

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

***Intravitalmikroskopische Untersuchungen zu Einflussfaktoren der
Interaktion von humanen CD 133⁺ Knochenmarkstammzellen mit
Endothelzellen in vivo***

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

vorgelegt von

Dritan Useini

aus Ohrid

geboren am: 08.April.1983 in Ohrid

Rostock; Februar 2013

Tag der Einreichung: 13.02.2013

Tag der mündlichen Verteidigung: 18.12.2013

Dekan: Prof.Dr.med. Emil C. Reisinger

1. Gutachter: Prof.Dr.med.habil. Gustav Steinhoff
(Universitäres Herzzentrum Rostock, Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie)
2. Gutachter: Prof Dr.med. Brigitte Vollmar
(Institut für Experimentelle Chirurgie, Zentrale Versuchstierhaltung, Universität Rostock)
3. Gutachter: Prof.Dr.med. Sonja Schrepfer
(Universitäres Herzzentrum Hamburg, Klinik und Poliklinik für Herz- und Gefäßchirurgie, TSI-Labor)

Inhaltverzeichnis

1. Einführung	5
1.1. Einleitung	5
1.2. Stammzellen	6
1.2.1. CD 133 ⁺ Stammzellen	8
1.3. Stammzellhoming	9
1.3.1. Definition	9
1.3.2. Etappen, Mechanismen und Mediatoren	10
1.3.2.1. SDF-1 α und CXCR4 und Bedeutung der SDF-1 α /CXCR4 – Achse beim Stammzellhoming	11
1.3.2.2. TNF α als Homingfaktor	13
1.3.2.3. Das ``Rolling`` und die Adhäsion	14
2. Ziel der Arbeit und Aufgabenstellungen	17
3. Material und Methoden	18
3.1. CD133 ⁺ - Stammzellisolation	18
3.1.1. Stammzellfärbung	20
3.1.2. Bestimmung der Zellzahl	21
3.1.3. Durchflusszytometrie (FACS)	21
3.2. Tiermodell	22
3.2.1. Versuchsaufbau	22
3.2.2. Versuchstiere	23
3.2.2.1. Hintergrund der SCID-Mäuse	23
3.2.3. Der chirurgische Eingriff	24
3.2.3.1. Materialien	24
3.2.3.2. Narkose und Kanülierung der linken Arteria femoralis	25

3.2.3.3. Chirurgische Präparation des M. cremaster	26
3.3. Intravitalmikroskopie	28
3.3.1. IVM Grundlagen	28
3.3.2. Aufbau des IVM	29
3.3.2.1. Rhodamin 6G als Fluoreszenzfarbstoff	30
3.3.2.2. Mikrozirkulatorische Parameter	30
3.4. Versuchsgruppen	31
3.5. Versuchsablauf	32
3.6. Fluoreszenzimmunohistochemie	34
3.6.1. Gewebeschnitte	34
3.6.2. Grundlagen der Immunfärbung	34
3.6.3. Immunfärbung des M.cremaster	34
3.6.4. Quantifizierung des CXCR4-Signals	35
3.7. Statistik und Auswertung	38
4. Ergebnisse	39
4.1. Ergebnisse der FACS-Analyse von isolierten humanen CD 133 ⁺ Stammzellen aus dem Knochenmark.....	39
4.2. Mikrozirkulatorische Ergebnisse	40
4.3. ``Rolling``-Analyse als Stammzellhoming- Parameter	41
4.3.1. ``Rolling`` in der Kontrollgruppe	41
4.3.2.``Rolling`` in der SDF-1 α Gruppe.....	41
4.3.3. ``Rolling`` in der TNF α Gruppe.....	42
4.3.4. ``Rolling`` in der SDF-1 α /TNF α Gruppe.....	42
4.4. ``Rolling`` als variabler Parameter	43
4.4.1. Geschwindigkeit des ``Rollings`` in der Kontrollgruppe	44
4.4.2. Geschwindigkeit des ``Rollings`` in der SDF-1 α Gruppe	44
4.4.3. Geschwindigkeit des ``Rollings`` in der SDF-1 α /TNF α - Gruppe	44

4.4.4. Geschwindigkeit des ``Rollings`` in der TNF α - Gruppe.....	44
4.5. Adhäsion-Analyse als Stammzellhoming- Parameter	45
4.5.1. Adhäsion in der Kontrollgruppe	45
4.5.2. Adhäsion in der SDF-1 α - Gruppe	45
4.5.3. Adhäsion in der TNF α - Gruppe	46
4.5.4 Adhäsion in der SDF-1 α / TNF α - Gruppe.....	46
4.6. Expression von CD 44 und CXCR4 auf der CD 133 ⁺ Stammzelloberfläche	47
4.7. Expression des CXCR4-Rezeptors in den Endothelzellen	48
4.7.1. Expression des CXCR4-Rezeptors in den ``großen Gefäßen`` (71-140 μ m).....	49
4.7.1.1. Kontrollgruppe.....	49
4.7.1.2. SDF-1 α - Gruppe	50
4.7.1.3. SDF-1 α /TNF α – Gruppe	51
4.7.2. Expression des CXCR4-Rezeptors in den ``kleinen Gefäßen`` (20-70 μ m)	52
4.7.2.1. Kontrollgruppe	52
4.7.2.2. SDF-1 α - Gruppe	53
4.7.2.3. SDF-1 α /TNF α -Gruppe	54
4.8. Das endotheliale ``Rolling`` und die Adhäsion in Abhängigkeit des Gefäßdurchmessers	56
5. Diskussion	59
5.1. Versuchsmodell und Xenotransplantation	59
5.2. ``Rolling`` als Stammzellhoming-Parameter	60
5.2.1.``Rolling`` als variabler Parameter	61
5.2.2. CD 133 als ``Rolling``-beeinflussendes Molekül.....	62
5.3. Adhäsion als Stammzellhoming-Parameter	63
5.3.1. Additive Wirkung von SDF-1 α und TNF α bei der Expression von adhäsiven Molekülen	63
5.4. Der endotheliale CXCR4-Rezeptor fördert die Adhäsion der humanen CD 133 ⁺ Stammzellen.....	65

5.5. Die neue Methodik der Quantifizierung des Endothelsignals	66
6. Zusammenfassung	67
7. Literaturverzeichnis	69
8. Anhang	80
I. Thesen	80
II. Eidesstattliche Erklärung	82
III. Danksagung	83
IV. Liste häufig verwendeter Abkürzungen	84
V. Lebenslauf	86

1. Einführung

1.1 Einleitung

Das noch relativ junge Feld der regenerativen Medizin befasst sich mit der Heilung verschiedener Erkrankungen durch die Wiederherstellung funktionsgestörter Zellen und Gewebe. Das aktuelle Interesse an Stammzellen erwächst vor allem aus der Hoffnung, dass sie für die Behandlung von Organen bieten, welche bisher als nicht oder als nur sehr eingeschränkt regenerationsfähig angesehen wurden, wie z.B. das Herz. Die Tatsache, dass die Stammzellen schon seit Jahren im Rahmen der Knochenmarktransplantation klinisch verwendet werden und daher gut charakterisiert sind [7], ermöglichte die zügige Entwicklung entsprechender regenerativer Therapiekonzepte. Bisher wurden dazu zahlreiche wissenschaftlichen Arbeiten und klinischen Studien veröffentlicht. [1] [8] [9] [10] [11] [12] [13] [14] [15] [16] [17] [18] [21][26] Studien an Menschen folgten früheren experimentellen Daten [19,20], die u.a. auf eine kardial regenerative Wirkung der Knochenmarksstammzellen hinwiesen.

