/P bezeichnet das Verhältnis von kationischen Stickstoffresten des Polymers zu anionischen DNA-Phosphaten. Pro PEI/DNA-Komplex sind etwa 3,5 Plasmide untergebracht und etwa 30 Moleküle Polyethylenimin [70]. Die Aufnahme von Polymer/DNA-Komplexen in die Zelle erfolgt vermutlich endozytotisch [71] und durch lysosomale Einschleusung. An dieser Stelle ist PEI ein sehr günstiger DNA-Träger. Einerseits bietet die komplexhafte Struktur einen Schutz vor abbauenden Enzymen im Cytosol [72] und andererseits nimmt PEI die durch V-ATPasen in Lysosomen gepumpten Protonen auf und bewirkt damit eine Inaktivierung lysosomaler Abbauenzyme (Nukleasen), als sogenannter „Proton sponge“ (Protonenschwamm) agierend. Auf diese Weise können PEI/DNA-Komplexe in Lysosomen überleben. Durch osmotisch bedingtes Reißen der Lysosomen [73] gelangen die Komplexe wieder ins Cytosol, „endosomal escape“ (endosomales Entweichen) genannt [74, 75]. Am Transport zum Zellkern wird dem Zytoskelett eine Beteiligung zugeschrieben [76, 77]. Grosse und Kollegen beobachteten, dass Aktinfilamente vorrangig an der Aufnahme der Komplexe und die Mikrotubuli am Trans-

port in Richtung Nukleus, vermutlich in endosomalen Vehikeln mitwirken [88]. Die Passage der Zellkernmembran von Plasmid-DNA erfolgt während der Zellteilung [78] oder durch Zellkernporen, entweder passiv oder in einem energieverbrauchenden Transportprozess mittels eines Zellkernporen-Komplexes [79, 80]. Intranukleäre Prozesse sind noch unzureichend beschrieben. Polymer/DNA-Komplexe wurden im Zellkern nachgewiesen [71]. Der Zugang der Plasmid-DNA zu den Transkriptionsprozessen ist determiniert durch das N/P-Verhältnis, das die Kondensierung der DNA in DNA/PEI-Komplexe maßgeblich beeinflusst [82].

Toxische beziehungsweise zell dysfunktionale Effekte von PEI auf die Zelle sind mehrfach beschrieben worden. Die Zytotoxizität scheint vor allem durch ungebundenes Polyethylenimin verursacht, das in „Clustern“ (Anhäufungen) an der Zellmembran bindet. Dadurch werden die Funktion und Stabilität der Membran beeinträchtigt, wodurch es zur Zellnekrose (2h nach Transfektion) kommt [83]. Helander und Kollegen [84] berichteten von einer durch PEI verursachten Destabilisierung der äußeren Membran für gramnegative Bakterien und Oku und Kollegen [85] von einer PEI-bedingten Gefügelockerung liposomaler Membranen aus Phosphatidylserin. Des weiteren zeigten Klemm und Kollegen [74] eine durch PEI-hervorgerufene lysosomale Zerreißung in Rattenhepatozyten, die bei höheren Polymerkonzentrationen und Akkumulation relevant werden kann. Eine kleine N/P-Verhältniszahl erniedrigt die Tendenz zirkulierender Proteine, an die Komplexoberfläche zu binden [86]. Durch eine Entfernung ungebundenen Polyethylenimins mit „Size Exclusion“-Chromatographie kann eine verringerte Toxizität erreicht werden [88]. Ungebundenes PEI trägt jedoch substantiell zur effizienten Genexpression bei und nach Purifikation müssen erhöhte Konzentrationen für eine effiziente Genexpression eingesetzt werden [88]. Möglicherweise führt PEI, das in den Zellkern der Zielzelle gelangt, zu Alterationen von transkriptionalen Prozessen und folglich zu einem verzögerten Zelltod (7-9 h nach Transfektion) [87]. Der Polymer PEI600-PSL5 wurde aufgrund seiner Herstellungsweise als effizient, geringtoxisch und biokompatibel beschrieben [67].

## 1.5 Zielsetzung

Diese Arbeit hat als Untersuchungsziel, Hinweise und neue Erkenntnisse zum therapeutischen Potential mesenchymaler Stammzellen (MSCs) und Bcl-2-veränderter MSCs zu erhalten. Aus dem Knochenmark adulter Ratten gewonnene mesenchymale Stammzellen wurden ex vivo genetisch zur Überexpression von Bcl-2 modifiziert,

mit dem Ziel, die Zellen lebensfähiger zu machen und, nach Zelltransplantation ins Herz, ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber ischämischen Konditionen zu verbessern, so dass eine bessere kardiale Erholung nach akutem Myokardinfarkt stattfinden kann.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Stammzellisolierung und Zellkultur

##### Zellkulturmedium für MSCs der Ratte

$\alpha$ -MEM (Invitrogen)

10% FBS (HyClone, Logan, UT, USA)

100  $\mu$ g/ml Streptomycin (PAA Laboratories, Linz)

100 U/ml Penicillin (PAA Laboratories, Linz)

4 mM L-Glutamin (PAA Laboratories, Linz)

##### Zellkulturmedium für andere Zelllinien als MSCs

DMEM (Invitrogen)

10% FBS (HyClone, Logan, UT, USA)

100  $\mu$ g/ml Streptomycin (PAA Laboratories, Linz)

100 U/ml Penicillin (PAA Laboratories, Linz)

4 mM L-Glutamin (PAA Laboratories, Linz)

##### Einzelsubstanzen

Phosphate Buffered Saline (Zentralapotheke der Universität Rostock)

Trypanblau (MERCK, Darmstadt)

Trypsin 0,02% / EDTA 0,05% (Viralex<sup>TM</sup>)

##### Verbrauchsmaterialien

21-Gauge-Nadel (BD Microlance<sup>TM</sup>3)

70  $\mu$ m-Nylonnetz (Falcon)

Gewebekulturflaschen (25- und 75-cm<sup>3</sup>, Cellstar R<sup>®</sup> greiner bio-one)

Pipetten (Eppendorf)

Pipettenspitzen für 1000  $\mu$ l, 100  $\mu$ l und 10  $\mu$ l (Cellstar R<sup>®</sup> greiner bio-one)

Pipettenspitzen für 25 ml, 10 ml, 5 ml (Cellstar R<sup>®</sup> greiner bio-one)

Reaktionsgefäße für 50 ml (Cellstar, Frickenhausen)

Roti<sup>®</sup>-Store Cryoröhrchen (ROTH)

##### Geräte

Hämatozytometer

Inkubator (Heraeus, BBD 6220)

Knochenschere

Kühlzentrifuge (Biofuge primo R, Hereus)

Laminarflow (safeflow 1.2, nunc TTM)

Mikroskop (LEICA DMLB)

Software: Multipurpose Color Image Processor

Pipettierhilfe (Pipetboy acu, IBS Integra Biosciences)

Wärmebad (Medingen W6)

Vortexgerät (Vortex Genie<sup>®</sup>2, Scientific Industries)

### 2.1.2 Transfektionsmaterialien

#### Plasmide

(zur Verfügung gestellt von Frau Dr. phil. N. Ma, FKGO, Universität Rostock)

pRE-Luciferase

pcDNA3.1/Bcl-2

pcDNA3.1

#### Polymer

PEI600-PSL5, MW 21 kDa (freundlicherweise von G.P. Tang, Hongkong zu Verfügung gestellt)

Polyethylenimin, MW 25 kDa (Sigma-Aldrich, Steinheim)

#### Zelllinien

(alle von American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA, USA)

COS7 (African Green Monkey SV40 Transformed Kidney Fibroblast)

PT67 (von Mäusefibroblasten abgeleitete Zelllinie)

HEK293 (Human Embryonic Kidney-Cells)

#### Transformation

Library Efficiency<sup>®</sup> DH5 $\alpha$ TM Competent Cells

Luria Bertani-Nährböden:

Luria Bertani-Medium (1 Liter: 10g Trypton, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl und 950 ml deionisiertes H<sub>2</sub>O)

25,5 mg/l LE Agarose (Sea Kem<sup>®</sup>)

1  $\mu$ l/1000  $\mu$ l Ampicillin

Gewebekulturschale 100 mm x 20 mm (greiner bio one)

#### Assays und Kits

BCA Assay (Bio Rad)

Luciferase Reporter 1000 Assay System (Promega, Madison, WI, USA)

Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)

### **Substanzen**

5% Glukose

DNA-Marker LAMBDA III

Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich)

Ladepuffer

LE Agarose (Seakem<sup>®</sup>)

Opti-MEM (PAA Laboratories, Linz)

PBS (Zentralapotheke der Universität Rostock)

TBE-Puffer (10 x: 890 mM TRIS, 890 mM Borsäure und 20 mM EDTA)

### **Verbrauchsmaterialien**

24-, 48- und 96- Well (Zylinder-)platten (Cellstar R<sup>®</sup> greiner Labortechnik)

Sterile Deckgläschen

### **Geräte**

Biomate 3 (Thermo Spectronic)

LB 96 V Luminometer (Berthold Micro Lumat Plus, EXFO)

Minizentrifuge (VWR<sup>™</sup> Galaxy Mini)

Schüttler (Edmund Bühler, Johanna Otto GmbH)

Vortexgerät

## **2.1.3 Western Blot-Analyse**

### **SDS-PAGE und Blotting**

Die Herstellung von Elektrophorese-Puffer (pH 8,3), Probenpuffer, Trenngelpuffer, Trenngel (12%), Sammelgelpuffer, Sammelgel (12%), Transferpuffer, Färbung und -entfärbungslösung (Coomassie Blau) und Ponceau S erfolgte nach genauen Angaben entsprechend den üblichen Protokollen [90].

### **Antikörper (Ak)**

Primär-Antikörper:

Primary human monoclonal Bcl-2-protein (1 : 200) (Dako, Glostrup, Dänemark)

Primary monoclonal  $\beta$ -Aktin (1 : 300) (Chemicon)

Sekundär-Antikörper:

Secondary horseradish-peroxidase conjugated anti-mouse (1 : 2.000) (Pierce,

Rockford, IL)

### **Assays**

BCA-Assay (Sigma-Aldrich)

ECL-Kit (Amersham Biosciences)

### **Substanzen**

PBS ohne Calcium und Magnesium (Zentralapotheke der Universität Rostock)

Lysis Puffer (Promega, Madison, WI)

### **Verbrauchsmaterialien**

Nitrocellulose-Membran (Hybond<sup>TM</sup>-ECL<sup>TM</sup> Amersham Biosciences Piscataway, NJ)

### **Geräte**

Blotapparatur (Fastblot<sup>TM</sup> B44, Biometria)

Elektrophorese-Kammer (Multi Gel long, Biometra)

Netzgerät (P30 High Voltage Power Supp, Biometra)

## **2.1.4 In vitro-Assays**

### **MTT-Assay**

DMSO

MTT (AppliChem)

### **TUNEL-Assay**

ApopTag Assay Kit (Chemicon)

Fluorsave (Calbiochem, San Diego, <http://www.biosciences.com>)

Propidium-Jodid

### **VEGF-Immunoassay**

Quantikine Rat VEGF Immunoassay (R&D Systems inc., Minneapolis)

## **2.1.5 Tierversuch**

### **Tiere**

Lewis-Ratten, männlich, 200-250 g (Charles River Laboratories)

### **Medikamente**

Diäthylether (J.T. Baker)

Heparin-Lösung (Liquemin N 25000, Hofmann La Roche AG))

Luft für medizinische Zwecke (Messer Griesheim)

Metamizol-Tropfen (Novaminsulfon ratiopharm®)

Pentobarbital-Natrium (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz, <http://roche-applied-science.com/>))

Sauerstoff für medizinische Zwecke (Messer Griesheim)

### **Verbrauchsmaterialien und Geräte**

6-0 Seidenfaden (Ethicon)

EKG, PC-Livestream

Injektionsnadel (BD Bioscience)

Kleintierbeatmungsgerät

Kleintier-Operationsbesteck (Krauth und Timmermann)

Kleintier-Rippenspreizer

Operationsmikroskop (Carl Zeiss)

Operationstisch, beheizbar

Temperaturmessgerät, rektal

#### **2.1.6 Immunzyto- und histochemie, Histologie**

##### **Antikörper für die Immunzytochemie**

Primär-Antikörper: (alle von BD Biosciences)

CD14 (LPS Rezeptor)

CD29 ( $\beta$ 1-Integrin )

CD31 (PECAM-1)

CD34 (L-Selektin)

CD45 (Ly-5)

CD117 (c-kit)

Sekundär-Antikörper:

Goat anti-mouse secondary antibody Alexa Fluor 488 (Molecular Probes/Invitrogen)

##### **Antikörper für die Immunhistochemie**

Primär-Antikörper:

Monoclonal mouse anti-BrdU antibody (Lab Vision)

Polyclonal anti-vWF-antibody, H-300 (Santa Cruz)

Monoclonal anti-troponin-T-antibody, kardiale Isoform, Clone CT-3 (Lab Vision)

Sekundär-Antikörper:

Alexa 568 (Molecular Probes)

Horseshoe-peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA)

Alexa 488 (Molecular Probes)

### **Zellmarker**

Bromodeoxyuridin (Lab Vision, Firemont, CA, <http://www.labvision.com/>)

Vybrant CFDA SE Cell Tracer (Molecular Probes)

### **Substanzen**

DAPI (Sigma-Aldrich)

Ethanol (70%, 80%, 90%, 100%, Zentralapotheke der Universität Rostock)

Fast Green (Sigma-Aldrich)

Haematoxylin-Eosin

O.C.T.-Medium

Sirius Red F3BA (Polysciences)

0,1% Triton X-100 in PBS

0,5% BSA (SERVA) in PBS

### **Verbrauchsmaterialien**

Liquid barrier pen (DAKO)

Objektträger

### **Geräte**

Mikroskop (LEICA DMLB)

Bildbearbeitungssoftware:

LEICA IM 5 (V2.01) Software

ESI-Vision (SIS)

## **2.2 Polymer-DNA-Transfersystem**

### **2.2.1 Transformation**

Alle Plasmide wurden in E.coli DH5 $\alpha$  nach den genauen Angaben des Herstellers transformiert und auf Luria Bertani-Nährböden kultiviert. Transformierte Zellen wurden in Gefrierkulturen (Kryogefäße) angelegt und bei -80° Celsius gelagert.

### 2.2.2 Plasmidpräparation

Für die Plasmidpräparation wurden 2-3 Gefrierkultur-Einheiten (Kugeln) mit transformierten *E.coli* DH5 $\alpha$  und 400  $\mu$ l Ampicillin zu 400 ml Luria Bertani-Medium gegeben und über Nacht bei 37° Celsius und 250 rpm kultiviert. Die amplifizierte Plasmid-DNA wurde säulenchromatographisch mit dem Plasmid Maxi Kit entsprechend dem Herstellerprotokoll aufgereinigt.

### 2.2.3 DNA-Quantifizierung

Das Absorptionsmaximum  $\alpha$  von Nukleinsäuren beträgt 260 nm, und das von Aminosäuren und Proteinen 280 nm. Für die photometrischen Messungen wurden die DNA-Proben in einem Verhältnis von 1 : 100 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt und mit dem Gerät Biomate analysiert. Der Reinheitsgrad der DNA wurde durch den Quotienten  $Abs_{260\text{ nm}} / Abs_{280\text{ nm}}$  ermittelt. Ein Wert von 1,8 oder höher lässt auf ausreichende Reinheit schließen. Die Plasmidausbeute betrug durchschnittlich 500-800  $\mu$ g/ml.

### 2.2.4 DNA-Gelelektrophorese

Eine gelelektrophoretische Analyse erfolgte an einem 0,8% TBE-Agarosegel. Agarose (0,8 g) und TBE-Puffer (100 ml) wurden in einem Erlenmeierkolben bis zur Siedetemperatur erhitzt, dann eine Abkühlung auf 60° Celsius abgewartet, Ethidiumbromid (10  $\mu$ l/ 100 ml) hinzupipettiert, durch Schwenken gemischt und in eine Gelkammer gegossen. Die Proben aus 1  $\mu$ l DNA (0,5-0,8  $\mu$ g/ $\mu$ l) und 9  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O wurden mit 1-2  $\mu$ l / 6  $\mu$ l Ladepuffer versehen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 Volt/mA für 60 Min in TBE-Puffer. Das Gel wurde unter UV-Durchleuchtung gesichtet und bilddokumentiert.

### 2.2.5 Herstellung der Polymer/DNA-Komplexlösungen

Die Beschreibung der Komponentenverhältnisse für die Lösungen der Polymer/DNA-Komplexe erfolgte als Stickstoffrest (N) – Phosphat (P) – Verhältnis (N/P-Verhältnis). Die Polymerlösung (siehe \* in unten stehender Tabelle) (Polymer in Opti-MEM) wurde zur DNA-Lösung (DNA in 5% Glukose) pipettiert und sofort durch Auf- und Abpipettieren vermischt, für 30 Sek mit dem Vortexgerät geschüttelt und weiter bei Raumtemperatur für 30 Min inkubiert.

Herstellungsschema von Polymer/DNA-Lösungen in serieller Verdünnung:

PEI600-PSL 5 oder PEI	DNA	N/P
1) 7,2 $\mu\text{l}$ 0,1 M Stammlösung + 13,8 $\mu\text{l}$ Opti-MEM = 360 nmol/10 $\mu\text{l}^*$	+ 3 nmol/10 $\mu\text{l}$	= 120
2) 10 $\mu\text{l}$ von 1) + 10 $\mu\text{l}$ Opti-MEM = 180 nmol/10 $\mu\text{l}^*$	+ 3 nmol/10 $\mu\text{l}$	= 60
3) 10 $\mu\text{l}$ von 2) + 10 $\mu\text{l}$ Opti-MEM = 90 nmol/10 $\mu\text{l}^*$	+ 3 nmol/10 $\mu\text{l}$	= 30
4) 10 $\mu\text{l}$ von 3) + 10 $\mu\text{l}$ Opti-MEM = 45 nmol/10 $\mu\text{l}^*$	+ 3 nmol/10 $\mu\text{l}$	= 15
5) 10 $\mu\text{l}$ von 4) + 10 $\mu\text{l}$ Opti-MEM = 22,5 nmol/10 $\mu\text{l}^*$	+ 3 nmol/10 $\mu\text{l}$	= 7,5
6) 10 $\mu\text{l}$ von 5) + 10 $\mu\text{l}$ Opti-MEM = 11,25 nmol/10 $\mu\text{l}^*$	+ 3 nmol/10 $\mu\text{l}$	= 3,75
7) 10 $\mu\text{l}$ von 6) + 10 $\mu\text{l}$ Opti-MEM = 5,625 nmol/10 $\mu\text{l}^*$	+ 3 nmol/10 $\mu\text{l}$	= 1,875

### 2.2.6 Gelretardierungsassay

Die DNA-Bindungskapazität des Polymers wurde mit einem Gelretardierungsassay verifiziert. Komplexlösungen wurden mit den N/P-Verhältnissen 60, 30, 15, 7,5, 3,75 und 1,875 hergestellt. Hierfür galt die Annahme, dass 1  $\mu\text{l}$  0,1 M PEI 100 nmol Stickstoffaminen und 1  $\mu\text{g}$  DNA 3 nmol Phosphaten entspricht. Vom Polymer PEI600-PSL5 wurde eine 0,1M Stammlösung hergestellt. 7,2  $\mu\text{l}$  der Stammlösung wurden zu 13,8  $\mu\text{l}$  Opti-MEM addiert, um eine Lösung mit 720 nmol/ 20  $\mu\text{l}$  zu erhalten, welche seriell verdünnt wurde. DNA-5% Glukose-Lösungen wurden entsprechend des DNA-Gehaltes pro  $\mu\text{l}$  für 1  $\mu\text{g}$  pro 10  $\mu\text{l}$  angefertigt. Die Polymer/DNA-Komplexe wurden wie oben beschrieben entsprechend unten stehendem Herstellungsschema aufbereitet. Als Kontrollprobe diente 1  $\mu\text{g}$  DNA in 20  $\mu\text{l}$  5% Glukose. Alle Proben wurden mit 1-2  $\mu\text{l}$ / 6  $\mu\text{l}$  Ladepuffer versehen, in ein 0,8% Agarosegel geladen und elektrophoretisch bei 100 Volt/ mA für 1-2 h aufgetrennt.

