

Aus der  
Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie  
Direktor: Prof. Dr. med. G. Steinhoff  
der Universität Rostock

**Rolle der endothelialen NO-Synthase beim SDF-1 $\alpha$  /TNF- $\alpha$   
vermittelten Stammzellhoming *in vivo***

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

vorgelegt von

Peter Donndorf  
aus Geesthacht

Rostock, den 08.07.2008

Tag der mündlichen Verteidigung: 17.12 .2008

Dekan: Prof. Dr. med. E. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. G. Steinhoff
2. Gutachter: Prof. Dr. med. H. Ince
3. Gutachter: Prof. Dr. med. W. Zimmermann

# Inhaltsverzeichnis

1	Einführung .....	7
1.1	Einleitung.....	7
1.2	Stammzellen.....	8
1.2.1	Definition und Einteilung .....	8
1.2.2	Knochenmarkstammzellen .....	9
1.3	Stammzelhoming.....	11
1.3.1	Bedeutung und Mechanismus .....	11
1.3.2	Homing assoziierte Signalwege.....	12
1.3.2.1	Stromal cell-derived factor-1 alpha .....	13
1.3.2.2	Tumornekrosefaktor alpha .....	13
1.3.2.3	Endothelfunktion .....	14
1.4	Das Stickoxid und die Stickoxidsynthasen .....	15
1.4.1	Bedeutung im Rahmen der Stammzellmigration .....	15
1.4.2	Die Stickoxidsynthasen.....	15
1.4.3	Struktur und Lokalisation der eNOS .....	16
1.4.3.1	Regulation der Enzymaktivität .....	16
1.4.3.2	Rolle der eNOS bei der Regulation des Gefäßtonus .....	17
1.4.3.3	Bedeutung der eNOS für die endothelialeLeukozytenadhäsion .....	18
2	Ziel der Arbeit und Aufgabenstellungen.....	19
3	Material und Methoden .....	20
3.1	Stammzellisolation und Fluoreszenzmarkierung .....	20
3.1.1	Zellzählung .....	21
3.2	Tiermodell .....	21
3.2.1	Versuchsaufbau.....	21
3.2.2	Versuchstiere.....	22
3.2.3	Materialien .....	22

3.2.4	Narkose und Lagerung der Versuchstiere .....	23
3.2.5	Durchführung der Operation .....	23
3.2.5.1	Kanülierung der linken Arteria femoralis .....	23
3.2.5.2	Hintergrund des M. cremaster Versuchsmodells .....	24
3.2.5.3	Durchführung der Cremasterpräparation .....	24
3.3	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie .....	25
3.3.1	Prinzip der Epiillumination .....	25
3.3.2	Aufbau des Intravitalmikroskops.....	26
3.3.3	Fluoreszenzfarbstoffe .....	26
3.4	Gewebeanalysen.....	27
3.4.1	Anfertigung der Gewebsschnitte.....	27
3.5	Immunfärbungen .....	27
3.6	Immunhistologische Anfärbung des M. cremaster.....	27
3.6.1.1	Immunhistologische Anfärbung c-kit positiver Knochenmarkstammzellen .	29
3.6.2	Auswertung.....	30
3.6.2.1	Lichtmikroskopie .....	30
3.6.2.2	Konfokale Lasermikroskopie.....	30
3.7	Versuchsgruppen .....	31
3.8	Versuchsablauf.....	32
3.9	Auswertung und Statistik .....	33
4	Ergebnisse .....	34
4.1	Ergebnisse der Isolation von c-kit+ Zellen aus dem Knochenmark der Maus .....	34
4.2	Erhobene hämodynamische Parameter in postkapillären Venolen des M. cremaster der Maus .....	35
4.3	Homingverhalten von Knochenmarkstammzellen im unbehandelten M. cremaster .....	37
4.3.1	Rolling.....	37
4.3.2	Feste Adhärenz .....	37

4.4	Homingverhalten von Knochenmarkstammzellen im M. cremaster nach lokaler Applikation von SDF-1 $\alpha$ und TNF- $\alpha$ .....	37
4.4.1	Rolling .....	37
4.4.2	Feste Adhärenz .....	37
4.5	Expression der endothelialen NO-Synthase im M.cremaster .....	39
4.6	Homingverhalten von Knochenmarkstammzellen bei fehlender Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS knock-out) .....	41
4.6.1	Rolling .....	41
4.6.2	Feste Adhärenz .....	42
4.7	Homingverhalten von Knochenmarkstammzellen nach funktioneller Inhibition der endothelialen NO-Synthase .....	43
4.7.1	Rolling .....	43
4.7.2	Feste Adhärenz .....	44
4.8	Expression des SDF-1 $\alpha$ Rezeptors CXCR4 auf der Stammzelloberfläche .....	48
4.9	Expression des SDF-1 $\alpha$ Rezeptors CXCR4 im Gefäßendothel .....	49
5	Diskussion .....	51
5.1	Versuchsmodell .....	52
5.2	Homingverhalten von Knochenmarkstammzellen im unbehandelten M. cremaster in vivo .....	53
5.3	Einfluss von SDF-1 $\alpha$ und TNF- $\alpha$ auf das Homingverhalten von Knochenmarkstammzellen in vivo und Rolle der endothelialen CXCR4 Expression.....	53
5.4	Einfluss der Expression und Funktion der endothelialen NO-Synthase auf das Homingverhalten von Knochenmarkstammzellen in vivo.....	55
6	Zusammenfassung und Ausblick .....	58
7	Literaturverzeichnis .....	59
8	Anhang .....	66
I	Thesen	
II	Selbständigkeitserklärung	
III	Danksagungen	
IV	Lebenslauf	

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
A. femoralis	Arteria femoralis
CD	Cluster of differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
EC	Endothelial cell
eNOS	Endothelial NO-Synthase
eNOS ko	Endothelial NO-Synthase knock-out
EPC	Endothelial progenitor cell (Endothelial Vorläuferzelle)
HSC	Haematopoietische Stammzelle
ICAM-1	Interstitiell Cell Adhesion Molecule-1
IgG	Immunglobulin G
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
GFP	Green fluoreszenz protein
LFA-1	Leukozyte function associated antigen-1
L-NAME	N-nitro-L-arginine methyl ester
MACS	Magnetic cell sorting
M. cremaster	Musculus cremaster
MSC	Mesenchymale Stammzelle
NaCl	Natriumchlorid
NO	Nitric oxide (Stickoxid)
RT	Raumtemperatur
Sca-1	Spino-cellular-ataxie-1
SDF-1α	Stromal cell-derived factor-1 alpha

SZ	Stammzelle
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-alpha
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
V.	Vena
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLA-1	Very late antigen-1
VSMC	Vascular smooth muscle cell
WT	Wildtyp

## 1 Einführung

### 1.1 Einleitung

Neue Therapieansätze in der Medizin schließen derzeit die Möglichkeit ein, durch den gezielten Einsatz der Pluripotenz von Stammzellen zu einer Regeneration von erkrankten Organen zu gelangen. Daher sind Stammzellen in Bereichen der regenerativen Medizin zu Beginn des 21. Jahrhunderts Gegenstand intensiver Forschung.

Ihre Pluripotenz und die Berichterstattung über den Nachweis der Stammzellen in knochenmarksfernen Organen [1] erwecken die Hoffnung der Entwicklung gänzlich neuer Therapiestrategien bei Krankheiten, die bisher als nur eingeschränkt heilbar galten.

Ein Beispiel sind die ischämische Herzkrankheit und der Herzinfarkt, bei deren Behandlung man in der Vergangenheit von der irreversiblen, nicht regenerationsfähigen Muskelschädigung ausgegangen ist. In den letzten Jahren konnte jedoch zunächst im Tierversuch [2, 3] und jüngst auch in ersten klinischen Studien [4, 5] gezeigt werden, dass der Herzmuskel auch nach abgelaufener Ischämie von einer lokalen oder systemischen Applikation körpereigener Stammzellen profitiert. Dabei konnte die zusätzliche oder alleinige Stammzellbehandlung zu einer Steigerung der funktionellen Effekte traditioneller Therapiekonzepte führen, während über stammzellassozierte Angioneogenese, Vaskuloneogenese und organtypische Differenzierung berichtet wird [6].

Um den klinischen Einsatz der Stammzelltherapie auszubauen und zu optimieren, ist es notwendig, die Stammzellen in ihrem Interaktionsverhalten mit dem Endothel der peripheren

Organe genauer zu charakterisieren und die molekularen Mechanismen, die eine zielgerichtete Anreicherung von Stammzellen im geschädigten Gewebe vermitteln, zu identifizieren. Derzeit wird die Rolle unterschiedlicher Faktoren für das Stammzellhoming in knochenmarksferne Organe diskutiert. Dabei haben das Chemokin Stromal-cell-derived-Faktor-1 (SDF-1 $\alpha$ ) und die endotheliale Isoform der NO-Synthasen (eNOS) eine herausragende Rolle [7, 8].

In der vorliegenden Arbeit wurden die vorübergehenden („Rolling“) und festen („Adhärenz“) Interaktionen von Knochenmarkstammzellen in extramedulärem Gewebe in Abhängigkeit endothelialer Faktoren in der Mikrozirkulation des M. cremaster der Maus durch Anwendung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

## 1.2 Stammzellen

### 1.2.1 Definition und Einteilung

Stammzellen sind Mutter- oder Ursprungszellen, aus denen sich andere Zellen im Organismus ableiten. Sie sind definiert als Zellen, die klonogen (fähig exakte Duplikate ihrer selbst zu produzieren), selbst erneuernd (fähig sich unbegrenzt zu teilen) und potent (fähig in Richtung verschiedener Zelllinien zu differenzieren) sind [9].

Stammzellen der frühen embryonalen Entwicklung werden häufig als totipotent oder omnipotent bezeichnet. Aus einer totipotenten Zelle kann sich jede beliebige Zelle entwickeln: Zellen des Trophoblast und Zellen aller drei Keimblätter (Endoderm, Mesoderm, Ektoderm).

Das bedeutet, dass aus einer totipotenten Zelle ein ganzer Organismus entstehen kann [10]. Jedoch werden totipotente Stammzellen, wie zum Beispiel die befruchtete Eizelle, nicht als echte Stammzellen nach dem Wortlaut der o.g. Definition angesehen, da sie nur eine bestimmte Zahl von Teilungen durchlaufen können, bevor sie eine weitergehende Differenzierung und Spezialisierung beginnen [11].

Stammzellen, aus denen sich Zellen aller drei Keimblätter, aber keine Trophoblastzellen entwickeln können, werden als pluripotent angesehen. Im Säugetierembryo können sich drei Arten von pluripotenten Stammzellen entwickeln: embryologische Stammzellen, embryologische Geschlechtszellen und embryologische Karzinomzellen [10, 12].

Stammzellen, die sich zu verschiedenen Zellen eines Keimblattes differenzieren können, werden als multipotent angesehen. Diese auch als adulte Stammzellen bezeichneten Zellen entstehen in der Fetal- und frühen Postnatalperiode und sind verantwortlich für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase im Gewebe, indem sie untergegangene Gewebszellen ersetzen [13].

Zur Zeit wird noch kontrovers diskutiert, ob die multipotenten Zellen lebenslang in erneuerbaren Organen persistieren oder ob sie kontinuierlich aus einem zentralen Pool, der v. a. im Knochenmark gesehen wird, freigesetzt werden [6, 9].

Es ist denkbar, dass jedes erneuerbare Organ einen begrenzten lokalen Pool von Stammzellen aufweist, durch den die physiologisch untergehenden Zellen ersetzt werden [14].

In Situationen von unphysiologischen Gewebe- oder Organschäden ist dieser begrenzte Stammzellpool jedoch nicht länger in der Lage, eine adäquate Menge von gewebsspezifischen Zellen zu produzieren. Dies hat zu der Hypothese geführt, dass Stammzellen aus dem Knochenmark als zentraler Pool mobilisiert werden und zielgerichtet in geschädigtes Gewebe einwandern und ggf. mit den lokalen Stammzellen kommunizieren.

### 1.2.2 Knochenmarkstammzellen

Im Knochenmark finden sich aufgrund der dort stattfinden Blutbildung vor allem haematopoetische Vorläuferzellen (HSC) der roten und weißen Blutzellen.

Daneben finden sich auch noch andere Gruppen von Vorläuferzellen, u.a. die der mesenchymalen Stammzellen (MSC), endotheliale Vorläuferzellen (EPC) sowie sogenannte multipotente adulte Vorläuferzellen. Die Gruppe der hämatopoetischen Stammzellen wird schon seit Jahren im Rahmen der Knochenmarktransplantation klinisch verwendet und ist daher relativ gut charakterisiert [15].

Die Zellen werden dazu nach etablierten Protokollen aus Spenderknochenmark isoliert und dem Empfänger, dessen eigene Knochenmarkzellen vorher durch Bestrahlung zerstört werden, injiziert. Im Rahmen dieser Transplantationen wurde erkannt, dass eine besondere Fähigkeit der Stammzellen diese befähigt, gezielt dorthin zu gelangen, wo sie gebraucht werden, also in das Empfängerknochenmark. Dieses Phänomen wird als „Homing“ bezeichnet [16].

Aus hämatopoetischen Stammzellen entwickeln sich im Knochenmark im Rahmen der Hämatopoiese die roten Blutzellen sowie die Zellen des Immunsystems. Sie finden sich auch

im Nabelschnurblut, in der peripheren Zirkulation sowie im hämatopoetischen System des Feten. Hämatopoetische Stammzellen sind charakterisiert durch die Expression bestimmter Oberflächenproteine. Zu diesen gehören nach dem heutigen Kenntnisstand die Proteine CD (cluster of differentiation) 133, CD 34 und CD 117 [17].

Die potentiellen Differenzierungsmöglichkeit hämatopoetischer Stammzellen in Richtung von kardiomuskulärem Gewebe *in vivo* wurde jedoch erst in den vergangenen Jahren, u.a. von Orlic et al. und Jackson et al. im Tiermodell aufgezeigt [2, 18].

Die Arbeitsgruppe von Jackson isolierte eine spezifische Subpopulation von hämatopoetischen Vorläuferzellen und transplantierte diese in Mäuse, deren eigenes Knochenmark vorher durch Bestrahlung zerstört worden war. Die Zellen exprimierten die Oberflächenmarker c-kit (CD 117) und Sca-1+ und wurden mit einem Indikator Gen (LacZ) markiert.

Die transplantierten Mäuse wurden anschließend einem myokardialen Ischämie-Reperfusionsmodell unterzogen, und die Herzen nach 2 bzw. 4 Wochen entnommen. In der Zone, die das Infarktgebiet unmittelbar umgab, fanden sich von den Spenderstammzellen abstammende Kardiomyozyten, womit erstmals die Fähigkeit von zirkulierenden hämatopoetischen Stammzellen zur spezifischen Differenzierung von Herzmuskelzellen gezeigt war [18].

Orlic et al. untersuchten die direkte intramyokardiale Injektion von hämatopoetischen Stammzellen in Mäusen. Nach Ligierung einer Koronararterie wurden GFP (Green Fluorescenz Protein) markierte, c-kit positive Zellen in die Grenzzone des infarzierten Areals injiziert. Nach 9 Tagen zeigten 40 % der Mäuse eine Regeneration des Herzmuskels. In annähernd 68 % des infarzierten Areals fand sich neu gebildetes Herzmuskelgewebe. Weiteren Anhalt für die Regeneration des Myokards lieferte die verlängerte Überlebenszeit der Tiere und die verbesserte Herzfunktion [19].

Obwohl diese Studien zeigen, dass unterschiedliche Populationen von hämatopoetischen Stammzellen sowohl die Kapazität für kardiale Zielwanderung („Homing“) als auch für herzmuskelpezifische Differenzierung aufzuweisen scheinen, konnte die direkte Neubildung von Kardiomyozyten aus applizierten Knochenmarkstammzellen in unterschiedlichen nachfolgenden experimentellen Ansätzen nicht durchgehend so nachvollzogen werden. Daher erscheint diese im Moment noch fraglich. Jedoch ergaben die jüngsten klinischen Studien, z.B. BOOST und TOPCARE-AMI [4, 5], doch zumindest eine verbesserte linksventrikuläre Funktion und auch eine Verringerung der reaktiven myokardialen

Hypertrophie in Patientengruppen, die eine intramuskuläre bzw. intracoronare Stammzelltherapie erhielten.

Diese verbesserte kardiale Funktion nach Stammzellapplikation ist u.a. auf eine verstärkte Neoangiogenese (Gefäßneubildung) im Bereich des geschädigten Herzmuskelgewebes zurückzuführen [20], die eine verbesserte Sauerstoffversorgung des geschädigten Herzmuskelns zur Folge hat. Neben den hämatopoetischen Stammzellen wird in letzter Zeit auch intensiv das therapeutische Potential der endothelialen Vorläuferzellen untersucht.

Diese mononukleären Zellen exprimieren die Oberflächenmoleküle CD133, CD34 sowie VEGFR-2 [21] (Vascular endothelial growth factor receptor-2) und befinden sich normalerweise im Knochenmark (s. o). Nach einem Gewebsschaden werden sie in die Zirkulation mobilisiert, um nach erfolgreicher Zielwanderung in das geschädigte Gewebe in Endothelzellen zu differenzieren und neue Gefäße zu bilden [22].

Als dritte wichtige Vorläuferzellgruppe im Knochenmark sind die Mesenchymalen Stammzellen zu nennen. Sie werden auch als Knochenmark Stromazellen bezeichnet und sind u.a. charakterisiert durch die Expression der Oberflächenmoleküle CD29, CD44, und CD 71 [23].

Bei ihnen handelt es sich um sich selbst erneuernde Vorläuferzellen von nicht-hämatopoetischen Gewebszellen mesodermalen Ursprungs. Normalerweise differenzieren sie zu Osteozyten, Chondrozyten und Adipozyten. Doch unter bestimmten Bedingungen können sie auch in Richtung anderer Zelltypen differenzieren. So fand sich bei Behandlung von Mesenchymalen Stammzellkulturen mit VEGF (vascular endothelial growth factor) eine Differenzierung zu Endothelzellen [24].

In der vorliegenden Arbeit wurden Stammzellen aus dem Knochenmark der Maus mit Expression des Oberflächenmarkers c-kit (CD 117) verwandt. Dabei handelt es sich um eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die als Ligand des Stammzellfaktors (SCF) wirkt [25] und auf hämatopoetischen Knochenmarkstammzellen exprimiert wird [26].

### 1.3 Stammzelhoming

#### 1.3.1 Bedeutung und Mechanismus

Mit dem Begriff „Homing“ wird die Zielwanderung von Zellen in ein spezifisches Gewebe oder Organ bezeichnet. Für ein erfolgreiches Homing ist es notwendig, dass die Zelle in

ihrem jeweiligen Zielgewebe mit den Endothelzellen der Gefäßwände interagiert. Dies geschieht, wie schon länger für weiße Blutzellen bekannt, vor allem im Bereich der postkapillären Venolen des Zielorgans, die alle molekularen Voraussetzungen für die Interaktion mit zirkulierenden Zellen erfüllen.

Das Konzept der Regeneration von geschädigtem knochenmarksfernem Gewebe durch Knochenmarkstammzellen beinhaltet das „Homing“ von Knochenmarkstammzellen mit dem Blutstrom hin zu dem geschädigten Organ, z. B. dem Herz, und die dortige Interaktion mit den Endothelzellen im Sinne der festen endothelialen Adhärenz sowie die anschließende Migration.

Es handelt sich dabei um einen kaskadenartigen Prozess, bestehend aus vielen Einzelschritten [20]. Initial kommt es zu einem Rollen („Rolling“) der Zelle an der endothelialen Gefäßwand, bis die Zelle schließlich fest am Endothel haftet. Diese feste Adhärenz ist die Voraussetzung für die folgende Transmigration der Zelle über die endotheliale Gefäßwand hinweg, in Richtung ihres spezifischen Zielgewebes. Dabei werden sowohl das „Rolling“ als auch die feste Adhäsion der Zellen durch spezifische Interaktionen von endothelseitigen und zellseitigen Adhäsionsmolekülen vermittelt.

Nach den ersten Berichten über die Einwanderung von Stammzellen in infarziertes Myokardgewebe ist der Prozess des Homings von Knochenmarkstammzellen im Bereich von geschädigtem extramedulärem Gewebe bisher nur ansatzweise untersucht worden.

### 1.3.2 Homing assoziierte Signalwege

Ein grundlegendes Konzept für die Regeneration von geschädigtem extramedullärem Gewebe durch Knochenmarkstammzellen ist die Annahme, dass molekulare Signalwege existieren, die unmittelbar nach eingetretenem Gewebsschaden, z.B. einem Myokardinfarkt, aktiviert werden und die zielgenaue lokale Anreicherung von Stammzellen vermitteln [27].