Trotz der bis zum jetzigen Zeitpunkt erarbeiteten klinischen Zelltherapie-Protokolle, bleiben zugrunde liegenden Mechanismen, für die ausgewiesenen positiven funktionalen Effekten der kardialen Stammzellen-Anwendung, unklar. Zur Beantwortung dieser Frage sind verschiedene Hypothesen vorgeschlagen worden, einschließlich der Möglichkeit, dass das geschädigte Gewebe parakrine Faktoren sezerniert, die endogene Vorläufer- und Stammzellen rekrutieren. [25]

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Migrationspotential einer spezifischen Subpopulation, humaner CD 133⁺ Knochenmarkstammzellen *in vivo*.

Hierzu wurde ein peripheres Muskelgewebe der Maus verwendet. Da für ein erfolgreiches ``Homing`` initial eine Interaktion zwischen den Stammzellen und Endothelzellen erforderlich ist, wurden das sogenannte endotheliale ``Rolling`` und die feste endotheliale Adhäsion unter Verwendung eines intravitalen Mikroskops beobachtet. Bislang wird der SDF-1/CXCR4-Achse die entscheidende Relevanz beim ``Homing`` der humanen Stammzellen zugeschrieben. [4] Daher wird in dieser Arbeit der Einfluss des endothelialen CXCR4-Rezeptors beim ``Homing`` der humanen CD 133⁺ Stammzellen untersucht.

1.2 Stammzellen

Als Stammzellen werden allgemein Körperzellen bezeichnet, die sich in verschiedene Zelltypen oder Gewebe ausdifferenzieren können. Je nach Art der Stammzelle und ihrer Beeinflussung haben sie das Potential, sich in jegliches Gewebe (embryonale Stammzellen) oder in bestimmte festgelegte Gewebetypen (adulte Stammzellen) zu entwickeln. Stammzellen sind in der Lage, Tochterzellen zu generieren, die selbst wiederum Stammzelleigenschaften besitzen, aber auch solche mit größerer Ausdifferenzierung. [2] Die Fähigkeit der Selbsterneuerung und der Differenzierung sind somit die beiden Kriterien, welche alle Stammzellen verbinden. Dabei sind zwei Begriffe wichtig, die im Folgenden erklärt werden.[3]

Totipotenz -. Die Fähigkeit einer Zelle, sich in sämtliche Zellen eines Gesamtorganismus zu entwickeln. Menschliche Embryonen verfügen bis ca. zum Achtzellstadium über totipotente Zellen, von denen sich jede einzelne als eigenständiges Individuum entwickeln könnte, was

alle embryonalen und extraembryonalen Zelltypen einschließt. Extraembryonale Strukturen, wie beispielsweise die Plazenta, werden vom Trophoektoderm gebildet. Das Trophoektoderm und die innere Zellmasse, aus welcher sich der eigentliche Embryo entwickelt, sind die beiden Zellgruppen, die aus den ersten Furchungsteilungen hervorgehen (bis zum Achtzellstadium). Sie haben die gleiche Fähigkeit wie eine befruchtete Eizelle. Pluripotenz: Innerhalb der inneren Zellmasse befinden sich nur noch Zellen, die dazu befähigt sind, durch Teilung und Differenzierung alle Zelltypen des eigentlichen Embryos (Zellen aller drei Keimblätter), nicht aber extraembryonale Strukturen, zu erzeugen. Sie werden als pluripotente Zellen bezeichnet. [5-7] In der Literatur sind noch weitere Begriffe erwähnt wie Multipotenz - welche zwar nicht in alle Zelltypen des adulten Organismus, jedoch in viele verschiedene Zelltypen differenzieren können.

Man unterscheidet je nach Herkunft zwischen embryonalen und adulten Stammzellen. Adulte Stammzellen können ab der Geburt bis zum Tod entnommen werden. Sie befinden sich im Knochenmark, Nabelschnurblut, Fettgewebe, sowie im peripheren Blut. Auch der erwachsene Körper benötigt zur Erneuerung seines Gewebes Stammzellen. Besonders reichhaltig ist das Knochenmark, wobei nach einer künstlichen Stimulation des Knochenmarks auch aus dem normalen Blut Stammzellen gewonnen werden können. Die Entwicklungspotenz von adulten Stammzellen galt bislang gegenüber embryonalen Stammzellen als reduziert. Aber auch sie können mittels Wachstumsfaktoren dazu angeregt werden, sich in spezialisierte Zelltypen zu entwickeln. Sie bewahren ihre Pluripotenz auch nach 60 Zellteilungen. [3] Deshalb können Stammzellen theoretisch jedes zerstörte Gewebe im Körper erneuern oder ersetzen.

1.2.1 CD 133⁺ Stammzellen

Vor vierzehn Jahren wurde eine neuartige Cholesterin-Wechselwirkung, ein Pentaspan Membranglykoprotein namens Prominin-1 (CD 133) als Oberflächenmarker von sowohl neuronalen (Weigman et al. 1997) als auch hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (Yin et al. 1997) identifiziert . [23]

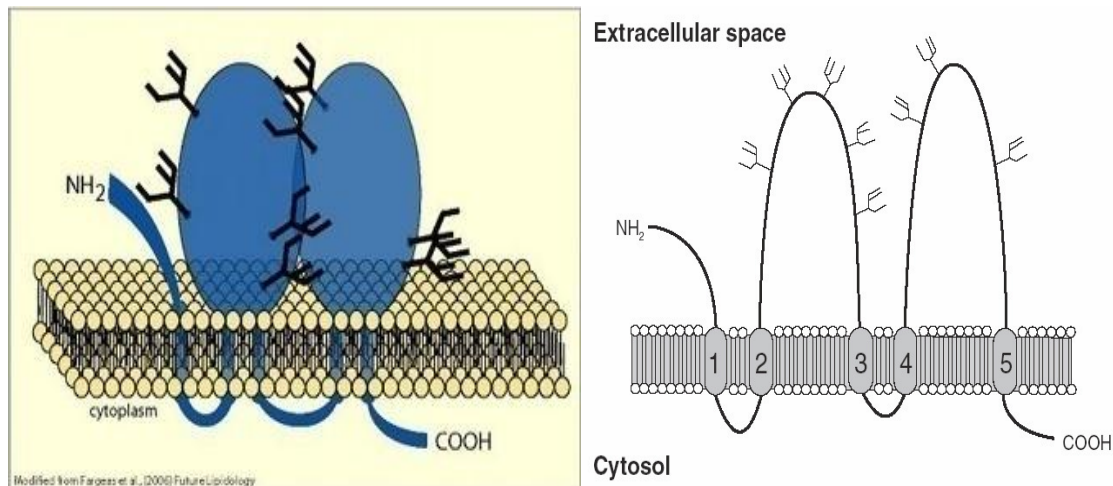


Abb. 1. Membranprotein CD133 (AC133) [22]

Das CD 133-Antigen (Prominin-1) ist ein 5 Transmembran Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 120 kD. Es gibt eine N-terminale Domäne und zwei große glykolisierte Schleifen extrazellulär sowie zwei kleine zytosomatische Schleifen und das C-terminale Proteinende intrazellulär.[23] CD 133 wurde zuerst von Yin et al. 1997 als Marker auf hämatopoetischen CD34⁺ Vorläuferzellen des adulten menschlichen Blutes und Knochenmarks sowie auf fetalen epithelialen Zellen der Leber oder der Niere beschrieben. Im selben Jahr entdeckten Weigman und Kollegen Prominin, das homologe Sequenzenanalog in der Maus. Zusätzlich zu den blutbildenden System- und Epithelzellen ist Prominin-1 (CD133) in einer großen Gruppe von somatischen Stamm- und Vorläuferzellen zu finden [35] CD 133 zeigt eine bemerkenswerte zelluläre Lokalisation. An

der Plasmamembran ist CD 133 auf bestimmte Teilbereiche beschränkt. In den epithelialen Zellen ist Prominin-1 auf den Mikrovilli und ähnlichen Vorsprüngen der apikalen Plasmamembran konzentriert. In nicht-epithelialen Zellen, wie hämatopoetischen Stammzellen, ist Prominin-1 ebenfalls auf den Plasmamembran-Vorsprüngen angereichert.