### 2.2.7 Luciferase-Assay

Der Luciferase-Assay ermöglicht die Quantifizierung der eukaryontischen Genexpression. Luciferase bewirkt die Oxidation seines Substrats Luciferin zu Oxyluciferin unter Freisetzung von Licht, das mit einem UV-Luminometer detektiert werden kann. Die Transfektions-Versuche wurden mit einem Luciferase-Reportergen an PT67-

und HEK293-Zelllinien durchgeführt. Das verwendete pRE-Luciferase-Plasmid ist eine 12,5 kb pcDNA, kodierend für die Glühwürmchen-Luciferase, die von einem in einen pREP7-Vektor (Invitrogen, San Diego, CA, USA) eingebauten Rous sarcoma Virus (RSV) gesteuert wird. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium bei 37°C in angefeuchteter 5% CO<sub>2</sub>-haltiger Luft kultiviert. PT67 und HEK293 wurden je in einer 48-Wellplatte mit einer Dichte von 3 x 10<sup>3</sup> Zellen pro Well ausgesät und einer PEI600-PSL-5-basierten Transfektion mit den N/P-Verhältnissen 60, 30, 15, 7,5, 3,75 und 1,875 und 0,5 µg DNA pro Well unterzogen. Für den Proteinabgleich blieb eine Zellreihe pro Wellplatte ohne Transfektion. Nach 24 Stunden Expressionszeit und einem Waschschrift mit PBS erfolgte die Zugabe von 20 µl Cell Lysis-Puffer. Der Zelldebris wurde 1:1 in eine 96-Wellplatte (Mikrotiterplatte) übertragen und die Luciferaseaktivität nach Zugabe von 100 µl Luciferase Assay Reagent Kit an einem Luminometer für ein zeitliches Intervall von 10 Sekunden pro Wellreihe gemessen. Die Daten sind in relativen Lichteinheiten (RLU, engl.: relative light units) angegeben und auf den Gesamtproteingehalt im Lysat bezogen (RLU pro 10 sek pro mg Protein). Die Auswertung erfolgte über eine Standardkurve.

### 2.2.8 MTT-Assay

Der MTT-Assay wurde zur Bestimmung der Zellvitälität verwendet. (4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-Diphenyltetrazolinbromid (MTT) wird von metabolisch aktiven Zellen durch mitochondriale Dehydrogenasen zu Formazan reduziert. Wir testeten die Zellüberlebensrate an zwei verschiedenen Zelllinien, COS7 und MSCs, unter Einfluss der Polymere PEI600-PSL-5 und PEI. In eine 96-Zylinderplatte wurden 4 x 10<sup>3</sup> Zellen in 200 µl Zellkulturmedium pro Zylinderloch ausgesät, bei 37°C für 5 h inkubiert, anschließend das Zellkulturmedium vorsichtig entfernt und ein Waschschrift mit PBS vorgenommen. Die Zellen wurden nun gegenüber 20 µl Polymer/DNA-Komplexlösungen der N/P 240, 120, 60, 30, 15, 7,5, 3,75 und 1,875 exponiert, und eine Inkubation für ein 44-Stunden-Zeitintervall schloss sich an. Der Kontrolle diente eine Lochzeile mit Polymer/DNA-freiem Medium. Das Medium wurde vorsichtig entfernt und 10 µl Stammlösung, bestehend aus 5 mg/ml MTT in PBS pro Well hinzugefügt, für 4 Stunden belassen, wieder entfernt und mit Dimethylsulfoxid (DM-SO) versehen, um entstandene dunkelviolette Kristalle zur Lösung zu bringen. Die optische Dichte (OD) wurde bei der Wellenlänge 570 nm und 630 nm mit dem Plattenlesegerät gemessen. Für die graphische Darstellung nutzten wir die subtrahierte optische Dichte (OD<sub>570-630</sub>). Die Ergebnisse sind angegeben als relatives Zellüberle-

ben, das sich aus dem Quotienten  $OD_{570-630}$  der behandelten Zellen/ $OD_{570-630}$  der unbehandelten Zellen errechnet.

## 2.3 Isolierung von MSCs

Primärkulturen mesenchymaler Stammzellen wurden, modifiziert nach dem Protokoll von Friedenstein und Kollegen (1970) [91], aus den Femurknochen der Ratte hergestellt. Die Isolierung erfolgte in einem Zellkulturlabor mit S2 Sicherheitsbedingungen in der Sterilbank unter Laminarfluss.

Die Knochenmarkhöhle wurde mit einer Knochenschere eröffnet und das Knochenmark mit einer 21-Gauge-Nadel und 25 ml PBS pro Femur herausgespült. Die gewonnene Suspension wurden mehrmals vorsichtig auf- und abpipettiert, um eine Ein-Zell-Suspension zu erhalten und durch ein 70  $\mu\text{m}$ -Nylonnetz filtriert. Das Filtrat wurde 10 Min zentrifugiert (300 x g, RT), der Zelldebris verworfen, die gewonnen Zellen in 3 ml MSC-Zellkulturmedium pro Ratte resuspendiert und ausgezählt. Es wurden  $100 \times 10^6$  Zellen pro 75  $\text{cm}^3$ -Gewebekulturflasche ausgesät und in angefeuchteter und mit 5%  $\text{CO}_2$ -angereicherter Luft bei 37 °C kultiviert. Nach 24 Stunden erfolgte ein kompletter Zellkulturmediumwechsel, um nichtadhärente Zellen zu entfernen und weiterhin wurde alle 3-5 Tage das Zellkulturmedium zu zwei Drittel erneuert, um eine ausreichende Konzentration sezernierter Wachstumssignalstoffe zu gewährleisten.

Bei einer Konfluenz von 70-90% sind die Zellen passagiert und ab der zweiten Passage für die in vitro- und in vivo- Versuche eingesetzt worden.

### 2.3.1 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 15  $\mu\text{l}$  der zellhaltigen Suspension mit 15  $\mu\text{l}$  Berliner Blau gemischt und in der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Die ermittelte Zellzahl wurde auf die gesamte Zellzahl in der Zellsuspension hochgerechnet. Die Formel ist im folgenden angeführt.

$$n_{\text{gesamt}} = n_{\text{gezählte Zellen}} \times 2^{1)} \times \text{ml Zellsuspension} \times 10\,000^{2)}$$

<sup>1)</sup>Verdünnungsfaktor

<sup>2)</sup>Neubauerfaktor

## 2.4 Immunzytochemie der MSCs

Die Immunostain-Methode (Immunfärbung) beruht auf der Markierung von Antigenen mit einem primären Antikörper (Ak) und der Detektion dieses Antikörpers mittels eines an den primären Ak bindenden fluoreszierenden sekundären Antikörpers. Auf Glasplättchen mit 30-50% Dichte gewachsene MSCs wurden für 5 Min mit 0,5% BSA in PBS gewaschen, für 20 Min mit Fixierlösung versehen und erneut für 5 Min gewaschen. Die Zellen wurden in 0,1% Triton X-100 in PBS permeabilisiert, nach einem Waschschrift mit 0,1% BSA in PBS für 10 Min mit Block Puffer versehen, um unspezifische Bindungen zu verhindern, und anschließend mit dem primären Antikörper, verdünnt in DAKO Antibody Dilution Buffer with Background Reducing Components, über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal für 5 Min mit 0,5% BSA in PBS gewaschen und der sekundäre Antikörper für 60 Min in einer Dunkelbox aufgetragen. Das Präzipitat wurde dreimal für 5 Min in 0,5% BSA in PBS gewaschen, die Deckgläschen vorsichtig mit einer Pinzette angehoben und mit der Zellseite nach unten auf einem Glasobjektträger eingebettet. Das Resultat wurde lichtmikroskopisch und softwaregestützt ausgewertet.

## 2.5 Genetische Modifizierung von MSCs

Eine genetische Modifizierung für Genexpressions-, Differenzierungs- und in vivo-Studien der MSCs erfolgte mit dem PEI600-PSL-5-basierten Gentransfersystem; hierfür wurden 24 Stunden vor der Transfektion die Zellen ausgesät. Pro  $4 \times 10^5$  Zellen wurden eine Verdünnung von 3  $\mu\text{g}$  pcDNA3.1/Bcl-2 (für Bcl-2-MSCs) oder pcDNA3.1 (für Vektor-MSCs) in Opti-MEM und 6  $\mu\text{l}$  PEI-600-PSL-5 in 5% Glukose separat vorgenommen. Die Transfektionslösung wurde sogleich gemischt und zu den adhären Zellen im volumendefinierten Medium (1 ml) hinzugefügt. Die Genexpression des Bcl-2-Proteins wurde mit der Western blot-Methode nachgewiesen. Zur Aufbereitung der Zellen zur Injektion wurde das Kulturmedium vorsichtig entfernt, die Zellschichten mit PBS gewaschen und durch Inkubation mit 0,25% Trypsin/EDTA sowie durch seitliches Beklopfen vom Flaschenboden gelöst. Die Zellversuche wurde dreifach ausgeführt.

## 2.6 Funktionelle Differenzierung von MSCs in vitro

Für die Differenzierungsversuche mit Bcl-2-transfizierten MSCs wurde nach dem Protokoll des Differenzierungsassays von RnD Systems vorgegangen.

Um eine adipogene Differenzierung zu induzieren wurden MSCs nach genetischer Modifikation mit einer Dichte von  $3 \times 10^3$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  ausgesät und bis zu drei Wochen in adipogenem Zellkulturmedium (101 ml: 90 ml  $\alpha$ -MEM, 10 ml FBS, 100U/ml Penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin, 2mM L-Glutamin, Hydrocortison, Isobutylmethylxanthin, Indomethazin) in einer 24-Well-Platte kultiviert.

Für eine chondrogene Differenzierung wurden  $3 \times 10^5$  Bcl-2-MSCs in 1 ml chondrogenem Induktionsmedium (50 ml: 49 ml D-MEM, 100U/ml Penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin, 2mM L-Glutamin, 500  $\mu\text{l}$  ITS Supplement (6,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Insulin, 6,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Transferrin, 6,25 ng/ml Selensäure, 1,25 mg/ml Bovines Serum-Albumin, 5,33  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Linolsäure), 0,1  $\mu\text{M}$  Dexamethason, 1 mM Natriumpyruvat, 0,17 mM L-Ascorbinsäure 2 Phosphat, 0,35 mM L-Prolin, 0,001  $\mu\text{g}/\text{ml}$  TGF- $\beta$ 3) in die Spitze eines konischen 15-ml-Reaktionsgefäßes platziert, um eine Aggregation der Zellen in der Kultursuspension zu ermöglichen. Der Induktionsprozess wurde für 4 Wochen durchgeführt.

Um eine kardiomyozytäre Differenzierung anzustoßen, wurden die Bcl-2-MSCs mit dem DNA-methylierenden Cytosin-Analogon 5-Azacytidin entsprechend früheren Protokollen [39] behandelt.

Die Differenzierungskapazität in Richtung verschiedener Zelllinien wurde anhand morphologischer Veränderungen und Immunfärbung spezifischer Marker, wie Aggrecan (Goat anti-human Aggrecan) für Chondrozyten, Fatty Acid Binding Protein-4 (Goat-anti-mouse FABP-4) für Adipozyten und Homeobox-Protein NK-2 homolog E (Nkx2,5) für Kardiomyozyten [92] verifiziert.

## 2.7 Western Blot-Analyse

Die Western Blot Analyse stellt eine Kombination aus a) der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) zum Auftrennen von Proteinextrakten unter denaturierenden Bedingungen und nach Blotten der Proteine auf eine Membran b) der Immundetektion einer speziellen Proteinbande mit Antikörpern dar. Genetisch modifizierte MSCs wurden mit PBS gewaschen und mit Lyse-Puffer versehen. Das Lysat wurde durch Zentrifugation (10.000 x g, 15 min, 4 °C ) geklärt und die Proteinkonzentration der

Proben im Überstand mit dem BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, Il) bestimmt. 20  $\mu\text{g}$  des Gesamt-Proteins wurden mit einer 12,5% Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)-PAGE nach Laemmli [93] aufgetrennt und auf eine 0,2  $\mu\text{m}$  Nitrocellulose-Membran transferiert. Eine Poncheau S-Färbung schloss sich dem Western Blot-Transfer an, um eine gleiche Proteinladung und die Effizienz des Transfers zu verifizieren. Der Blockungsschritt der Membran erfolgte in PBS-Puffer mit 0,2% Tween 20 (Roth) und 5% Magermilch über Nacht bei 4° Celsius. Später wurde der Blot mit „human monoclonal bcl-2-protein“-Antikörper für 3 Stunden inkubiert. Als Kontrolle diente das „housekeeping“-Protein  $\beta$ -Aktin. Die Antikörperbindung wurde mit dem „horseradish-peroxidase conjugated anti-mouse secondary“-Antikörper detektiert und mit dem ECL-Kit (Amersham Biosciences) visualisiert. Proteine aus MSCs, welche lediglich mit dem Vektor transfiziert wurden, dienten als positive Kontrolle.

## 2.8 Apoptose-Assay

10 x 10<sup>3</sup> MSCs wurden auf sterile Deckgläschen gesät. Angewachsenen Zellen wurden einer 24-stündigen hypoxischen Konditionierung mit 95% Stickstoff und 5% Kohlendioxid unterzogen. Die Zellen wurden mit dem Chemicon ApopTag Assay Kit gefärbt und mit Propidium-Jodid gegengefärbt. Die Glasplättchen wurden mit PBS gewaschen und in FluorSave (Calbiochem) eingebettet. Die Bildgewinnung erfolgte unter Phasenkontrast (400-fach) an einem LEICA DMLB-Mikroskop. Die Ergebnisse sind repräsentativ für dreifach unabhängig ausgeführte Experimente mit je sechs Glasplättchen.

## 2.9 Detektion der Sekretion von VEGF

Die Sekretion des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) durch MSCs der Ratte wurde mit dem Quantikine Rat VEGF Immunoassay (R&D Systems inc.) analysiert. Dieser Assay beruht auf der quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay-Methode. MSCs der Ratte wurden mit Bcl-2 transfiziert und eine 48-stündige Expressionszeit oder 24-stündige Expressionszeit und 24 Stunden Hypoxie zugelassen. In eine mit monoklonalen Antikörpern vor-beschichtete Mikrotiterplatte wurden 50  $\mu\text{l}$  des Kulturmediums pro Well platziert und für 2 Stunden bei Raumtemperatur und 500 rpm inkubiert. Mit einer seriellen Verdünnungsreihe einer Standardlösung wurde eine Kalibrierungskurve (2000-31.2 pg/ml) erstellt; als Kontrolle diente Rat VEGF Kit Control. Es folgten ausgiebiges Waschen und die Inkubation mit Rat VE-

GF Conjugate für 1 Stunde. Nach einem erneuten ausgiebigen Waschschrift wurden Substrat- und Stop-Solution in einem 30 Minuten-Abstand aufgetragen. Die optische Dichte wurde an einem Mikroplattenlesegerät bei 450 nm mit Wellenlängenkorrektur bei 540 nm innerhalb von 30 Minuten gemessen.

## 2.10 Markierung der Zellen

Um transplantierte MSCs im Herzen zu identifizieren, wurden vor ihrer Transplantation die Zellen mit Bromodeoxyuridin (BrdU) in einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  in Zellkulturmedium für 12 Stunden inkubiert. Die Effizienz dieser Methode der Zellmarkierung wurde durch Immunfärbung der Zellen mit dem monoklonalen BrdU-Antikörper (Lab Vision, CA) bestimmt und betrug  $42,1\% \pm 3,5\%$  ( $n = 3$ ). Zusätzlich wurde das Zellengraftment mit dem Marker 5- (und 6)-Carboxyfluoreszein Diacetat Succinimidylester (CFSE, 5  $\mu\text{M}$ ) beurteilt. Die gewonnenen Zellen wurden in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen pro 100  $\mu\text{l}$  in MSC-Zellkulturmedium resuspendiert und auf Eis nicht länger als eine Stunde bis zur Transplantation gelagert.

## 2.11 Tierversuch

Die Genehmigung des Tierversuchs und zur personengebundenen Durchführung ist durch das zuständige Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Mecklenburg-Vorpommern gemäß §9 Abs.1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes (Genehmigungspflicht) erteilt worden (Aktenzeichen: LVL M-V/TSD/7221.3-3.2-007/005).

### 2.11.1 Tiere und Tierhaltung

Männliche Lewis-Ratten wurden von Charles River Laboratories (Wilmington, MA) bezogen und unter Beachtung der Vorschriften des Tierschutzgesetzes (TierSchZG M-V) behandelt. Die Tierhaltung erfolgte in Rattenkäfigen mit Futter und Trinkflaschen bei konstanten Licht-, Temperatur-, Luftfeuchtigkeits- und Luftdruckverhältnissen im Tierhaus der Universität Rostock und im Tier-Operationsraum des FKGO der Universität Rostock.

### 2.11.2 Koronararterienligatur

Das Versuchstier erhielt zur Narkose eine intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (50mg/kg Körpergewicht, 100mg Pentobarbital/ 10 ml NaCl 0,9%), wurde endotracheal intubiert und volumenkontrolliert gerätbeatmet (20/ min, 12 mmHg Beatmungsdruck). Das Herz wurde mit einer linksseitigen Thorakotomie freigelegt. Die anatomischen Verhältnisse der Koronargefäße wurden geklärt und der Ramus interventricularis anterior permanent mit einem Seidenfaden (6-0) ligiert. Eine erfolgreiche Infarktinduktion ließ sich durch Auftreten einer umschriebenen Abblassung des Herzmuskels und anhand sichtbarer Ischämiezeichen (ST-Elevation) im abgeleiteten EKG bestimmen. Umgehend nach der Ligatur erfolgte die Injektion von  $6 \times 10^6$  Bcl-2-MSCs oder Vektor-MSCs mit einer 31-Gauge-Nadel an sechs Punkten der vorderen und seitlichen Grenzzone des Infarktgebiets. Eine weitere Gruppe mit lediglich der Injektion von DMEM diente als Kontrolle. Die Tiere wurden nach 4 Tagen, 3 oder 6 Wochen getötet. Das Zellüberleben wurde 4 Tage, 3 und 6 Wochen nach der Zelltransplantation bestimmt. Angiogenese, Infarktgröße und Kolokalisation der Zellen wurden nach 3 Wochen bestimmt.