Die lokale Inflammation und Ischämie selbst scheinen, vermittelt durch Signalmoleküle der entzündlichen Gewebsreaktion, eine Rolle bei der Rekrutierung von Stammzellen in geschädigtes Gewebe zu spielen.

Daneben existieren verschiedene so genannte Chemokine, die eine bedeutende Rolle im Rahmen dieser Signalwege einnehmen. Chemokine sind kleine, proinflammatorische Zytokine, die an spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren binden und zentrale Regulatoren der Zellmigration und –adhäsion sind [28, 29].

Die Familie der Chemokine wird nach Struktur- und Sequenzmerkmalen in vier Unterfamilien eingeteilt, die als CXC-Chemokine (z. B. IL-8 = CXCL8, SDF-1 $\alpha$  = CXCL12), CC-Chemokine (z.B. monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 = CCL2), C-Chemokine (Lymphotaktin = XCL1) und CX3C-Chemokine (Fraktalkin = CX3CL1) bezeichnet werden [30]. Die Mitglieder dieser Familie werden im Allgemeinen von Endothelzellen und Zellen des perivaskulären Gewebes freigesetzt.

#### 1.3.2.1 Stromal cell-derived factor-1 alpha

Das Chemokin SDF-1 $\alpha$  (Stromal cell-derived factor-1 alpha) ist in jüngster Zeit als ein zentraler kardialer Homingfaktor für Stammzellen identifiziert worden [31]. Er wird von Stromazellen und Endothelzellen exprimiert, u. a im Herzen [32], im Skelettmuskel [33] und in der Leber [34]. In vitro Versuche haben eine eindeutige dosisabhängige Migration von CD 34+ Knochenmarkstammzellen in Richtung von SDF-1 $\alpha$  Gradienten gezeigt [35].

Das korrespondierende Oberflächenmolekül der Stammzellen für dieses wichtige Chemokin ist der Rezeptor CXCR4 (CD 184), an den SDF-1 $\alpha$  spezifisch bindet [29].

Im Herzen des gesunden Erwachsenen wird SDF-1 $\alpha$  konstitutiv exprimiert [36]. Daneben konnte sowohl in präklinischen Tiermodellen [37] als auch in klinischen Studien [38] eine Hochregulierung der Expression nach Myokardinfarkt nachgewiesen werden, die eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung von Stammzellen aus dem Blutstrom der zur Regeneration von geschädigtem Herzmuskelgewebe zu spielen scheint. So steigt bei Herzinfarktpatienten die Plasmakonzentration von SDF-1 $\alpha$  in der ersten Woche nach dem kardialen Ereignis schnell an und erreicht ein Maximum 3 Wochen nach dem Infarktgeschehen [38].

#### 1.3.2.2 Tumornekrosefaktor alpha

Zentrales pro-inflammatorisches Zytokin des ischämischen Gewebsschadens, z. B. beim Myokardinfarkt, ist TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor alpha). Es vermittelt neben anderen pro-inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 $\beta$  und Interleukin-6 den lokalen Entzündungsprozess.

TNF- $\alpha$  wird von Monozyten/Makrophagen [39], degranulierenden Mastzellen [40], kardialen Fibroblasten [41] und Herzmuskelzellen [42] produziert.

Nach Berichten von Abbot et al. ist der lokale Gewebsschaden bzw. die lokale Entzündung unabdingbarer Cofactor für die SDF-1 $\alpha$  vermittelte Rekrutierung von Stammzellen zum Herzen [31]. Chen et al. konnten in vitro zeigen, dass die Überexpression von TNF- $\alpha$  durch Cardiomyozyten die Migration von embryologischen Stammzellen verstärkt [43].

### 1.3.2.3 Endothelfunktion

Neben den vorher genannten Faktoren sind auch der Funktionszustand des Endothels, sowie das Expressionsmuster bestimmter Adhäsionsproteine auf den Endothelzellen von Bedeutung.

Das Endothel als zentrale Komponente aller Blutgefäße kleidet das gesamte Gefäßsystem vom Herz bis zu den kleinsten Blutgefäßen aus, ist der wichtigste Regulator der vaskulären Homöostase (Aufrechterhaltung des inneren Milieus des Blutgefäßes) und interagiert sowohl mit zirkulierenden Zellen des Blutes als auch mit Zellen der Gefäßwand [16].

Für die Interaktion von Endothelzellen mit den zirkulierenden Zellen des Blutkreislaufes, wie Leukozyten und auch mobilisierten Knochenmarksstammzellen, sind Adhäsionsproteine aus den Gruppe der Selektine, der Integrine und der Immunglobulin-Superfamilie von Bedeutung. So konnten Rüster et al. kürzlich zeigen, dass die Interaktion von Mesenchymalen Stammzellen mit Endothelzellen durch das Adhäsionsmolekül VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) und das Integrin VLA-1 (very late antigen-1) vermittelte Adhäsionsprozesse zu Stande kommt [44]. Gleichzeitig ist bekannt, dass TNF- $\alpha$  die endotheliale Adhäsion von Leukozyten im M. cremaster durch eine Verstärkung der ICAM-1- (inter cellular adhesionmolecule-1) -Expression induziert [45, 46].

Um die neuen Therapieschemata der ischämischen Herzkrankheit basierend auf der lokalen und intravaskulären Stammzellapplikation zu optimieren, ist es notwendig, die Faktoren, die das „Homing“ der Knochenmarkstammzellen im Bereich des geschädigten Herzmuskels beeinflussen, weitergehend zu charakterisieren.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher der Einfluss von SDF-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  auf die Interaktion von c-kit+ Knochenmarkstammzellen mit dem Gefäßendothel im knochenmarksfernen Gewebe in vivo untersucht werden.

## 1.4 Das Stickoxid und die Stickoxidsynthasen

### 1.4.1 Bedeutung im Rahmen der Stammzellmigration

In den letzten Jahren ist die endotheliale Stickoxidsynthase (eNOS) verschiedentlich auch im Zusammenhang mit der Mobilisation und dem Homing von Stammzellen in Zusammenhang gebracht worden. So ist die eNOS von Aicher et al. als ein Schlüsselfaktor bei der Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark identifiziert worden [7].

Die Gruppe fand, dass die Mobilisation von Stammzellen aus Knochenmark der Maus bei Verlust des eNOS Gens deutlich eingeschränkt ist.

Die selbe Arbeitsgruppe konnte kürzlich zeigen, dass die Stickoxid produzierenden Enzyme spezifisch die Migrationskapazität von mononukleären Knochenmarkszellen *in vivo* beeinflussen [47]. Hiasa et al. fanden, dass der bekannte Stammzellhomingfaktor SDF-1 $\alpha$  die postischämische Gefäßneubildung über einen VEGF/eNOS gekoppelten sekundär-messenger Prozess beeinflusst [48].

Auch auf die Beeinflussung der Neoangiogenese durch endotheliale und hämatopoetische Stammzellen in der Retina gibt es wissenschaftliche Hinweise.

So zeigten Guthrie et al., dass die Gefäßneubildung nach retinaler Ischämie durch Stammzellen entscheidend von NO-abhängigen Signalwegen beeinflusst wird [49].

In der vorliegenden Arbeit wurde vor diesem Hintergrund der Einfluss der endothelialen NOS auf die periphere Stammzellmigration *in vivo* nach Stammzellinjektion anhand eines etablierten Tiermodells untersucht.

### 1.4.2 Die Stickoxidsynthasen

Das Stickoxid, NO, ist ein multifunktionales Agens, und spielt im Organismus eine bedeutende Rolle als Botenstoff für viele physiologische Vorgänge. Dies sind z. B. die körpereigene Abwehr, neuronale Signalübertragung und der Regulation des Gefäßtonus [50]. NO wird im Körper in einer energieabhängigen Reaktion aus der Aminosäure L-Arginin, über die Zwischenstufe N-hydroxy-L-Arginin, gebildet [51].

Diese Reaktion wird im Organismus durch die Stickoxidsynthasen, kurz die NOS, katalysiert [52]. Es gibt drei NOS-Isoformen, die sich in zwei Gruppen einteilen lassen.

Die erste Gruppe beinhaltet die konstitutiven Isoformen des Enzyms, die endotheliale NOS (eNOS=NOS-3) sowie die neuronale NOS (nNOS=NOS-1).

Diese Kalzium-/Calmodulin-abhängigen Enzyme produzieren NO in kurzen Schüben und geringen Konzentrationen (nmol) für physiologische Vorgänge, wie z. B. die Regulation der Gefäßweite.

Die zweite Gruppe beinhaltet die induzierbare Isoform des Enzyms, iNOS. Diese Isoform arbeitet Kalzium-unabhängig [53] und kommt in der Regel in gesundem Gewebe nicht vor. Sie wird erst nach Induktion durch verschiedene pathologische Reize in Makrophagen, Astrocyten, Kupffer-Zellen, Endothelzellen, Chondrozyten u.a. exprimiert [54]. iNOS produziert NO in relativ hohen Konzentrationen solange sie aktiviert ist.

### 1.4.3 Struktur und Lokalisation der eNOS

Die eNOS ist ein dimeres Protein, bestehend aus zwei identischen Monomeren (je 134 kD) mit je einer N-terminalen Oxygenase-Domäne und einer C-terminalen Reduktase Domäne [55]. Das Enzym wird in Endothelzellen, Thrombozyten, glatten Muskelzellen, und auch Kardiomyozyten exprimiert [56]. Die exakte subzelluläre Lokalisation der eNOS ist noch nicht endgültig geklärt. Man geht jedoch momentan davon aus, dass der größte Anteil sich in plasmalemmalen Caveolae befindet und dort an das Hüllprotein Caveolin-1 gebunden ist. Bei den Caveolae handelt es sich um spezielle, invaginierte Areale der Zellmembran, die v. a. durch das Membranprotein Caveolin (Caveolin-1 ist die endothiale Isoform) charakterisiert sind [57].

#### 1.4.3.1 Regulation der Enzymaktivität

Ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, führt zu Bildung von Kalzium-Calmodulin-Komplexen. Diese binden an das Enzym und bewirken eine Dissoziation vom Caveolin und eine Translokation der eNOS ins Zytosol. Die Aktivierung des Enzyms und damit die NO-Produktion besteht für die Dauer der Calmodulin-Bindung [58].

Neben den regulierenden Signalwegen, die in erster Linie die Kalzium-Calmodulin Interaktion beinhalten, wird die dynamische Regulation der eNOS auch durch verschiedene Signalwege der Phosphorylierung und Dephosphorylierung beeinflusst.

Die eNOS wird an verschiedenen Domänen phosphoryliert (u.a. Serin 1177 und Serin 635, (Aktivierung), sowie Threonin 495 und Serin 116 (Inaktivierung)). Die Protein Kinase Akt, auch bekannt als Protein Kinase B, scheint eine Schlüsselrolle bei der Phosphorylierung der eNOS an Serin 1177 und damit der Enzymaktivierung zu spielen [59, 60].

Obwohl das Enzym konstitutiv aktiv ist, sind verschiedene Stimuli bekannt, die das basale Aktivitätsniveau beeinflussen. So ist die Abhängigkeit der endothelialen Stickoxidfreisetzung durch die eNOS von den lokal wirkenden vaskulären Scherkräften schon lange bekannt. Seit den bahnbrechenden Arbeiten von Furchtgott et al. in den späten 70er Jahren weiß man, dass das Stickoxid in auf diese Weise als zentraler Botenstoff den glattmuskulären Gefäßtonus beeinflusst.

Daneben sind heute jedoch auch Wachstumsfaktoren wie das VEGF (vascular endothelial growth factor) und auch Hormone, u. a. das Östrogen als Aktivatoren der eNOS identifiziert.

#### 1.4.3.2 Rolle der eNOS bei der Regulation des Gefäßtonus

Eine wichtige Rolle spielt das endotheliale NO bei der Regulierung des Gefäßtonus. NO wird vom Gefäßendothel produziert, diffundiert in die benachbarten glatten Muskelzellen und aktiviert dort die lösliche Isoform der Guanylatzyklase. Dies führt zur Produktion von cGMP aus GTP durch die Guanylatzyklase [61]. Dadurch werden die c-GMP abhängigen Kinasen aktiviert, welche schließlich über eine Dephosphorylierung der Myosin-Leicht-Ketten-Kinasen zur Relaxation der glatten (Gefäß-)Muskelzellen und damit zur Vasodilatation führen [62] (Abb.1).

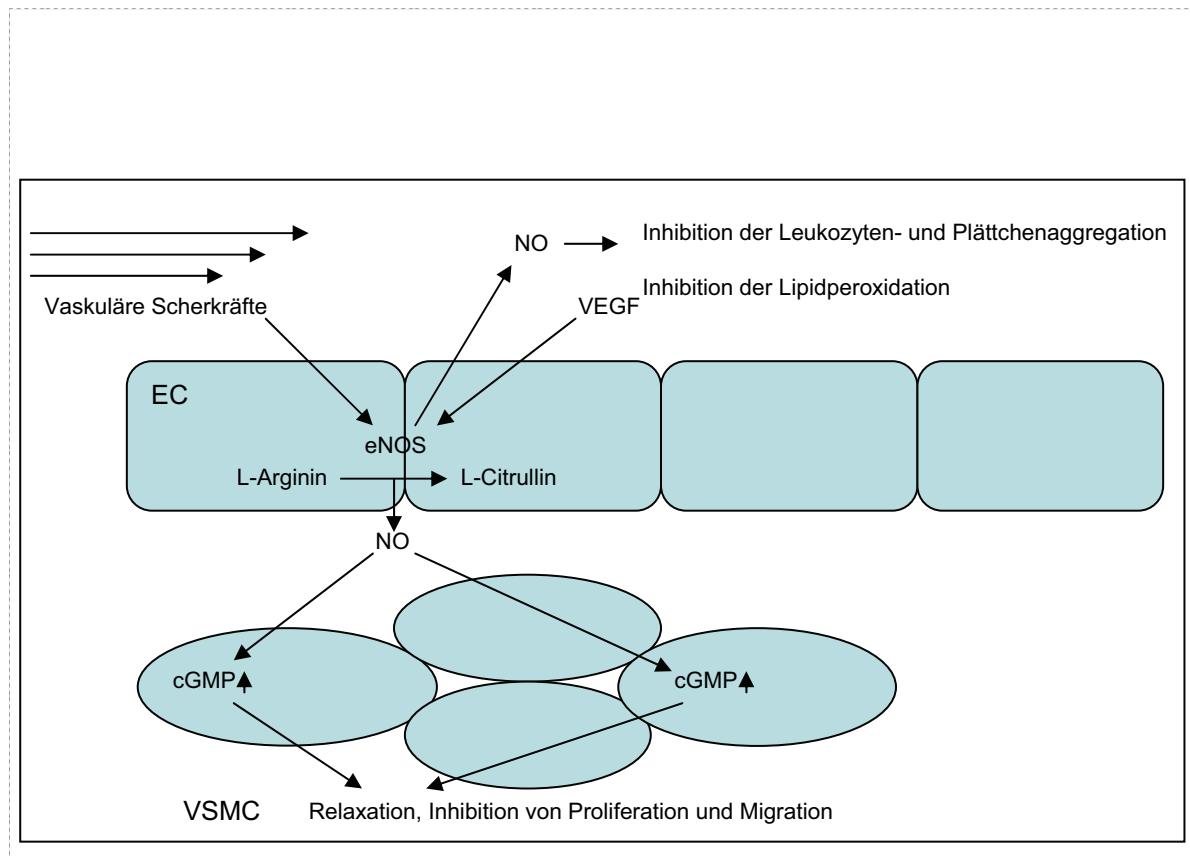


Abb. 1: Funktion der eNOS (nach: Kondo et. al. Nitric oxide signalling during myocardial angiogenesis, Molecular and Cellular Biochemistry 264:25-34,2004)

#### 1.4.3.3 Bedeutung der eNOS für die endotheliale Leukozytenadhäsion

Neben dieser wichtigen Funktion spricht man der eNOS aber heute auch noch verschiedene andere Funktionen zu.

So beeinflusst die Enzymaktivität auch die endotheliale Leukozytenadhäsion und die Plättchenaggregation. Auch die Gefäßneubildung wird durch die eNOS beeinflusst [63]. Nach inflammatorischen Stimuli wurden zellprotektive Reaktionen gefunden [64], die durch die NO-Synthasen aktiviert werden sollen. Steigt die Aktivität des NO-Synthase Systems intrazellulär an, so wurde beobachtet, dass der NF- $\kappa$ B-Inhibitor I- $\kappa$ B stabilisiert wird und somit der Transkriptionsfaktor nicht in den Zellkern verlagert werden kann, um inflammatorische Gene zu aktivieren [65]. Ein wichtiges Zielgen in diesem Zusammenhang stellt das „Interstitiell Cell Adhesion molecule – 1“ (ICAM-1) dar, welches über NF- $\kappa$ B aktiviert

wird und eine entscheidende Rolle bei der Leukozytenmigration in das geschädigte Gewebe spielt [66].

Vor diesem Hintergrund ist die eNOS als ein Schlüsselenzym der endothelialen und auch vaskulären Funktion anzusehen, und in jüngster Zeit sind verschiedene pathologische Situationen wie die arterielle Hypertonie, die Arteriosklerose, und auch der Diabetes mellitus mit einer verminderten Funktion der endothelialen NOS in Verbindung gebracht worden [67, 68].

## 2 Ziel der Arbeit und Aufgabenstellungen

Die Einführung sowie die einleitende Literaturdiskussion zeigen, dass dem Prozess des Homings eine wichtige Rolle bei der Geweberegeneration durch Stammzellen zukommt und dass dieser Prozess durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird. Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Homingverhaltens von Knochenmarkstammzellen in knochenmarksfernem Gewebe *in vivo*. Es werden hierzu mit Hilfe intravitaler Fluoreszenzmikroskopie die Interaktion von Knochenmarkstammzellen mit Endothelzellen, sowie die Beeinflussung dieser Interaktion durch Ko-Faktoren untersucht. Die Aufgabenstellungen dazu lauteten wie folgt:

Untersuchen Sie zunächst das Homingverhalten von Knochenmarkstammzellen *in vivo* im unbehandelten M. cremaster der Maus.

Untersuchen Sie den Einfluss einer lokalen Inflammation durch TNF- $\alpha$  in Kombination mit der Applikation des Zytokins SDF-1 $\alpha$  auf das Homingverhalten der Stammzellen *in vivo*. Analysieren Sie dabei die Expression des korrespondierenden SDF-1 $\alpha$  Rezeptors CXCR-4 sowohl auf Seiten der Stammzellen als auch auf Seite der Gefäßendothelzellen.

Untersuchen Sie die Expression der endothelialen NO-Synthase im Gewebe des M. cremaster der Maus unter den Bedingungen 1. und 2. Untersuchen Sie weiterhin, welchen Einfluss die Expression bzw. die Funktion der endothelialen NO-Synthase auf das Homingverhalten von Knochenmarkstammzellen unter den Bedingungen 1. und 2. haben. Verwenden Sie dazu gendefizierte Mäuse und kompetitive NOS Blocker.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Stammzellisolation und Fluoreszenzmarkierung

Hämatopoetische Stammzellen, charakterisiert durch die Expression des Oberflächenmarkers c-kit (CD 117), wurden mit Hilfe von magnetischen microbead-gekoppelten, monoklonalen anti-CD 117 Antikörpern der Firma Miltenyi Biotec unter Verwendung des MiniMacs® Isolations-sets (Miltenyi Biotec, Deutschland) isoliert. Zunächst wurden der Femur und der Humerus der jeweiligen Spendermaus beidseits frei präpariert und durch Deartikulation herausgelöst. Anschließend wurde mit einer 26 G Nadel das Knochenmark mit PBS Puffer (PBS+ EDTA 0,1 %) aus der Markhöhle herausgespült und in einer Petrischale aufgefangen. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden die Markbestandteile in PBS Puffer gelöst. Um Zell- und Gewebsklumpen zu entfernen, wurden die Zellen durch einen 30 Mikrometer Nylonfilter (Miltenyi Biotec, Deutschland) gepresst. Danach wurden die Zellen durch Zugabe von Puffer und Zentrifugation bei 300 G für 10 Minuten gewaschen. Anschließend wurde der Überstand abgegossen und das Zellpellet in Puffer resuspendiert. Hiernach wurde eine Probe zur Zellzählung entnommen (s. u.).