Über die Funktion des CD 133-Rezeptors ist bisher wenig berichtet worden. [36] [37] Dem CD 133 Molekül wird eine Rolle als Organisator der Plasma-Membran-Vorsprünge zugeschrieben. [38] [39] In letzter Zeit werden CD 133⁺ Stammzellen als Zellen mit großem regenerativem Potential angesehen. Im Jahr 2007 wurde gezeigt dass, humane CD 133⁺ Stammzellen das Potenzial haben, sowohl in Richtung endothelialer, als auch in Richtung myokardialer Zelllinien zu differenzieren. [40]

1.3 Stammzellhoming

1.3.1 Definition

Die Migration von hämatopoetischen Stammzellen über das Blut, durch das Gefäßsystem hin zum Ziel-Organ bzw. das Knochenmark wird als ``Homing``-Prozess bezeichnet. [27] Während der Ontogenese werden die frühen Vorläufer des blutbildenden Systems zunächst in der intraembryonalen Aorta-Gonaden-Mesonephros (AGM) gebildet, und es scheint sehr wahrscheinlich, dass solche ‚AGM-derived‘ hämatopoetischen Stammzellen auswandern und die fetale Leber besiedeln, den wichtigsten Ort der embryonalen Blutbildung. Während der Neugeborenen-Stadien wandern die hämatopoetischen Stammzellen erneut. Sie verlassen die fetale Leber und gelangen durch den Blutstrom in das Knochenmark. [28]

In den letzten 30 Jahren konnte gezeigt werden, dass hämatopoetische Stammzellen nach dem Neugeborenenstadium ihre Fähigkeit zu

migrieren, behalten.[29][30] Das ``Homing`` ist nicht nur ein natürlicher Prozess, der ständig abläuft, sondern er kommt auch im Rahmen pathologischer Bedingungen im Sinne von akuten Organschäden vor, wie z.B. dem Herzinfarkt. Der größte Teil der Stammzellen im Knochenmark befindet sich normalerweise in Ruhestellung und zeigt keine proliferative Aktivität. Kommt es aber im Organismus zu einem erhöhten Bedarf, so werden diese Stammzellen aktiviert und beginnen zu proliferieren und in Progenitorzellen zu differenzieren. Schließlich kommt es zur Mobilisierung der Stamm- und Progenitorzellen in das periphere Blut. Bei physiologischen bzw. pathophysiologischen Prozessen wie z.B. Gewebeischämie kommt es über Stresssignale zu einer gesteigerten Mobilisierung von Stamm- und Progenitorzellen, bevor sie aus dem Knochenmark-Mikromilieu über die Sinusoide des Knochenmarks in die Zirkulation gelangen können. [41]

Es handelt sich um komplexe Prozesse, Signalwege und Mechanismen, die durch die Wechselwirkung zahlreicher Faktoren (Zytokine, Chemokine, proteolytische Enzyme, Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle) entstehen.[43]

1.3.2 Etappen, Mechanismen und Mediatoren

Das Stammzellhoming besteht aus mehreren Etappen. Zunächst werden Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark von verschiedenen Mediatoren stimuliert. Diese Phase wird als Mobilisation bezeichnet. Als nächster Schritt folgt das sogenannte ``Rolling`` und danach die Adhäsion zwischen den Stammzellen und Endothelzellen. Danach folgt transendotheliale Migration von dem Mikromilieu des Knochenmarks ins periphere Blut

über die Sinusoide. ``Rolling``, Adhäsion und schließlich transendotheliale Migration finden auch im knochenmarkfernen Zielorgan statt. Ein erfolgreiches peripheres ``Homing`` bildet die Voraussetzung für eine gewebe- und organspezifische Ausdifferenzierung der Stammzellen.[42][56]

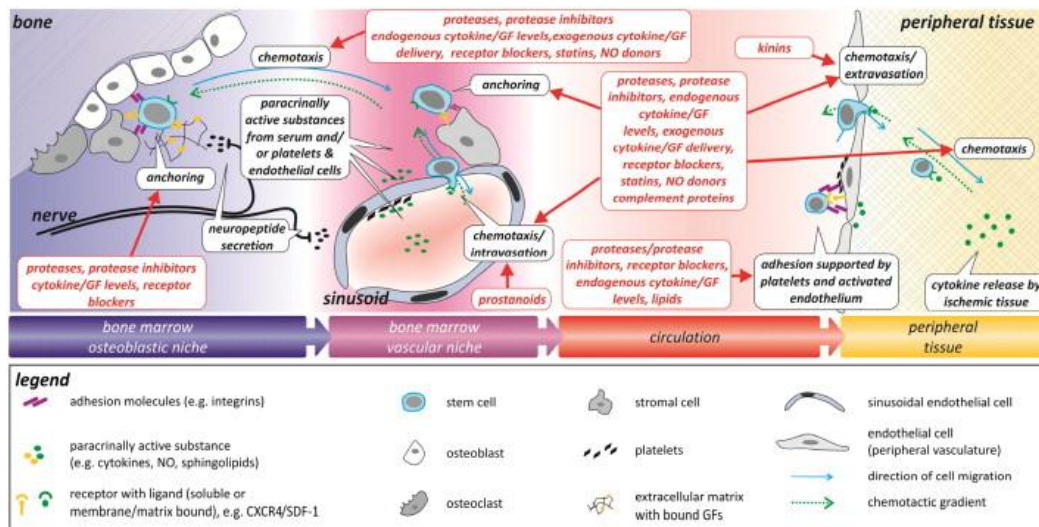


Abb. 2. Etappen, Mechanismen und Mediatoren des Stammzellhoming [42]

1.3.2.1 SDF-1 α und CXCR4 und Bedeutung der SDF-1 α /CXCR4 - Achse beim Stammzellhoming

SDF-1 α .-

Das Chemokin ``Stromalcell-derived factor 1 α `` (SDF-1 α) gehört zu den C-X-C-Chemokinen, welches ursprünglich aus murinen Stromazellen des Knochenmarks isoliert und zunächst als „murine pre-B-cell growth stimulating factor`` bezeichnet wurde. [31]

Die Chemokine stellen eine Familie kleiner Moleküle dar, die für ihre Fähigkeit bekannt sind, Zellmigration im Körper zu steuern und zu kontrollieren. In jedem Chemokinmolekül findet man zwei Cysteine direkt aufeinanderfolgend, und je nachdem, ob eine oder drei andere Aminosäuren dazwischen liegen, unterscheidet man CC-, CLC-sowie CL₃C-Chemokine.

Die Chemokinrezeptoren besitzen sieben Transmembranhelices und gehören zur Klasse der G- Protein- gekoppelten Rezeptoren. Wie bei den Chemokinen unterscheidet man zwischen Rezeptoren für CXC und solche für CC- Chemokine.