### 2.12 Histologische Analyse

Am Ende der Beobachtungszeit wurden die Tiere getötet, das Herz entnommen, mit PBS gewaschen, gewogen, in Ornithin Carbamyl-Transferase (O.C.T.)-Medium eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Gefrierschnitte der Dicke 5  $\mu\text{m}$  wurden bei  $-20^\circ\text{C}$  mit dem Kryotom angefertigt und mit Siriusrot/ Fast Green oder Haematoxylin-Eosin gefärbt. Von jedem Herz wurden drei Schnitte auf mittlerer Ebene aus dem Infarktgebiet für die Messung der Infarktgröße verwendet. Die Quantifizierung des Infarktareals wurde mit ESI-Vision ausgeführt. Das Narbenaereal wurde in Prozent des gesamten Areals des linksventrikulären Gewebeschnittes kalkuliert.

### 2.13 Quantitative Analyse des Zellüberlebens

Eine quantitative Analyse von BrdU-positiven Zellen erfolgte an immungefärbten Gefrierschnitten. Pro Herz wurden fünf Schnitte aus der mittleren Ebene der Infarktregion für die Messung verwendet. Myokard, das weiter als 0,5-1mm vom infarzierten Gewebe oder von der Infarktnarbe entfernt lag, wurde als die Infarkt-

grenze repräsentierend betrachtet. Um eine Kontamination von weiter entferntem Myokard mit der Infarktgrenze zu vermeiden, wurde Myokardareal, das weiter als 1-2 mm von der Infarktgrenze entfernt lag, nicht in die statistische Analyse eingeschlossen (siehe [89]). Mindestens 20 repräsentative mikroskopische Felder einer 1000-fachen Vergrößerung mit Öl-Immersion-Phasenkontrast (LEICA DMLB) von jedem Schnittpräparat wurden randomisiert aus der Interessenregion gewählt und digital fotografiert. BrdU-positive Zellen wurden im Gewebe der Infarktgrenze (4 Tage postoperativ) und in der Infarktgrenze der Infarktnarbe (3 und 6 Wochen postoperativ) mit LEICA IM 5 (V2.01) Software gezählt. Das Zellüberleben wurde als Anteil der BrdU-positiven Zellkerne an der Gesamtzahl der Zellkerne einfachblind bestimmt und dargestellt.

#### **2.14 Bestimmung der Infarktgröße**

Herzgewebeschnitte wurden mit Haematoxylin-Eosin und Siriusrot (0,1% Pikrinsäure) gefärbt. Das Infarktgebiet, das einen Anstieg an Kollagengehalt aufweist, wurde als Siriusrot-positive Anfärbung deutlich und mit computerisierter Planimetrie ausgemessen. Das Verhältnis des Umfangs der Infarktnarbe zur gesamten Zirkumferenz definierte das Ausmaß des Infarkts für die epikardiale beziehungsweise endokardiale Oberfläche. Die endgültige Infarktgröße wurde als Durchschnitt der endokardialen und epikardialen Oberflächen bestimmt und in Prozent angegeben. Die quantitative Bestimmung der Kollagenablagerung wurde von einem für die erhaltene Behandlung blinden Untersucher mit Multicolor Image Processor (Envision; DAKO) durchgeführt.

#### **2.15 Immunfärbung der Gewebeschnitte**

Für die immunhistologische Detektion der transplantierten Zellen im Herzen wurden Gefrierschnitte mit „monoclonal mouse anti-BrdU“-Antikörper inkubiert. Nach Auftragen von Envision Blocking Puffer (Dako), um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4-8 °C versehen. Am Folgetag wurden die Schnitte mit den sekundären Antikörpern Alexa 568 oder „horseradish-peroxidase-conjugated goat anti-mouse“ IgG inkubiert. Endothel-ähnliche Zellen wurden auf von Willebrand-Faktor (primärer Antikörper: polyklonaler anti-vWF-Antikörper, sekundärer Antikörper Alexa 568) getestet. Zellkerne wurden mit 4,6-Diamidino-2-

Phenylindol gegengefärbt. Kardiomyozyten-ähnliche Zellen wurden auf Troponin-T (primärer Antikörper: monoklonaler anti-Troponin-T-Antikörper, kardiale Isoform, Klon CT-3, sekundärer Antikörper: Alexa 568) getestet. Zur Untersuchung von Kollagenlokalisationen wurden BrdU-positive Zellen identifiziert (primärer Antikörper: „monoclonal mouse anti-BrdU“-Antikörper, sekundärer Antikörper: Alexa 488).

### 2.16 Kapillardichte

Die Kapillardichtebestimmung erfolgte in infarziertem, wie auch normalem myokardialen Gewebe wie von Weidner und Kollegen [94] beschrieben. Gewebeschnitte wurden unter Verwendung von vWF-Antikörpern angefärbt. Für eine Quantifizierung von positiv gefärbten Gefäßen wurden fünf Schnitte aus dem Infarktgebiet je Herz einfachblind bezüglich der Zellbehandlung von einem Untersucher ausgewertet. Die Kapillaren wurden in 10 randomisiert ausgewählten Gesichtsfeldern (engl.: high-power field, HPF, 400 x) in zwei Gewebeschnittpräparaten pro Ratte gezählt. Das Ergebnis ist in Kapillaren pro Gesichtsfeld angegeben.

### 2.17 Statistische Auswertung

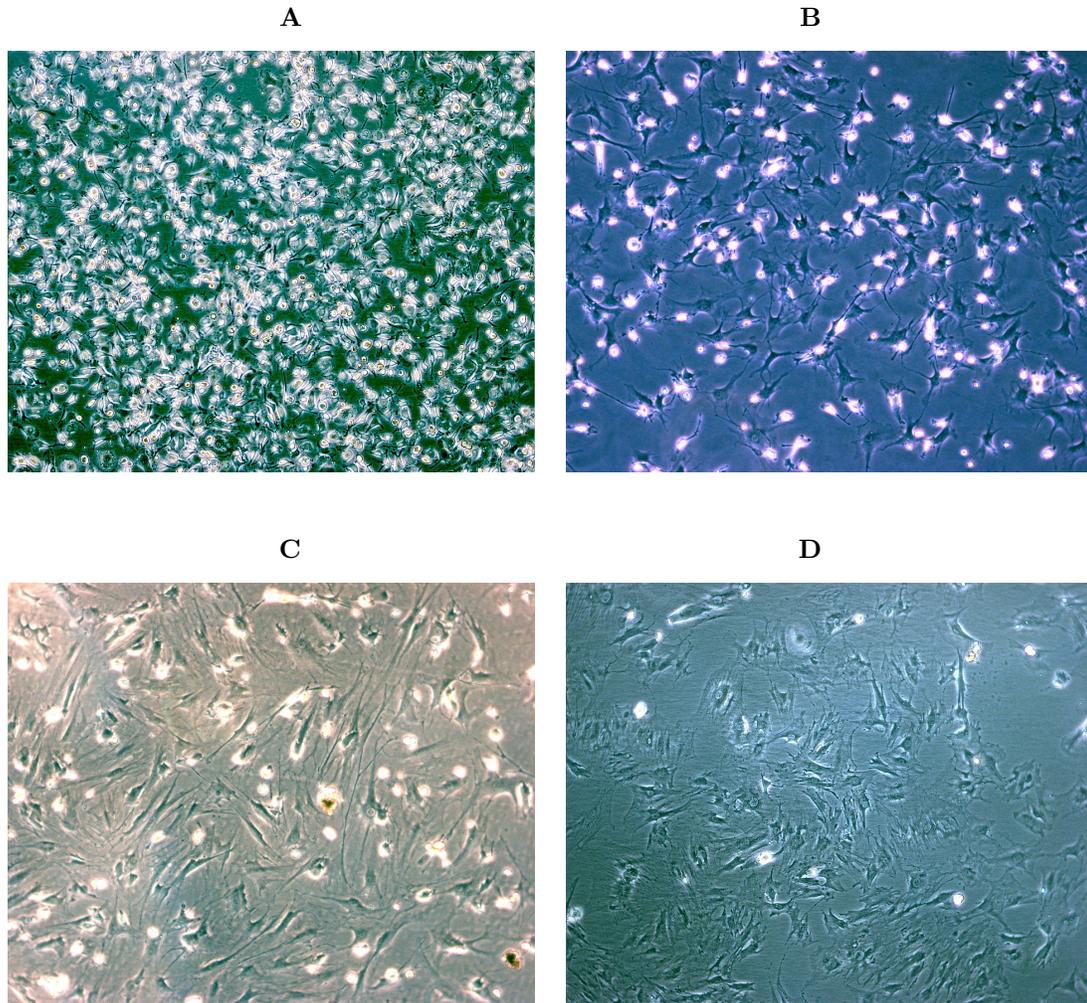
Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt. Die Einweg-Analyse der Varianz mit Scheffe's post hoc Test (ANOVA) wurde für ungleiche Probengrößen verwendet, um numerische Daten zwischen den experimentellen Gruppen zu vergleichen. Ein Wert von  $p < 0,5$  wurde als signifikant angesehen.

### 3 Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden die eigenen Ergebnisse der Arbeit dargestellt. Der erste Teil beschreibt die Isolierung, ex vivo-Kultur und Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark der Ratte. Der zweite Teil beschäftigt sich mit dem nichtviralen Gentransfer und dessen Eignung für die ex vivo-Modifizierung von MSCs. Gegenstand des dritten Teils sind schließlich die Ergebnisse der durchgeführten in vivo-Studien zur Transplantation der nichtviral transduzierten mesenchymalen Stammzellen in den Randbereich infarzierten Myokardgewebes nach Koronararterienligatur mit dem Hauptaugenmerk auf Monitoring und Schicksal nach der Stammzellinjektion.

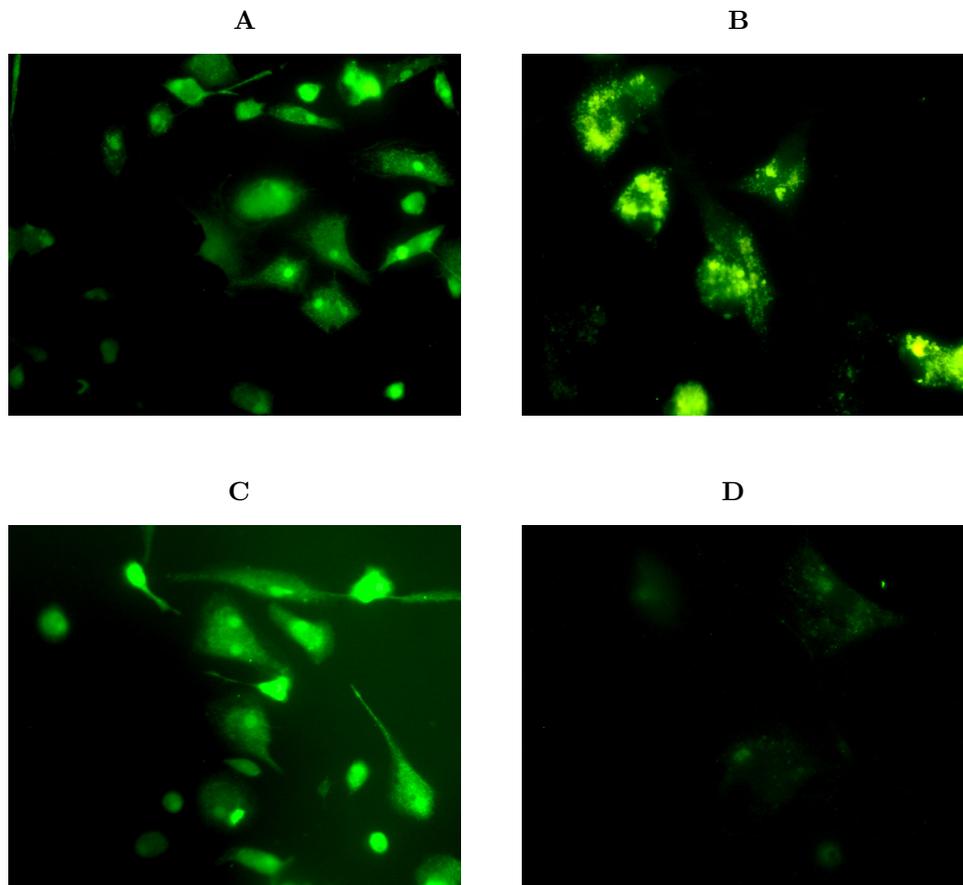
#### 3.1 Charakterisierung von MSCs

Zellisolierung, Zellanreicherung, Charakterisierung und Differenzierung von Ratten-MSCs wurden wie in früheren Berichten vorgenommen [20]. Primärkulturen von Knochenmarkzellen wurden nach der Methode von Dexter [43] angelegt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von insgesamt 100 Mio. Zellen/ 7 ml MSC-Medium/ 75cm<sup>3</sup>-Gewebekulturflasche inkubiert - ohne Zusatz von lymphatischem oder Wachstums-Faktor. Aus je 2 Femurknochen ließen sich 120 Mio.  $\pm$  8 Mio. Knochenmarkzellen erhalten. Basierend auf der charakteristischen Oberflächenadhärenz konnte die Population der mesenchymalen Stammzellen (MSCs) relativ einfach aus dem Pool der gesamten Knochenmarkzellen isoliert werden, da sich nichtadhärente Zellen durch mehrere Waschschriffe effektiv aus der Kultur entfernen ließen (Abb. 3.1 A-D). Eine erste Zellpassage (P1) erfolgte insgesamt 7-10 Tage nach Beginn der Zellkultur. Zu diesem Zeitpunkt war der Gewebeflaschenboden bereits zu 80% mit typisch spindelförmigen mesenchymalen Stammzellen bedeckt. Das morphologische Bild blieb bis zur zweiten Passage (P2) nach insgesamt 12-15 Tagen konstant; dann wurden die Stammzellen größer. Gleichzeitig nahm die Replikationsrate ab der zweiten Passage deutlich ab, so dass sich an weiteren Tagen wieder verringerte Zahlen pro Zellkulturflasche ergaben.



**Abbildung 3.1 A-D:** Isolierung und ex vivo-Kultur der aus dem Knochenmark der Ratte stammenden mesenchymalen Stammzellen (MSCs). Die Morphologie der MSCs wurde unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Darstellung nach insgesamt (A) 0 Tagen, (B) 3 Tagen, (C) 7-10 Tagen und (D) 12-15 Tagen, 100-fache Vergrößerung.

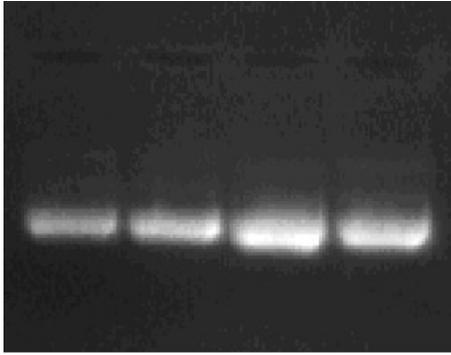
Die Immunfärbungen zur Charakterisierung des Antigenprofils zeigten eine deutliche Expression von CD29, CD31 und CD117 (Abb. 3.2 A-C). Die MSC-Kulturen waren für den monozytären Marker CD14 (Abb. 3.2 D) und die haematopoetischen Stammzellmarker CD34 und CD45 negativ (Daten nicht gezeigt).



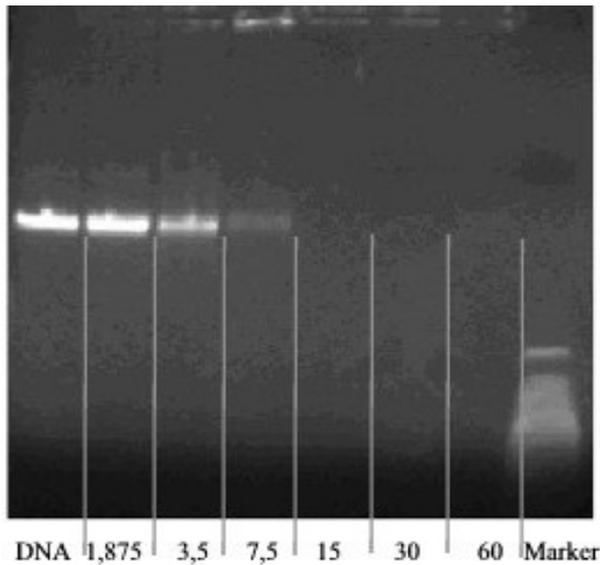
**Abbildung 3.2 A-D:** Charakterisierung der mesenchymalen Stammzellen. Repräsentative immunzytochemische Analysen für die Antigene (A) CD29, (B) CD31, (C) CD117 und (D) CD14 nach insgesamt 12-15 Tagen Primärkultur.

### 3.2 Evaluierung und Optimierung des PEI600-PSL-5-Gentransfersystems

Zur Analyse von DNA-Komplexierung und Kondensation als Funktion des N/P-Verhältnisses wurde der Gelretardierungs-Assay verwendet. Polymer/DNA-Komplexe sind aus purifizierter DNA (Abb. 3.3) und dem Polymer PEI600-PSL5 mit verschiedenen N/P-Verhältnissen hergestellt worden. Das Ergebnis findet sich in Abb. 3.4 dargestellt. Eine vollständige Retardierung stellt sich ab einem N/P-Verhältnis von 15 dar und ab diesem Wert kann von einer vollständigen DNA-Bindung und damit der effizientesten Carrierfunktion des eingesetzten Polymers ausgegangen werden.