Im Anschluss wurde der anti-CD 117 Antikörper zugegeben. Dabei wurden jeweils 20 µl Antikörper für  $10^7$  Zellen verwendet. Zur besseren Durchmischung der Zellsuspension der wurde diese mehrmals auf- und abpipettiert und anschließend bei 4-8 Grad für 15 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml Puffer je  $10^7$  Zellen und Zentrifugation bei 300 G für 10 Minuten gewaschen. Anschließend erfolgte die Resuspension des Zellpellets in 500 µl Puffer. Für die magnetische Zelltrennung wurden MACS Zelltrennungssäulen aus dem MiniMacs® Isolationsset verwendet. Nach Befestigung im Magnetfeld des MACS Seperator wurden die Säulen zunächst mit 500 µl Puffer gespült. Danach wurde die Zellsuspension durch die Säule filtriert. Die unmarkierte Zellfraktion wurde aufgefangen und die Säule nach Ende der Filtration 3-fach mit 500 µl Puffer gespült. Die unmarkierte, d. h. nicht durch Antikörper gebundene Zellfraktion wurde danach durch eine zweite Trennungssäule filtriert, um die Effektivität der Isolation antikörper-positiver Zellen zu erhöhen. Nach Ende der Filterung wurde die Säule wiederum dreifach mit 500 µl Puffer gespült. Danach wurden beide Trennsäulen aus dem Magnetfeld entfernt.

Die Säulen wurden nun auf Auffangbehältern (20 ml Röhrchen) platziert und mit jeweils 50 µl Puffer gefüllt. Sofort im Anschluss wurde die Antikörper tragende Zellfraktion mit Hilfe eines dafür vorgesehenen Stempels in den Auffangbehälter gespült.

Die Reinheit des Isolationsproduktes wurde mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Analyse (FACS) überprüft. Dazu wurden die Zellen mit einem Phycoerythrin (PE) markierten anti-CD 117 Antikörper (PE-anti mouse CD 117, BD Pharmingen) markiert.

Die gewonnenen Stammzellen wurden für die intravitale Mikroskopie fluoreszensmarkiert. Dazu wurden 2,5 µl des Fluoreszenzmarkers carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE, Molecular Probes, Eugene, Oregon) je 1 ml Zellsuspension hinzu gegeben. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und Dunkelheit, wurden die Zellen bei 300 G für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Zellpellet in 300 µl PBS Puffer resuspendiert.

### 3.1.1 Zellzählung

Im Anschluss an den zweiten Filtrationsdurchlauf, wurden die isolierten c-kit+ Stammzellen gezählt. Die Zellzählung erfolgte unter Verwendung einer Neubauer Zählkammer. Die Zellen wurden dazu mit Trypan Blau gefärbt. Die Zahl isolierter und injizierter c-kit+ Knochenmarkstammzellen betrug  $3,2 \pm 0,2 \times 10^6$  Zellen.

## 3.2 Tiermodell

### 3.2.1 Versuchsaufbau

Das Homingverhalten von Knochenmarksstammzellen in knochenmarksfernem Gewebe wurde anhand eines Mausmodells untersucht. Es wurde hierzu das vaskuläre Verhalten arteriell injizierter Knochenmarksstammzellen in der Mikrozirkulation des M. cremaster mit Hilfe intra-vitaler Fluoreszenzmikroskopie beobachtet.

Zur Stimulierung des Stammzellhomings wurde der präparierte M. cremaster mit dem bekannte Homingfaktor für Knochenmarksstammzellen, SDF-1α, superfundiert. Gleichzeitig erfolgte zusätzlich eine Superfusion des Muskels mit dem Entzündungsmediator TNF-α (Tumor-nekrose-faktor alpha), um eine entzündliche Gewebsreaktion zu induzieren. Auf diese Weise wurde eine Gewebssituation simuliert, wie sie in ähnlicher Form auch im ischämischen Herzmuskelgewebe zu finden ist. Um die Stammzellmigration in diesem Gewebe zu untersuchen, wurden zwei Parameter im mikrovaskulären Verhalten der Knochenmarksstammzellen analysiert. Zunächst wurde nach akuter Injektion der Anteil

„rollender“ Stammzellen bestimmt. Nach 45 Minuten wurde dann das Ausmaß der festen Adhärenz der Stammzellen am Endothel quantifiziert.

### 3.2.2 Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den Tierschutzgesetz und nach Genehmigung durch die lokalen Behörden durchgeführt (Tierversuchsvorhaben LVL-MV/TSD/7221.3-1.1-022/04).

Die verwendeten Mäuse wurden aus den Jackson Laboratories (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Als Versuchstiere wurden männliche Mäuse der Linie C57-black 6/6J (Kurzbezeichnung: wildtyp; wt) verwendet. Als Vergleichsgruppe wurden männliche Mäuse mit der Linie black 6.129p2-Nos3 verwendet, die einen homozygoten Verlust des Gens für die endotheliale Stickoxid Synthase aufweisen (Kurzbezeichnung: eNOS knock-out; enos-ko) ansonsten aber den gleichen genetischen Hintergrund wie die C57-black6/6J haben.

Der Verlust des eNOS Gens in den Tieren dieser Linie, ist in vorangehenden Versuchen unserer Arbeitsgruppe molekularbiologisch nachgewiesen worden [69].

Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Versuche zwischen 6 - 12 Wochen alt und wogen 20-30g. Bis zum Versuch wurden sie entsprechend den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes bei freiem Zugang zu Trockenfutter und Wasser bei einem 12-stündigem Hell-Dunkelrhythmus in der Zentralen Tierhaltung am Institut für Experimentelle Chirurgie gehalten.

### 3.2.3 Materialien

Mäusekäfige mit Futter und Trinkflaschen

OP-Tisch, beheizbar

Operationsbesteck, bestehend aus:

1 Nachstarschere nach Vannas 85 mm; gerade

Nagelhautschere, 90 mm gebogen, extrafein

Mikro-Pinzette, Uhrmacher, 110 mm

Anatomische Pinzette, sehr fein, 115 mm

Knüpfpinzette Geb. Maul 0,3mm 150mm

Mikro-Nadelhalter, 160 mm, gebogen

3 Gewebeklemmen, nach Kocher

Die Instrumente wurden von der Firma Krauth und Timmermann bezogen.

### 3.2.4 Narkose und Lagerung der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden vor dem Beginn des operativen Eingriffes mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin (Ketanest) 75mg/kg, und Xylazin (Rompun) 25mg/kg anästhesiert.

Nach erfolgreicher Narkose wurden der linke Oberschenkel sowie das rechte Skrotum rasiert. Zur Sicherung der Atmung wurde die Zunge luxiert. Das Versuchstier wurde dann auf einem Präparationstisch aus durchsichtigem Plexiglas (Spezialanfertigung des Instituts für experimentelle Chirurgie) in Rückenlage fixiert.

### 3.2.5 Durchführung der Operation

#### 3.2.5.1 Kanülierung der linken Arteria femoralis

Unter Verwendung eines Operationsmikroskops erfolgte zunächst die Präparation der linken A. femoralis. Nach dem Hautschnitt wurde das Gefäß in seinem Verlauf bis in die Inguinalregion dargestellt. Der linke Hoden wurde zwecks besserer Übersicht mit einem 6-0 Polypropylen Faden (Prolene™, Ethicon) angeschlungen und nach medial oben gezogen.

Ein zur Abdomialwand abgehender Seitenast der Arterie wurde mit Hilfe eines Thermokauters ligiert.

Nach Anlegen einer distalen Ligatur (Ligaturfaden) wurde das Gefäß proximal durch einen vorgelegten Knoten abgeknickt, so dass eine Blutleere hergestellt war. Nach Inzision der Arterie wurde ein Katheter (Portex non sterile Polythen Tubing 0.28mm ID, SIMS Portex, UK) eingeführt und mit Hilfe des vorgelegten Fadens gesichert.

### 3.2.5.2 Hintergrund des M. cremaster Versuchsmodells

Der M. cremaster besteht aus einer dünnen Schicht quergestreifter Skelettmuskulatur, die Hoden und Nebenhoden umschließt. Das Gewebe ist für die Intravitalmikroskopie sehr gut geeignet, da es dünn und transparent ist. Die ventrale Eröffnung des Muskels jenseits der dorsal liegenden zentralen zu- und abführenden Gefäße erlaubt eine Präparation ohne schädigenden Einfluss auf diese [70]. Die offene Präparation des M. cremaster ist erstmalig in den frühen 1970er Jahren beschrieben worden. Vorher waren die Venolen des Cremaster nur bei nicht eröffnetem Muskel visualisiert worden [71]. Die Erstbeschreiber der offenen Präparation Baez et al. etablierten das Modell zunächst für die Ratte [70]. Dieses Modell wurde in der Arbeitsgruppe um Frau Professor Vollmar, Institut für experimentelle Chirurgie, Universität Rostock, auf Mäuse übertragen [72]. Durch die offene Präparation ist eine Visualisierung der Gefäße im gesamten Muskel möglich. Lange Beobachtungsperioden können problemlos eingehalten werden, da das Gewebe stabil und sicher gelagert werden kann.

### 3.2.5.3 Durchführung der Cremasterpräparation

Nach Inzision des Skrotums in der Mittellinie wurde der M. cremaster an seinem distalen Ende dargestellt, mit einem Faden der Stärke 7-0 (Prolene) angeschlungen und unter dosiertem distalen Zug stumpf vom umgebenden Gewebe frei präpariert. Der Muskel wurde dann in seinem Verlauf von proximal nach distal unter maximaler Schonung der Gefäße eröffnet. Die vom Nebenhoden zur Muskelspitze verlaufenden A. und V. epididymidis wurden mit Hilfe eines Thermokauters durchtrennt und der Nebenhoden mit Hoden nach lateral oben abgelegt. Der M. cremaster wurde daraufhin als axial gestielter Lappen auf dem Präparationstisch flach ausgebreitet und durch fünf Nähte (7-0 Faden, Prolene) an den Rändern fixiert.

### 3.3 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

#### 3.3.1 Prinzip der Epiillumination

Fluoreszenz ist ein Licht, das nicht aufgrund einer Temperaturerhöhung der fluoreszierenden Substanz emittiert, sondern durch Bestrahlung mit Licht bestimmter Wellenlänge erzeugt wird [73]. Im Gegensatz zu Phosphoreszenz leuchtet Fluoreszenz nicht nach. Bei der Epiilluminationsmikroskopie (Abb.1) wird ein fluoreszierender Indikator mit Licht geeigneter Wellenlänge angeregt, das durch eine Lichtquelle erzeugt wird und einen Filter passieren muss. Zur Beobachtung der Fluoreszenzemission sind Sperrfilter in den Strahlengang eingebbracht, die das Licht des Anregungsspektrums absorbieren oder reflektieren. Im Okular erscheint deswegen keine Erregungsstrahlung, während das Fluoreszenzlicht den Sperrfilter passiert. Durch die helle Emission des fluoreszierenden Indikators vor einem dunklen Hintergrund wird ein hoher Bildkontrast erreicht.

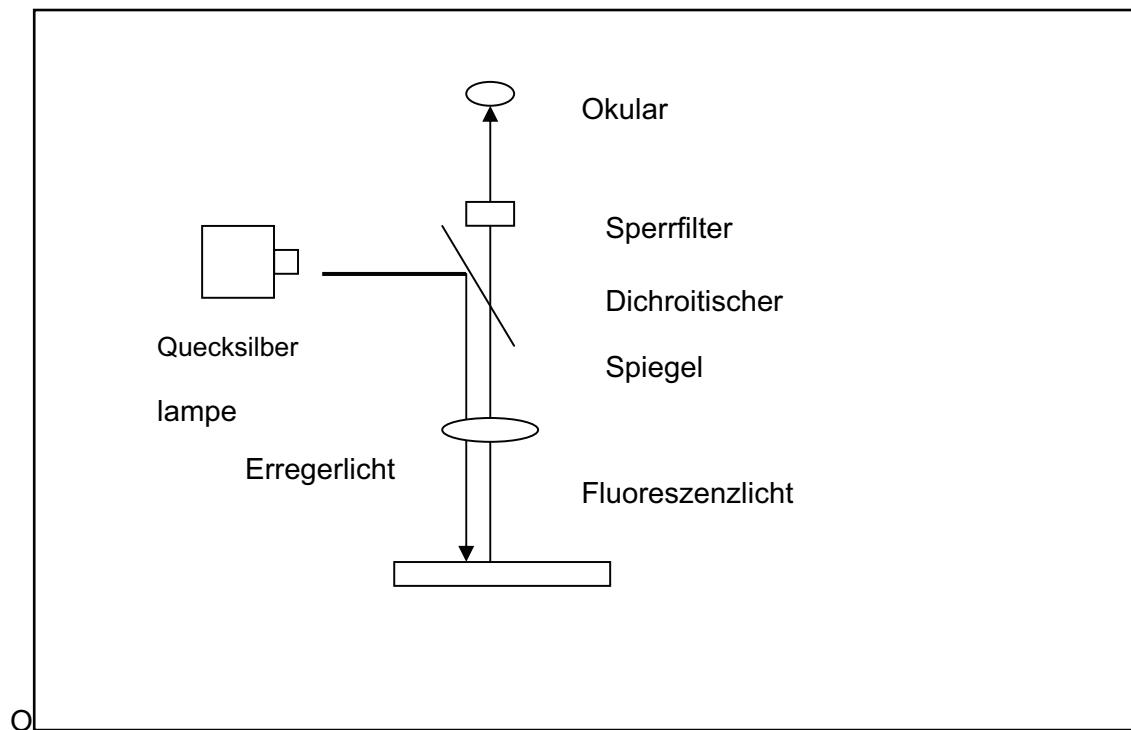


Abb. 2 Schema der Fluoreszenzmikroskopie mit Epiilluminationstechnik [74]

### 3.3.2 Aufbau des Intravitalmikroskops

Die Mikrozirkulation des M. cremaster wurde mit Hilfe eines Axiotech vario Fluoreszenzmikroskops (Zeiss, Jena, Deutschland) des Instituts für experimentelle Chirurgie der Universität Rostock beobachtet. Die Versuche wurden bei einer konstanten Raumtemperatur von 21 - 23 Grad Celsius durchgeführt. Das Versuchstier wurde auf einem beweglichen Mikroskopiertisch gelagert. Die Mikroskopie erfolgte unter Verwendung einer 100 Watt HBO-Quecksilberlampe als Anregungslichtquelle. Das Licht passiert zunächst einen Hitzefilter, danach eine verstellbare Irisblende und schließlich einen von zwei austauschbaren Filterblöcken. In diesen erfolgt die Integration auf einander abgestimmten Erreger- und Sperrfilter (Tabelle 1). Durch eine Schaltvorrichtung kann rasch zwischen diesen Filterblöcken gewechselt werden.

Filterblock	Anregungsbereich	Anregungsfilter	Sperrfilter
Übersicht	grün	530-560 nm	580 nm
Stammzellen	blau	450-490 nm	520 nm

Tabelle 1: verwendete Filterblöcke

Das Objektiv konzentriert als Kondensor das Erregerlicht im Objektfeld und sammelt gleichzeitig das emittierte Fluoreszenzlicht. Zur Durchmusterung des gesamten muskulären Gefäßsystems zu Beginn des Versuchs sowie zur Beobachtung der festen endothelialen Adhäsion der Stammzellen wurde ein 10er Objektiv verwendet. Für die Beobachtung der Stammzellen nach erfolgter Injektion wurde ein Wasserimmersionsobjektiv (Achromplanx20/0.50W, Zeiss) mit 20-facher Vergrößerung verwendet. Die durch die jeweils gefilterte Fluoreszenzemission dargestellten Bildelemente konnten durch ein Okular betrachtet oder direkt mit Hilfe einer Videokamera (FK-6990-IQ-S; Pieper, Schwerte, Deutschland) auf einen Monitor übertragen werden. Zur späteren offline Analyse wurden die Bilder mit Hilfe eines Videorekorders auf VHS-Videokassetten aufgezeichnet.

### 3.3.3 Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoffe wurden als Indikatoren eingesetzt, da Blutplasma, Endothelzellen und Leukozyten keine ausreichende Eigenfluoreszenz aufweisen. Außerdem ermöglichen sie

eine deutliche Markierung der injizierten c-kit positiven Stammzellen im Gefäßsystem. Hochmolekulares (Molekulargewicht 150000 kD), an den Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin gekoppeltes Dextran gewährleistete eine Kontrastverstärkung des Plasmas. Es wurde vor Beginn der Mikroskopie als Bolus von 0,1 ml (2,5 % in NaCl) über den liegenden Katheter in die A. femoralis appliziert. Zur Markierung der injizierten c-kit+ Stammzellen diente CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, Molecular Probes, Eugene, USA).

### 3.4 Gewebeanalysen

#### 3.4.1 Anfertigung der Gewebsschnitte

Das Muskelgewebe wurde nach der Entnahme mit Hilfe von Tissue Tek™ (Sakura Finetek) eingebettet und bis zur weiteren Verwendung bei -80 Grad Celsius gelagert. Unter Verwendung eines Mikrotoms (Leica, Deutschland) wurden daraufhin 5µm dicke Gewebsschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgetragen und bei -20 Grad Celsius bis zur immunhistologischen Verwendung aufbewahrt.

### 3.5 Immunfärbungen

### 3.6 Immunhistologische Anfärbung des M. cremaster

Antikörper	Verdünnung in Verdünnungspuffer	Inkubationszeit
Anti-eNOS	1:100	über Nacht bei 4° Celsius
Anti-CD 184 (CXCR4)	1:200	über Nacht bei RT
Anti-CD 146	1:200	über Nacht bei RT

Tabelle 2: verwendete Primärantikörper mit Verdünnung und Inkubationszeit

Die Gewebsschnitte wurden zunächst für 2 Minuten in Wasser gewaschen. Danach wurden die Schnitte mit Hilfe von Formalin (4 % in PBS, Phosphatgepufferte Salzlösung) fixiert. Nach 20 Minuten wurden die Schnitte erneut gewaschen um das Formalin zu entfernen: 2 Minuten Wasser + 5 Minuten PBS-Puffer (pH 7,4). Um die Gewebszellen permeabel zu

machen, wurden die Schnitte als nächstes für 30 Minuten mit Triton-X-100 (Sigma, Steinheim, Deutschland), einem nicht-ionischen Detergenz, 0,1 % in PBS, inkubiert. Bei Anfärbung von CXCR4 wurde auf diesen Schritt verzichtet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Schnitte erneut mit Wasser gespült und für 2 x 5 Minuten in PBS gewaschen.

Bei späterer Verwendung eines Biotin-gekoppelten Sekundärantikörpers wurden die Schnitte als nächstes für 10 Minuten mit einem spezifischen Peroxidaseblock-Reagenz (Sigma) inkubiert, um die gewebseigene Peroxidase zu blockieren. Daraufhin erneutes Waschen für 5 Minuten mit PBS, um das Reagenz zu entfernen. Anschließend wurden die Schnitte für weitere 10 Minuten mit einem Proteinblockreagenz (DAKO, Hamburg, Deutschland) inkubiert, um Proteinbindungsstellen im Gewebe, die zu unspezifischen Antikörperbindungen führen können, zu blockieren. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Schnitte mit dem primären Antikörper, Anti-eNOS (monoclonal Anti-Nitric Oxide Synthase, Bovine; Calbiochem) 1:100 inkubiert.

Alle angegebenen Antikörperverdünnungen wurden mit einem speziellen Antikörper-Lösungsreagenz der Firma DAKO (Antibody Diluent with Background reducing components DakoCytomation) hergestellt.

Zur Detektion von CXCR4 wurde der primäre Antikörper Anti-CXCR4 (rat anti-mouse CD 184 CXCR4 monoclonal, BD Pharmingen) in einer Konzentration von 1:200 verwendet. Auf jeden Schnitt wurden 40 µl der Antikörperlösung aufgebracht und die Schnitte daraufhin über Nacht bei 4 Grad Celsius inkubiert. Bei Anfärbung von CXCR4 wurde eine parallele Inkubation mit einem Antikörper gegen den Endothelzellmarker CD 146 (mouse anti-CD 146, Chemicon ) in einer Konzentration von 1:200 durchgeführt.

Antikörper	Verdünnung in Verdünnungspuffer	Inkubationszeit
Biotin gekoppelter Anti-IgG	1:500	30 Min.
Anti-Ratte IgG 488	1:1000	20 Min.
Anti-Maus IgG 568	1:1000	20 Min.

Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper mit Verdünnung und Inkubationszeit

Die Schnitte wurden nach Ablauf der Inkubationszeit für 3 x 5 Minuten in PBS gespült, um nicht gebundenen primären Antikörper abzuwaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper. Zur Anfärbung von eNOS wurde als sekundärer Antikörper ein Biotin-gekoppelter anti-IgG Antikörper (SIGMA) verwendet. Bei Anfärbung von CXCR4

wurden die fluoreszierenden Anti-IgG Sekundärantikörper verwendet (anti-rat IgG 488 und anti-mouse IgG 568 jew. Alexa Fluor, Molecular Probes).

Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten für eNOS und 15 Minuten für CXCR4. Im Anschluss wurde die Schnitte für 2 x 5 Minuten in PBS gespült, um nicht gebunden sekundären Antikörper abzuwaschen. Daraufhin wurden, bei Anfärbung von eNOS, die Schnitte für 20 Minuten mit einem Peroxidase- Reagenz (Immunostaining kit, IMMH-2, SIGMA ) inkubiert.

Im nächsten Schritt wurde ein Substratgemisch hergestellt:

4 ml destil. Wasser, 2 Tropfen Acetatpuffer , 1 Tropfen AEC Chromogen,

1 Tropfen Hydrogenperoxid (gemäß Herstellerangaben für Immunostaining kit, SIGMA).

Die Schnitte wurden im Anschluss mit je einem Tropfen des fertigen Substrats inkubiert. Nach fünfminutiger Inkubation wurde damit begonnen, die Färbung der Schnitte unter einem Mikroskop zu überprüfen. Sobald eine ausreichende Färbung erreicht war, wurden die Schnitte für 5 Minuten in destilliertem Wasser gespült. Danach wurde eine Gegenfärbung der Schnitte für 2 Minuten mit Hematoxylin Blau (Mayer's Hematoxylin, Merck, Deutschland) durchgeführt. Die Schnitte wurden dann mit einem Deckglas bedeckt und luftdicht versiegelt.

Bei Anfärbung von CXCR4 wurden die Schnitte nach Abwaschen der Sekundärantikörper Zur Anfärbung der Kerne für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit Draq 5 (Alexis Biochemicals, Schweiz) inkubiert. Nach anschließendem Waschen erfolgte die Einbettung (FluorsSave™, Calbiochem) und Abdeckung der Schnitte. Als Negativkontrollen wurden, zum Ausschluss unspezifischer Antikörperbindungen, bei jeder Färbereihe 2 Schnitte lediglich mit dem jeweiligen Sekundärantikörper inkubiert, ohne Verwendung des Primärantikörpers.

### 3.6.1.1 Immunhistologische Anfärbung c-kit positiver Knochenmarkstammzellen

C-kit positive Stammzellen wurden für 40 Stunden in RPMI 1640 mit Zusatz von 10% FKS (fetales Kälberserum) inkubiert. Dabei wurde die Zellen entweder ohne weitere Zytokine oder mit SDF-1α (50 ng/ml; R&D Systems) co-inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss auf mit 10 µg/cm<sup>2</sup> Fibronectin (BD Biosciences) bedeckte, gläserne Objektträger gegeben und für weitere 2 Stunden bei 37 Grad Celsius und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit Paraformaldehyd 4% in PBS für 15 Minuten fixiert und im Anschluss mit 0.1% Triton-X in PBS 10 Minuten permeabilisiert. Als nächstes wurden die Zellen mit einem CXCR4 Primärantikörper (anti-mouse CXCR4 polyclonal Ab, Chemicon International, Temecula, California, USA) inkubiert. Danach wurden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen und

anschließend mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper (goat anti-rabbit Alexa 488, Molecular Probes) inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin ein weiters Mal mit PBS gewaschen und abschließend mit Hilfe von FluorSave<sup>TM</sup> (Calbiochem) auf einem Objektträger eingebettet.

### 3.6.2 Auswertung

#### 3.6.2.1 Lichtmikroskopie

Die Auswertung der Immunfärbungen erfolgte mit einem Lichtmikroskop (Biomed; Leitz, Wetzlar, Deutschland). Die gefärbten Gewebsschnitte wurden in 200- und 400facher Vergrößerung unter Verwendung eines elektronischen Bildbearbeitungsprogramms (IC 50) photographiert und gespeichert. Zur Quantifizierung der eNOS Expression im Gefäßendothel wurde eine semiquantitative Bewertung der Färbungsintensität durch einen verblindeten Untersucher vorgenommen.

Es wurde hierzu folgende Intensitätsskala verwendet:

0 = keine Färbung, 1 = schwache Färbung, 2 = mittlere Färbung, 3 = starke Färbung

Für die Quantifizierung wurden die Schnitte aus mindestens 3 verschiedenen Tieren je Versuchsgruppe ausgewertet und anschließend die Mittelwerte gebildet.

#### 3.6.2.2 Konfokale Lasermikroskopie

Zur Detektion von CXCR4 auf der Oberfläche der isolierten c-kit positiven Knochenmarkstammzellen, sowie im Gefäßendothel des M. cremaster wurden die Gewebsschnitte mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops (Leica TCS SP2) am Institut für Immunologie analysiert. Durch Verwendung verschiedener Farbfilter (grün = CXCR4, rot = Endothelzellmarker CD 146, blau = Zellkern) wurden zunächst die gebundenen, unterschiedlich fluoreszierenden Sekundärantikörper selektiv detektiert. Durch anschließende rechnergestützte Addition der Bildinformationen entstanden Gesamtbilder. Auf der Stammzelloberfläche wurden das Vorhandensein sowie das Verteilungsmuster des SDF-1α Rezeptors CXCR4 (rote Fluoreszenz) bewertet.

Die Quantifizierung der CXCR4 Expression auf der endothelialen Zellmembran erfolgte mittels semiquantitativer Bewertung der Signalstärke.

0 = kein Signal, 1 = schwaches Signal, 2 = mittleres Signal, 3 = starkes Signal.

Die Bewertung wurde durch einen verblindeten Untersucher an mindestens 3 Schnittserien je Versuchsgruppe durchgeführt und anschließend die Mittelwerte gebildet.

### 3.7 Versuchsgruppen

Das Homingverhalten der Knochenmarkstammzellen im Sinne des Stammzellrollings und der festen endothelialen Adhäsion wurde zunächst im unbehandelten M. cremaster von Wildtyp-Mäusen untersucht. Um den Einfluss der lokalen Inflammation durch TNF- $\alpha$  in Kombination mit dem Stammzell-Homingfaktor SDF-1 $\alpha$  auf das Homingverhalten zu untersuchen, wurden die Tiere einer zweiten Versuchsgruppe lokal mit TNF- $\alpha$  und SDF-1 $\alpha$  behandelt. Der Einfluss der endothelialen NO-Synthetase auf das Homingverhalten wurde durch zwei weitere Versuchsgruppen untersucht. In diesen Gruppen wurden die Versuche unter den o.g. Bedingungen durchgeführt, wobei in diesen Gruppen Tiere verwendet wurden, die aufgrund eines genetischen Defektes das eNOS Gen nicht exprimieren (eNOS knock-out). Um die Bedeutung der eNOS Funktion für das Homingverhalten von Knochenmarkstammzellen zu untersuchen, wurden in einer weiteren Versuchsgruppe Versuche mit Tieren durchgeführt, in denen vor Versuchsbeginn die endotheliale NOS auf pharmakologischen Weg mittels intraperitonealer Gabe von N-Nitro-L-arginin methyl ester, L-NAME, ein Argininanalogon und NOS Inhibitor, in ihrer Funktion gehemmt wurde.

Versuchsgruppe	Empfänger Tier	Spender Tier	M.cremaster Superfusion	Anzahl Tiere/ Zellinjektionen
Wildtypkontrolle	Wildtyp	Wildtyp	NaCl 0,9%	5/25
Wildtyp-SDF+TNF	Wildtyp	Wildtyp	SDF-1 $\alpha$ +TNF- $\alpha$	5/25
eNOS-kontrolle	eNOS knock-out	Wildtyp	NaCL 0,9%	5/25
eNOS-ko-SDF+TNF	eNOS knock-out	Wildtyp	SDF-1 $\alpha$ +TNF $\alpha$	5/25
Wildtyp-SDF+TNF+L-NAME	Wildtyp	Wildtyp	SDF-1 $\alpha$ +TNF $\alpha$	5/25

Tabelle 4 : Übersicht Versuchsgruppen; L-NAME= N-nitro-L-arginine methyl ester

### 3.8 Versuchsablauf

Nach Präparation des rechten M. cremaster (s.o.) und Darstellung der Mikrozirkulation wurden zunächst sechs postkapilläre Venolen mit einem Durchmesser von 15-80 µm für die spätere Beobachtung der festen endothelialen Adhäsion durch Zufallsauswahl definiert.

In den Versuchsgruppen, die eine Stimulation des M. cremaster mit SDF-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  vorsahen, wurde mit der Superfusion 15 Minuten vor der ersten Zellinjektion begonnen. Hierzu wurde das Muskelgewebe im Abstand von 5 Minuten mit Hilfe von 1 ml Spritzen (Omnifix-F 1ml, Braun, Melsungen, Deutschland) mit gelöstem SDF-1 $\alpha$  (300µl zu 0,2 µg/ml; rmSDF-1 $\alpha$ , RD systems, USA) und TNF- $\alpha$  (3000 U in 200µl; Tumor necrosis factor alpha, SIGMA) benetzt. In den Kontrollgruppen erfolgte die Benetzung des Muskelgewebes in äquivalenter Weise mit 0,9 % Natriumchloridlösung.

In der Versuchsgruppe mit pharmakologischer Inhibition der eNOS erfolgte die intraperitoneale Injektion von L-NAME (N-nitro-l-arginine methyl ester, Calbiochem, Merck, Deutschland), 20 mg/ kg KG in 0,9 % NaCl, 90 Minuten vor der ersten Stammzellinjektion.

Die Stammzellinjektion erfolgte durch 4 - 5 Einzillinjektionen über den in der linken A. femoralis liegenden Katheter. Das „Rolling“ der Stammzellen wurde im direkten Anschluss an jede Injektion beobachtet. „Rolling“ war hierbei definiert als Geschwindigkeitsverlust der Stammzelle im Blutstrom von mehr als 50% im Vergleich zu der Geschwindigkeit der Gefäßmitte, kombiniert mit typischen, in kurzem Abstand aufeinander folgenden Adhäsionsphasen an der endothelialen Wand. Die Fraktion von an der Gefäßwand rollenden Stammzellen wurde quantifiziert, indem zunächst ein definierter Gefäßabschnitt für 1 Minute beobachtet und die rollenden Stammzellen in diesem Abschnitt gezählt wurden. Diese Zahl wurde dann als Prozentsatz aller Stammzellen, die denn Gefäßabschnitt während einer Minute passierten, ausgedrückt. Dieser Prozentsatz entsprach der Fraktion von an der Gefäßwand rollender markierter Stammzellen (in Prozent aller passierender Stammzellen).

Die Fraktion von fest an der Gefäßwand haftenden (fest adhärenten) markierten Stammzellen wurde 45 Minuten nach der ersten Zellinjektion bestimmt. Hierzu wurden die zu Beginn definierten postkapillären Venolen der Reihe nach beobachtet. Eine Stammzelle wurde als fest adhären gewertet, wenn für 30 Sekunden keine Bewegung der Stammzelle registriert wurde. Diese Definition ist schon länger für die Analyse der endothelialen Adhärenz endogener Leukozyten etabliert [75]. Stammzellen, die im kapillären Stromgebiet des M. Cremaster im Sinne eines sog. „Sludge“ Phänomens feststeckten, wurden hier nicht berücksichtigt. Die Fraktion der fest an der Gefäßwand haftenden markierten Stammzellen entsprach der Zellzahl pro mm<sup>2</sup> Endotheloberfläche.

Die Oberfläche errechnete sich hierbei nach folgender Formel:

$$O = D \times l \times \pi$$

O = Endotheloberfläche, D = Gefäßdurchmesser, l = Gefäßlänge,  $\pi$  = Kreiskonstante

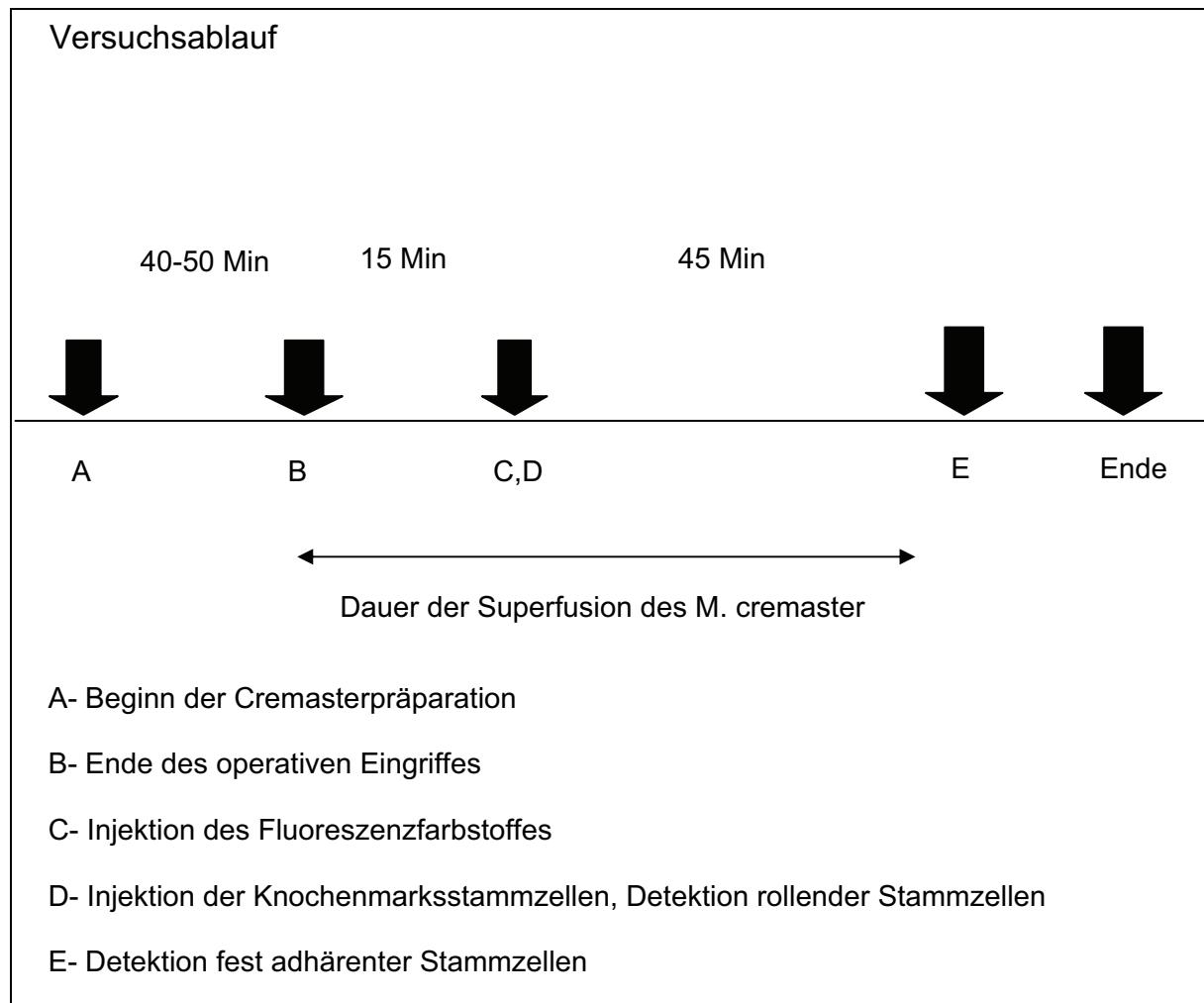


Abb. 3 Darstellung des Ablaufs der intravitalmikroskopischen Untersuchungen des Muskulus cremaster.

### 3.9 Auswertung und Statistik

Die Bestimmung der hämodynamischen Parameter (Gefäßlänge, und Gefäßdurchmesser, Blutflussgeschwindigkeit, Scherkraft) sowie die Bestimmung der rollenden und fest adhärenen Stammzellfraktion wurde offline mit Hilfe eines computergestützten Bildanalysesystems (CapImage; Zeintl, Heidelberg, Deutschland) des Instituts für

Experimentelle Chirurgie durchgeführt. Die vaskuläre Scherkraft wurde nach der Definition von Newtonian,  $\gamma = 8x(V \cdot D^{-1})s^{-1}$ , berechnet [76], wobei „V“ der mittleren Blutflussgeschwindigkeit dividiert durch 1,6 (Bayker-Wayland Faktor) entspricht, und „D“ für den Gefäßdurchmesser steht.

Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Die statistische Analyse der Versuchsergebnisse erfolgte mittels einseitiger Varianzanalyse (ANOVA) bzw. mittels des Kruskal-Wallis Test zur einseitigen Varianzanalyse nach Rängen und anschließender post-hoc Vergleichstestung (Verfahren nach Dunn). Ein  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant erachtet.

Die statistischen Analysen und die graphische Darstellungen wurden mit Hilfe des Softwarepaketes SigmaStat, SigmaPlot Version für Windows 3.0, SPSS Inc. durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der Isolation von c-kit+ Zellen aus dem Knochenmark der Maus

Die durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchungen zur Quantifizierung des Reinheitsgrades des Isolationsproduktes nach MACS Isolation ergaben für c-kit+ Zellen konstant einen Reinheitsgrad von über 95%. Abbildung 4 stellt ein repräsentatives Ergebnis der durchgeführten Analysen dar. Die grün unterlegte Kurve repräsentiert dabei die Bindung des spezifischen anti-CD 117 (c-kit) Antikörpers. Die blau unterlegte Kurve steht für die Bindungen des korrespondierenden Immunglobulin Isotyps (Iso IgG1 PE), der als Kontrolle zum Ausschluss unspezifischer Bindungen verwendet wurde. Es zeigt sich eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität bei Verwendung des anti-CD 117 Antikörpers im Vergleich zur Kontrolle.

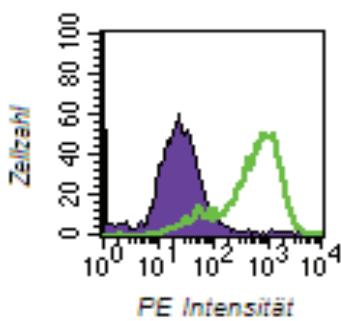


Abb 4: Ergebnis der Durchflußzytometrie zur Bestimmung des Reinheitsgrades der isolierten c-kit+ Knochenmarkstammzellen. Auf der x-Achse ist die Intensität der gemessenen Phycoerythrinfluoreszenz (PE) logarithmisch dargestellt. Auf der y-Achse ist die Zellzahl dargestellt. Anti- CD 117 = grüne Kurve, Isotypenkontrolle = violette Kurve.

#### 4.2 Erhobene hämodynamische Parameter in postkapillären Venolen des M. cremaster der Maus

Die zu Beginn des Versuches, erhobenen hämodynamischen Parameter ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Der p-Wert betrug im Ergebnis der statistischen Analyse (ANOVA) für den Gefäßdurchmesser  $p = 0,26$ , für die Gefäßlänge  $p = 0,78$ , für die Flussgeschwindigkeit  $p = 0,11$  sowie für die vaskuläre Scherkraft  $p = 0,25$  (Tabelle 2).

Versuchsgruppen	Gefäßdurchmesser ( $\mu\text{m}$ )	Gefäßlänge ( $\mu\text{m}$ )	Blutfluss-Geschwindigkeit (mm/s)	Scherkraft ( $\text{s}^{-1}$ )
Wildtyp-Kontrolle	$60,40 \pm 8,44$	$630 \pm 91$	$0,662 \pm 0,112$	$60,57 \pm 7,55$
Wildtyp-SDF-1 $\alpha$ +TNF- $\alpha$	$47,27 \pm 3,86$	$521 \pm 158$	$1,032 \pm 0,252$	$94,01 \pm 17,13$
eNOS ko-Kontrolle	$65,55 \pm 10,42$	$639 \pm 107$	$0,748 \pm 0,183$	$48,30 \pm 14,26$
eNOS ko-SDF-1 $\alpha$ +TNF- $\alpha$	$53,2 \pm 5,64$	$630 \pm 107$	$0,584 \pm 0,107$	$53,52 \pm 6,89$
Wildtyp-SDF-1 $\alpha$ +TNF- $\alpha$ +L-NAME	$47,42 \pm 3,74$	$492 \pm 9$	$0,805 \pm 0,201$	$67,81 \pm 19,18$

Tabelle 5: Erhobene hämodynamische Parameter im Bereich der postkapillären Venolen im M. cremaster. Aufgeführt sind die Mittelwerte +/- Standardfehler des Mittelwertes.