Das Chemokin SDF-1 α , ein alpha Chemokin, welches das G-gekoppelte Protein CXCR4 bindet, spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation der Migration von Stamm- und Progenitorzellen. Dabei wird SDF-1 α von den Knochenmarkstromazellen sezerniert und spielt eine wichtige Rolle während der Embryogenese für die Besiedlung des Knochenmarks durch die hämatopoetischen Stammzellen, die aus der fetalen Leber stammen. In den letzten Jahren wurde berichtet, dass SDF-1 α auch von verschiedenen knochenmarksfernen Organen und Geweben exprimiert bzw. sezerniert wird. z. B. Leber, Nieren, Gehirn, Haut, Herz, besonders unter hypoxischen und ischämischen Bedingungen.[44] [63]

Der SDF-1 α – Rezeptor CXCR4 .-

Das Molekül CXCR4 ist ein Rezeptor-Transmembranprotein aus der Familie der Chemokinrezeptoren. CXCR4 ist in vielen Zellen des blutbildenden Systems verbreitet und wird insbesondere von vielen Stammzellen und Tumorzellen exprimiert. Verglichen mit anderen Chemokinrezeptoren zeigt CXCR4 eine weite Verbreitung innerhalb des Organismus. Dieser Rezeptor kann innerhalb des blutbildenden Systems in neutrophilen Granulozyten, Monozyten, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Prä-B-Zellen, dendritischen Zellen, und Makrophagen nachgewiesen werden. Besonders charakteristisch ist die

Expression von CXCR4 auf CD 34-positiven Vorläuferzellen. Darüber hinaus wird CXCR4 von Zellen des Blutgefäß-Endothels, des ZNS und des Magen-Darm-Trakts gebildet. Auch die Mehrzahl aller Tumoren ist CXCR4-positiv.

CXCR4 wird durch seinen Liganden SDF-1 α aktiviert, wodurch der Rezeptor eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade startet. Die SDF-1 α -CXCR4-Achse stellt derzeit einen der wichtigsten Signalwege des Stammzellhoming dar. [57][63][64]

1.3.2.2 TNF α als Homingfaktor

Die Abkürzung TNF- α steht für Tumornekrose faktor alpha. Es handelt sich um ein Zytokin, welches eine zentrale Bedeutung bei entzündlichen und immunologischen Reaktionen des Körpers spielt.

Das Zytokin TNF α wird durch verschiedene Zellen und in verschiedenen Organen gebildet, hauptsächlich durch Makrophagen, aber auch durch Mastzellen, Lymphozyten, Endothelzellen, im Fettgewebe, in neuronalen Gewebe und im Herzen.

Das Zytokin TNF α wurde von verschiedenen Autoren wie Granger 1968, Rudel 1968 und Lloyd 1975 beschrieben, wobei die Fähigkeit dieser Substanz Maus- Fibrosarcoma Zellen zur Apoptose zu führen, gezeigt wurde.[65][66]

Vorliegende klinische Daten zeigen, dass die TNF α -Produktion und -Freisetzung bei Patienten mit Myokardinfarkt hochreguliert ist [68], wobei eine Abhängigkeit zwischen der Infarktgröße und der TNF α -Konzentration bei Patienten mit Myokardinfarkt postuliert wird.[69] Experimentelle Studien zeigten, dass TNF α bei jedem Schritt der transendothelialen Migration von Neutrophilen beteiligt ist. [70] Überexpression von TNF α durch Kardiomyozyten verstärkt die Migration von embryologischen SZ. [67] Das Zytokin TNF α induziert die Leukozyten-Adhäsion im M. cremaster und induziert eine

erhöhte Exprimierung von ICAM-1 auf den Endothelzellen.[72] [73] In einer experimentellen Studie wurde gezeigt, dass sowohl die Anwesenheit von SDF-1 α als auch TNF α für eine relevante, funktionelle Interaktion (Adhäsion) zwischen c-kit⁺ (CD 117⁺) Stammzellen und Endothelzellen erforderlich ist.[71]

In dieser Arbeit wird Rolle von TNF α bei dem ``Homing``-Prozess von humanen CD 133⁺ Stammzellen *in vivo* untersucht.

1.3.2.3. Das ``Rolling`` und die Adhäsion

Während des Homingsprozesses ist es erforderlich, dass hämatopoetische Stammzellen durch die Gefäßwand transmigrieren – ein Prozess, der als Extravasation bezeichnet wird. Die Extravasation von hämatopoetischen Stammzellen ist ein mehrstufiger Prozess, ähnlich wie bei der Extravasation von Leukozyten in Entzündungsherde, und wird durch stammzellseitige als auch endothelzellseitige Adhäsionsmoleküle vermittelt. Zunächst rollen die hämatopoetische Stammzellen entlang des Endothels. Anschließend aktivieren Chemokine endothelzellseitige Adhäsionsmoleküle, die eine feste Haftung zwischen hämatopoetischen Stammzellen und Endothelzellen bewirken. Schließlich migrieren die HSZ durch das Endothel in das Knochenmark oder in die KM-entfernten Organe. [34]

Während der Homingprozess eine Kaskade von Ereignissen umfasst, ist der erste kritische Schritt dieses Prozesses als ``Rolling`` bekannt, wobei die wandernden Zellen in eine Interaktion von zunächst geringerer Affinität mit den Endothelzellen treten. [45] Verschiedene endotheliale Selektinmoleküle vermitteln, induziert durch Entzündungsmediatoren und durch SDF-1 α das ``Rolling`` von Stammzellen [46,47,48,49,50].

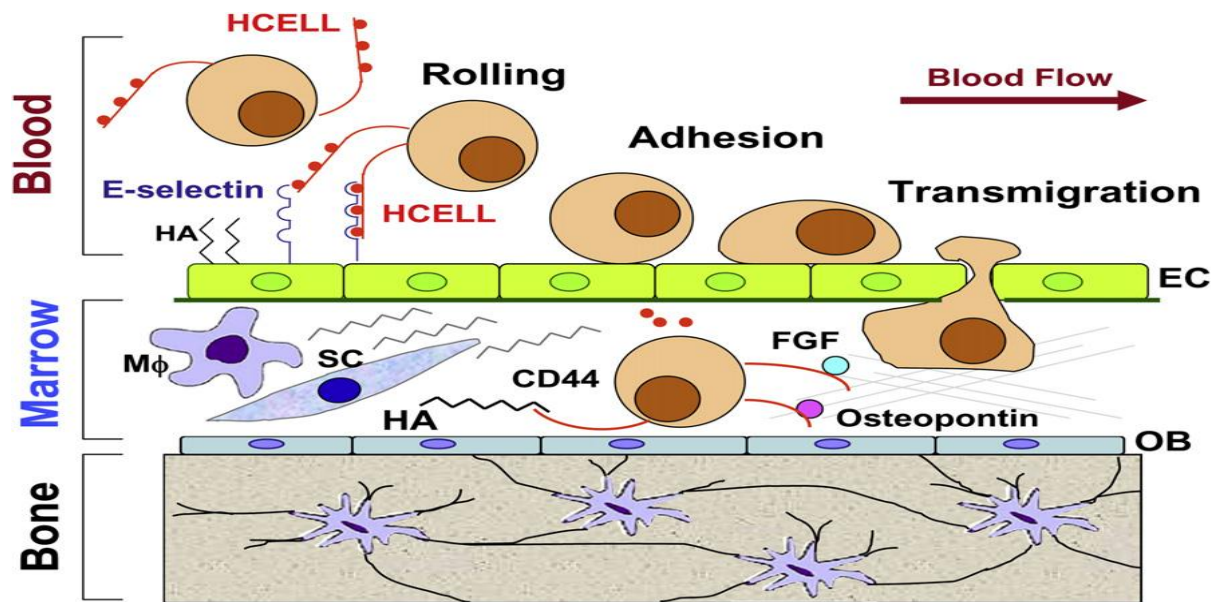


Abb.3. Moleküle, die das endotheliale "Rolling" von Stammzellen vermitteln
[52]

Nach der "Rolling"-Phase folgt die feste endotheliale Adhäsion, bei der es sich um eine feste Verbindung zwischen Stammzelle und Endothelzelle unmittelbar vor der Extravasation handelt. Es ist bekannt, dass SDF-1 α die Adhäsion von Zellen an Fibrinogen, Fibronectin, Stroma- und Endothelzellen moduliert. Diese Wirkung von SDF-1 α wird durch die Aktivierung verschiedener Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche der Zielzellen, z.B. Integrine vermittelt. Außerdem induziert SDF-1 α die LFA-1/ICAM-1- und VLA-4/VCAM-1 vermittelte feste Adhäsion und transendotheliale Migration von humanen CD34 $^{+}$ -Stammzellen. [48] Bis jetzt sind verschiedene, sowohl stammzellseitige als auch endothelseitige Moleküle, die zum "Homing" bzw. Adhäsion der Stammzellen beitragen, beschrieben worden (Abb. 4). In dieser Arbeit wird u.a. die Rolle des endothelialen CXCR4-Rezeptors beim "Homing" (Adhäsion und "Rolling") der humanen CD 133 $^{+}$ Stammzellen im knochenmarkfernen Gewebe untersucht.