**Abbildung 3.3** Gelelektrophoretische Darstellung von amplifizierter Luciferase-Plasmid-DNA.

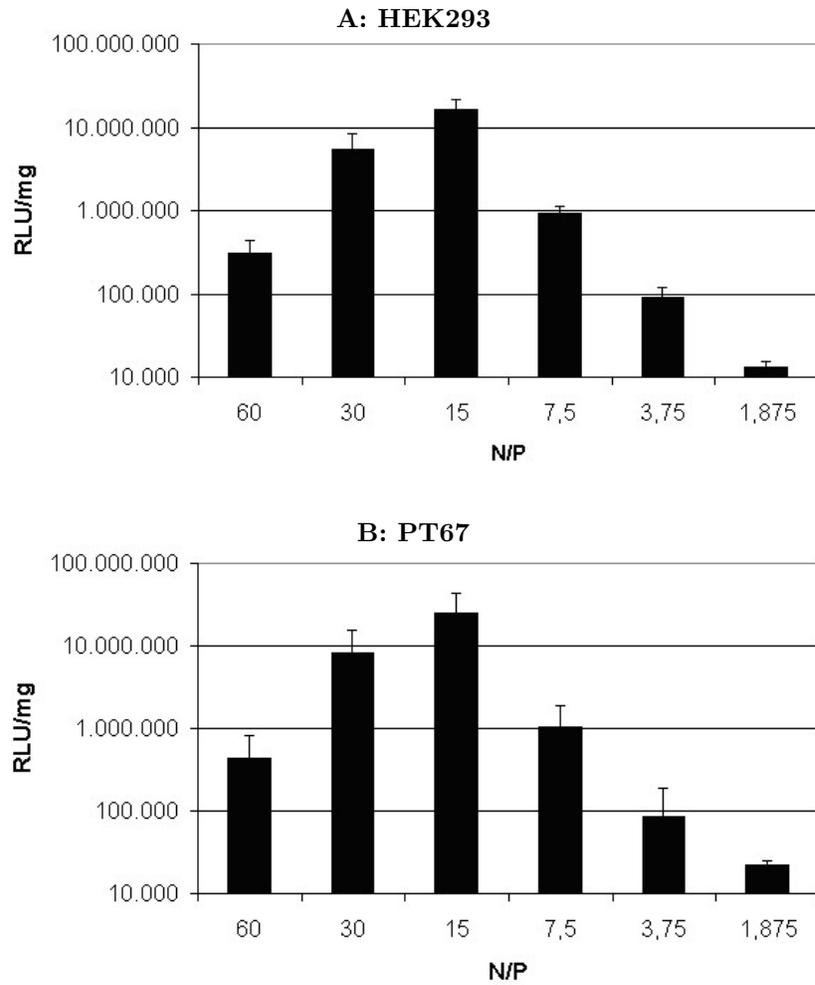


**Abbildung 3.4** Darstellung des Gelretardierungsassays von PEI600-PSL-5. Elektrophoretische Mobilität der Plasmid-DNA im Polymerkomplex mit unterschiedlichen Polymer/DNA-Verhältnissen in einem 0,8% Agarose-Gel.

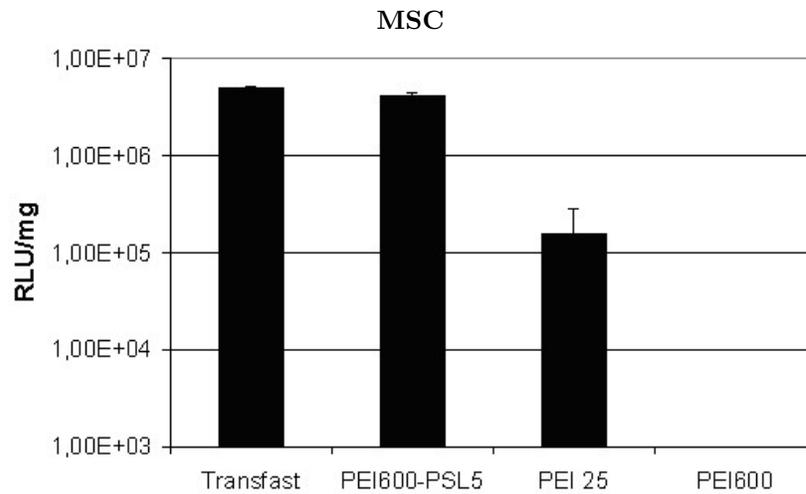
N= Stickstoffrest, P= Phosphate.

Wir nahmen Transfektionsexperimente mit PEI600-PSL-5 an PT67- und HEK293-Zellen vor, um den Effekt unterschiedlicher Polymer/DNA-Verhältnisse auf das Transfektionsmaximum zu bestimmen. Die höchste Transferrate ließ sich bei einem N/P-Verhältnis von 15 (Tab. 3.1 A, B) ablesen. Diese Ergebnisse decken sich mit der Arbeit von Tang und Kollegen (2006); diese beschrieben ein Transfektionsoptimum bei einem N/P-Verhältnis zwischen 12 und 15. Unter ermittelten (PEI600-PSL-5) und bekannten (Transfast, PEI 25, PEI 600) optimalen Transfektionsbedingungen wurde die Transfektionseffizienz an MSCs verglichen (Tab. 3.2). Transfast und PEI600-PSL-5 weisen eine ähnliche Transfektionseffizienz auf, wobei PEI600-PSL-5 aufgrund seiner kostengünstigen Herstellung und einfachen Applikation für die Anwendung in dieser Studie bevorzugt wurde. PEI600-PSL-5 zeigt sich zudem

für den Gentransfer deutlich effektiver im Vergleich zu PEI.

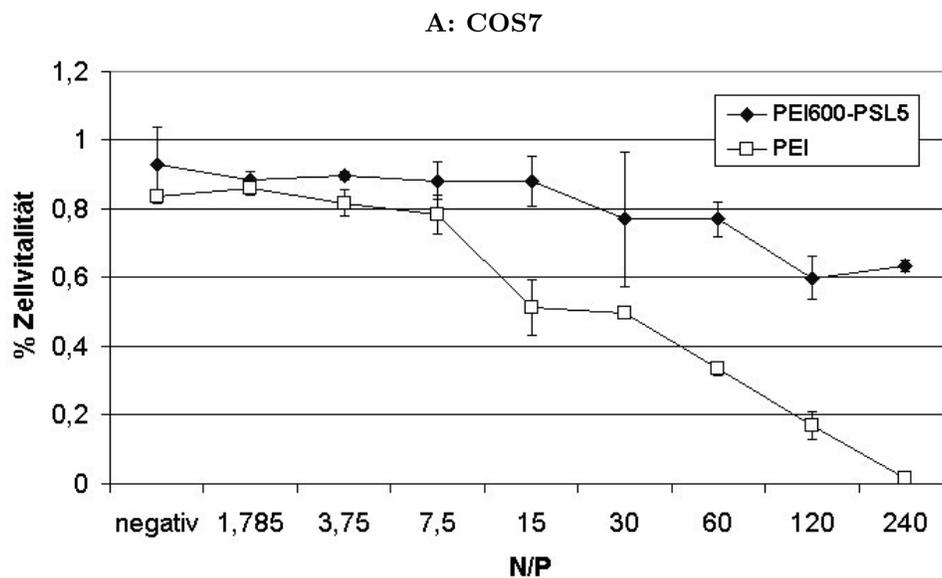


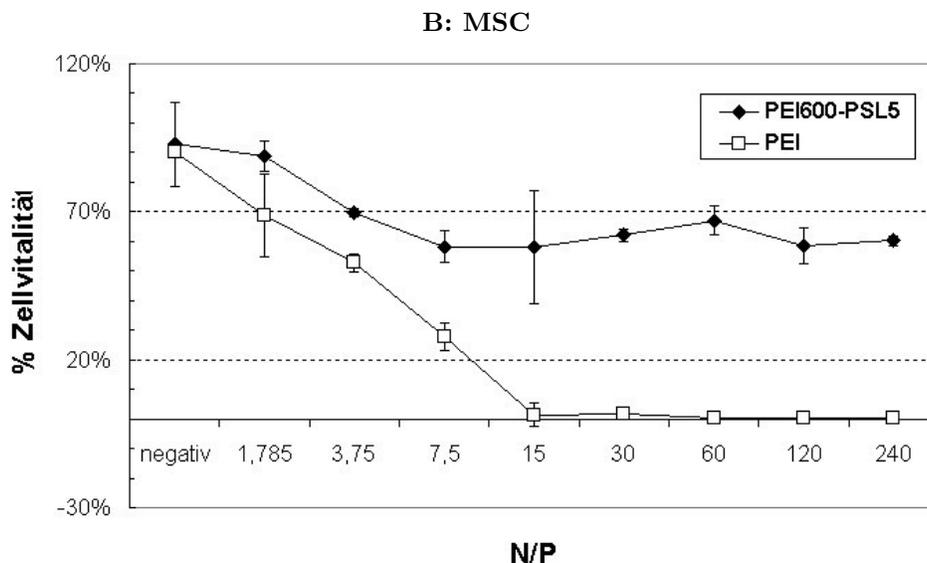
**Tabelle 3.1 A, B:** Transfektion mit PEI600-PSL5 bei verschiedenen N/P-Verhältnissen an HEK293-Zellen und PT67. N/P entspricht dem Stickstoffrest- zu Phosphatverhältnis der Polymer/DNA-Komplexe.



**Tabelle 3.2** Transfektionseffizienz der jeweils optimalen Transfektionsresultate verschiedener Carriersysteme an MSCs im Vergleich.

Zytotoxische Einflüsse des polymerischen DNA-Trägers *in vitro* wurden mit der MTT-Methode analysiert und die Ergebnisse sind in Tab. 3.3 A und B dargestellt. PEI600-PSL-5 besitzt an den Zelllinien COS7 und Ratten-MSCs eine im Vergleich zu PEI deutlich geringere Toxizität und auch in größeren (bei Kumulation relevanten) Polymerkonzentrationen persistiert das Zellüberleben bei über 60%.

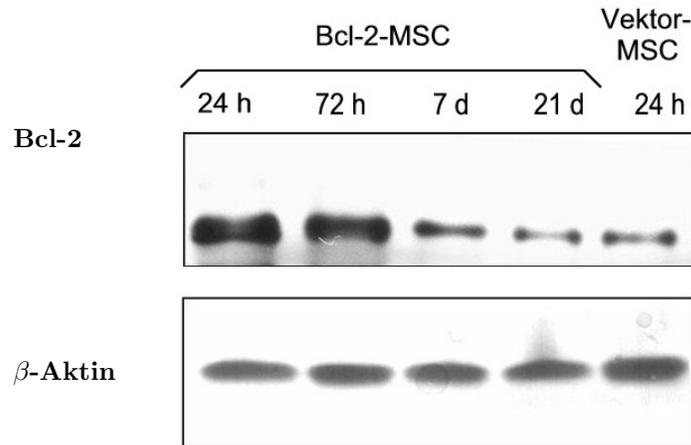




**Tabelle 3.3 A, B:** COS7 und MSCs wurden für 4 Stunden je mit PEI600-PSL-5 und PEI exponiert. Die Zellvitalität wurde mit dem MTT-Assay bestimmt und ist graphisch in % von der Gesamtzahl dargestellt.

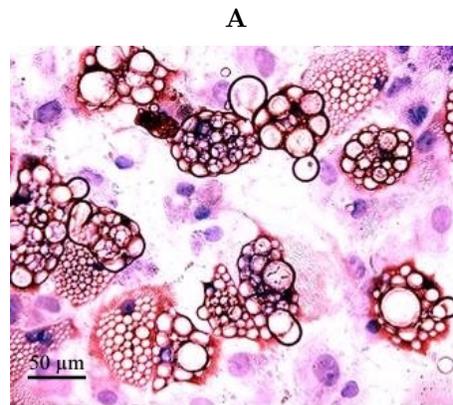
### 3.3 Bcl-2-Überexpression von genetisch modifizierten MSCs in vitro

Um die Expression des Bcl-2-Proteins in den genetisch modifizierten MSCs zu beurteilen, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (24 und 72 Stunden, 7 Tage sowie 21 Tage) nach der Transfektion eine Western blot-Analyse durchgeführt. Eine signifikant hohe Expression fand sich in Bcl-2-MSCs bereits nach 24 Stunden und blieb bis 7 Tage nach der Transfektion nachweisbar (Abb. 3.5). Eine vergleichende Analyse des „Housekeeping“-Gens  $\beta$ -Aktin zeigte für dieses eine konstante Expression (Abb. 3.5). Diese Beobachtungen zeigen eine erfolgreiche Transfektion mit dem Bcl-2-Gen. Die Hochregulation der Bcl-2-Proteinexpression war transient und könnte so das Risiko für eine maligne Transformation oder späteres Zellversagen minimieren. Während der Transfektionen wurde keine Änderung des Phänotyps der Zellen beobachtet (nicht gezeigt).

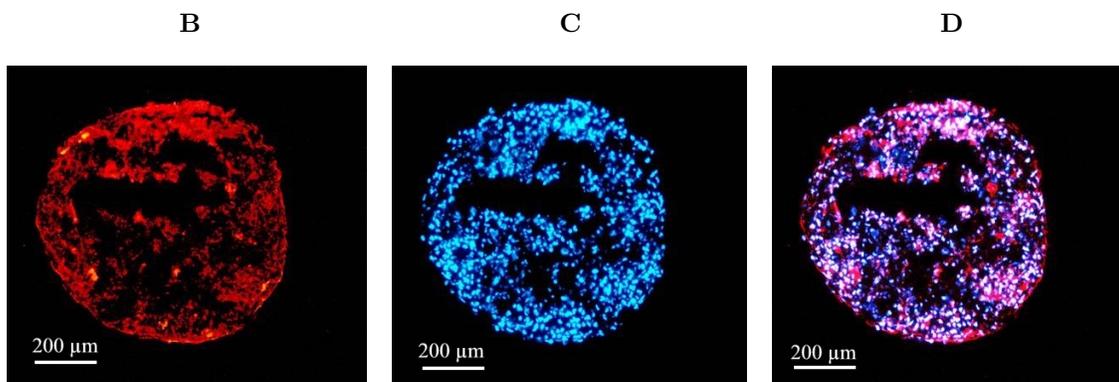


**Abbildung 3.5** Repräsentative Western Blot-Analysen zeigen eine Überexpression von Bcl-2 in Bcl-2-modifizierten MSCs bis 7 Tage nach Transfektion. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin. h= Stunden, d =Tage.

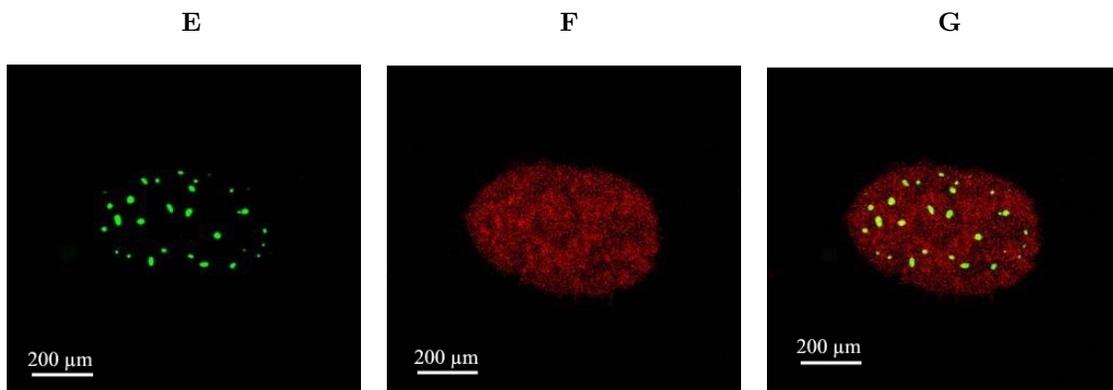
MSCs können in verschiedene Zelllinien differenzieren und diese Eigenschaft gilt als definierendes funktionelles Kriterium für MSCs. MSCs wurden zu adipogener, chondrogener und kardiomyozytärer Differenzierung konditioniert. Nach 21 Tagen Induktion in Richtung der adipogenen Differenzierung wurden charakteristische morphologische Veränderungen beobachtet. Die Immunfärbung erwies sich als positiv für das Fatty Acid Binding Protein-4 (FABP-4), einem Marker-Protein für Adipozyten (Abb. 3.6 A). Die Chondrogenese wurde mit der Immunfärbung für Aggrecan 4 Wochen nach Kultivierung unter chondrogenen Verhältnissen nachgewiesen. Die Chondrozyten-ähnlichen Zellen zeigten eine positive Anfärbung für das Aggrecan-Protein (Abb. 3.6 B-D). Für eine kardiomyozytäre Differenzierung erfolgte eine 24-stündige Exposition der MSCs mit dem Agens 5-Azacytidin. Nach zwei Wochen wurden Kardiomyozyten-ähnliche Zellen und eine positive Immunfärbung für den Transkriptionsfaktor Nkx2.5 beobachtet (Abb. 3.6 E-G). Insgesamt wurde das Differenzierungspotential der MSCs für adipogene, chondrogene und kardiomyogene Zelllinien erneut bestätigt.



**A:** Adipogene Differenzierung. Immunfärbung mit Fatty Acid Binding Protein-4 (braun).



**B-D:** Chondrogene Differenzierung. Immunfärbung für Aggrecan (rot dargestellt). Zellkernfärbung mit 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (blau). (D): „overlay“.

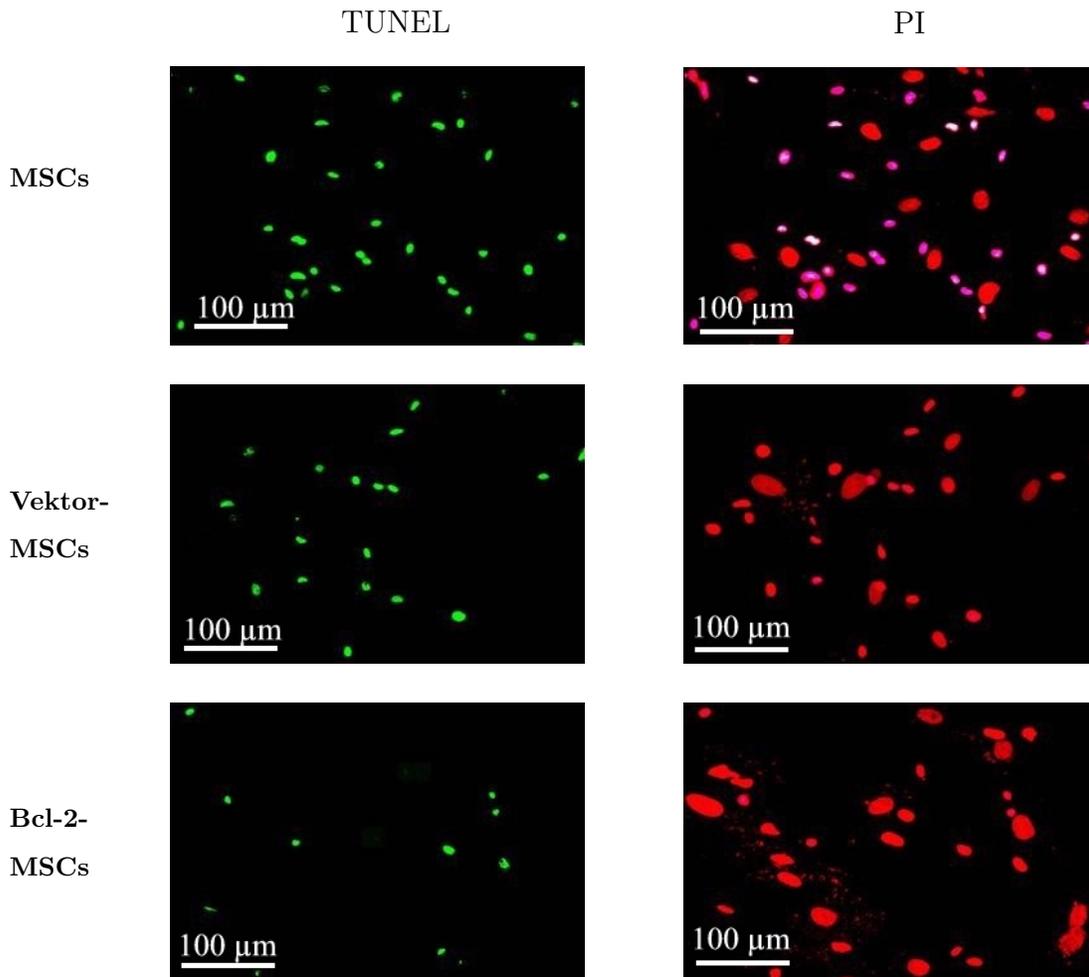


**E-G:** Kardiomyozyten-ähnliche Differenzierung. Nkx2.5-Antikörper-Immunfärbung, die sich grün darstellt. Zellkernfärbung mit Propidium-Jodid (rot).