Die Quantifizierung des Anteils rollender Knochenmarkstammzellen sowie der Anzahl fest adhäranter Stammzellen erfolgte mit Hilfe der Videoaufzeichnungen der intravitalmikroskopischen Versuche. In der folgenden repräsentativen Bildsequenz A – F der intravitalen Mikroskopie des präparierten M. cremaster sind zur Veranschaulichung des Bildmaterials jeweils eine rollende Stammzelle (schwarze Pfeilspitze) und eine fest an der Wand einer Venole haftende Stammzelle (weißer Pfeil) dargestellt. Die Stammzellen wurden jeweils mit CFSE markiert, die Gefäßdarstellung erfolgte mit Rhodamin Dextran.

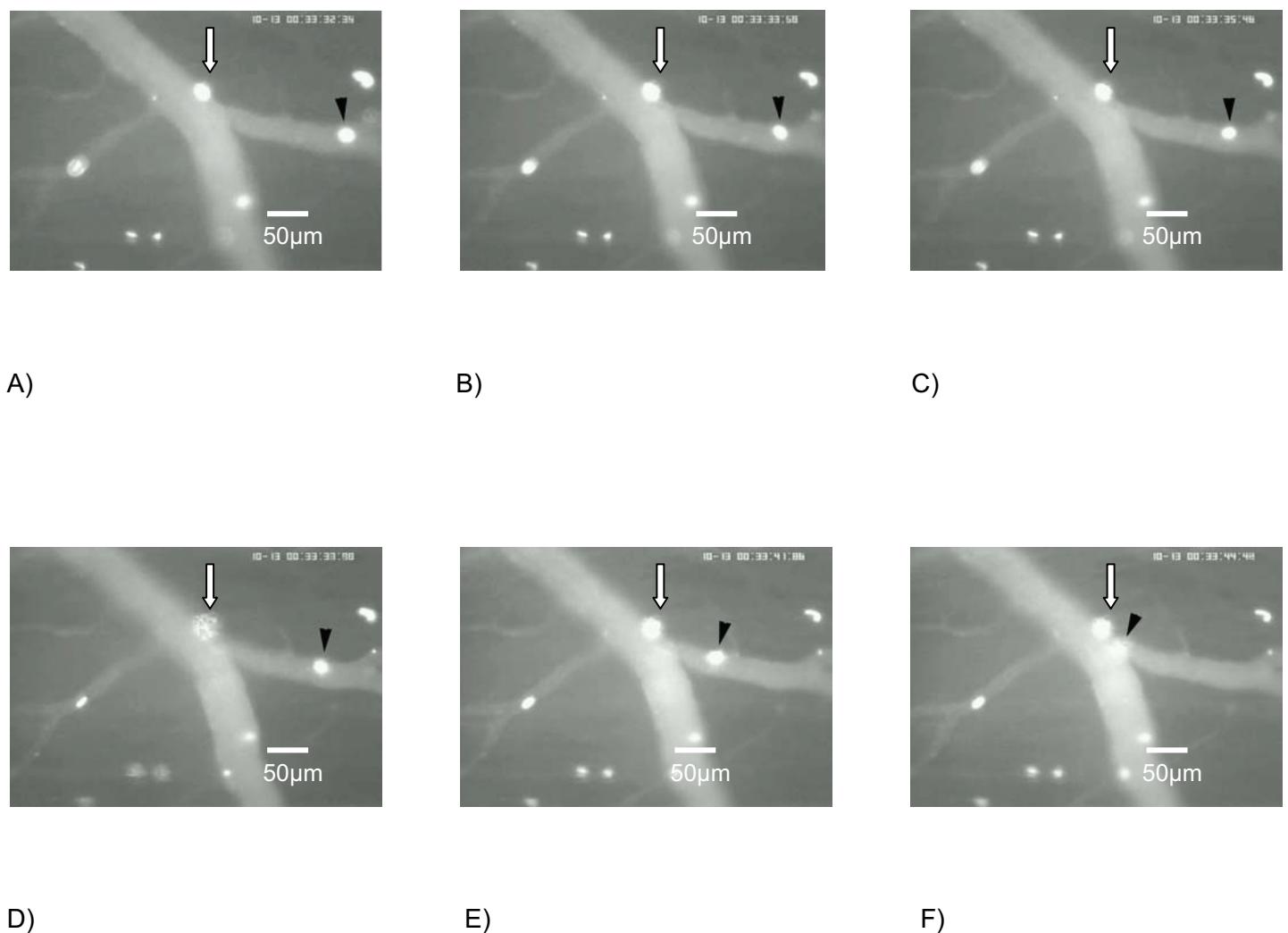


Abb. 5 Repräsentative Bildsequenz, A) bis F), zur Darstellung rollender (schwarze Pfeilspitze) und fest adhärenter (weißer Pfeil) Knochenmarkstammzellen im Gefäßsystem des M. cremaster der Maus.

## 4.3 Homingverhalten von Knochenmarkstammzellen im unbehandelten M. cremaster

### 4.3.1 Rolling

Interaktionen zwischen Knochenmarkstammzellen und dem Gefäßendothel waren in unbehandelten Wildtyp-Tieren insgesamt eher selten und fanden sich nur in postkapillären Venolen des untersuchten Gefäßsystems des M. cremaster. Der Anteil rollender Stammzellen nach akuter arterieller Injektion betrug in den unbehandelten Wildtyp-Tieren (wt-Kontrolle)  $6 \pm 2\%$  (Abb. 6)

### 4.3.2 Feste Adhärenz

Die Anzahl der fest an der Gefäßwand haftenden Knochenmarkstammzellen wurde 45 min nach der ersten Injektion bestimmt. In den unbehandelten Wildtyp-Tieren betrug die Anzahl fest adhärenter Zellen  $6 \pm 3$  Zellen/mm<sup>2</sup> (wt-kontrolle) (Abb. 7).

## 4.4 Homingverhalten von Knochenmarkstammzellen im M. cremaster nach lokaler Applikation von SDF-1α und TNF-α.

### 4.4.1 Rolling

Nach lokaler Applikation von SDF-1α +TNFα wurde in den Wildtyp Mäusen ein Anstieg des Anteils rollender Stammzellen auf  $12 \pm 1,3\%$  beobachtet (Abb. 6). Dieser Anteil war im Vergleich zu unbehandeltem Gewebe erhöht, der Anstieg war mit  $p>0,05$  jedoch nicht statistisch signifikant.

### 4.4.2 Feste Adhärenz

Nach Exposition mit SDF-1α und TNF-a zeigte sich in den Wildtyp Tieren ein deutlich signifikanter Anstieg der Zahl fest adhärenter Knochenmarkstammzellen,  $40+/-11$  Zellen/mm<sup>2</sup>, welche die Zahl in den unbehandelten Tieren um mehr als das Vierzehnfache

übertrifft (  $40 \pm 11$  Zellen/ $\text{mm}^2$  in „wt-SDF-1+TNF“ vs.  $3 \pm 1$  Zellen/ $\text{mm}^2$  in „wt-kontrolle“,  $p < 0.05$ ) (Abb. 7).

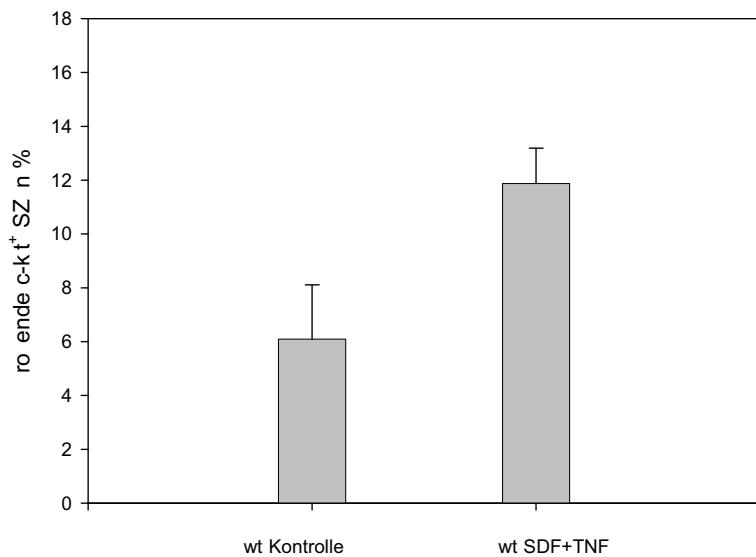


Abb.6 Quantitative Analyse der Interaktionen zwischen c-kit<sup>+</sup> Knochenmarkstammzellen (SZ) und Endothelzellen basierend auf intravitalmikroskopischem Bildmaterial. Zahl rollender Stammzellen am venolären Gefäßendothel (dargestellt als prozentualer Anteil aller passierender Zellen) im M. cremaster der Maus nach Superfusion mit SDF-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  im Vergleich zur Injektion von c-kit<sup>+</sup> Zellen ohne Behandlung (Kontrolle).

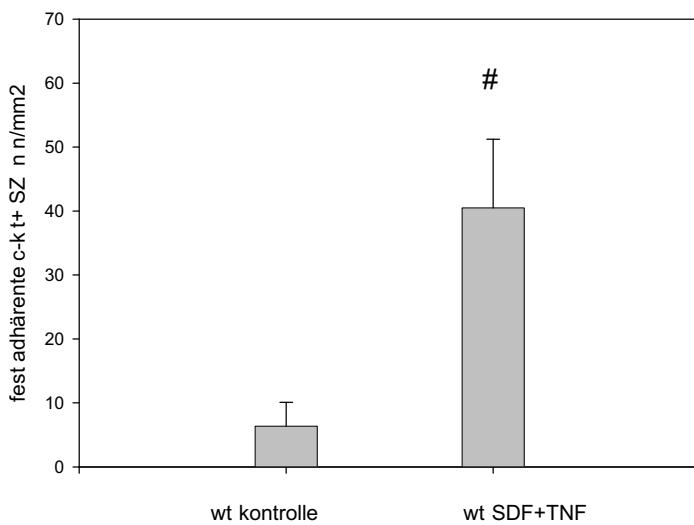
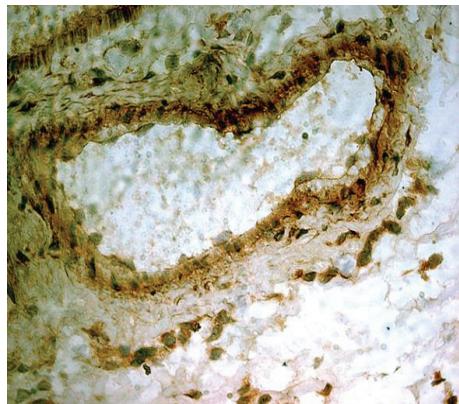


Abb.7 Quantitative Analyse der Interaktionen zwischen c-kit+ Knochenmarkstammzellen (SZ) und Endothelzellen basierend auf intravitalmikroskopischem Bildmaterial. Zahl fest adhärenter Stammzellen am venolären Gefäßendothel (dargestellt als Zellen (n) je mm<sup>2</sup>) im M. cremaster der Maus nach Superfusion mit SDF-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  im Vergleich zur Injektion von c-kit+ Zellen ohne Behandlung (wt-kontrolle). # p<0,05 vs. wt-kontrolle

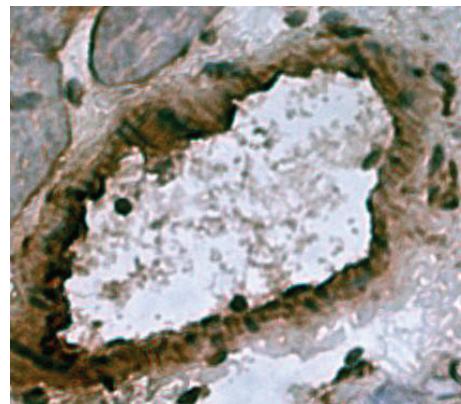
#### 4.5 Expression der endothelialen NO-Synthase im M.cremaster

Die semiquantitative Analyse der eNOS Expression ergab eine mäßige, jedoch nicht signifikante Erhöhung der eNOS Expression im venolären Gefäßendothel des M. cremaster nach 60minütiger Superfusion des Muskels mit SDF-1 $\alpha$  + TNF $\alpha$  im Vergleich zur Expression im mit physiologischer Natriumchloridlösung behandelten Muskel (Abb. 7).

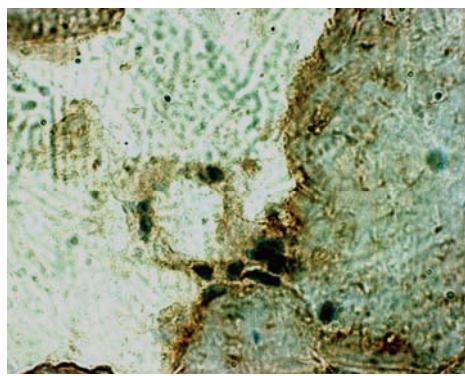
Es ergaben sich auf einer Intensitätsskala der Anfärbung von 0-3 Werte von  $2,5 \pm 0,3$  für die Gruppe mit SDF-1 $\alpha$  + TNF $\alpha$  Superfusion und  $1,7 \pm 0,2$  für die Kontrollgruppe mit NaCl Superfusion (Abb. 8 u. 9).



A)



B)



C)

Abb.8 Immunhistologische Anfärbung von eNOS Protein (rot-braun) im Gefäßendothel postkapillärer Venolen im M. cremaster. A) Wildtyp Kontrolle, B) Wildtyp SDF-1 $\alpha$ +TNF- $\alpha$ , C) Negativ Kontrolle. Repräsentative lichtmikroskopische Bilder der einzelnen Gruppen. Vergrößerung 200fach.

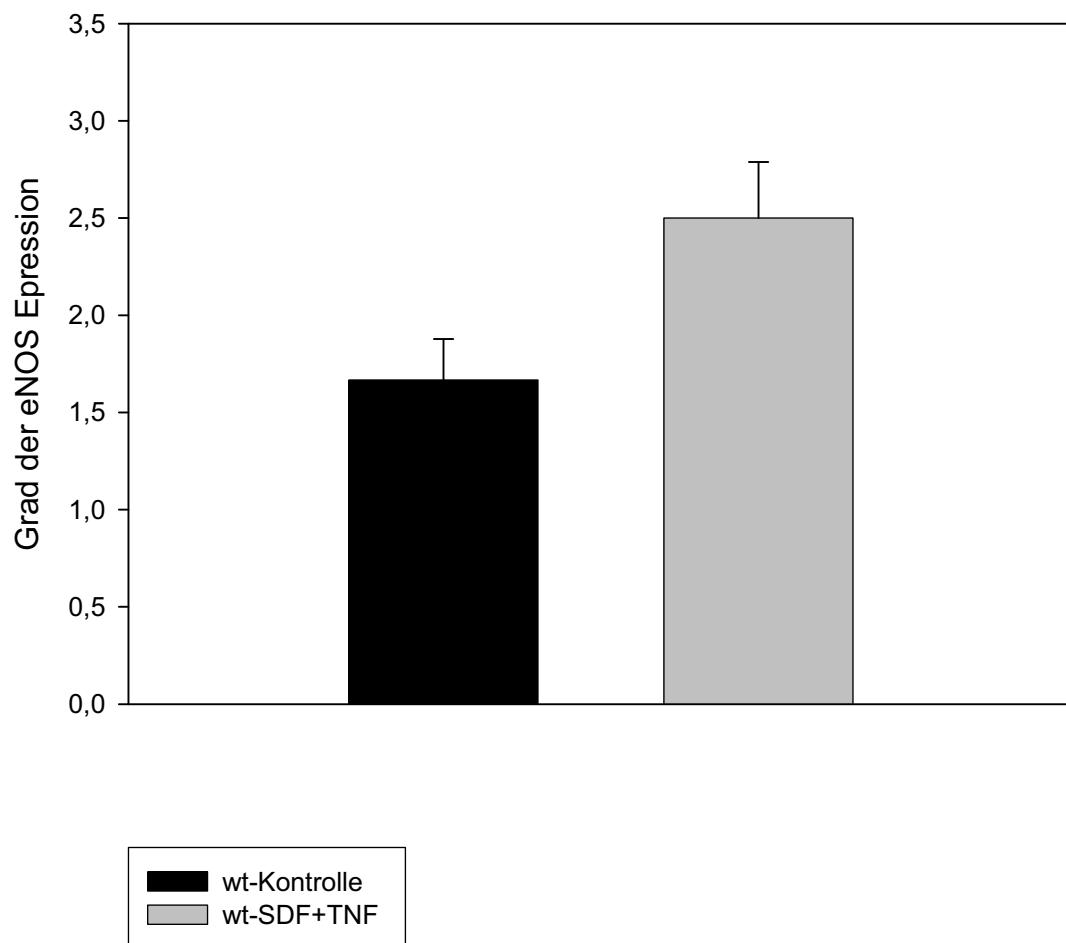


Abb.9 Immunhistologisch ermittelter, semiquantitativer Grad der eNOS Expression im Gefäßendothel postkapillärer Venolen des M.cremaster.

4.6 Homingverhalten von Knochenmarkstammzellen bei fehlender Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS knock-out)

#### 4.6.1 Rolling

Bei fehlender eNOS Expression betrug der Anteil rollender Stammzellen in unbehandelten eNOS-knock-out Tieren (enos-ko kontrolle)  $5 \pm 4\%$ . Dieser Anteil zeigte keinen signifikanten Unterschied zu der Gruppe un behandelter Wildtyp-Tiere. Nach lokaler Applikation von SDF-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  fand sich in den eNOS knock-out Tieren (enos-ko SDF+TNF) im Gegensatz zu entsprechend behandelten Wildtyp-Tiere keine Steigerung des Anteils rollender

Stammzellen ( $5 \pm 2\%$  in „enos-ko SDF+TNF“ vs.  $12 \pm 1,3\%$  in „wt-SDF+TNF“,  $p<0,05$ ) (Abb. 10).

#### 4.6.2 Feste Adhärenz

Stabile Interaktionen der injizierten Stammzellen mit dem Endothel waren bei fehlender eNOS Expression kaum zu beobachten. Die starke Induktion der festen Adhärenz durch SDF-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  fand sich bei fehlender eNOS Expression nicht. Die Zahl fest adhärenter Stammzellen betrug in den unbehandelten eNOS knock-out Tieren (eNOS ko kontrolle)  $0,4 \pm 0,4$  Zellen/mm $^2$ . Nach lokaler Applikation fand sich in den eNOS knock-out Tieren im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren kein signifikanter Anstieg dieser Zahl ( $40 \pm 11$  Zellen/mm $^2$  in „wt-SDF+TNF“ vs.  $1 \pm 0,5$  Zellen/mm $^2$  in „eNOS-ko + SDF+TNF“,  $p<0,05$ ) (Abb. 11).