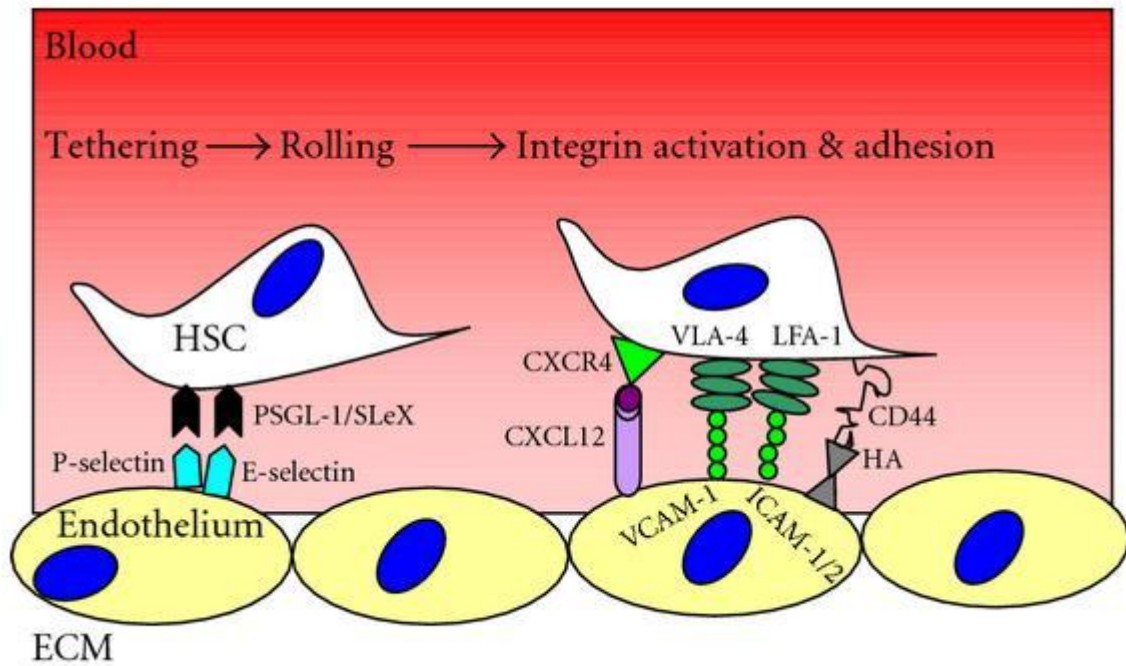


Abb. 4. 4. Moleküle, die die endotheliale Adhäsion der Stammzellen vermitteln
[58]

2. Ziel der Arbeit und Aufgabenstellungen

In dem vorangehenden Text wurde erläutert , dass dem Stammzell -`Homing` eine zentrale Rolle in der regenerativen Medizin zukommt. Das Stammzell -`Homing` stellt ein Gebiet mit vielen unbekanntem Einzelheiten dar. Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung eines Abschnittes des Stammzellhoming-Prozesses. Es werden hierzu `Rolling` und Adhäsion von humanen CD 133⁺ -Stammzellen in knochenmarksfernem Gewebe *in vivo* , unter Beeinflussung von bekannten Stammzellhoming-Faktoren, mit Hilfe der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie, untersucht.

Die Aufgabenstellungen dazu lauten:

1. Untersuchung von endothelialelem `Rolling` und endothelialer Adhäsion der humanen CD 133⁺ Stammzellen *in vivo* im unbehandeltem M.cremaster der Maus.
2. Untersuchung von endothelialelem `Rolling` und endothelialer Adhäsion der humanen CD 133⁺ Stammzellen *in vivo*, mit SDF-1 α behandeltem M.cremaster der Maus.
3. Untersuchung von endothelialelem `Rolling` und endothelialer Adhäsion der humanen CD 133⁺ Stammzellen *in vivo*, mit TNF α behandeltem M.cremaster der Maus.
4. Untersuchung von endothelialelem `Rolling` und endothelialer Adhäsion der humanen CD 133⁺ Stammzellen *in vivo*, mit SDF-1 α und TNF α behandeltem M.cremaster der Maus.
5. Untersuchung der Expression des CXCR4-Rezeptors im Gefäßendothel des M.cremaster und Entwicklung einer neuen, präzisen Methode zur Quantifizierung des CXCR4-Signals.
6. Welchen Parameter des Stammzellhomings beeinflusst die endotheliale CXCR4-Expression ?

3. Material und Methoden

3.1. CD133⁺ - Stammzellisolation

Während des Isolationsverfahrens wurden folgende Materialien verwendet:

- 50 ml- (50ml Leukosep-Röhrchen), 15 ml- und 1ml- Röhrchen
- RPMI 1640 Medium
- Kollagenase B
- DNA -se (I)
- LSM Lymphozyte Separation- Medium, PAA
- MACS Puffer (PBS, 2mM EDTA, 0,5% BSA)
- FCR blocking Reagent (Miltenyi), 100 µL CD 133 MicroBeads (Miltenyi)
- MACS MS/LS Säulen , Pre-Separation Filter
- Sterile 3 ml Serum-Pipette (Greiner)
- Trypan Blau Suspension
- 3% Ethansäure/ Methylenblau (stem cell technologies)

Humane hämatopoetische Stammzellen, charakterisiert durch die Expression des Oberflächenmarkers CD133, wurden mit Hilfe von magnetischen microbead- gekoppelten, monoklonalen anti-CD 133- Antikörpern der Firma Miltenyi Biotec unter Verwendung des MiniMacs Isolations-Sets (Miltenyi Biotec, Deutschland) isoliert. Humane hämatopoetische CD 133⁺ Stammzellen wurden aus dem Knochenmark von Patienten, bei denen ein herzchirurgischer Eingriff durchgeführt wurde, entnommen, nachdem sie aufgeklärt wurden. (Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie Rostock).

Die Menge des Knochenmarks, welches unmittelbar vor der Sternotomie entnommen wurde, betrug durchschnittlich 55 ml. Das entnommene Knochenmark wurde aus den

Spritzen in einem 50 ml Röhrchen gesammelt, gemischt und anschließend wurden je 10 ml in 50 ml Röhrchen pipettiert. Vorab wurde eine 500µl Probe des Knochenmarks für die FACS-Analyse und Zellzählung der TNCs (``total nuclear cells``) im Knochenmark entnommen. Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Kammer. Dazu wurden 10µl einer 1:10 Verdünnung mit PBS und 10 µl Ethansäure/ Methyleneblau gemischt (Endverdünnung 1:20). Zu den 10ml Knochenmarksproben wurden jeweils 6 ml PBS/EDTA 2mM, 20 ml vorgewärmtes RPMI-Medium, 175µl DNase und 175 µl Collagenase hinzupipettiert und anschließend für 30 Minuten schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischenzeitlich wurden Leukosep-Röhrchen für die Dichtezentrifugation mit 15 ml LSM befüllt und das Medium herunterzentrifugiert. Nach der Inkubation wurden die Knochenmarksproben vorsichtig in die Leukosep-Röhrchen überführt und nachfolgend bei 400 G 35 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden etwa 15 ml des Überstandes verworfen und anschließend die weißlich bis klare Monozytenschicht in ein neues 50 ml Röhrchen transferiert. Die Probe wurde mit PBS-Puffer auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt. Aus dieser Probe wurden jeweils 10 µl für eine Trypan-Blau - und eine Ethansäure/ Methyleneblau – Färbung entnommen. Aus der 1:2 Verdünnung wurden MNC (``mononuclear cells``) ``live, dead`` und MNC TNC bestimmt, während die Zellen für 10 Minuten bei 300 G bei RT zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet in 14 ml kaltem MACS-Puffer resuspendiert, in ein 15 ml Röhrchen überführt, für 10 Minuten bei 4°C und RT zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Die Zellen wurden mit 300 µl MACS-Puffer pro 1×10^8 Zellen resuspendiert, wobei das Pelletvolumen abgezogen wurde. Eine 3 µl –Probe der MNCs (1 Mio. Zellen) wurde für die FACS-Analyse entnommen und bei 4°C gelagert.