**Abbildung 3.6 A-G:** Differenzierungskapazität von Bcl-2-MSCs. MSCs wurden nach Transfektion mit dem Bcl-2-Gen in adipogenem, chondrogenem und myogenem Medium kultiviert.

### 3.4 Bcl-2-Überexpression bietet MSCs Schutz vor Apoptose in vitro

Um die Fähigkeit zum Schutz vor Apoptose der Bcl-2-MSCs in vitro zu testen, wurden die modifizierten MSCs für 24 Stunden hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Die Evaluation der Apoptose erfolgte mit dem TUNEL-Assay (Abb. 3.7).



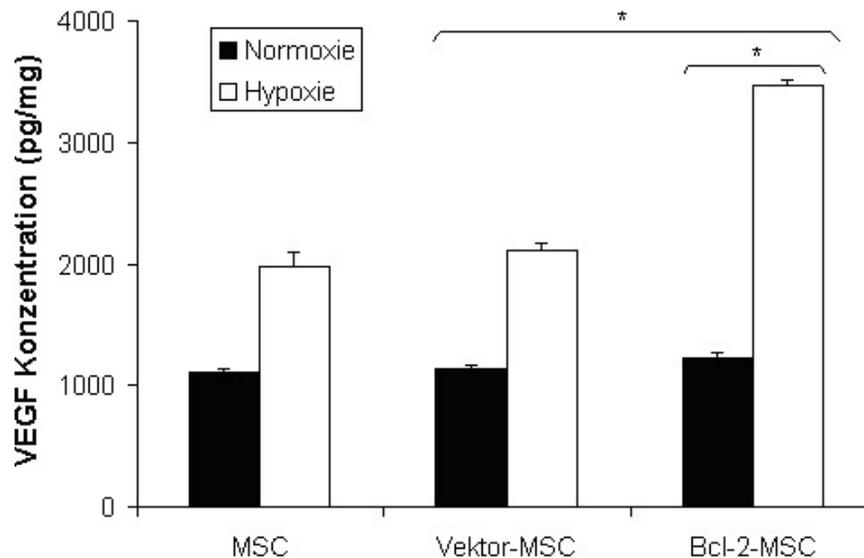
**Abbildung 3.7** Antiapoptotischer Effekt an Bcl-2-MSCs unter hypoxischen Bedingungen. Repräsentative Photomikrographien von TUNEL-positiven (linke Felder) und gesamten (rechte Felder) Zellen 24 Stunden nach hypoxischer Behandlung. PI = Propidium-Jodid, TUNEL = Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mMediated dUTP end labeling.

Unter Hypoxie lag die Apoptoserate der MSCs und Vektor-MSCs um das 1,5-fache höher als die der Bcl-2-MSCs. Die Zahl apoptotischer Zellen ist damit signifikant durch genetische Modifizierung mit Bcl-2 gesenkt worden. Der quantitative Nachweis zeigte eine Reduktion der Zahl TUNEL-positiver Zellen von  $53\% \pm 3,5\%$

der MSCs und  $51\% \pm 4,7\%$  der Vektor-MSCs auf  $36\% \pm 1,8\%$  der Bcl-2-MSCs ( $p < 0,001$ ). Jedoch gab es keine signifikanten Unterschiede der Zahl apoptotischer Zellen von MSCs, Vektor-MSCs und Bcl-2-MSCs unter Normoxie. Diese Ergebnisse zeigen einen Schutz von mit Bcl-2 modifizierten MSCs vor Apoptose unter hypoxischen Bedingungen. Wir erwarten, dass mit Bcl-2 modifizierte Zellen ihre antiapoptotischen Eigenschaften im ischämischen Myokard beibehalten.

### 3.5 Parakrine Sekretion unter hypoxischen Bedingungen

Um das Potential parakriner Mechanismen, die für einen therapeutischen Effekt der Bcl-2-MSCs verantwortlich sind, zu identifizieren, wurde die Sekretion von VEGF untersucht. MSCs, Vektor-MSCs und Bcl-2-MSCs wurden unter jeweils norm- und hypoxischen Bedingungen bis zu 24 Stunden kultiviert. Die Sekretion von VEGF wurde mit dem Quantikine Rat VEGF Immunoassay quantifiziert. Es zeigte sich eine Zunahme der Sekretion um mehr als 60% in Bcl-2-MSCs im Vergleich zu MSCs und Vektor-MSCs unter hypoxischen Kulturbedingungen (Tab. 3.4). Jedoch ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bei Kultivierung unter Normoxie feststellen. Das angiogene Zytokin VEGF in Bcl-2-MSCs war signifikant in Reaktion auf Hypoxie erhöht. Die hochregulierte VEGF-Expression von Bcl-2-MSCs könnte kardioprotektive und proangiogenetische Effekte innehaben.

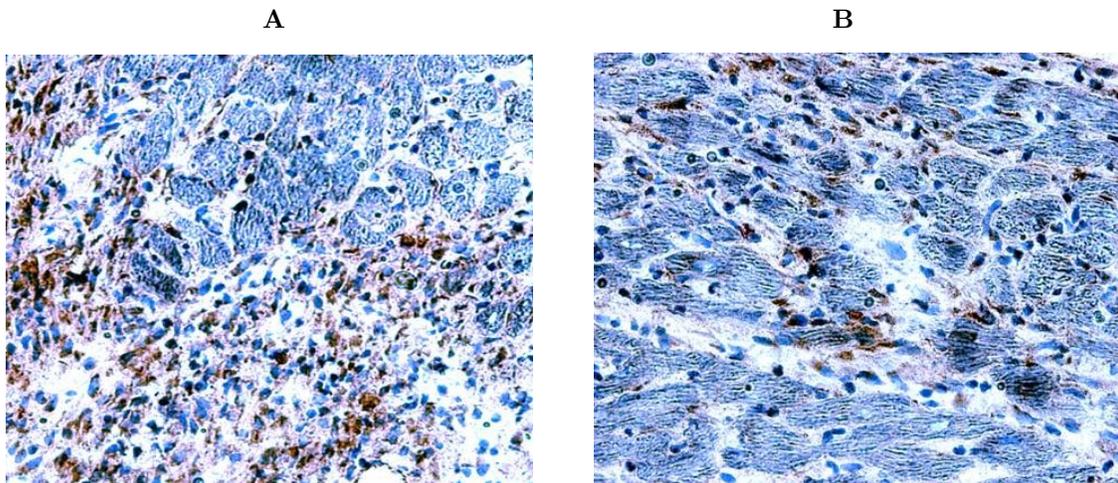


**Tabelle 3.4** Hochregulierung der VEGF-Sekretion von Bcl-2-MSCs unter hypoxi-

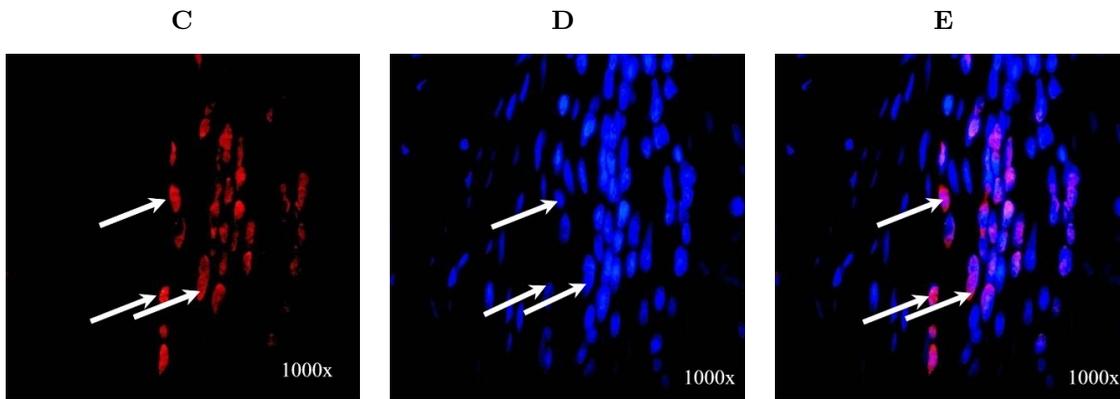
schen Bedingungen. Nach 24 Stunden Inkubation wurde konditioniertes Medium von Normoxie (schwarze Balken) und Hypoxie (leere Balken) mit dem VEGF Enzymgebundenen Immunosorbent Assay (ELISA)-Assay untersucht. Konzentrationswerte von VEGF sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (\*  $p < 0,001$ ). Die ELISA-Daten sind das Ergebnis dreier unabhängig ausgeführter Experimente. VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor.

### 3.6 Schicksal transplantiertes Zellen

Um die Effizienz der Transplantation von mit Bcl-2 modifizierten MSCs zu untersuchen, wurden  $6 \times 10^6$  Bcl-2-MSCs und MSCs in das Myokard des linken Ventrikels im Gebiet der Infarktgrenze transplantiert. Die Kontrollgruppe erhielt lediglich Kochsalzlösung. Eine Untersuchung auf Zellansiedlung erfolgte zu den verschiedenen Zeitpunkten: 4 Tage, 3 und 6 Wochen nach Zelltransplantation. BrdU-positive Zellkerne wurden mittels Immunfärbung identifiziert (Abb. 3.8 A-E).



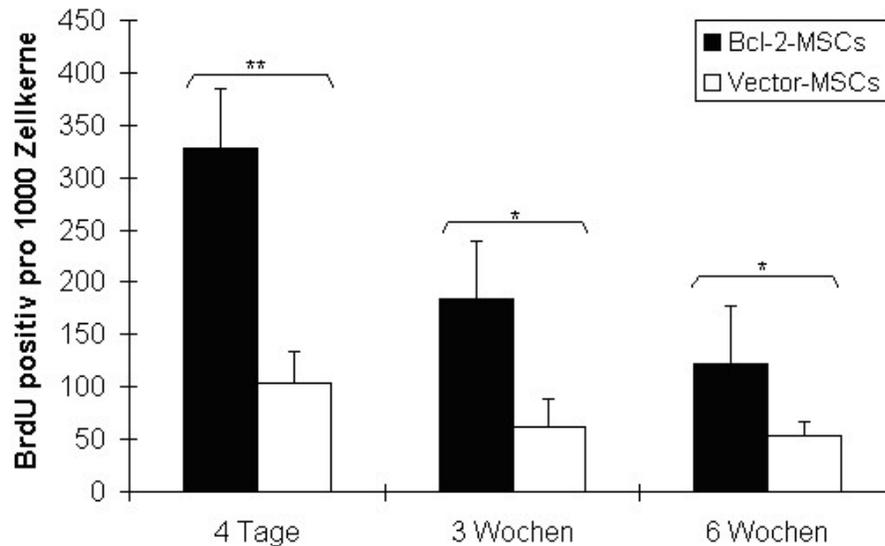
**A, B:** Repräsentative Ausschnitte aus der Immunfärbung von angesiedelten MSCs in infarziertem Ratten-Myokard 4 Tage nach Injektion von MSCs. Bromodeoxyuridin (BrdU)-markierte MSCs (braun) wurden deutlich identifiziert.



**C-E:** Immunfluoreszenz-Färbung von BrdU-markierten Zellen in der Bcl-2-MSCs-Gruppe 3 Wochen nach der Zellbehandlung. (C): BrdU (rot). (D): 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (blau). (E): Übereinandergelegte Bildausschnitte.

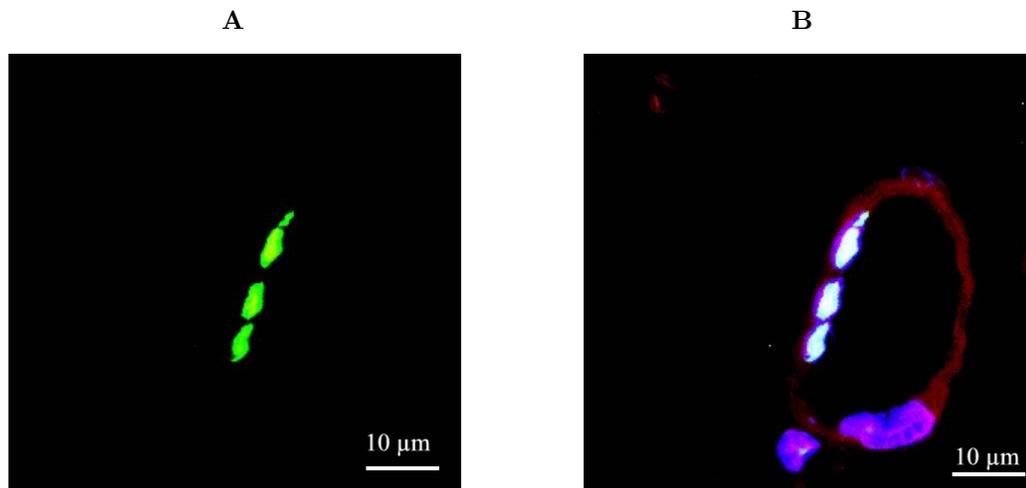
**Abbildung 3.8 A-E:** Ansiedlung von Bcl-2-MSCs in ischämischem Myokard. Die Pfeilspitzen zeigen auf die Zellansiedlung. 1000-fache Auflösung in allen Abbildungsfeldern.

In den Abbildungen 3.8 A-E sind repräsentative Bildausschnitte 4 Tage nach Transplantation (Abb. 3.8 A, B) und Bcl-2-MSCs im infarzierten Herz 3 Wochen nach Zelltransplantation (Abb. 3.8 C-E) dargestellt. Die Anzahl überlebender Zellen nach Zelltransplantation in der Bcl-2-MSCs-Gruppe war höher als in der Gruppe mit Vektor-MSCs. Diese Unterschiede erwiesen sich als statistisch signifikant (Tab. 3.5), mit einer 2,2-fachen Steigerung des Zellüberlebens am Tag 4 ( $n = 10$ ,  $p < 0,01$ ), einer 1,9-fachen Steigerung am Tag 21 ( $n = 9$ ,  $p < 0,05$ ) und einer 1,2-fachen Steigerung nach 6 Wochen ( $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ). Die Modifizierung der MSCs mit dem Bcl-2-Gen erhöhte das zelluläre Überleben nach artefiziellm Myokardinfarkt.

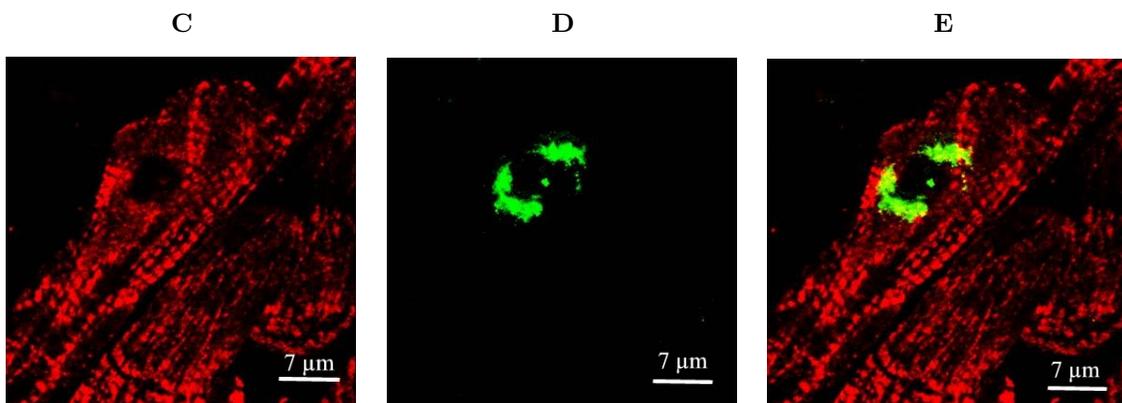


**Tabelle 3.5** Quantitative Beurteilung der angesiedelten MSCs nach 4 Tagen, 3 Wochen und 6 Wochen (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

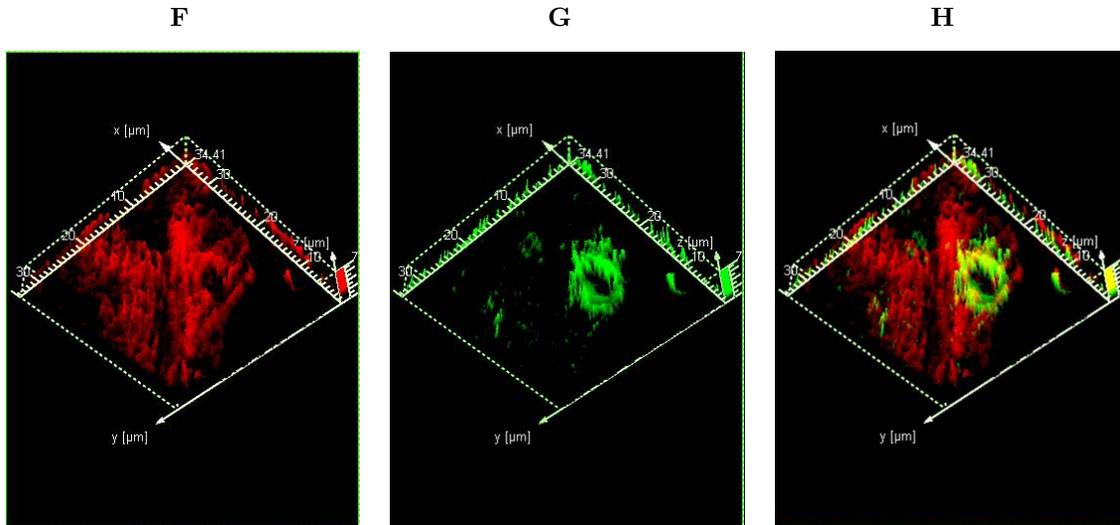
Des weiteren zeigte sich anhand der doppelten Immunfluoreszenz-Färbung mit BrdU und anti-vWF-Antikörper, ein zumindest bei einigen MSCs ( $3,1\% \pm 1,3\%$ ) sich entwickelnden Endothelzell-ähnlichen Phänotyp. Gelegentlich bestanden Blutgefäße aus BrdU-positiven Zellen (Abb. 3.9 A-B). Drei Wochen nach Zelltransplantation konnte eine geringe Anzahl von Zellen beobachtet werden, die mit kardialem Troponin T (cTnT) kolokalisiert waren (Abb. 3.9 C-E). Die Kolokalisation wurde durch eine dreidimensionale Rekonstruktion des Gewebes mit dem konfokalen Mikroskop Leica TCP2 deutlicher sichtbar gemacht (Abb. 3.10 A-C). Die Frequenz von cTnT-BrdU-doppeltpositiven war extrem niedrig (für die Gruppe mit Bcl-2-MSCs  $0,05\% \pm 0,02\%$  cTnT). Es gab hierbei keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe mit Bcl-2-MSCs und der mit MSCs). Unklar blieb, ob die transplantierten Zellen fusioniert oder in Kardiomyozyten differenziert waren. Es gibt keine Hinweise auf Tumorformationen und Differenzierung der MSCs in Knochen, Fettgewebe und Knorpelgewebe 3 und 6 Wochen nach Transplantation (nicht gezeigt).