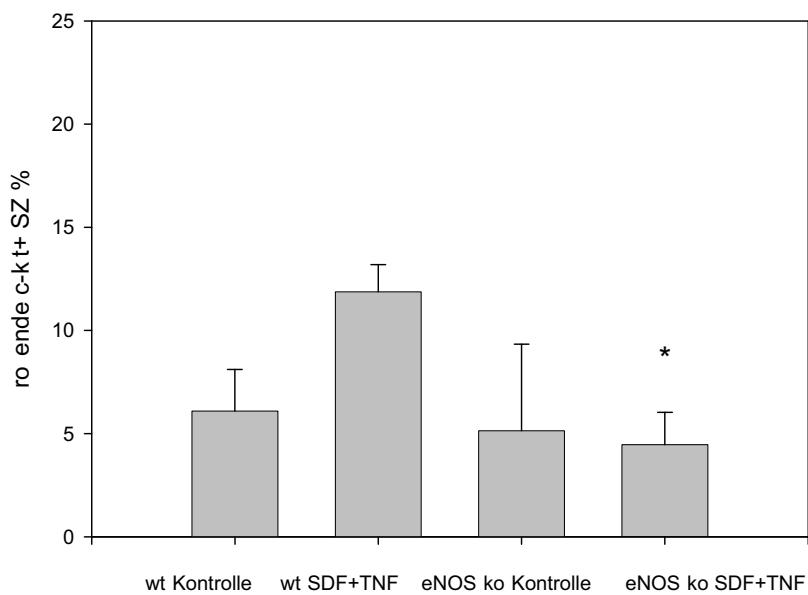


Abb.10 Quantitative Analyse der Interaktionen zwischen c-kit+ Knochenmarkstammzellen (SZ) und Endothelzellen basierend auf intravitalmikroskopischem Bildmaterial. Zahl rollender Stammzellen am venolären Gefäßendothel (dargestellt als prozentualer Anteil aller passierender Zellen) im M. cremaster von mit SDF-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  behandelten bzw. unbehandelten (wt-kontrolle) im Vergleich zu entsprechend behandelten eNOS knock-out Tieren. \* $p<0,05$  vs. wt-SDF+TNF

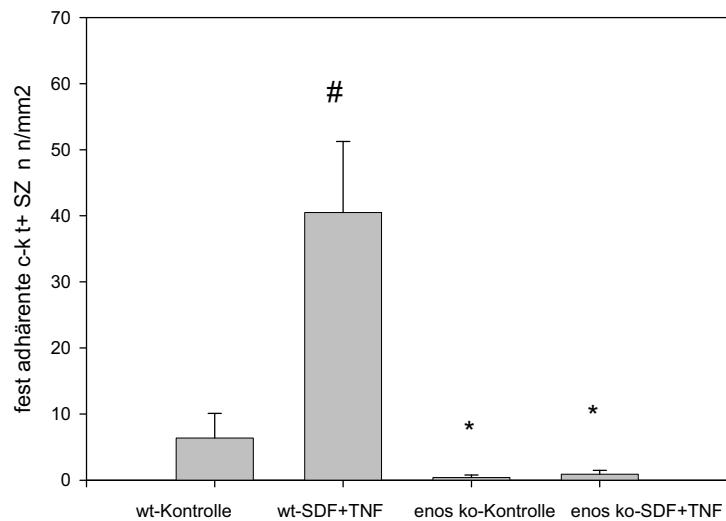


Abb.11 Quantitative Analyse der Interaktionen zwischen c-kit+ Knochenmarkstammzellen und Endothelzellen basierend auf intravitalmikroskopischem Bildmaterial. Zahl fest adhärenter Stammzellen am venolären Gefäßendothel (dargestellt als Zellen (n) je mm<sup>2</sup>) im M. cremaster der Maus in mit SDF-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  behandelten bzw. unbehandelten Wildtyp-Tieren im Vergleich zu entsprechend behandelten eNOS knock-out (enos-ko) Tieren. #p<0,05 vs. wt-kontrolle \*p<0,05 vs. wt-SDF+TNF

#### 4.7 Homingverhalten von Knochenmarkstammzellen nach funktioneller Inhibition der endothelialen NO-Synthase

##### 4.7.1 Rolling

Die Ergebnisse aus den knock-out Versuchen konnte durch die Gabe von L-NAME zur systemischen Antagonisierung der NO-Synthasen in Wildtyp-Tieren reproduziert werden. Denn bei vorheriger intraperitonealer Gabe von L-NAME war der Anteil rollender Stammzellen nach Applikation von SDF-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  (wt-SDF+TNF+L-NAME) signifikant niedriger als in entsprechend behandelten Wildtyp-Tieren ( $5,6 \pm 1\%$  in „wt-SDF+TNF+L-NAME“ vs.  $12 \pm 1,3\%$  in „wt-SDF+TNF“, p<0,05) (Abb. 12).

#### 4.7.2 Feste Adhärenz

Auch die feste Adhärenz der injizierten Stammzellen wurde durch systemische Antagonisierung der NO-Synthasen in analoger Weise zum eNOS knock-out beeinflusst. Die Induktion der Adhäsion durch SDF-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  fehlte vollständig. Die Zahl fest adhärenter Stammzellen war nach vorheriger Gabe von L-NAME signifikant niedriger als in entsprechend behandelten Wildtyp-Tieren ( $1,5 \pm 0,7$  Zellen/mm $^2$  in „wt-SDF+TNF+L-NAME“ vs.  $40 \pm 11$  Zellen/mm $^2$  in „wt-SDF+TNF“,  $p<0.05$ ) (Abb. 13).

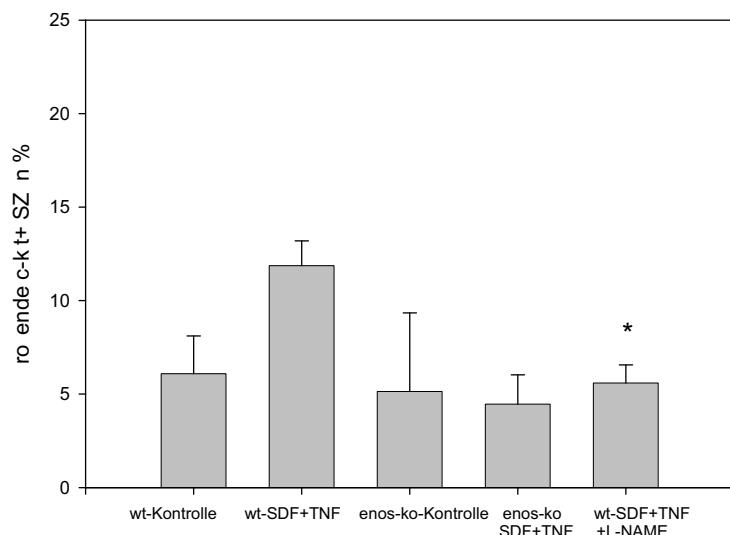


Abb.12 Quantitative Analyse der Interaktionen zwischen c-kit $^{+}$  Knochenmarkstammzellen (SZ) und Endothelzellen basierend auf intravitalmikroskopischem Bildmaterial. Anteil rollender Stammzellen am venolären Gefäßendothel (dargestellt als prozentualer Anteil aller passierender Zellen) im M. cremaster in mit SDF-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  behandelten (wt-SDF+TNF) bzw. unbehandelten (wt-kontrolle) Tieren im Vergleich zu entsprechend behandelten eNOS knock-out (enos-ko Tieren, sowie Wildtyp-Tieren mit vorangegangener funktioneller NOS Inhibition (wt-SDF+TNF+L-NAME). \* $p<0,05$  vs. wt-SDF+TNF

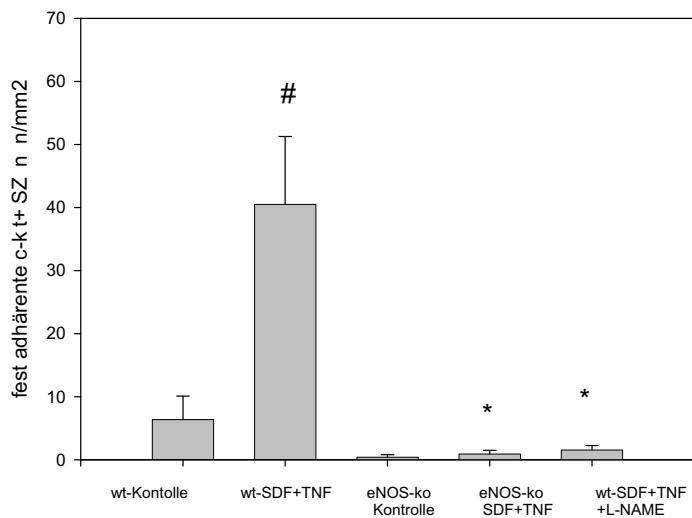


Abb.13 Quantitative Analyse der Interaktionen zwischen c-kit+ Knochenmarkstammzellen (SZ) und Endothelzellen basierend auf intravitalmikroskopischem Bildmaterial. Zahl fest adhärenter Stammzellen am venolären Gefäßendothel (dargestellt als Zellen (n) je mm<sup>2</sup>) im M. cremaster der Maus in mit SDF-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  behandelten bzw. unbehandelten Wildtyp-Tieren im Vergleich zu entsprechend behandelten eNOS knock-out (enos-ko) Tieren sowie Wildtyp-Tieren nach vorangegangener funktioneller NOS Inhibition (wt-SDF+TNF+L-NAME). # p<0,05 vs wt-kontrl.  
\*p<0,05 vs. wt-SDF+TNF



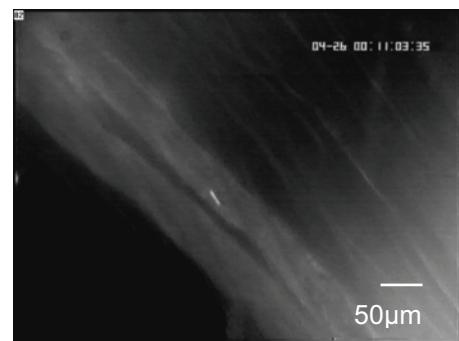
Abb.14 Intravitalmikroskopische Darstellung der postkapillären Venolen im Gefäßsystem des M. cremaster 45 min nach Stammzellinjektion. Repräsentative Aufnahmen, Vergrößerung 200fach. A) Wildtyp Kontrolle, B) wildtyp SDF-1  $\alpha$ + TNF- $\alpha$



A)

B)

Abb.15 Intravitalmikroskopische Darstellung postkapillärer Venolen im Gefäßsystem des M. cremaster 45 min nach Stammzellinjektion. Repräsentative Aufnahmen, Vergrößerung 200fach. A) eNOS knock-out kontrolle, B) eNOS knock-out SDF-1  $\alpha$  + TNF- $\alpha$



A)

Abb.16 Intravitalmikroskopische Darstellung postkapillärer Venole und Arteriole. Im Gefäßsystem des M. cremaster 45 min nach Stammzellinjektion. Repräsentative Aufnahme, Vergrößerung 200fach. A) wildtyp SDF-1  $\alpha$  + TNF- $\alpha$  + L-NAME

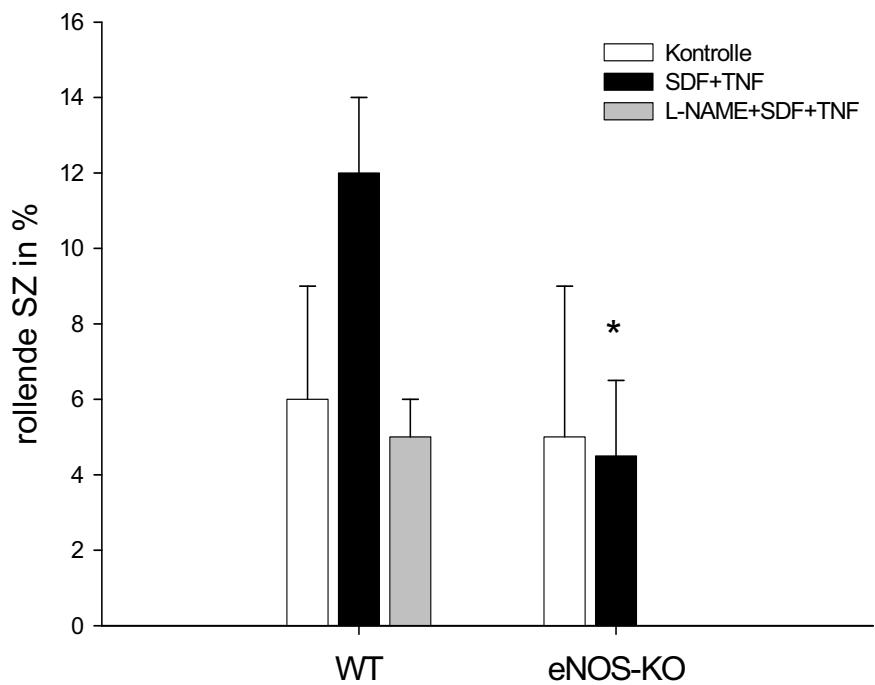


Abb.17 Zusammenfassung: Anteil rollender Knochenmarkstammzellen (SZ) (dargestellt als prozentualer Anteil aller passierenden Zellen) in mit SDF-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  behandelten bzw. unbehandelten (Kontrolle) Tieren im zusammenfassenden Vergleich zwischen Wildtyp-Tieren (WT) und eNOS knock-out Tieren. In der Gruppe der Wildtyp-Tiere wurde zusätzlich eine funktionelle NO-Blockade mit L-NAME durchgeführt (L-NAME+SDF+TNF). \* p<0,05 vs. WT-SDF+TNF

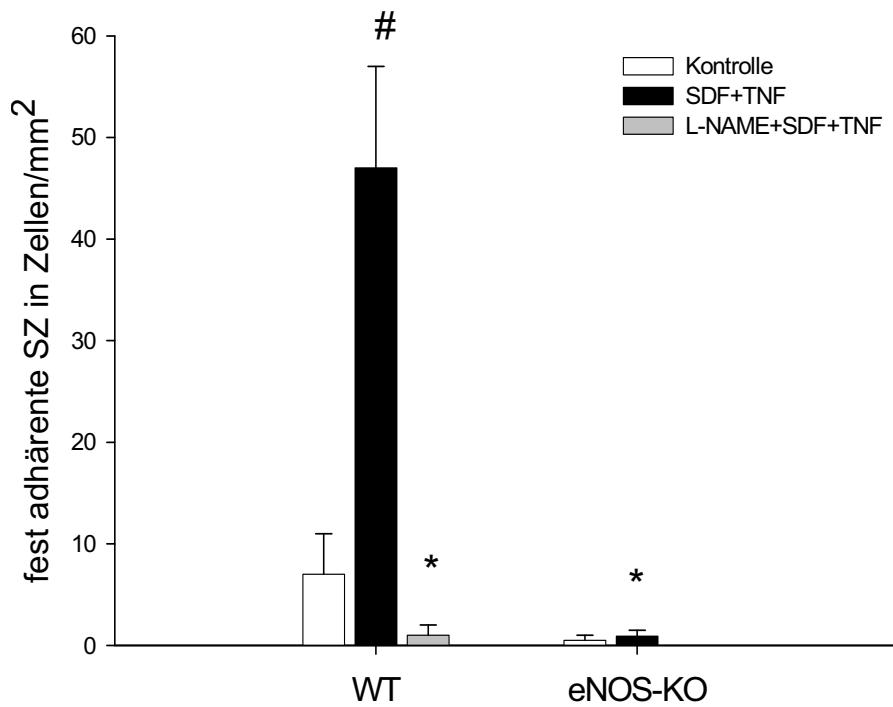
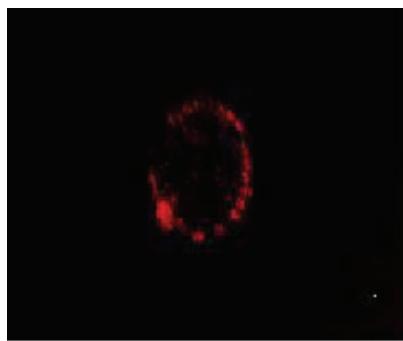


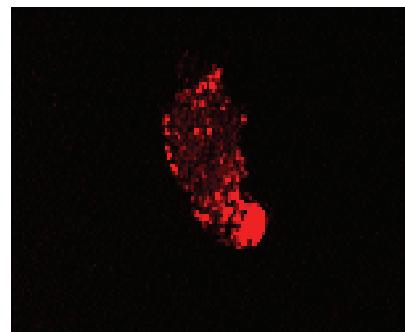
Abb.18 Zusammenfassung: Anzahl fest adhärenter Knochenmarkstammzellen (dargestellt als Zellen/mm<sup>2</sup>) in mit SDF-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  behandelten bzw. unbehandelten Tieren im zusammenfassenden Vergleich zwischen Wildtyp-Tieren und eNOS knock-out Tieren. In der Gruppe der Wildtyp-Tiere wurde zusätzlich eine funktionelle NO Blockade mit L-NAME durchgeführt (L-NAME+SDF+TNF). \* p<0,05 vs. WT-SDF+TNF, # p<0,05 vs. WT- Kontrolle

#### 4.8 Expression des SDF-1 $\alpha$ Rezeptors CXCR4 auf der Stammzelloberfläche

Sowohl unbehandelte, als auch mit SDF-1 $\alpha$  co-inkubierte, c-kit positive Stammzellen wiesen eine stabile Expression des SDF-1 $\alpha$  Rezeptors CXCR4 auf. Die unbehandelten c-kit positiven Stammzellen zeigten eine homogene Expression von CXCR4 auf der Zelloberfläche. Für die Stammzellen, die mit SDF-1 $\alpha$  co-inkubiert worden waren, fand sich eine Konzentration von CXCR4 am Zellpol (Abb.19).



A)

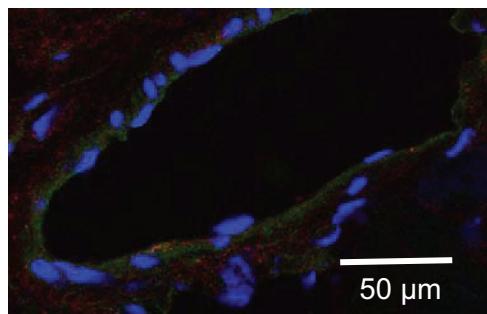


B)

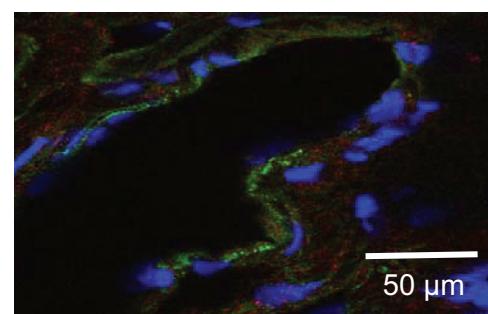
Abb. 19 Confokale Lasermikroskopie nach immunhistologischer CXCR4 (rote Fluoreszenz) Färbung. A) unbehandelte c-kit+ Stammzelle, B) SDF-1 $\alpha$  co-inkubierte c-kit+ Stammzelle. 100fache Vergrößerung

#### 4.9 Expression des SDF-1 $\alpha$ Rezeptors CXCR4 im Gefäßendothel

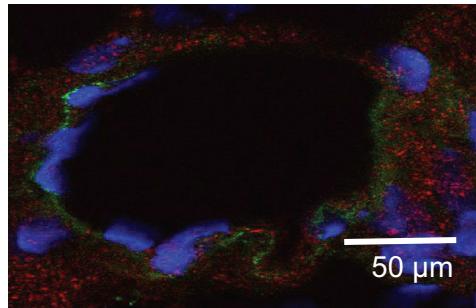
In den unbehandelten Wildtyp-Tieren fand sich in der Auswertung durch konfokale Lasermikroskopie im Bereich des Gefäßendothels nur ein schwaches Signal für den SDF-1 $\alpha$  Rezeptor CXCR4 (Abb.20 A) Dagegen zeigten die lokal mit SDF-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  behandelten Tiere ein deutlich positives Signal für CXCR4 (Abb.20 B). In den Tieren, die nur mit TNF- $\alpha$  behandelt wurden (Abb. 20 C), war diese Signalverstärkung nicht so deutlich wie in den mit SDF-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  behandelten. Es ergaben sich nach semiquantitativer Auswertung der Signalstärken auf einer Skala von 0-3 Werte von  $0,4 \pm 0,2$  (Kontrolle),  $1,0 \pm 0,3$  (SDF-1 $\alpha$ +TNF- $\alpha$ )  $0,6 \pm 0,2$  (TNF- $\alpha$ ),  $p > 0,05$  (Abb. 21).



A)



B)



C)

Abb. 20 Konfokale Lasermikroskopie postkapillärer Venolen des M. cremaster. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für die einzelnen Versuchsgruppen. A) Wildtyp Kontrolle, B) wildtyp SDF-1  $\alpha$  +TNF- $\alpha$ , C) wildtyp+TNF- $\alpha$ . blaues Signal= Zellkern, rotes Signal= Endothelzellmarker CD 146, hell grünes Signal= SDF-1  $\alpha$  Rezeptor CXCR4 (CD 184).

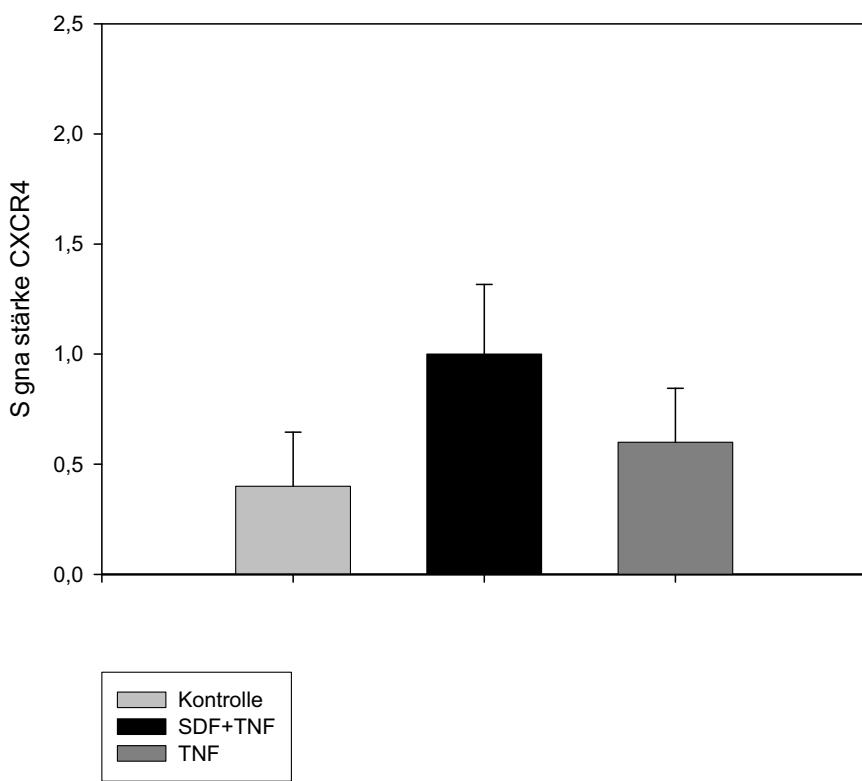


Abb. 21 Aus konfokaler Lasermikroskopie semiquantitativ ermittelte Signalstärke für die Expression des SDF-1  $\alpha$  Rezeptors CXCR4 (CD184) im Gefäßendothel postkapillärer Venolen des M. cremaster.