Es erfolgte die Zugabe von jeweils 100 µl FCR-blocking reagent und CD133⁺ MicroBeads pro 1×10^8 Zellen. Die Zellsuspension wurde für 30 Minuten bei 4°C schüttelnd inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschrift mit kaltem MACS-Puffer (1-2 ml pro 1×10^8 Zellen) und Zentrifugation bei 300g, 10 min, 4°C. Während der Zentrifugation wurden die

Separationssäule und der Filter mit 0,5/3 ml MACS-Puffer equilibriert. Für weniger als 2×10^8 Zellen wurden die MS Säulen verwendet, ansonsten LS Säulen. Nach dem Waschschrift wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in MACS-Puffer resuspendiert (500µl pro 1×10^8 Zellen). Die Zellsuspension wurde anschließend auf die Säule im magnetischen Feld aufgebracht und dreimal mit MACS-Puffer (0,5/3 ml) gewaschen. Während des dritten Waschens wurde eine zweite Säule mit 0,5/3 ml MACS-Puffer equilibriert. Aus der Negativfraktion (erster Durchfluss) wurden zweimal jeweils 500.000 Zellen zur FACS-Kontrolle entnommen. Die Zellfraktion der ersten Säule wurde mit 1/5 ml MACS-Puffer eluiert und direkt auf die zweite Säule aufgebracht. Der erste Durchfluss der zweiten Säule wurde nochmals auf die zweite Säule gegeben und anschließend dreimal mit 0,5/3 ml MACS-Puffer gewaschen. Diese Zellfraktion wurde dann in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß bzw. 15 ml Röhrchen eluiert, bei 300g für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand vorsichtig entfernt. Abschließend wurde das Zellpellet in 100-200 µl MACS-Puffer resuspendiert und eine weitere Zellzählung mit Trypan Blau vorgenommen (1:2 Verdünnung). 30.000 Zellen der Zellsuspension wurden für die FACS-Qualitätskontrolle abgenommen.

3.1.1 Stammzellfärbung

Nach der Isolation der CD 133⁺ Stammzellen erfolgte die Fluoreszenzmarkierung der Zellen. Dafür wurde CFDA (Carboxyfluoreszin – Diazetatester) als Fluoreszenzmarker verwendet.

Zunächst wurde das CFDA-SE Reagent vorbereitet. (1 vial component A + 90 µl component B (DMSO)= 10 mM stock). Danach wurden 10 µM CFDA im PBS Puffer vorbereitet (1µL von 10 mM stock wurde mit dem 999 µL PBS Puffer gemischt). Anschließend wurde die Suspension auf 37 °C aufgewärmt. Die Zellen wurden bei 300 G für

10 Min. zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Im Anschluss wurden die Zellen in CFDA-SE / PBS resuspendiert, danach erfolgte die Inkubation für 15 Min. bei 37 °C. Im Anschluß erfolgte die Zentrifugierung bei 300 G für 10 Min. Während der Zentrifugierung wurden 400 µL StemSpan aufgewärmt und anschließend wurden die Zellen im 400 µL StemSpan aufgenommen nachdem der Überstand verworfen wurde. Die Zellen wurden bei 37 °C für 30 Min. inkubiert . Schließlich wurde die Fluoreszenz unter dem Mikroskop überprüft.

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Nach der letzten Zentrifugation wurde das Zellpellet verworfen und die Zellen wurden in 100 – 200 µL MACS Puffer resuspendiert. Die letzte Zellzählung erfolgte unter Verwendung einer Neubauer Zählkammer. Dafür wurde eine 6 µL- Menge der Zellen mit 6 µL Trypanblau gemischt, um außer lebendigen, auch die Anzahl der toten Zellen zu zählen.

Die Anzahl der isolierten humanen CD133⁺ Stammzellen betrug durchschnittlich $0,802 \times 10^6 \pm 0,141 \times 10^6$.

3.1.3 Durchflusszytometrie (FACS)

Die für die Durchflusszytometrie verwendeten Reagenzien wurden von Miltenyi Biotec (anti-CD133-PE (293C2), anti-CD34-FITC) sowie von BD Biosciences bezogen (anti-CD45-APC-H7, anti-CD44-PerCP-Cy5.5, anti-CXCR4-APC und 7-Aminoactinomycin, 7-AAD).

Die Zellen wurden in Puffer mit 0,5% bovinem Serumalbumin resuspendiert. Um unspezifische Antikörperbindung zu verringern, wurde zu allen Proben FcR blocking-Reagenz (Miltenyi Biotec) gegeben. Die Zellen wurden für 10 Min. bei 4°C lichtgeschützt mit den Antikörpern inkubiert und am LSR-II-Durchflusszytometer mit Hilfe der FACSDiva-

Software (beides Becton Dickinson, CA USA) analysiert. Die Kompensation wurde mit Hilfe von Einzelfärbungen erstellt, das ``Gating`` nach passenden Isotyp/``Fluorescence minus one`` (FMO)-Kontrollen festgelegt. Zur Qualitätskontrolle der CD133-positiven Zellen wurde eine auf booleschen Operationen basierte ``Gating``-Strategie verwendet, die sich an den ISHAGE-Richtlinien zur Ermittlung der Zahl CD34-positiver Zellen orientiert.

3.2. Tiermodell

3.2.1. Versuchsaufbau

Das Homingverhalten von CD 133⁺ Stammzellen wurde mit Hilfe intravitaler Fluoreszenzmikroskopie in der Mikrozirkulation des M. cremaster der Maus untersucht. Dabei wurde die Interaktion akut arteriell injizierter CD 133⁺ humanen Stammzellen mit Endothelzellen beobachtet. Zunächst wurden humane CD 133⁺ Stammzellen in knochenmarksfernem Gewebe (M. cremaster) ohne Behandlung des M. cremaster untersucht, eine Situation, welche ständig im Organismus vorkommt. Als nächstes wurde eine Situation mittels SDF-1 α stimuliert, welche normalerweise im Knochenmark zu finden ist und bei erhöhtem Bedarf auch in einem peripheren Organ, z.B. im ischämischen Myokard, vermehrt exprimiert bzw sezerniert wird. Weiterhin wurde die Interaktion zwischen den humanen CD133⁺ Stammzellen und Endothelzellen untersucht, nachdem der M.cremaster mit einer Kombination von SDF-1 α + TNF α superfundiert wurde, eine Situation die ähnlich wie bei entzündlichen, hypoxischen oder ischämischen Prozessen, die z.B. in Rahmen eines Myokardinfarktes zu finden ist. Des weiteren wurde eine alleinige Stimulation mit TNF α durchgeführt.