**A, B:** Doppelte Immunfluoreszenz-Färbung. BrdU-markierte Bcl-2-MSCs (grün) in der endothelialen Auskleidung der Blutgefäße (rot) nahe der Infarktgrenzzone 3 Wochen nach Transplantation.



**C-E:** Gewebeschnitte nahe der Infarktzone drei Wochen nach Transplantation wurden doppelgefärbt mit BrdU (grün) und dem kardialen Marker Troponin T (rot). BrdU-positive Zellen kolokalisiert mit kardialem Troponin T.

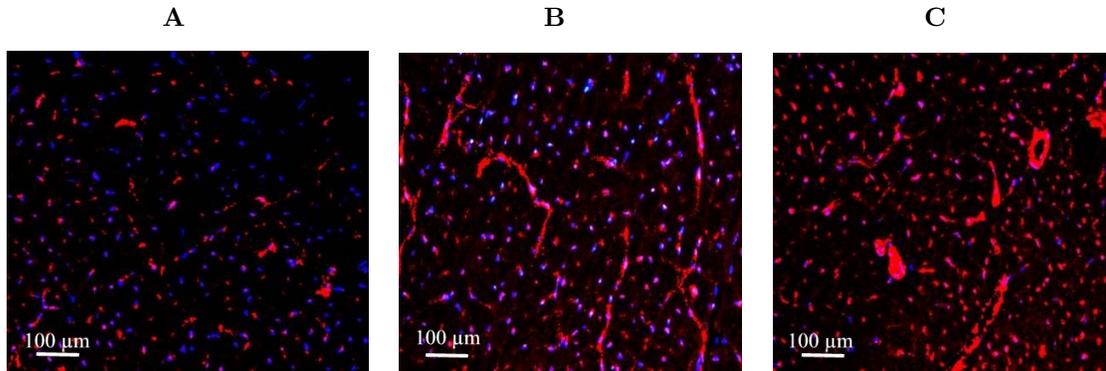


**F-H:** Dreidimensionale Rekonstruktion von Gewebeschnitten mit der konfokalen Mikroskopie. Der BrdU-positive Nukleus liegt innerhalb eines Zellkörpers, der kardiales Troponin T exprimiert.

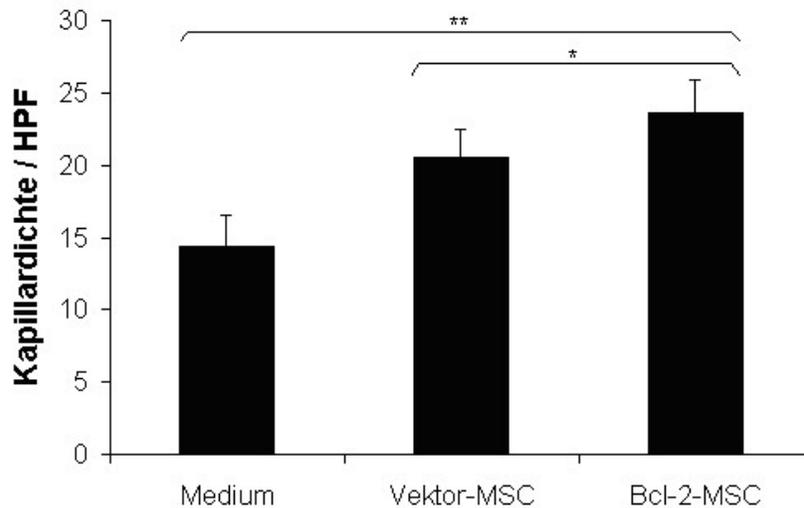
**Abbildung 3.9 A-H:** Bcl-2-MSCs in ischämischem Myokard.

### 3.7 Kapillardichte

Die Kapillardichte im Grenzgebiet des Myokardinfarkts wurde basierend auf einer vWF-Immunfärbung 3 Wochen nach Zelltransplantation ermittelt. Repräsentative Bildausschnitte sind in den Abb. 3.10 A-C gezeigt. Es lag ein signifikanter Anstieg der Kapillardichte in den Gruppen mit Vektor-MSCs ( $20,5 \pm 1,9$  Gefäße pro High Power Field) und Bcl-2-MSCs ( $23,6 \pm 1,3$  Gefäße pro HPF) im Vergleich zur mit DMEM behandelten Gruppe ( $14,4 \pm 2,1$  Gefäße pro HPF) ( $n = 8$ ,  $p < 0,001$ ) vor und es fand sich keine offensichtliche Angiogenese in der Mediumgruppe (Tab. 3.6). Die Dichte der Kapillaren lag in der Bcl-2-MSCs-Gruppe im Vergleich zur Vektor-MSCs-Gruppe um 15% höher und wies damit einen signifikanten ( $n = 8$ ,  $p = 0,002$ ) Unterschied auf.



**Abbildung 3.10 A-C:** Funktionelle Effekte von mit Bcl-2 modifizierten MSCs. Bcl-2-MSCs verstärkten die Angiogenese in infarziertem Myokard. Repräsentative Mikrophographien des Infarktgebietes, gewonnen nach Immunfärbung für von Willebrand-Faktor (vWF).

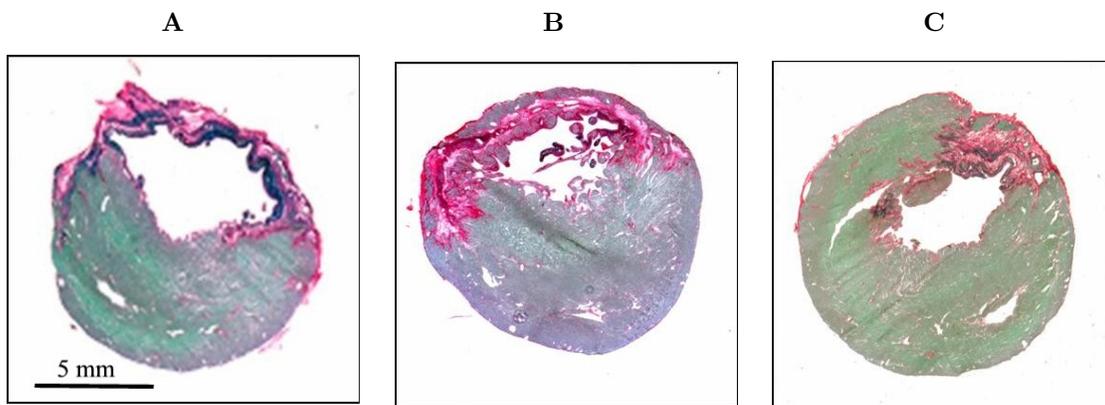


**Tabelle 3.6** Quantitative Kapillardichte-Resultate basierend auf vWF-Immunfärbung. Die Werte stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dar (\* $p = 0,002$ , \*\* $p < 0,001$ ). HPF = hochauflösendes Gesichtsfeld.

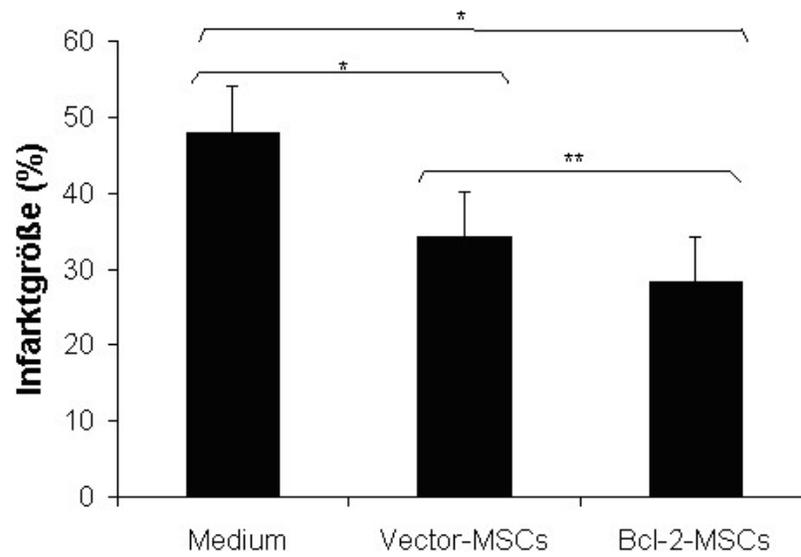
### 3.8 Ausmaß der Infarktgröße

Die Ligatur des Ramus interventricularis anterior (LAD-Ligatur) führte in konstantem Maße zu einem transmuralen Myokardinfarkt und wies ein entsprechendes typisches histologisches Bild mit Verdünnung der linksventrikulären freien Wand und ausgedehnter Kollagenablagerung 3 Wochen nach Infarkt auf. Repräsentative linksventrikuläre Gewebeschnitte 3 Wochen nach LAD-Ligatur der Gruppen mit lediglich

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Vektor (pcDNA3.1)-MSCs und Bcl-2 (pcDNA3.1/ Bcl-2)-MSCs sind in Abb. 3.11 dargestellt. In den beiden Gruppen mit Vektor-MSCs und Bcl-2-MSCs behandelter Tiere nach induziertem Myokardinfarkt zeigte sich im Vergleich zur Gruppe mit DMEM-Injektion eine kleinere Infarktgröße ( $34,2\% \pm 6,0\%$  für Vektor-MSCs,  $28,3\% \pm 5,8\%$  für Bcl-2-MSCs) und dieser Unterschied war signifikant ( $n = 8$ ,  $p < 0,001$  für Vektor-MSCs im Vergleich zur Medium-Gruppe;  $n = 8$ ,  $p < 0,001$  für Bcl-2-MSCs im Vergleich zur Medium-Gruppe). Des Weiteren war der Kollagengehalt 17% niedriger in der Bcl-2-MSCs-Gruppe als in der Vektor-MSCs-Gruppe ( $34,2\% \pm 6,0\%$  der Vektor-MSCs-Gruppe im Vergleich zu  $28,3\% \pm 5,8\%$  der Bcl-2-MSCs-Gruppe) ( $n = 8$ ,  $p = 0,29$ ) (Abb. 3.11).



**Abbildung 3.11 A-C:** Repräsentative histologische Picro-Siriusrot-Färbungen von transversalen Gewebeschnitten durch die Rattenherzen 3 Wochen nach Koronararterienligatur mit (A) Medium-, (B) Vektor-MSCs- und (C) Bcl-2-MSCs-Injektion. Verdünnung der linksventrikulären freien Wand und ausgedehnte Kollagenablagerungen (rot) im Narbengewebe wurde in den Gruppen mit Medium und Vektor-MSCs beobachtet.



**Tabelle 3.7** Signifikante Reduktion der Infarktgröße in den beiden Gruppen mit Vektor-MSCs ( $*p < 0,001$  gegenüber der Medium-Gruppe) und Bcl-2-MSCs ( $*p < 0,001$  gegenüber der Medium-Gruppe). Die Infarktgröße war in der Bcl-2-MSCs-Gruppe 17% kleiner als in der Vektor-MSCs-Gruppe ( $**p = 0,029$ )

## 4 Diskussion

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) aus dem Knochenmark sind als vielversprechende Zellentitäten für die Regeneration und Restauration der Funktion nach Myokardinfarkt beschrieben worden [24, 25, 97, 98]. Jedoch hat eine geringe Überlebensrate übertragener Zellen die therapeutische Effizienz beeinträchtigt. In dieser Arbeit wurde die Schlüsselrolle von Bcl-2 als Apoptoseschutz bei der Zelltransplantation unter Hypoxiebedingungen *in vitro* und *in vivo* als wesentlich herausgestellt. Es wurden MSCs der Ratte aus dem Knochenmark identifiziert und gezeigt, dass die genetisch mit dem Gen Bcl-2 veränderten MSCs (Bcl-2-MSCs) die typische Fähigkeit zur Differenzierung [35] beibehalten, und zu verschiedenen Zelllinien *in vitro* programmiert werden können. Die Überexpression von Bcl-2 vermindert die Zelltodrate von MSCs unter hypoxischen Bedingungen. *In vivo*-Transplantation von Bcl-2-MSCs erhöht die Überlebensrate der MSCs im LAD–(engl.: left anterior descending)–Ligatur-Modell der Ratte. Es konnte das linksventrikuläre Remodeling nach Infarkt vermindert werden. Die Infarktgröße blieb deutlich begrenzt. Laut früherer Berichte [99] kann durch eine limitierte Infarktgröße das Entstehen einer ventrikulären Dysfunktion verhindert werden. Im Rahmen dieser Studie erhobene hämodynamische Parameter wiesen eine Wiederherstellung der linksventrikulären Funktion auf [100]. Diese Beobachtungen konnten auf die verbesserten anti-apoptotischen Eigenschaften der MSCs zurückgeführt werden und legen nahe, dass die genetische Modifikation der MSCs mit Bcl-2 von signifikantem Wert für eine verbesserte Effizienz der Stammzelltherapie kardialer Erkrankungen ist. Die Ergebnisse gehen mit früheren Beobachtungen an transgenen Mäusen einher, bei denen eine kardiale Überexpression von Bcl-2 zu verminderter Infarktgröße und verbesserter kardialer Funktion nach Ischämie-Reperfusionsschaden [57, 58, 101] geführt hatte.

Mehrere Mechanismen tragen zum Tod der Stammzellen innerhalb von vier Tagen nach Transplantation in das ischämiegeschädigte Herz bei [40, 44]. Zu diesen gehören die Entzündungsreaktion des Empfängers, ausbleibende Pro-Überlebenssignale durch Matrixhaftung und Zell-Zell-Kontakte, verminderter Transport von Sauerstoff und Substraten durch Diffusion [44], verschiedene proapoptotische oder zytotoxische Faktoren im ischämischen Myokard [102], und Ischämie-Reperfusionsschäden der implantierten Stammzellen [117]. Des Weiteren sind MSCs äußerst sensibel gegenüber ischämischen oder inflammatorischen Einflüssen [58]. In dieser Arbeit zeigt sich, dass durch genetische Modifikation von MSCs mit Bcl-2 die transplantierten MSCs effektiv vor Ischämie geschützt werden und das Zellüberleben nach Transplan-

tation zunimmt. In den vorgenommenen Untersuchungen wird eine enge Beziehung zwischen der therapeutischen Effizienz der MSCs und der in situ-Überlebensrate implantierter Zellen in der unwirtlichen Umgebung von Hypoxie, Entzündung, und Narbenbildung des Myokards deutlich, und dies ist mit Untersuchungen von Manti und Kollegen [25] sowie Tang und Kollegen [103] vereinbar. Dennoch müssten entscheidende Faktoren, die das Überleben der MSCs beeinflussen, wie Zytokine, Chemokine, Integrine und andere Adhäsionsmoleküle weiter quantitativ analysiert werden.

Mit dem TUNEL-Test war ein signifikanter Anstieg an nukleosomaler DNA-Fragmentation und -Kondensation unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zu normoxischen Zellen festzustellen und diese Befunde sind mit früheren Daten konkordant, die eine durch Hypoxie provozierte Apoptose von MSCs verifizierten [25]. Hypoxie kann eine „Down“-Regulation von Bcl-2 über den nukleären Faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in Endothelzellen [104] und Myozyten [105] induzieren. NF- $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von Genen reguliert, die in inflammatorische Prozesse, Angiogenese und Zellüberleben involviert sind [106, 107]. Wir geben erstmals einen direkten Beweis dafür, dass eine Hochregulation von Bcl-2 durch exogenen Transfer zur Aktivierung eines Überlebensmechanismus führt und die Hypoxie-induzierte Apoptose der MSCs erfolgreich unterbindet. Der zugrundeliegende Mechanismus, durch den Bcl-2 mesenchymale Stammzellen unter Hypoxie schützt, ist noch unbekannt; vermutlich besitzt NF- $\kappa$ B eine wichtige Rolle. Es sind jedoch weitere Studien notwendig, um diese Hypothese zu unterlegen.

Weiter unklar ist, wie intramyokardial übertragene MSCs funktionieren, ob als neu differenzierte Kardiomyozyten und Endothelzellen oder als parakrine Zellen durch Sekretion von kardioprotektiven Proteinen. Diese Arbeit und andere Studien [103, 108, 109] bestätigen, dass MSCs wichtige Überlebensfaktoren, einschließlich VEGF, IGF (engl.: insulin-like growth factor), HGF (engl.: hepatocyte growth factor), SDF-1 (engl.: stromal derived growth factor) und BFGF (engl.: basic fibroblast growth factor) sezernieren. In Anbetracht der geringen Frequenz neuer Kardiomyozyten und Endothelzellen [103, 110, 111], könnte dieser parakrine Effekt sogar noch bedeutsamer für die funktionelle Erholung des infarzierten Herzens sein als das Potential zur Transdifferenzierung der Stammzellen [110]. Gnecci und Kollegen wiesen nach, dass konditioniertes Medium von hypoxischen, mit Akt modifizierten MSCs (Akt-MSCs) in vitro einen protektiven Effekt an Kardiomyozyten der Ratte besitzt. Die Gruppe zeigte zudem, dass nach intramyokardialer Injektion der Akt-MSCs am

Herzinfarktmodell der Ratte deutlich die Infarktgröße begrenzt und die ventrikuläre Funktion verbessert wird [111]. Diese Studien entstanden aufgrund der Beobachtung von Gnechi und Kollegen, dass bereits 72 Stunden nach Infarkt und intramyokardialer Akt-MSCs-Transplantation die ventrikuläre Funktion wiederhergestellt war [111]. Innerhalb einer derart kurzen Zeitspanne ist eine Reifung übertragener MSCs zu voll funktionierenden Kardiomyozyten unwahrscheinlich [112], eine Rolle für Langzeit-Prozesse jedoch nicht auszuschließen. Aus diesem Grunde verdient die quantitative Analyse parakrin sezernierter zytoprotektiver Faktoren von mit Stammzellen kultiivierten Kardiomyozyten unter Hypoxie besondere Aufmerksamkeit. Ein Cocktail von parakrin sezernierten Faktoren könnte neue therapeutische Optionen für eine Vielzahl von Krankheiten, einschließlich Herzversagen, darstellen.