## 5 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Stammzellhomigs in extramedullärem Gewebe *in vivo* anhand intravitaler Mikroskopie des M. cremaster in der Maus. Insbesondere sollten der Einfluss von SDF-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$ , sowie der endothelialen NO-Synthase auf die Interaktion von c-kit+ Knochenmarkstammzellen und Gefäßendothelzellen *in vivo* analysiert werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Kombination aus dem Homingfaktor SDF-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  relevante Interaktionen von Knochenmarkstammzellen mit knochenmarksfernem Gefäßendothel vermittelt. Des Weiteren

stellte sich heraus, dass der Expression und Funktion der endothelialen NO-Synthase eine Schlüsselrolle bei der peripheren Stammzelladhäsion zukommt.

Für das Knochenmark konnte bereits das Zusammenspiel endothelialer Selektine und Integrine mit stammzellseitigen Adhäsionsmolekülen als Voraussetzung für die stabile Interaktion zwischen Stammzellen und Endothelzellen identifiziert werden [77]. Auch die an dieser Interaktion beteiligten intrazellulären Signalprozesse sind bereits in Ansätzen aufgeklärt [78, 79].

Erfolgreiches Homing von Stammzellen ins Zielgewebe setzt eine Interaktion der zirkulierenden Zellen mit dem Gefäßendothel in den postkapillären Venolen des Zielgewebes voraus. Diese stabile Interaktion mit dem Gefäßendothel und das konsekutive Homing von c-kit+ Knochenmarkstammzellen in ein spezifisches Zielgewebe, erfordern verschiedene lokale Faktoren [31, 80].

## 5.1 Versuchsmodell

Anhand des gewählten Versuchsmodells war es möglich, die Interaktionen von Stammzellen und Endothelzellen im M. cremaster *in vivo* zu beobachten, und spezifische Interaktionen im Sinne der festen endothelialen Adhärenz von frühen, möglicherweise weniger zielgerichteten Interaktionen wie dem „Rolling“ abzugrenzen. Das M. Cremaster Versuchsmodell ist besonders praktikabel, da das Gewebe durch einfache Superfusionstechniken selektiv und lokal mit verschiedenen chemischen Komponenten behandelt werden kann. So ist das Modell schon seit längerem für die Analyse des *in vivo* Verhaltens von Leukozyten etabliert[81]. Durch die direkte arterielle Injektion der Knochenmarkstammzellen über die kontralaterale A. femoralis bzw. A. iliaca war es möglich die Interaktion der Stammzellen mit den Endothelzellen noch vor stattgehabter Rezirkulation im Gesamtorganismus zu beobachten, wie dies bei einer venösen Injektion der Fall gewesen wäre. Ein möglicher Verlust von Zellen im Zuge der venösen Zirkulation konnte so vermieden werden. Das Versuchsmodell kommt damit dem Ansatz klinischer Therapieprotokolle, die eine selektive intravaskuläre Applikation von Knochenmarkstammzellen vorsehen (z. B. in die Koronararterien), näher als eine venöse Injektion. Gerade bei Therapieansätzen, die Stammzellen intravaskulär applizieren, scheint das Ausmaß der Stammzell-Endothel-Interaktion ein entscheidender, möglicherweise limitierender Faktor für den Therapieerfolg zu sein.

## 5.2 Homingverhalten von Knochenmarkstammzellen im unbehandelten M. cremaster in vivo

Im unbehandeltem M. cremaster in Wildtyp-Tieren fand sich nach Injektion von c-kit+ Knochenmarkstammzellen nur ein geringer Anteil rollender Zellen. Ebenso fanden sich nach 45 Minuten nur wenige vereinzelte Zellen, die eine stabile Interaktion mit dem Endothel im Sinne einer festen Adhärenz zeigten. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es auch bei einer physiologischen, „nicht-entzündlichen“ Gewebssituation zu einem gewissen Anteil von Interaktionen zwischen injizierten Knochenmarkstammzellen und Gefäßendothelzellen kommt. Jedoch ist die Zahl der fest adhärenten Zellen sehr gering. Studien mit endogenen Leukozyten zeigen bis zu 10fach höhere Zahlen für rollende bzw. fest adhärente Zellen [81]. Diese Werte waren stabil und konnten in mehreren Studien innerhalb der Arbeitsgruppe so nachvollzogen werden. Im weiteren Verlauf dienten diese Werte als Vergleichs- bzw. Kontrollwerte. Denn obwohl zahlreiche Studien zum Adhäsionsverhalten von endogenen Leukozyten in knochenmarksfernen Organen existieren [82, 83], gibt es nur wenige Berichte über periphere Stammzell-Endothelinteraktionen in vivo [84]. Ursache für das geringe periphere Homing von Knochenmarkstammzellen bei „nicht-entzündlicher“ Gewebssituation dürfte die Tatsache sein, dass SDF-1 $\alpha$  als zentraler Mediator des Stammzellhomings in nicht-geschädigten knochenmarksfernen Organen nur in geringem Maße exprimiert wird. SDF-1 $\alpha$  wirkt physiologisch v. a. im Knochenmark, wo es von Osteoblasten und Stromazellen gebildet und sezerniert wird [77], so dass eine Zielwanderung zirkulierender Stammzellen in erster Linie dorthin erfolgt.

## 5.3 Einfluss von SDF-1 $\alpha$ und TNF- $\alpha$ auf das Homingverhalten von Knochenmarkstammzellen in vivo und Rolle der endothelialen CXCR4 Expression.

Für Wildtyp-Tiere konnte anhand des gewählten Versuchsmodells in der Maus gezeigt werden, dass sowohl die Präsenz des Stammzellhomingfaktor SDF-1 $\alpha$ , als auch die Aktivierung des Endothels durch TNF- $\alpha$ , einem zentralen Mediator der entzündlichen Gewebsreaktion, die Zahl der stabilen, funktionell relevanten Interaktionen zwischen Knochenmarkstammzellen und Endothelzellen in postkapillären Venolen in vivo deutlich steigern.

Für die Versuchstiere, die mit SDF-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  behandelt wurden fanden sich im Vergleich zu nicht behandelten Tieren eine hochsignifikante Erhöhung der Zahl von Knochenmarkstammzellen, die eine stabile Interaktion mit dem Gefäßendothel eingingen. Auch die Tatsache, dass sich, nach Inkubation c-kit+ Stammzellen mit SDF-1 $\alpha$  in vitro, in

der konfokalen Lasermikroskopie eine Umverteilung des SDF-1 $\alpha$  Rezeptors CXCR4 hin zum Stammzellpol fand, stützt das Bild von SDF-1 $\alpha$  als einem spezifischen Mediator der Migration von c-kit+ Stammzellen.

Von SDF-1 $\alpha$  ist bekannt, dass es u.a. in geschädigtem und ischämischen Gewebe vermehrt exprimiert wird und das Homing von Knochenmarksstammzellen ins Myokard begünstigt [36].

Jedoch berichteten bereits Abbot et. al., dass SDF-1 $\alpha$  allein nicht in der Lage ist, das Stammzellhoming in extramedullären Organen suffizient zu steigern [31], die ischämische Schädigung bzw. die entzündliche Gewebsreaktion scheinen notwendige Co-Faktoren zu sein. Diese entzündliche Komponente wurde im hier verwendeten Modell durch die Gabe von TNF- $\alpha$  induziert. Von TNF- $\alpha$  weiß man, dass es die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen, wie z.B. ICAM-1 [45] erhöht. Des weiteren gibt es Berichte, die zeigen, dass TNF- $\alpha$  auch die endotheliale Expression von CXCR4 beeinflusst [85].

In unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass erst die kombinierte Applikation von SDF-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$ , zu einer hochsignifikanten Steigerung der lokalen endothelialen Adhärenz von c-kit+ Knochenmarkstammzellen in vivo führt.

Diese verstärkte Interaktion von c-kit+ Knochenmarkstammzellen mit dem Gefäßendothel wird wahrscheinlich u.a. durch endotheliales CXCR4 vermittelt. Denn nur für das Gefäßendothel, das aus Gewebe entstammte, welches sowohl mit SDF-1 $\alpha$  als auch mit TNF- $\alpha$  behandelt worden war, fand sich eine erhöhte Expression vom CXCR4 in der konfokalen Lasermikroskopie. Während andere Arbeitsgruppen zeigen konnten, dass die Aktivierung humaner CD 34+ Stammzellen durch SDF-1  $\alpha$ /CXCR4 zur LFA-1 (Leucocyte function antigen-1) und ICAM-1 (intercellular adhesionmolecule-1) vermittelten festen endothelialen Adhäsion führt [86], werden in unserem Modell der peripheren Stammzelladhäsion auch die Endothelzellen des Zielgewebes durch SDF-1 $\alpha$  und CXCR4 aktiviert. Daher scheinen sowohl die stammzellseitige, als auch die endotheliale Aktivierung die Interaktion dieser Zellen im Zuge des peripheren Stammzellhomings zu vermitteln. Die Blockierung von CXCR4 im in vivo Versuch mit dem entsprechenden Antikörper war nicht Zielstellung dieser Arbeit, wurde jedoch in weiteren Studien innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführt. Es fanden sich in den entsprechenden Versuchstieren kaum noch Knochenmarkstammzellen, die eine stabile Interaktion mit dem Endothel eingingen.

## 5.4 Einfluss der Expression und Funktion der endothelialen NO-Synthase auf das Homingverhalten von Knochenmarkstammzellen in vivo.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun im Weiteren der Einfluss der endothelialen Stickoxidsynthase, eNOS, auf die durch SDF-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  vermittelte stabile Interaktion zwischen c-kit+ Knochenmarkstammzellen und Endothelzellen in vivo untersucht werden.

### *Gewebsprotektion und -regeneration*

Die eNOS ist bereits in mehrfacher Hinsicht als möglicher wichtiger protektiver Faktor in Rahmen der kardiovaskulären Regeneration beschrieben worden. Einerseits konnte die endotheliale NOS als wichtiger vermittelnder Faktor der Stammzellmobilisation aus dem Knochenmark identifiziert werden [7]. Andererseits sind verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen mit einer verminderten Expression der eNOS in Zusammenhang gebracht worden[56]. Verschiedene Mechanismen der Geweberegeneration nach vorangegangener ischämischer Schädigung scheinen Abhängig von einer intakten endothelialen NO Produktion zu sein. So zeigen jüngste Ergebnisse von Landmesser et al. , dass das Vorhandensein der eNOS ein notwendiger Faktor der Statin-induzierten myokardialen Neoangiogenese ist [87]. Auch Hiasa et al. konnten im Tiermodell die Beteiligung der eNOS and der durch SDF-1 induzierten postischämischen Neoangiogenese zeigen [48]. Die Gruppe identifizierte die endotheliale NOS als einen notwendigen Faktor für die ischämische Neoangiogenese nach SDF-1a Gentransfer in der Maus. Für das Knochenmark ist gezeigt worden, dass die eNOS hier als ein Vermittler der VEGF (vascular endothelial growth factor) induzierten Stammzellmobilisierung wirkt, v.a. durch Aktivierung der Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) [63].

Welche Rolle die eNOS in den Endothelzellen des Zielorgans für das Homing von Knochenmarkstammzellen in extramedullärem Gewebe in vivo spielt, ist jedoch bisher unklar.

### *Stammzelladhäsion und -rolling*

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten zeigen, dass die Expression der eNOS im Gefäßendothel vor allem für die feste Adhäsion von injizierten Knochenmarkstammzellen am Gefäßendothel des Zielgewebes nötig ist. Denn für Tiere, die das Gen für die eNOS nicht exprimieren, fand sich, dass injizierte Knochenmarkstammzellen kaum eine stabile

Interaktion mit dem Gefäßendothel im Sinne der festen Adhärenz zeigen, trotz der lokalen Stimulierung des Gewebes mit dem zentralen Mediator des Stammzellhomings, SDF-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$ .

Für das von der festen Adhärenz unabhängige, initiale Rolling der Stammzellen, zeigte die Abwesenheit der eNOS nicht diesen deutlichen Effekt. Aus diesen Daten lässt sich ableiten, dass die Expression der eNOS für die initiale Kontaktaufnahme von Knochenmarkstammzellen mit dem Gefäßendothel im Zielgewebe, dem Rolling, nicht unbedingt erforderlich ist. Hingegen scheint die stabile Interaktion zwischen Knochenmarksstammzellen und Endothelzellen, als Voraussetzung für ein erfolgreiches Homing der Stammzellen, ohne die Expression der eNOS im Gefäßendothel stark beeinträchtigt zu sein.

Für diesen Unterschied bezüglich der eNOS Abhängigkeit zwischen dem initialen Kontaktaufnahme, dem „Rolling“ und der festen Adhäsion gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Am naheliegendsten erscheint, dass das Rolling und die feste Adhäsion der c-kit+ Stammzellen, wie bereits für Leukozyten bekannt, von unterschiedlichen Adhäsionsmolekülen vermittelt werden. Wie Chavakis, Dimmeler et al. zeigen konnten exprimieren hematopoetische Stammzellen in erster Linie Adhäsionsmoleküle der  $\beta$ 2-Integrin Familie, v. a. LFA-1, Mac-1 und p150,95 [88]. Diese interagieren im Rahmen der festen Adhäsion v. a. mit dem endothelialen Adhäsionsmolekül ICAM-1 aus der Immunglobulin Superfamilie. Daneben wird auf c-kit+ Zellen der Rezeptor CXCR4 (CD 184) für das Zytokin SDF-1 $\alpha$  exprimiert. Ein Verlust der endothelialen NOS führt möglicherweise zu einer Störung der Funktion von endothelialem ICAM-1. Hierzu passen Forschungsergebnisse, welche die endotheliale NOS als einen Bestandteil des Signalweges von ICAM-1 vermittelten Prozessen in der Endothelzelle identifizierten [89]. Daneben hat der Verlust der eNOS Expression, im Sinne eines schweren Endothelzellschadens, wahrscheinlich auch Folgen für andere endotheliale Signalprozesse, die für eine stabile Interaktion der Endothelzellen mit Stammzellen nötig sind. Für das endotheliale Rolling, als initiale Form der Stammzell-Endothel-Interaktion scheinen vornehmlich endotheliale Selektine, v.a. E-Selektin, und P-Selektin, die u.a. mit dem  $\beta$ 1 Integrin VLA-4 interagieren, von Bedeutung zu sein [90]. Vor dem Hintergrund unserer Ergebnisse scheinen diese frühen, durch Selektine vermittelten Interaktion weniger durch die Präsenz von endothelialen NO beeinflusst zu werden.

Jedoch bedarf die genaue Aufklärung dieser spezifischen Adhäsionsmechanismen, v. a. im Hinblick darauf, welche Adhäsionsmoleküle genau die Interaktionen zwischen Knochenmarkstammzellen und Endothelzellen beeinflussen, sicherlich noch weiterer Untersuchungen.

### *eNOS und SDF-1 $\alpha$*

Eine weitere Interpretationsmöglichkeit der vorliegenden Ergebnisse ergibt sich mit Blick auf die Ergebnisse von Hiasa und Kollegen [48], die fanden, dass die endotheliale NOS bzw. endotheliales Stickoxid als nachgeordnete Mediatoren von SDF-1 $\alpha$  wirken. Im Hinblick auf das vorliegenden Versuchsmodell ließe sich schlussfolgern, dass NO bzw. eNOS abhängige Signalwege die SDF-1 $\alpha$  induzierten Effekte auf das Gefäßendothel im extramedullärem Gewebe vermitteln und dass zu diesen Effekten u.a. das erhöhte Interaktionspotential der Endothelzellen mit Knochenmarkstammzellen zählt.

### *eNOS und TNF- $\alpha$*

Daneben ist die endotheliale NOS auch als Vermittler der Effekte des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  in Betracht zu ziehen. Hierfür fanden jüngst De Palma und Mitarbeiter Anhaltspunkte, indem sie zeigten, dass die endotheliale NOS durch TNF- $\alpha$  über einen Sphingomyelinase 2 Sphingokinase1 gekoppelten Signalweg aktiviert wird [91].

### *Systemische eNOS Antagonisierung*

Die systemische Antagonisierung der NO Produktion durch L-NAME führte zu einer Reduktion der stabilen Stammzell-Endothelinteraktion von annähernd gleichem Ausmaß, wie sie für eNOS knock-out Tiere beobachtet wurde. Somit scheint nicht nur die Expression der endothelialen NO-Synthase, sondern auch die intakte systemische NO Produktion für die stabile Interaktion c-kit+ Stammzellen mit dem Gefäßendothel von Bedeutung zu sein. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die systemische Antagonisierung durch L-NAME auch die NO Produktion in den Knochenmarkstammzellen selbst beeinflusst. Man muss davon ausgehen, dass auch die intakte stammzellseitige NO Produktion Voraussetzung für die stabile Interaktion von Stammzellen mit dem Gefäßendothel ist. Hiermit im Einklang stehen Berichte über eine verbesserte Zellfunktion mononukleärer Knochenmarkstammzellen in vivo nach Vorbehandlung mit einem Aktivator (AVE9488) der eNOS Funktion [47].

### *Vergleich mit Leukozyten*

Ein weiterer Gesichtspunkt ergibt sich aus Ergebnissen für endogene Leukozyten, die ein gänzlich anderes Verhalten nach NOS Inhibition zeigen als die Knochenmarkstammzellen in unseren Versuchen. So berichten u.a. Sanz et al. von einem Anstieg der Zahl fest

adhärenter Leukozyten im Gefäßbett des M. cremaster nach NOS Inhibition durch Superfusion des Gewebes L-NAME [81]. Hiermit wäre ein bemerkenswerter Unterschied in der Interaktion mit dem Endothel zwischen endogenen Leukozyten und Knochenmarkstammzellen aufgezeigt. Denn während für Leukozyten gezeigt werden konnte, dass diese in Situationen verminderter Aktivität der endothelialen NOS eine verstärkte endotheliale Adhärenz aufweisen, scheint für die feste Adhäsion von Knochenmarkstammzellen die Expression der eNOS unabdingbare Voraussetzung zu sein.

Die Verfügbarkeit von endothelialem Stickoxid scheint vor diesem Hintergrund in zweifacher Hinsicht von protektiver Bedeutung zu sein: einerseits durch die Vermittlung funktionell relevanter Stammzell-Endothelinteraktionen und damit Initiierung der Geweberegeneration durch Stammzellen, andererseits durch den Schutz vor übermäßiger Leukozyteninfiltration bei entzündlicher Gewebssituation, wie dies neben dem Cremaster, auch für andere extramedulläre Gewebe, z.B. die Lunge, gezeigt werden konnte [92]. Der endothelialen NOS kommt möglicherweise die Rolle einer zentralen Determinante der gewebeinternen Entzündungs- bzw. Regenerationsprozesse zu.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand des M. cremaster-Versuchsmodells gezeigt werden, dass die Präsenz des Chemokins SDF-1 $\alpha$  in Kombination mit lokaler Stimulation durch TNF- $\alpha$  selektiv die Interaktion von c-kit+ Knochenmarkstammzellen mit dem Gefäßendothel in extramedullärem Gewebe signifikant verstärkt. Grundlage für diese verstärkte Interaktion ist die spezifische Aktivierung des Gefäßendothels durch SDF-1 $\alpha$  und den korrespondierenden Rezeptor CXCR4 sowie durch TNF- $\alpha$ .