Zur Quantifizierung des Stammzellhomings unter den o.g. Umgebungsbedingungen wurden zwei Hauptschritte der transendothelialen Migration untersucht : Das endotheliale ``Rolling`` und die feste endotheliale Adhäsion.

3.2.2. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Mäuse der Linie C.B. – 17 Icr- Prkdc^{scid} / IcrIco CrI (Kurzbezeichnung : SCID Mäuse) verwendet. Begutachtet und genehmigt wurde die Versuchsdurchführung von den lokalen Behörden. (Aktenzeichen 7221.3-1.1-021/11). Die SCID- Mäuse wurden in der zentralen Tierhaltung am Institut für Experimentelle Chirurgie (Universität Rostock) unter standardisierten Bedingungen, die den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes entsprechen (Raumtemperatur + 20°C , relative Luftfeuchtigkeit 55%, Tag-/ Nacht- Rhythmus 12 Stunden durch Kunstlicht bei 300 Lux und bei freiem Zugang zu Trockenfutter und Wasser) gehalten. Zum Zeitpunkt der Versuche wogen die Tiere zwischen 16-24 g und waren 4- 12 Wochen alt.

3.2.2.1. Hintergrund der SCID-Mäuse

Im Jahr 1983 wurde erstmals von Bosma und Mitarbeitern [74] die SCID-Mutation der Maus (severe combined immunodeficiency) beschrieben, ein autosomal-rezessiver Defekt, der auf dem zentromeren Ende des Chromosoms 16 liegt.

Diese homozygote Mutation entspricht einem Defekt des VDJ (`` variable diversity joining``)

– Rekombinase – Systems ohne funktionelle coding joints und führt zu einem fehlenden Gen – Rearrangement von funktionellen Antigen- Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Lymphozyten-Vorläufer-Zellen. Hierdurch kommt es bei den T-Zell-Vorläufern zu einem fehlenden bzw. gestörten Rearrangement der alpha/beta- bzw. gamma/delta-Kette des T-Zell-Rezeptors (TCR) und bei den B-Zell-Vorläufern zu einem Fehlen zellgebundener Immunoglobuline. Dies führt zu einer Entwicklung, wobei reife und funktionsfähige T- und B-Lymphozyten fehlen.[75] SCID-Mäuse sind pathologisch-anatomisch gekennzeichnet durch eine periphere Leukopenie mit relativer Granulozytose, Hypo- bzw. Agammaglobulinämie, Thymushypoplasie, kleiner Milz, kleiner Lymphknoten und normalem Knochenmark.

Die SCID-Maus besitzt also aufgrund des Fehlens eines spezifischen Immunsystems eine Immuntoleranz gegenüber allogenen sowie xenogenen Zellen und Geweben da ihr die Antigen –Rezeptoren zu deren Erkennung fehlen. Dies führte zu der Idee, die SCID-Maus mit humanen Zellen zu rekonstituieren und als in-vivo –Modell zu benutzen.

Neben dem Transfer von humanen Tumoren und in-vivo Untersuchung des humanen Immunsystems werden SCID-Mäuse in letzter Zeit auch im Rahmen der Forschung an humanen Stammzellen benutzt.

3.2.3 Der chirurgische Eingriff

3.2.3.1 Materialien

OP-Mikroskop Leica M 651

OP-Tisch (Hitzplatte) HI 1220

Plexiglas

Mikroschere

OC 498 R

Aesculap®

Katheter Protex non sterile Polythen Tubing 0,28 mm ID, SIMS Portex, UK

Gewebeklemmen WDT 27066 und BH 1 08 R 35 GGS Aesculap®

Zwei Mikropinzetten FD 285 Aesculap®

Schere (gebogen) ABTS 1027 HH

Kauter Acu. Dispo Cautery DCFT 2

Nadelhalter BM 002 R DOO 3G

Spritzen OMNIFIX-F 1ml

Faden PROLENE EH 7406 H 6-0 75cm ETHICON und

Polyester –S grün USP 5/0 1x 400 cm

3.2.3.2 Narkose und Kanülierung der linken Arteria femoralis

Die Versuchstiere wurden mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin (Ketanest) 75mg/kg und Xylazin (Rompun) 25 mg/kg anästhesiert. Die Operation wurde ohne Beatmung durchgeführt und zur Sicherung der Spontanatmung wurde die Zunge luxiert. Vor dem Beginn der OP wurden der linke Oberschenkel und das rechte Scrotum rasiert und anschließend wurden die Versuchstiere auf einem Präparationstisch aus durchsichtigem Plexiglas in Rückenlage fixiert.

Zunächst wurde die A. femoralis präpariert. Die Haut der Inguinalregion und der Oberschenkel wurde entfernt, um die A.femoralis darzustellen.



Abb.5. Kanülierung der A. femoralis

Um eine Blutleere im Gefäß herzustellen, wurde die A. femoralis mit Hilfe eines Ligaturfadens distal ligiert und proximal durch einen vorgelegten Knoten suspendiert und abgeknickt. Anschließend wurde die A. femoralis inzidiert, der Katheter (Protex non sterile PolythenTubing 0,28 mm ID, SIMS Portex, UK) eingeführt und mit dem vorgelegten Knoten fixiert. Anschließend wurde der M.cremaster präpariert. Während der Präparation des Muskels wurde der Katheter mehrmals mit Hilfe der NaCl-Lösung abgespült, um eine Verstopfung des Katheters zu verhindern.

3.2.3.3 Chirurgische Präparation des M. cremaster

Die chirurgische Präparation des M.cremaster erfolgte unter Verwendung des

Operationsmikroskops mit kleineren Modifikationen nach der Erstbeschreibung von Baez 1973. Nach Induktion der Narkose und retrograder Kanülierung der linken A.femoralis wurde die Haut des Scrotums von seiner Spitze längs inzidiert. Die Inzision wurde von der Scrotumbasis nach lateral zur Spina iliaca anterior superior fortgesetzt, und die darunter liegende Muskelfaszie abpräpariert. An der Spitze des freiliegenden Muskelsacks wurde ein atraumatischer Faden (Prolen 6-0 Ethicon) fixiert, über den der Cremastermuskel senkrecht aufgespannt wurde, um anhaftende Bindegewebsreste zu lösen und den Muskel zu mobilisieren.

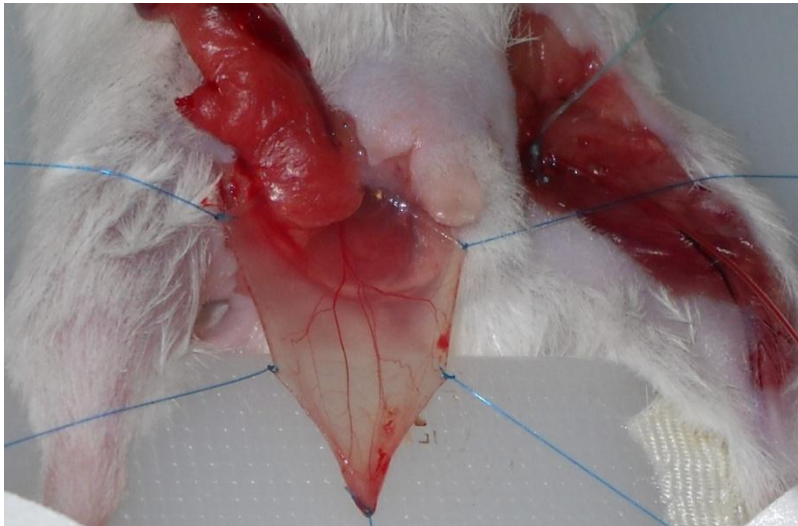


Abb.6. Präparierter M. cremaster

Mit der Mikroschere wurde der aufgespannte Muskelsack, unter größtmöglicher Schonung der Gefäßarkaden vom proximalen Pol bis zu seiner Spitze eröffnet. Die Trennung der Nebenhoden und Hoden vom M.cremaster, die nach oben und lateral abgelegt wurden, erfolgte, nachdem die A. und V. epididymis mit Hilfe des Thermokauters koaguliert wurden sowie das zwischenliegende Bindegewebe mit Hilfe der Mikroschere gelöst wurde. Der M.cremaster wurde danach durch weitere vier Nähte an den Rändern fixiert, wodurch er

ausgespannt wurde. Während der chirurgischen Präparation, sowie im gesamten Versuchsverlauf wurde der Muskel mit warmer (37°C) Salzlösung superfundiert.