Diese Arbeit, wie auch andere, zeigt, dass MSCs aus dem Knochenmark eine Induktion von therapeutischer Angiogenese im infarzierten Herz [18, 113, 114, 115] oder in ischämischem Gewebe [116] bewirken können. Unsere Daten legen zum einen nahe, dass die Lebensfähigkeit transplantierte Zellen einen wichtigen Faktor für den Erhalt der myokardialen Funktion bedeutet und zum anderen, dass die therapeutische Angiogenese nicht linear mit der Zellüberlebensrate transplantierte Zellen korreliert. Der dem angiogenetischen Potential von MSCs zugrundeliegende Mechanismus ist kompliziert; zum Beispiel können MSCs in Gefäßendothelzellen differenzieren und kapillarähnliche Strukturen bilden [18, 113, 115]. Darüber hinaus unterstützen MSCs die Angiogenese zum Teil durch eine Erhöhung der endogenen Konzentration des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und gesteigerte Dichte des VEGF Typ 2 Rezeptors [116]. Die Resultate der vorliegenden Arbeit untermauern die Theorie, dass parakrine Effekte von MSCs hauptverantwortlich für die therapeutische Angiogenese sind.

Kürzlich wurde eine persistierende Überexpression von VEGF durch viralen Gentransfer in nicht-ischämischem Myokard als Ursache einer Formation vaskulärer Tumore berichtet [117]. Die hier vorliegenden Untersuchungen zeigen erstmals eine erhöhte Expression von VEGF durch Bcl-2-modifizierte MSCs als Reaktion auf hypoxische Bedingungen. Deshalb könnte die Transplantation von Bcl-2-MSCs zu einer zeitlich und konzentrationsmäßig adäquaten Expression von VEGF in ischämischem Myokard ohne Tumorformation führen. Die erhöhte VEGF-Expression transplantierte Bcl-2-MSCs in das Ischämie-geschädigte Herz kann kardioprotektive Effekte hervorrufen und die Bildung funktionsfähiger Kollateralgefäße induzieren, die zur Protektion ischämischen Myokards und einem kleineren Infarktareal beitragen. Bei

Verwendung des Ansatzes der genetischen Modifikation können der zytoprotektive Effekt und die stammzellvermittelte Angiogenese weiter verbessert werden.

Einzelne Schritte der Mechanismen der Bcl-2-vermittelten VEGF-Expression sind unbekannt. VEGF-modulierende Effekte und in-vivo-Angiogenese in Bcl-2-überexprimierenden Brustkrebszellen finden unabhängig von der Bcl-2-vermittelten Protektion vor Hypoxie-induzierter Apoptose statt [59]. Ausgeschlossen wurde an Brustkrebszellen eine Beteiligung der vaskulären Wachstumsfaktoren bFGF und TGF- $\beta$ 1, wie auch eine Modulation der p53-Proteinexpression und konsekutiv reversen VEGF-Anstieg durch Bcl-2-Überexpression unter Hypoxie [59]. Einige Autoren beschreiben eine synergistische Modulation der VEGF-Expression durch Bcl-2 und Hypoxie [118, 119]. Hierbei instruiert Hypoxie die Zellen zu erhöhter VEGF-Expression („priming“), und die Bcl-2-Überexpression stellt das notwendige Signal dar, diesen Zustand zu verstärken oder beizubehalten [120, 59]. In Bcl-2-überexprimierenden Melanomzellen unter hypoxischen Bedingungen wird die VEGF-Expression über den „hypoxia-inducible factor 1“ (HIF-1) vermittelt [121]. In weiteren Arbeiten stellte die Gruppe um Del Bufalo zwei Signalwege für die Modulation des Bcl-2-Effektes auf die VEGF/HIF-1-Expression heraus, den ERK (extrazelluläre Signale-regulierende Kinase) /MAPK (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase)- sowie den PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase)-Signalweg. Den Autoren zufolge bewirken Bcl-2 und Hypoxie gemeinsam die Phosphorylierung von AKT (Protein-Kinase B), einem „downstream“-Signal von PI3K, und ERK 1 / 2 und die Translokation von ERK 1 / 2 in den Zellkern; konsekutiv würden HIF-1 $\alpha$  phosphoryliert und die HIF-1-Transkriptionsaktivität gesteigert werden [122, 123]. Die Bcl-2-Transduktion in „human dermal microvascular endothelial cells“ (Bcl-2-HDMEC) führt zu einer signifikanten Steigerung des Effektes dieser Zellen, sich auf einem biodegradiblen Trägermaterial, das in SCID (engl.: severe combined immunodeficient)-Mäuse implantiert wurde, zu funktionsfähigen humanen Mikrogefäßen, die Blutzellen der Maus transportieren können, zu organisieren [119]. Bcl-2-HDMEC weisen zudem eine Induktion der proangiogenen Chemokine CXCL8 und CXCL1 durch einen NF- $\kappa$ B-medierten Signalweg auf [124]. Fortführende Studien der Signalwege, insbesondere der HIF-1-vermittelten VEGF-Expression von MSCs, wären für das Verständnis molekularer Effekte der Bcl-2-Modifizierung von MSCs notwendig.

In dieser Arbeit wurde für die genetische Modifizierung von MSCs mit Bcl-2 ein neuer kationischer Polymer-basierter Vektor, Poly(ethylenimine)-grafted-poly(aspartic acid)-co-lysine (PEI600-PSL5), mit einigen einzigartigen Vorteilen eingesetzt. Struk-

tur und chemische Eigenschaften des Polymers sind gut definiert [67, 125]. Eine geringe Effizienz der Transgen-Expression galt bislang als starker Nachteil nichtviraler Gentransfersysteme. Diese Eigenschaft ist auf eine schwache Freisetzung aus den Endosomen ins Zytoplasma und spätere ineffiziente Übertragung in den Zellkern zurückgeführt worden [65], die aufgrund der Biodegradabilität des Polymers (Daten nicht gezeigt) möglicherweise wegfällt. PEI600-PSL5 weist eine überlegene Transfektionseffizienz gegenüber dem synthetischen, etablierten DNA-Träger Polythylenimin auf. Die hohe Transgen-Expression ließ sich neben den Zelllinien HEK293 und PT67 auch in primären Zellkulturen, Ratten-MSCs aus dem Knochenmark, nachweisen. Er besitzt eine relativ geringe Toxizität, die u.a. durch die lineare Struktur erreicht wurde, und die Fähigkeit zum Transport großer therapeutischer Gene bei fehlender Immunogenität. Bedeutsam ist die nachgewiesene transiente Überexpression Bcl-2-modifizierter MSCs, die auf den nicht-viralen Gentransfer zurückzuführen ist und das Risiko für eine Tumorentstehung minimiert, während ein sicherer und suffizienter Schutz vor Kurzzeit-Ischämie-Schäden für transplantierte MSCs besteht.

Weitere Untersuchungen zum langfristigen Verbleib, zu Funktion und Phänotyp von Bcl-2-modifizierten MSCs, die mit nicht-viralen Vektoren behandelt wurden, sollten das volle Potential der MSCs zur myokardialen Regeneration weiter klären.

Zusammenfassend wurde die These bestätigt, dass eine genetische Modifikation mit dem antiapoptotischen Gen Bcl-2 zu einer stark erhöhten Expression von VEGF als Reaktion auf hypoxische Bedingungen führt. Es sind die übertragenen MSCs im Herzgewebe nach akutem Myokardinfarkt besser überlebensfähig. Die Transplantation der mit dem Bcl-2-Gen modifizierten MSCs verbessert linksventrikuläre Remodelingprozesse. Gentechnisch mit Bcl-2 unter Gebrauch des nicht-viralen Vektors versehene MSCs könnten eine effiziente Strategie darstellen, um das Zellüberleben nach Zelltransplantation zu verbessern, während das potentielle Risiko der Tumorentstehung minimiert wurde.

## Zusammenfassung

Engraftment (= Ansiedlung) von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark war als potentieller therapeutischer Ansatz bei infarktbedingter linksventrikulärer Dysfunktion bezeichnet worden. Jedoch schränkt ein limitiertes Überleben der transplantierten Zellen nach Myokardinfarkt die regenerative Kapazität der übertragenen Zellen ein.

In dieser Arbeit wurden MSCs genetisch mit dem Gen Bcl-2 modifiziert, das antiapoptotische und parakrine Effekte, wie die Sekretion des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) unter Hypoxie-Exposition generiert. Das Zellüberleben, die Zellansiedlung und Revaskularisation wurden am LAD (engl.: left anterior descending)-Ligatur Modell via intramyokardialer Injektion evaluiert. Ratten-MSCs wurden zur Überexpression von Bcl-2 manipuliert. In vitro wurden antiapoptotische und parakrine Effekte unter hypoxischen Bedingungen untersucht. In vivo wurden Bcl-2-modifizierte Ratten-MSCs (Bcl-2-MSCs) nach myokardialer Infarktinduktion injiziert. Überlebende Zellen wurden nach Transplantation ermittelt und die Kapillardichte nach 3 Wochen quantifiziert.

Der eingesetzte Polymer PEI(600)PSL-5 erwies sich als deutlich effizient und gering toxisch. Fehlende Sicherheitsbedenken, für die bei viralen Gentransfersystemen Grund besteht, führen zusätzlich zu der Ansicht, dass dieser biokompatible DNA-Träger für weitere Versuche und therapeutische Anwendungen günstig anwendbar wäre.

Das Bcl-2-Gen schützte MSCs vor Apoptose. In vitro reduzierte die Bcl-2-Überexpression die Apoptoserate von MSCs um 32% und erhöhte die Sekretion des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) um mehr als 60% unter hypoxischer Behandlung. Die Transplantation von Bcl-2-MSCs erhöhte das Zellüberleben nach vier Tagen 2,2-fach, nach drei Wochen 1,9-fach und nach sechs Wochen 1,2-fach im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Kapillardichte der Infarktgrenze lag bei Bcl-2-MSCs behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe 15% höher. Des Weiteren hatten Bcl-2-MSCs-behandelte Tiere eine 17% kleinere Infarktgröße als die Kontrollgruppe.

Diese Ergebnisse untermauern die These, dass die Transplantation modifizierter MSCs von Wert für eine substantielle funktionelle Erholung nach akutem Myokardinfarkt sein kann. Es bietet sich ein neuer und effektiver Ansatz in der Behandlung des akuten Myokardinfarkts.

**Literatur**

- [1] Dorner T, Rieder A. Epidemiologie der koronaren Herzerkrankung und Bedeutung für die Prävention. *J Kardiol* 2005; 12(Suppl B):13-15.
- [2] Statistisches Bundesamt Deutschland, Wiesbaden. Pressemitteilung Nr.395 vom 21.09.2006. [www.destatis.de](http://www.destatis.de)
- [3] Eber B, Rammer M. Aktuelle Konzepte der Postinfarkttherapie, UNI-MED SCIENCE 2007; 1. Auflage
- [4] Tiyyagura SR, Pinney SP. Left ventricular remodelling after myocardial infarction: past, present, and future. *Mt Sinai J Med* 2006; 73:840-851.
- [5] Sharpe N. Cardiac remodelling in coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2004; 93:17B-20B.
- [6] Schwarz F, Schuler G, Katus H, Hofmann M, Manthey J, Tillmanns H, Mehmel HC, Kubler W. Intracoronary thrombolysis in acute myocardial infarction: duration of ischemie as a major determinant of late results after recanalization. *Am J Cardiol* 1982; 50:933-937.
- [7] Rosamond W, Flegal K, Friday G, Furie K et al. Heart disease and stroke statistics - 2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2007; 115:e69-e171.
- [8] Leor J, Patterson M, Quinones MJ et al. Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium? *Circulation* 1996; 94(suppl 9):332-336.
- [9] Min JY, Yang Y, Sullivan MF et al. Long-term improvement of cardiac function in rats after infarction by transplantation of embryonic stem cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 125:361-369.
- [10] Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM et al. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 1996; 98:2512-2523
- [11] Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P et al. Regenerating functional myocardium: Improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998; 4:929-933.

- [12] Jia ZQ, Mickle DA, Weisel RD et al. Transplanted cardiomyocytes survive in scar tissue and improve heart function. *Transplant Proc* 1997; 29:2093-2094.
- [13] Li RK, Jia ZQ, Weisel RD et al. Cardiomyocyte transplantation improves heart function. *Ann Thorac Surg* 1996; 62:654-660.
- [14] Li RK, Jia ZQ, Weisel RD et al. Smooth muscle cell transplantation into myocardial tissue improves heart function. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31:513-522.
- [15] Yoo KJ, Li RK, Weisel RD et al. Autologous smooth muscle cell transplantation improved heart function in dilated cardiomyopathy. *Ann Thorac Surg* 2000; 70:859:865.
- [16] Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev* 2005; 85:1373-1416.
- [17] Tomita S, Li RK, Weisel RD et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999; 100(suppl 19):247-256.
- [18] Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001; 7:430-436.
- [19] Li RK, Mickle DA, Weisel RD et al. Optimal time for cardiomyocyte transplantation to maximize myocardial function after left ventricular injury. *Ann Thorac Surg* 2001; 72:1957-1963.
- [20] Stamm C, Westphal B, Kleine HD et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361:45-46.
- [21] Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:1078-1083.
- [22] Assmus B, Schachinger V, Teupe C et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOP-CARE-AMI). *Circulation* 2002; 106:3009-3017.
- [23] Ma N, Ladilov Y, Moebius JM et al. Intramyocardial delivery of human CD133+ cells in a SCID mouse cryoinjury model: Bone marrow vs. cord blood-derived cells. *Cardiovasc Res* 2006; 71:158-169.

- [24] Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 2004; 95:9-20.
- [25] Mangi AA, Noiseux N, Kong D et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodelling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med* 2003; 9:1195-1201.
- [26] Caplan AI. The Mesengenic Process. *Clin Plast Surg* 1994; 21:429-435.
- [27] Friedenstein AJ, Gorskaja JT, Kuragma NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976; 4:267-274.
- [28] Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 2003; 5:362-369.
- [29] De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001; 44:1928-1942.
- [30] Nakahara H, Bruder SP, Goldberg VM, Caplan AI. In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum. *Clin Orthop Relat Res* 1990:223-232.
- [31] Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:13625-13630.
- [32] Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem progenitor cell potential. *Stem Cells* 2004; 22:649-658.
- [33] Erices A, Conget P, Minguez JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000; 109:235-242.
- [34] da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006; 119:2204-2213.
- [35] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143-147.
- [36] Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:4857-4861.

- [37] Chen J, Li Y, Wang et al. Therapeutic benefit of intracerebral ischemia in rats. *J Neurol Sci* 2001; 189:49-57.
- [38] Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279:1528-1530.
- [39] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103:697-705.
- [40] Toma C, Pittenger MF, Cahill KS et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002; 105:93-98.
- [41] Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003; 31:890-896.
- [42] Djouad F, Ponce P, Bony C et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003; 102:3837-3844.
- [43] Wollert KC, Meyer GP, Lotz J et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: The BOOST randomized controlled clinical trial. *Lancet* 2004; 364:141-148.
- [44] Zhang M, Methot D, Poppa V et al. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: Graft cell death and anti-death strategies. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33:907-921.
- [45] Gross A, My Donnell JM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13:1899-1911.
- [46] Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998; 17:3224-3236.
- [47] Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003; 22:8590-8607.
- [48] Gross A, McDonnell J, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13:1899-1911.
- [49] Hetts SW. To die or not to die: An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 1998; 279(4):300-307.

- [50] Misao J, Hayakawa Y, Ohno M et al. Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulation* 1996; 94:1506-1512.
- [51] Feuerstein G, Ruffolo RR Jr., Yue TL. Apoptosis and congestive heart failure. *Trends Cardiovasc Med* 1997; 7:249-255.
- [52] Liu L, Azhar G, Gao W et al. Bcl-2 and Bax expression in adult rat hearts after coronary occlusion: Age-associated differences. *Am J Physiol* 1998; 275:R315-R322.
- [53] Kirshenbaum LA, de Moissac D. The bcl-2 gene product prevents programmed cell death of ventricular myocytes. *Circulation* 1997; 96 :1580:1585.
- [54] Murphy AN, Bredesen DE, Cortopassi G et al. Bcl-2 potentials the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:9893-9898.
- [55] Nunez G, London L, Hockenberry D et al. Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-derived hemopoietic cell lines. *J Immunol* 1990; 144:3602-3610.
- [56] Veis DJ, Corenson CM, Shutter JR et al. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 1993; 75:229-240.
- [57] Imahashi K, Schneider MD, Steenbergen C et al. Transgenic expression of Bcl-2 modulates energy metabolism, prevents cytosolic acidification during ischemia, and reduces ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 2004; 95:734-741.
- [58] Chen Z, Chua CC, Ho YS et al. Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:H2313-H2320.
- [59] Biroccio A, Candiloro A, Mottolese M et al. Bcl-2 overexpression and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor and in vivo angiogenesis in a breast carcinoma line. *The FASEB Journal* 2000; 14:652-660.
- [60] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285:1182-1186.

- [61] Ferrera N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996; 32A:2413-2422.
- [62] Hashimoto M, Ohsawa M, Ohnishi A, Naka N, Hirota S, Kitamura Y and Aozasa K. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNA in angiosarcoma. *Lab Invest* 1995; 73:859-863.
- [63] Plate KH and Warnke PC. Vascular endothelial growth factor. *J Neurooncol* 1997; 35:365-372.
- [64] Schätzlein AG. Non-viral vectors in cancer gene therapy: principles, problems and prospects. *Anticancer Drugs* 2001; 12(4):275-304.
- [65] Verma IM, Somia N. Gene therapy-promises, problems and prospects. *Nature* 1997; 289:239-242.
- [66] Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:7297-7301.
- [67] Tang GP, Yang Z, Zhou J. Poly(ethylenimine)-grafted-poly(aspartic acid)co-lysine), a potential non-viral vector for DNA delivery. *J Biomater Sci Polym Ed* 2006; 17(4):461-680.
- [68] Dunlap DD, Maggi A, Soria MR and Monaco L. Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:3095-3101.
- [69] Godbey WT, Barry MA, Saggau P, Wu KK, Mikos AG. Poly(ethylenimine)-mediated transfection: A new paradigm for gene delivery. *J Biomed Mater Res* 2000; 51:321-328.
- [70] Clamme JP, Azoulay J, Mély Y. Monitoring and Dissociation of Polyethylenimine/DNA Complexes by two photon fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Journal* 2003; 84:1960-1968.
- [71] Godbey WT, Wu KK and Mikos AG. Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *J Biomed Mater Res* 1999; 45:268-275.
- [72] Houk BE, Hochhaus G, Hughes JA. Kinetic Modeling of Plasmid DNA Degradation in Rat Plasma. *AAPS Pharm Sci* 1999; 1.