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sowohl die Expression als auch die Funktion der endothelialen Stickoxidsynthase für diesen adhäsionsverstärkenden Effekt von SDF-1 $\alpha$  bei einer entzündlichen Gewebssituation unabdingbar sind. Es ist davon auszugehen, dass Interaktionsprozesse zwischen Stammzellen und Endothelzellen durch endogenes Stickoxid bzw. eNOS-abhängige Signalwege vermittelt werden. Sowohl bei fehlender Expression der eNOS als bei systemischer Antagonisierung der NO Produktion fanden sich kaum relevante Interaktionen zwischen injizierten Knochenmarkstammzellen und Endothelzellen, trotz gleichzeitiger „Homingstimulation“ mit SDF-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$ . Somit scheint der endothelialen

NOS bzw. dem endothelialen Stickoxid, neben der bereits verschiedentlich aufgezeigten protektiven Funktion durch Aufrechterhaltung einer intakten Endothelfunktion im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen, auch eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung der Gewebsregeneration durch Stammzellen in knochenmarksfernen Organen zuzukommen.

Für die klinische Anwendung von Knochenmarkstammzellen im Rahmen der Therapie des Myokardinfarkts ergeben sich hieraus direkte Konsequenzen. Bei Therapieprotokollen, die eine intravaskuläre Applikation von Stammzellen vorsehen, müsste das Ausmaß des Endothelschadens und die damit verbundene Einschränkung der eNOS Funktion in der Zielregion als ein möglicher limitierender Faktor der transendothelialen Migration berücksichtigt werden. Sicherlich können die Ergebnisse aus dem Cremastermodell nicht geradlinig auf das kardiale Stammzellhoming übertragen werden. Dennoch bieten die vorliegenden Ergebnisse eine Grundlage für das Verständnis von Stammzell-Endothelinteraktionen in der peripheren Mikrozirkulation, wie z.B. in den Koronargefäßen. Zur weiteren Aufklärung der geschilderten Zusammenhänge sind noch weitere Analysen, möglicherweise auch im Rahmen humaner Studien notwendig.

Gleichzeitig könnte eine pharmakologische (Vor-)Behandlung zur Steigerung der lokalen endogenen eNOS Expression, z.B. durch HMG-CoA Reduktase Inhibitoren (Statine) [93], die Möglichkeit bieten, die Interaktion von Knochenmarkstammzellen mit Gefäßendothelzellen in extramedullärem Gewebe und damit das Homing von applizierten Stammzellen zu optimieren.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Masuda H, Kalka C, T. A. Endothelial progenitor cells for regeneration. *Hum Cell* 2000; Dec; 13(4):153-60.
- [2] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 28;98(18):10344-9.
- [3] Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K, Ivanova S, Streubel B, Hauser E, et al. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol (Berl)*. 1999 May;199(5):391-6.
- [4] Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*. 2004 Jul 10-16;364(9429):141-8.

- [5] Schachinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Oct 19; 44(8):1690-9.
- [6] Orlic D. Adult bone marrow stem cells regenerate myocardium in ischemic heart disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 May; 996:152-7.
- [7] Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med.* 2003 Nov;9(11):1370-6.
- [8] Claps CM, Corcoran KE, Cho KJ, Rameshwar P. Stromal derived growth factor-1alpha as a beacon for stem cell homing in development and injury. *Curr Neurovasc Res.* 2005 Oct;2(4):319-29.
- [9] Korbling M, Estrov Z, Champlin R. Adult stem cells and tissue repair. *Bone Marrow Transplant.* 2003 Aug;32 Suppl 1:S23-4.
- [10] Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res.* 2002 Aug 9;91(3):189-201.
- [11] Rosenstrauch D, Poglajen G, Zidar N, Gregoric ID. Stem celltherapy for ischemic heart failure. *Tex Heart Inst J.* 2005;32(3):339-47.
- [12] Gepstein L. Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. *Circ Res.* 2002 Nov 15;91(10):866-76.
- [13] Orlic D, Hill JM, Arai AE. Stem cells for myocardial regeneration. *Circ Res.* 2002 Dec 13;91(12):1092-102.
- [14] Anversa P, Leri A, Kajstura J. Cardiac regeneration. *J Am Coll Cardiol.* 2006 May 2;47(9):1769-76.
- [15] Smits AM, van Vliet P, Hassink RJ, Goumans MJ, Doevedans PA. The role of stem cells in cardiac regeneration. *J Cell Mol Med.* 2005 Jan-Mar;9(1):25-36.
- [16] Krukenmeyer M.G. SH-U. *Chirurgische Forschung:* Thieme 2005.
- [17] Iwami Y, Masuda H, Asahara T. Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future. *J Cell Mol Med.* 2004 Oct-Dec;8(4):488-97.
- [18] Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest.* 2001 Jun;107(11):1395-402.
- [19] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001 Apr 5;410(6829):701-5.
- [20] Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest.* 2005 Mar;115(3):572-83.
- [21] Dome B, Timar J, Ostoros G, Paku S. Endothelial progenitor cells in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol.* 2005 Apr;58(4):447.

- [22] Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med.* 1999 Apr;5(4):434-8.
- [23] Majumdar MK K-MM, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, Mosca JD. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci.* 2003;10:228-41.
- [24] MacKenzie TC, Flake AW. Human mesenchymal stem cells: insights from a surrogate in vivo assay system. *Cells Tissues Organs.* 2002;171(1):90-5.
- [25] Smith MA PC, Smith JG. Stem cell factor: biology and relevance to clinical practice. *Acta Haematol* 2001(1005(3)):143-50.
- [26] DeJong MO WW, Wognum, AW. Separation of myeloid and erythroid progenitors based on expression of CD34 and c-kit. *Blood.* 1995;Dec1(86(11)):4076-85.
- [27] Vandervelde S, van Luyn MJ, Tio RA, Harmsen MC. Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2005 Aug;39(2):363-76.
- [28] Strieter RM, Burdick MD, Mestas J, Gomperts B, Keane MP, Belperio JA. Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. *Eur J Cancer.* 2006 Apr;42(6):768-78.
- [29] Horuk R. Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001 Dec;12(4):313-35.
- [30] Romagnani P. LL, Annunziato F., et al. CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol.* 2004;25 (4):201-9.
- [31] Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation.* 2004 Nov 23;110(21):3300-5.
- [32] Damas JK, Eiken HG, Oie E, Bjerkeli V, Yndestad A, Ueland T, et al. Myocardial expression of CC- and CXC-chemokines and their receptors in human end-stage heart failure. *Cardiovasc Res.* 2000 Sep;47(4):778-87.
- [33] Ratajczak MZ MM, Kucia M, Drukula J, Pietrzkowski Z, Peiper S et al. Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. *Stem Cells.* 2003;21:363-71.
- [34] Hatch HM ZD, Jorgensen ML, Petersen BE. . SDF-1 alpha/CXCR4: a mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats. *Stem Cells.* 2002;4:339-51.
- [35] Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation.* 2003 Mar 11;107(9):1322-8.
- [36] Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet.* 2003 Aug 30;362(9385):697-703.

- [37] Pillarisetti K, Gupta SK. Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1): SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction. *Inflammation*. 2001 Oct;25(5):293-300.
- [38] Wang Y, Johnsen HE, Mortensen S, Bindslev L, Ripa RS, Haack-Sorensen M, et al. Changes in circulating mesenchymal stem cells, stem cell homing factor, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Heart*. 2006 Jun;92(6):768-74.
- [39] Weihrauch D, Arras M, Zimmermann R, Schaper J. Importance of monocytes/macrophages and fibroblasts for healing of micronecroses in porcine myocardium. *Mol Cell Biochem*. 1995 Jun 7-21;147(1-2):13-9.
- [40] Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, et al. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation*. 1998 Aug 18;98(7):699-710.
- [41] Jacobs M, Staufenberger S, Gergs U, Meuter K, Brandstatter K, Hafner M, et al. Tumor necrosis factor-alpha at acute myocardial infarction in rats and effects on cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol*. 1999 Nov;31(11):1949-59.
- [42] Kapadia S, Lee J, Torre-Amione G, Birdsall HH, Ma TS, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest*. 1995 Aug;96(2):1042-52.
- [43] Chen Y, Ke Q, Yang Y, Rana JS, Tang J, Morgan JP, et al. Cardiomyocytes overexpressing TNF-alpha attract migration of embryonic stem cells via activation of p38 and c-Jun amino-terminal kinase. *Faseb J*. 2003 Dec;17(15):2231-9.
- [44] Ruster B, Gottig S, Ludwig RJ, Bistrian R, Muller S, Seifried E, et al. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*. 2006 Dec;108 (12):3938-44.
- [45] Sumagin R, IH. S. TNF-{alpha} activation of arterioles and venules alters distribution and levels of ICAM-1 and affects leukocyte-endothelial cell interactions *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006,Nov;291:H2116-H25.
- [46] Chandrasekharan UM, Siemionow M, Unsal M, Yang L, Poptic E, Bohn J, et al. TNF-{alpha} receptor-II is required for TNF-{alpha}- induced leukocyte-endothelial interaction in vivo. *Blood*. 2006 Oct;prepublished online October 26, 2006; DOI 10.1182.
- [47] Sasaki K, Heeschen C, Aicher A, Ziebart T, Honold J, Urbich C, et al. Ex vivo pretreatment of bone marrow mononuclear cells with endothelial NO synthase enhancer AVE9488 enhances their functional activity for cell therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Sep 26;103(39):14537-41.
- [48] Hiasa K, Ishibashi M, Ohtani K, Inoue S, Zhao Q, Kitamoto S, et al. Gene transfer of stromal cell-derived factor-1alpha enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway: next-generation chemokine therapy for therapeutic neovascularization. *Circulation*. 2004 May 25;109(20):2454-61.
- [49] Guthrie SM, Curtis LM, Mames RN, Simon GG, Grant MB, Scott EW. The nitric oxide pathway modulates hemangioblast activity of adult hematopoietic stem cells. *Blood*. 2005 Mar 1;105(5):1916-22.

- [50] Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:737-69.
- [51] Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988 Jun 16;333(6174):664-6.
- [52] Hemmens B, Mayer B. Enzymology of nitric oxide synthases. *Methods Mol Biol.* 1998;100:1-32.
- [53] Albrecht EW, Stegeman, C. A. et al Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* 2003;199(1): :8-17.
- [54] W K Alderton CEC, and R G Knowles. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001 August 1;357(Pt 3):593-615.
- [55] Sessa WC. eNOS at a glance. *J Cell Sci.* 2004 May 15;117(Pt 12):2427-9.
- [56] Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol.* 2003 Jan;199(1):8-17.
- [57] Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell.* 1992 Feb 21;68(4):673-82.
- [58] Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001 Feb;280(2):F193-206.
- [59] Bauer PM, Fulton D, Boo YC, Sorescu GP, Kemp BE, Jo H, et al. Compensatory phosphorylation and protein-protein interactions revealed by loss of function and gain of function mutants of multiple serine phosphorylation sites in endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2003 Apr 25;278(17):14841-9.
- [60] Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003 Jan;284(1):R1-12.
- [61] Moncada S HE. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991;21(4) 361-74.
- [62] Vural KM, Liao, H. et al Effects of mast cell membrane stabilizing agents in a rat lung ischemia- reperfusion model. *AnnThoracSurg* 2000;69(1):228-32.
- [63] Duda DG, Fukumura D, Jain RK. Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells. *Trends Mol Med.* 2004 Apr;10(4):143-5.
- [64] Vural KMaO, M. C. Endothelial adhesivity, pulmonary hemodynamics and nitric oxide synthesis in ischemia-reperfusion EurJ CardiothoracSurg 2000;18(3):348-52.
- [65] Buras JA, Stahl, G. L. et al Hyperbaric oxygen downregulates ICAM-1 expression induced by hypoxia and hypoglycemia: the role of NOS AmJPhysiol Cell Physiol. 2000;C292.
- [66] Laroux FS, Pavlick, K. P. et al Role of nitric oxide in inflammation. *Acta Physiol Scand* 2001;173(1):113-8.

- [67] Huang PL. Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rep.* 2003 Dec;5(6):473-80.
- [68] Makino N, Maeda T, Sugano M, Satoh S, Watanabe R, Abe N. High serum TNF-alpha level in Type 2 diabetic patients with microangiopathy is associated with eNOS down-regulation and apoptosis in endothelial cells. *J Diabetes Complications.* 2005 Nov-Dec;19(6):347-55.
- [69] Sponholz C. Der Einfluss des NO-Synthase Systems auf die Leukozytenmigration nach Ischämie und Reperfusion der Lunge in der Maus [Inauguraldissertation]. Rostock: Universität Rostock; 2004.
- [70] Baez S. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc Res.* 1973 May;5(3):384-94.
- [71] Grant R. Direct observation of skeletal muscle blood vessels ( rat cremaster ). *Journal of Physiologie.* 1964 -,172(-):123-37.
- [72] Lindenblatt N MM, Klar E, Vollmar B:. Sustained hypothermia accelerates microvascular thrombus formation in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*2005289H2680-H7.
- [73] Häder DP HM. Moderne Labortechniken. 1 ed. Thieme,1993.
- [74] Gerlach. Das Lichtmikroskop. 2 ed. Thieme 1985.
- [75] Kubes P, Ibbotson G, Russell J, Wallace JL, Granger DN. Role of platelet-activating factor in ischemia/reperfusion-induced leukocyte adherence. *Am J Physiol.* 1990 Aug;259(2 Pt 1):G300-5.
- [76] Baker M, Wayland H. On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc Res.* 1974 Jan;7(1):131-43.
- [77] Peled A, Grabovsky V, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Petit I, et al. The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. *J Clin Invest.* 1999 Nov;104(9):1199-211.
- [78] Wang JF, Park IW, Groopman JE. Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C. *Blood.* 2000 Apr 15;95(8):2505-13.
- [79] Zhang XF, Wang JF, Matczak E, Proper JA, Groopman JE. Janus kinase 2 is involved in stromal cell-derived factor-1alpha-induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and migration of hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 2001 Jun 1;97(11):3342-8.
- [80] Kollet O, Shivtiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, et al. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest.* 2003 Jul;112(2):160-9.
- [81] Sanz MJ, Hickey MJ, Johnston B, McCafferty DM, Raharjo E, Huang PL, et al. Neuronal nitric oxide synthase (NOS) regulates leukocyte-endothelial cell interactions in endothelial NOS deficient mice. *Br J Pharmacol.* 2001 Sep;134(2):305-12.

- [82] Kantele JM, Kurk S, Jutila MA. Effects of continuous exposure to stromal cell-derived factor-1 alpha on T cell rolling and tight adhesion to monolayers of activated endothelial cells. *J Immunol.* 2000 May 15;164(10):5035-40.
- [83] Thorlacius H, Vollmar B, Guo Y, Mak TW, Pfreundschuh MM, Menger MD, et al. Lymphocyte function antigen 1 (LFA-1) mediates early tumour necrosis factor alpha-induced leucocyte adhesion in venules. *Br J Haematol.* 2000 Aug;110(2):424-9.
- [84] Ruster B, Gottig S, Ludwig RJ, Bistrian R, Muller S, Seifried E, et al. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood.* 2006 Dec 1;108(12):3938-44.
- [85] Gupta SK, Lysko PG, Pillarisetti K, Ohlstein E, Stadel JM. Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J Biol Chem.* 1998 Feb 13;273(7):4282-7.
- [86] Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, Petit I, Franitza S, Grabovsky V, et al. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood.* 2000 Jun 1;95(11):3289-96.
- [87] Landmesser U, Engberding N, Bahlmann FH, Schaefer A, Wiencke A, Heineke A, et al. Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2004 Oct 5;110(14):1933-9.
- [88] Chavakis E, Aicher A, Heeschen C, Sasaki K, Kaiser R, El Makhfi N, et al. Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp Med.* 2005 Jan 3;201(1):63-72.
- [89] Kevil CG, Orr AW, Langston W, Mickett K, Murphy-Ullrich J, Patel RP, et al. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) regulates endothelial cell motility through a nitric oxide-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2004 Apr 30;279(18):19230-8.
- [90] Voermans C, Rood PM, Hordijk PL, Gerritsen WR, van der Schoot CE. Adhesion molecules involved in transendothelial migration of human hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells.* 2000;18(6):435-43.
- [91] De Palma C, Meacci E, Perrotta C, Bruni P, Clementi E. Endothelial nitric oxide synthase activation by tumor necrosis factor alpha through neutral sphingomyelinase 2, sphingosine kinase 1, and sphingosine 1 phosphate receptors: a novel pathway relevant to the pathophysiology of endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Jan;26(1):99-105.
- [92] Kaminski A, Pohl CB, Sponholz C, Ma N, Stamm C, Vollmar B, et al. Up-regulation of endothelial nitric oxide synthase inhibits pulmonary leukocyte migration following lung ischemia-reperfusion in mice. *Am J Pathol.* 2004 Jun;164(6):2241-9.
- [93] Walter DH, Dimmeler S, Zeiher AM. Effects of statins on endothelium and endothelial progenitor cell recruitment. *Semin Vasc Med.* 2004 Nov;4(4):385-93.

## 8 Anhang

I

### Thesen

1. Die lokalen und systemischen Umstände, die die Zielwanderung (Homing) transplantieter Knochenmarkstammzellen in knochenmarksferne Organe beeinflussen, sind bisher nur in Ansätzen untersucht.
2. Zur Untersuchung des peripheren Stammzellhomings wurde ein Tiermodell entwickelt, welches die Analyse von Stammzell-Endothelinteraktionen im knochenmarksfernen Gewebe mittels intravitaler Mikroskopie ermöglichte.
3. Dazu wurde der Musculus Cremaster der Maus so präpariert, dass injizierte c-kit positive Stammzellen aus dem Knochenmark einer Spendermaus in ihrem intravaskulären Verhalten direkt beobachtet werden konnten.
4. C-kit positive Stammzellen zeigen eine geringe Interaktion mit dem unbehandelten Endothel der postkapillären Venolen in der muskulären Mikrozirkulation.
5. Erst die kombinierte Applikation des Stammzellhomingfaktors SDF-1 $\alpha$  zusammen mit TNF- $\alpha$ , einem zentralen proinflammatorischen Zytokin, erbrachte einen signifikanten Anstieg der Stammzelladhärenz am Endothel des Zielorgans.
6. Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) ist ein Schlüsselenzym für die periphere Stammzelladhärenz unter den Bedingungen von These 5.
7. Sowohl die funktionelle Blockade der NO-Produktion durch Gabe von L-NAME, als auch die Verwendung von knock-out Mäusen für die eNOS, führen zu einer nahezu kompletten Hemmung der endothelialen Stammzelladhärenz.
8. Bei klinischen Therapieprotokollen, die eine intravaskuläre Applikation von Stammzellen vorsehen, ist die lokale Endothelfunktion im Sinne einer intakten NO-Produktion zu berücksichtigen.

**II****Selbständigkeitserklärung**

Ich erkläre an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

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

Rostock, den 07.07.08

Peter Donndorf

### III

### Danksagungen

Ich möchte mich bei Herrn Dr. med. Alexander Kaminski bedanken, der mir als Betreuer meiner Arbeit während der gesamten Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mich in allen Belangen unterstützte.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff, der als betreuender Hochschullehrer die vorliegende Arbeit ermöglicht hat.

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, ohne deren Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Schließlich möchte ich allen Mitarbeitern des FKGO- Forschungslabors danken, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit halfen, wo sie nur konnten. Außerdem allen Freunden und Verwandten, die mir Mut machten, wenn mal etwas schief ging, und in den richtigen Momenten für Ablenkung sorgten.

**Persönliche Angaben:**

Name: Peter Johannes Donndorf

Geboren am: 19.11.1981 in Hamburg

Eltern: Andreas und Sirpa Donndorf

Staatsangehörigkeiten: deutsch und finnisch

**Ausbildung:**

2001: Abitur am Otto-Hahn Gymnasium in Geesthacht

2002-2008: Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock

2005-2008: Doktorand in der Klinik für Herzchirurgie unter Prof. Dr. med. G. Steinhoff

2006: Studienaufenthalt an der Universität Kuopio (Finnland)

2007-2008: Im Rahmen des Praktischen Jahres Studienaufenthalte am Kantonsspital St. Gallen (Schweiz), sowie am Universitätsklinikum Bern (Schweiz)

**Wissenschaftliche Veröffentlichungen:**

Kaminski A, Ma N, Donndorf P, Lindenblatt N, Feldmeier G, Ong LL, Furlani D, Skrabal CA, Liebold A, Vollmar B, Steinhoff G Endothelial NOS is required for SDF-1alpha/CXCR4-mediated peripheral endothelial adhesion of c-kit+ bone marrow stem cells. Lab Invest. 2008 Jan; 88 (1): 58-69