- [73] Behr JP, Transfert de gènes par l'intermédiaire de lipides et de polymères aminés. *CR Soc Biol* 1996; 190:33-38.
- [74] Klemm AR, Young D and Lloyd JB. Effects of polyethylenimine on endocytosis and lysosome stability. *Biochem Pharmacol* 1998; 56:41-46.
- [75] Kichler A, Leborgne C, Coeytaux E and Danos O. Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J Gene Med* 2001; 3:135-144.
- [76] Walker RA and Sheetz MP. Cytoplasmic microtubule-associated motors. *Annu. Rev Biochem* 1993; 62:429-451.
- [77] Grosse S, Aron Y, Thévenot G, Mosigny M and Faja I. Cytoskeletal involvement in the cellular trafficking of plasmid/PEI derivative complexes. *J Control Release* 2007; Epub ahead of print.
- [78] Brunner S, Sauer T, Carotta S, Cotten M et al. Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Ther* 2000; 7:401-407.
- [79] Kreiss P, Cameron B, Rangara R et al. Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucl Acids Res* 1999; 27:3792-3798.
- [80] Ludtke JJ, Zhang G, Sebestyen MG and Wolff JA. A nuclear localization signal can enhance both the nuclear transport and expression of 1 kb DNA. *J Cell Sci* 1999; 112:2033-2041.
- [81] Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(9):5177-5181.
- [82] Honoré I, Gross S, Frison N, Favatier F, Monsigny M and Fajac I. Transcription of plasmid DNA: Influence of plasmid DNA/polyethylenimine complex formation. *Journ Control Release* 2005; 107:537-546.
- [83] Fischer D, Bieber T, Li Y, Elsasser HP and Kissel T. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res* 1999; 16:1273-1279.

- [84] Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K and Koski P. Polyethylenimine is an effective permeabilizer of Gram-negative bacteria. *Microbiology* 1997; 143:3193-3199.
- [85] Oku N, Yamaguchi N et al. The fusogenic effect of synthetic polycations on negatively charged lipid bilayers. *J Biochem* 1986; 100:935-944.
- [86] Plank C, Mechtler K, Jr Szoka FC and Wagner E. Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum Gene Ther* 1996; 7:1437-1446.
- [87] Godbey WT, Wu KK and Mikos AG. Poly(ethylenimine)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability. *Biomaterials* 2001; 22:471-480.
- [88] Boeckle S, von Gersdorff K, van der Piepen S, Culmsee C, Wagner E and Ogris M. Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer. *J Gene Med* 2004; 6(10):1102-1111.
- [89] Palojoki E, Saraste A, Eriksson A et al. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:H2726-H2731.
- [90] Sambrook J and Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press,U.S. 2001; Vol.1-3.
- [91] Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; 3:393-403
- [92] Tanaka M, Chen Z, Bartunkova S, Yamasaki N and Izumo S. The cardiac homeobox gene *Csx/Nkx2.5* lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development. *Development* 1999; 126:1269-1280.
- [93] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(259):680-685.
- [94] Weidner N, Semple JP, Welch WR et al. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324:1-8.
- [95] Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* 1977; 91:335-344.

- [96] Barry F, Boynton RE, Liu B et al. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: Differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res* 2001; 268:189-200.
- [97] Berry MF, Engler AJ, Woo YJ et al. Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290:H2196-H2203.
- [98] Schuleri KH, Boyle AJ, Her JM. Mesenchymal stem cells for cardiac regenerative therapy. *Handb Exp Pharmacol* 2007; 180:195-218.
- [99] Pfeffer MA and Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990; 81:1161-1172.
- [100] Li W, Ma N, Ong LL, Nesselmann C, Klopsch C, Ladilov Y, Furlani D, Piechaczek C, Moebius JM, Luzow K, Lendlein A, Stamm C, Li RK and Steinhoff G. Bcl-2-engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. *Stem Cells* 2007; 25(8):2118-2127.
- [101] Bricheriou V, Hagege AA, Oubenaissa A et al. Cardiac functional improvement by a human Bcl-2 transgene in a mouse model of ischemia/reperfusion injury. *J Gene Med* 2002; 2:329-333.
- [102] Geng YJ. Molecular mechanisms for cardiovascular stem cell apoptosis and growth in the hearts with atherosclerotic coronary disease and ischemic heart failure. *Ann N Y Acad Sc* 2003; 1010:687-697.
- [103] Tang YL, Tang Y, Zhang YC et al. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated hemoxygenase-1 vector. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46:1339-1350.
- [104] Matsushita H, Morishita R, Nata et al. Hypoxia-induced endothelial apoptosis through nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)-mediated bcl-2 suppression: In vivo evidence of the importance of NF-kappaB in endothelial cell regulation. *Circ Res* 2000; 86:974-981.
- [105] Regula KM, Baetz D, Kirshenbaum LA. Nuclear factor-kappaB represses hypoxia-induced mitochondrial defects and cell death of ventricular myocytes. *Circulation* 2004; 110:3795-3802.

- [106] Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF- $\kappa$ B. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5:392-401.
- [107] Suh J, Rabson AB. NF- $\kappa$ B activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon? *J Cell Biochem* 2004; 91:100-117.
- [108] Yoon YS, Wecker A, Heyd L et al. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* 2005; 115:326-338.
- [109] Tang YL, Zhao Q, Qin X et al. Paracrine action enhances effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *Ann Thorac Surg* 2005; 80:229-236.
- [110] Gnecci M, He H, Liang OD et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemia heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* 2005; 11:367-368.
- [111] Gnecci M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, Mu H, Melo LG, Pratt RE, Ingwall JS and Dzau VJ. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *The FASEB J* 2006; 20:661-669.
- [112] Anversa P, Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodeling. *Nature* 2002; 415; 240-243.
- [113] Uemura R, Xu M, Ahmad N et al. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circ Res* 2006; 98:1414-1421.
- [114] Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001; 103:634-637.
- [115] Nagaya N, Fujii T, Iwase T et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol* 2004; 287:H2670-2676.
- [116] Chen J, Zhang ZG, Li Y et al. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ Res* 2003; 92:692-699.

- [117] Lee RJ, Springer ML, Blanco-Bose WE et al. VEGF gene delivery to myocardium: Deleterious effects of unregulated expression. *Circulation* 2000; 102:898-901.
- [118] Vaux DL, Cory S and Adams JM. Bcl-2 gene promotes haematopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre B-cells. *Nature* 1998; 335:440-442.
- [119] Nör JE, Christensen J, Mooney DJ and Polverini PJ. VEGF-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of bcl-2 expression. *Am J Pathol* 1999; 154:375-384.
- [120] Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ and Giaccia AJ. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996; 379:88-91.
- [121] Iervolino A, Triscuoglio D, Ribatti D, Candiloro A, Biroccio A, Zupi G and Del Bufalo D. Bcl-2 overexpression in human melanoma cells increases angiogenesis through VEGF mRNA stabilization and HIF-1 mediated transcriptional activity. *FASEB J* 2002; 16:1453-1455.
- [122] Triscuoglio D, Iervolino A, Candiloro A, Fibbi G, Fanciulli M, Zangemeister-Wittke U, Zuoi G and Del Bufalo D. Bcl-2 overexpression in human melanoma cells increases angiogenesis through VEGF mRNA stabilization and HIF-1 mediated transcriptional activity. *J Biol Chem* 2004; 279:6737-6745.
- [123] Triscuoglio D, Iervolino A, Zupi G and Del Bufalo D. Involvement of PI3K and MAPK Signaling in bcl-2-induced Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Melanoma Cells. *Mol Biol Cell* 2005; 16:4153-4162.
- [124] Karl E, Warner K, Teitlin et al. Bcl-2 acts in a proangiogenic signalling pathway through nuclear factor  $\kappa$ B and CXC Chemokines. *Cancer Res* 2005; 65(12):5063-5069.
- [125] Ma N, Wu SS, Ma YX et al. Nerve growth factor receptor-mediated gene transfer. *Mol Ther* 2004; 9:270-281.

## Anhang

### Abkürzungen

%	Prozent (x von 100)
°C	Grad Celsius
$\alpha$ -MEM	$\alpha$ -modified Minimum Essential Medium
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting Enzyme
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Bicininchoninic Acid
Bcl	B-Cell-Lymphom
Bcl-2-MSCs	mit Bcl-2 modifizierte Mesenchymale Stammzellen
bmMSCs	MSCs aus dem Knochenmark (engl.: bone marrow-derived MSCs)
BrdU	Bromodeoxyuridin
CD	Cyclodextrin
CFSE	5-(und 6)-Carboxyfluoreszein Diacetat Succinimidylester
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cTnT	kardiales Troponin T
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribunukleinsäure
EB	Ethidiumbromid
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	in englischer Sprache
FBS	Fetales Schweineserum, engl.: fetal bovine serum
FABP	Fatty Acid Binding Protein
g	Gramm oder Fallbeschleunigung in der Nähe der Erdoberfläche ( = 9,81m/s <sup>2</sup> )
h	Stunde
HPF	High power field, hochaufgelöstes Gesichtsfeld
i.p.	intraperitoneal
kDa	Kilo Dalton = 1000 Dalton
KG	Körpergewicht

KHK	Koronare Hererkrankung
KM	Knochenmark
L	Liter
LAD	Ramus interventricularis anterior, engl.: left anterior descending
LB	Luria-Bertani
M	Molar
Min	Minute/-n
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MSCs	Mesenchymale Stammzellen
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazolyl -2)-2, 5-Diphenyltetrazolinbromid
MW	Molekulargewicht
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor $\kappa$ B
n	Anzahl
N/P	Stickstoff (engl.: nitrogene)-Phosphat-Verhältnis
NaCl	Natriumchloridlösung
nm	Nanometer = $10^{-9}$ Meter
O.C.T.	Ornithin Carbamyl-Transferase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PECAM	Platelet/endothelial cell Adhesion Molecule
PEI	Polyethylenimine
PEI600-PSL5	Poly(ethylenime)-grafted-poly(aspartic acid)-co-lysine
pH	Pondus hydrogenii
PI	Propidium-Jodid
PV	Druck-Volumen (engl.: Pressure Volume)
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RLU	Relative Light Units
rpm	Rounds per Minute, Umdrehungen
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TRIS	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP End Labeling
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	von Willebrand-Faktor
z.B.	zum Beispiel

$\mu\text{g}$       Mikrogramm =  $10^{-6}$  Gramm

$\mu\text{l}$       Mikroliter =  $10^{-6}$  Liter

## **Danksagung**

Herzlich danke ich Prof. Dr. med. G. Steinhoff für die Überlassung des Themas und die Ratschläge zur Umsetzung dieser Arbeit.

Dr. phil. Nan Ma gilt mein großer Dank für ihre „Supervision“ während der gesamten Durchführung der Arbeit, für die gute Einarbeitung und immer vorhandene Bereitschaft zu Diskussion und Hilfestellung.

PD Dr. C. Stamm danke ich für die Hilfe bei der Wahl des Themas und erste Einblicke in die klinische Forschung.

Ich danke dem gesamten Laborteam (in der Zeit meiner Arbeit), Juri, Sanjeev, Whenzong, Lee Lee, Alexander, Ferenc, Cornelius, Claudia, Miriam und Margit, für die gute Atmosphäre im Labor und stets vorhandene Hilfsbereitschaft.

Dr. med. Dorothea Peters danke ich für ihr beständiges Interesse am Progress dieser Arbeit und kritische Sicht von „außerhalb der Laborwände“.

Der größte Dank gilt meinen Eltern. Sie unterstützten und ermutigten mich während meiner gesamten Studienzzeit und machten somit mein Studium und das Gelingen dieser Arbeit möglich. Meiner Schwester Caroline danke ich für ihr mutiges Vorgehen in allen wichtigen Schritten des Lebens.

Ich erkläre, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den 14.09.2007

## Curriculum vitae

Familienname: Neßelmann  
Vorname: Catharina  
Wohnort: Richard-Wagner-Str.1, 18119 Rostock  
Geburtsdatum: 28.04.1981  
Geburtsort: Rostock  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: ledig

### Schule:

1987 - 2000                   Hansestadt Rostock  
August 2000                 Abitur an der Christophorusschule Rostock  
1997/1998                   Austauschjahr, Lathrop Highschool in Fairbanks,  
Alaska, USA

### Studium:

2000 - 2007                 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock  
September 2002             Ärztliche Vorprüfung  
April 2007                  Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr:           1. Tertial: Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitäts-  
frauenklinik Rostock  
2. Tertial: Pneumologie, Klinik für Innere Medizin, Uni-  
versität Rostock, und Gastroenterologie, McGill Univer-  
sity, Montreal, Quebec, Kanada  
3. Tertial: Chirurgische Klinik, Kantonsspital Zug,  
Schweiz

Famulaturen:                Innere Medizin, Boddenkliniken Ribnitz-Damgarten  
Chirurgische Gemeinschaftspraxis, Ärztehaus Lütten  
Klein, Rostock  
Neurologische Klinik, Charité Campus Benjamin Fran-  
klin Universitätsmedizin Berlin  
Gastroenterologie, Klinik und Poliklinik für Innere Me-  
dizin, Universität Rostock

- Zusätzliche Kurse:
- Vorlesung Transfusionsmedizin
  - Kurs „Scientific Writing and Presentation Techniques“
  - Seminar „Praktische EKG-Auswertung“
  - 2. EKG-Kurs, Universität Rostock
- Nebentätigkeiten:
- Nachtwache, Klinikum der Universität Rostock
  - Studentische Hilfskraft in den Fachbibliotheken der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
  - Beitragsautorin „GK2-Kompakt“ Band I und IX, Springer Medizin Verlag
- Promotion:
- Mai 2003 - August 2007
- Forschungslabor für kardialen Gewebe- und Organersatz der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie an der Universität Rostock,  
Thema: Übertragung Bcl-2-modifizierter MSCs am Koronararterienligatur-Modell der Ratte
- seit August 2007
- wissenschaftliche Mitarbeiterin der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie an der Universität Rostock

## Thesen

- Untersuchungsziel der vorliegenden Arbeit ist, neue Hinweise und Erkenntnisse zum therapeutischen Potential von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) und MSCs, die mit einem anti-apoptotischen Gen verändert wurden, zu erlangen. Eine bessere kardiale Erholung nach akutem Myokardinfarkt durch einen zelltherapeutischen Ansatz, die intramyokardiale Übertragung von adulten Stammzellen, ist zuerst von R.K. Li 1997 beschrieben worden.
- Die Ausstattung mit dem Gen Bcl-2 soll die Zellen speziell für die peritransplantäre Periode, einschließlich der Zellinjektion und Platzierung in ungünstiges ischämisches Milieu, vorbereiten und so ihr Überleben zum Zwecke regenerativer oder supportiver Effekte im Infarktgebiet verbessern.
- Adulte Stammzellen der Ratten können aus dem Knochenmark isoliert, mit der Adhärenzmethode kultiviert und als mesenchymale Stammzellen (MSCs) identifiziert werden. Die Adhärenzmethode beruht auf der Eigenschaft von MSCs, an Böden von Gewebekulturflaschen fest anzuhafte. Friedenstein et al. beschrieben erstmals 1970 diese Tatsache, die für die Zellseparierung der MSCs von haematopoetischen Zellen relevant ist, da hierdurch nach einigen Waschschrritten eine überwiegend homogene MSCs-Population mit typisch spindelförmiger Morphologie erreicht werden kann. Stammzellmarker, nachgewiesen durch Immunfärbungen, sowie Differenzierungsversuche ergänzen die Charakterisierung und bieten weitere Optionen, kultivierte adhärenzte Zellen aus dem Knochenmark und deren Potential zu beschreiben.
- Das nicht-virale Gentransfersystem Poly(ethylenimine)-grafted-poly(aspartic acid)-co-lysine (PEI-600-PSL-5) ist eine geeignete Methode zum DNA-Transfer in Ratten-MSCs und andere Zelllinien in vitro. Tang und Kollegen (2005) entwickelte diesen synthetischen DNA-Träger, der aufgrund seiner guten Effizienz und geringen Toxizität eine Alternative zu mit Sicherheitsbedenken behafteten, bislang zumeist jedoch effektiveren, viralen Gentransfersystemen, bietet. Die biokompatiblen Eigenschaften des neuen Polymers sind anhand von Transfektions- und Zytotoxizitätstesten nachvollziehbar.
- Parakrine Mechanismen spielen eine wesentliche Rolle für positive Effekte durch die Transplantation adulter Stammzellen aus dem Knochenmark in das Myokard nach Infarktinduktion. Der in vitro Nachweis erhöhter Konzentrationen

sezernierten Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) im Kulturmedium Hypoxie-exponierter, Bcl-2-überexprimierender MSCs im Vergleich zu nicht-modifizierten MSCs bekräftigt, gemeinsam mit dem weiterhin ausstehenden Nachweis der in vivo Transdifferenzierung in ischämisches Herzgewebe übertragener MSCs, die Annahme, dass übertragene MSCs andere Zellen unterstützen, eher als zu einem größeren Prozentsatz die Regeneration kardialer Myozyten hervorzurufen.

- Die Modifikation mit Bcl-2 führt in vitro zu einem nachweisbaren antiapoptischen Effekt der adulten Stammzellen. Bcl-2 trägt eine wichtige Funktion als Pro-Überlebenssignal bei Zuständen ausbleibender Überlebenssignale, wie Zell-Zell-Kontakte oder Signalstoffe, die sich beispielsweise durch Heraustrennen aus dem Zellgefüge im Organismus oder aus einer Zellkultur ergeben.
- Die ex vivo Modifikation von mesenchymalen Stammzellen mit Bcl-2 führt zu einem verbesserten Resultat der direkten myokardialen Injektion von MSCs nach akutem Myokardinfarkt im Vergleich zu nicht-modifizierten mesenchymalen Stammzellen und zu Kontroll-Medium. Beobachtete Parameter, wie Zellnachweis im Herzinfarktgrenzgebiet, Infarktgröße und Kapillardichte, geben Aufschluss über den Zugewinn durch Übertragung von Stammzellen in der Akutphase nach Myokardinfarkt.
- Die gewonnenen Ergebnisse geben neue Erkenntnisse auf den Gebieten der Stammzellforschung, Zelltherapie und Gentherapie. Erstmals wurde gezeigt, dass eine Bcl-2-Überexpression bei mesenchymalen Stammzellen, die Hypoxie-exponiert werden, zu signifikant erhöhter VEGF-Sekretion im Vergleich zu nicht-modifizierten MSCs führt. Die erhöhte Sekretion lässt sich unter Normoxie nicht nachweisen, darauf hinweisend, dass eine synergistische Modulation durch Bcl-2 und Hypoxie stattfindet. Weiterhin wurden erstmals Bcl-2-modifizierte MSCs am Ratten-Koronararterienligatur-Modell untersucht und deren positive Effekte nachgewiesen. Die Bcl-2-modifizierte Stammzellen-Transplantation ins Herzinfarktgrenzgebiet kann als potentieller therapeutischer Ansatz zur Therapie des Myokardinfarkts bezeichnet werden.