3.3 Intravitalmikroskopie

3.3.1 IVM Grundlagen

Der Hintergrund des Fluoreszenzmikroskops beruht auf dem physikalischen Effekt der Fluoreszenz. Bestimmte Moleküle, sogenannte Fluorophore absorbieren Licht einer bestimmten Wellenlänge und emittieren dann Licht einer anderen (längerwelligen) Wellenlänge. Die Verwendung von Fluoreszenzmarkierungen ermöglicht die Lokalisierung bestimmter Bestandteile komplexer biomolekularer Strukturen, inklusive von Endothelzellen bzw. kleiner Gefäße und Stammzellen. Die Lichtquelle des Mikroskops liefern Licht, das Wellenlängen aus dem gesamten Lichtspektrum enthält. Dieses Licht wird anhand eines dichromatischen Spiegels in seine Spektralfarben zerlegt. Der Anregungsfilter sorgt dafür, dass nur die für die Anregung einer bestimmten Wellenlänge (z.B. blaues Licht) nötige Farbe hindurch geht. Dieses nahezu einfarbige Licht erreicht das Präparat und regt die Fluoreszenz an, sodass Licht einer größeren Wellenlänge (in diesem Fall grünes Licht) emittiert wird. Der Lichtstrom fließt anschließend durch den Sperrfilter, der nur das durch das Präparat emittierte längerwellige Fluoreszenz- Licht durchlässt, und das noch vorhandene blaue Anregungslicht absorbiert. Schließlich kommt es zur Entstehung des Bildes, wobei Objektdetails in der Farbe des entsprechenden Fluoreszenzlichtes auf dunklem Hintergrund erscheinen. [76]

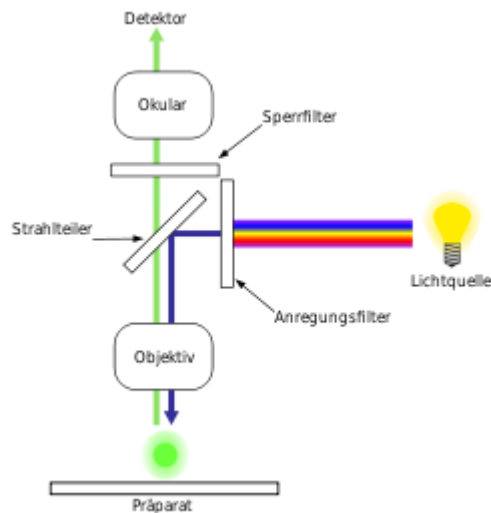


Abb.7. Funktionsschema eines Fluoreszenzmikroskops

3.3.2 Aufbau des IVM

Die intravitalmikroskopischen Versuche wurden im Institut für experimentelle Chirurgie der Universität Rostock durchgeführt. Ein Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Axiotech Vario, Zeiss, Deutschland) wurde für die Versuche verwendet. Die Versuche wurden mit einem Wasserimmersionsobjektiv (20 x 0,5 W, Archoplan Zeiss, Deutschland) durchgeführt. (zur Beobachtung des ``Rollings`` und der Adhäsion der CD 133⁺ Stammzellen 20- fache Vergrößerung; zur Durchmusterung des gesamten Gefäßsystems des M. cremaster wurde eine 10-fache Vergrößerung verwendet). Im Lichtgang ist eine Schwarzweiß- Kamera (FK 6990 IQ-S, Piper, Schwerte, Deutschland), mit deren Hilfe die dargestellten Bildelemente auf einen Monitor übertragen wurden, angeschlossen. Eine 100 Watt HBO-Quecksilberlampe diente als Anregungslichtquelle.

Die Zeitkodierung wurde mit einem Videozeitgenerator visualisiert (VTG -33 For-A Japan), der an einen Videorekorder (S-VHS Panasonic AG 7350-E Matsushita, Tokio, Japan) angeschlossen ist. Das Signal wurde online computerunterstützt über den Bildschirm

dargestellt und auf VHS- Videokassetten zur späteren ``offline``-Auswertung aufgenommen. Für die Darstellung, der mit CFDA gefärbten CD 133⁺ SZ wurde ein Anregungsfilter (450-490 nm) , sowie ein Sperrfilter (520 nm, Anregungsbereich blau) verwendet.

3.3.2.1 Rhodamin 6G als Fluoreszenzfarbstoff

Zur Visualisierung des Gefäßsystems wurde Rhodamin 6G verwendet. Dabei handelt es sich um einen kationischen, lipophilen Marker, der sich bei intravenöser Applikation in den Zellkernen und Mitochondrien von Leukozyten akkumuliert. Rhodamin 6G markiert Granulozyten und Monozyten. Gleichzeitig akkumuliert Rhodamin 6G sich in den Thrombozyten und Endothelzellen [24]. In unserem Fall diente Rhodamin 6G zur Darstellung der Blutgefäße, denn Endothelzellen weisen keine ausreichende Fluoreszenz auf. Rhodamin 6G wurde durch den Katheter in die A. femoralis als Bolus von 0,05 mL appliziert, nachdem der M.cremaster präpariert war.

3.3.2.2 Mikrozirkulatorische Parameter

Im Folgenden werden die intravitalmikroskopisch erhobenen Parameter beschrieben.

Venolendurchmesser. –

In den postkapillären Venolen, wo die Untersuchung durchgeführt wurde, wurde der Durchmesser der Venolen mit dem Programm CapImage gemessen. Hierzu wurde an 3 Stellen der Gefäßdurchmesser (das Lumen) als Einzelwert gemessen und als Mittelwert in µm notiert. Die Länge der jeweiligen Gefäßabschnitte wurde als Einzelwert gemessen und in µm notiert.

Blutfließgeschwindigkeit .-

Die Blutfließgeschwindigkeit in den postkapillären Venolen wurde unter Zuhilfenahme der Software CaplImage berechnet. Hierzu wurde die ``Line-Shift-Diagram``- Methode herangezogen und die *Blutfließgeschwindigkeit* in mm/s angegeben.

Das Programm ``CaplImage`` ermöglichte es in Echtzeit Gefäßdurchmesser-, Gefäßlängen- und Flußgeschwindigkeitsmessungen durchzuführen.

Rollingsgeschwindigkeit.-

Die Geschwindigkeit des ``Rollings`` wurde ebenso mit Hilfe von CaplImage ausgewertet. Hierbei wurden je 60 rollenden CD 133⁺ SZ von allen Versuchsgruppen in µm/s bewertet. Die Geschwindigkeit des ``Rollings`` wurde als Länge (Strecke) des ``Rollings`` durch die Zeit gerechnet (µm/s) mit der Formel $V=S/t$, wobei S – der Rollingstrecke und t – diesem Zeitraum entspricht.

3.4 Versuchsgruppen

Das ``Rolling`` und die feste endotheliale Adhäsion von humanen CD133⁺ Stammzellen wurden in vier Gruppen von SCID-Mäusen, mit jeweils 6 Tieren pro Gruppe, untersucht.

In der ersten Gruppe wurden das ``Rolling`` und die feste endotheliale Adhäsion im M. cremaster der unbehandelten Mäuse beobachtet (Kontrollgruppe).

Die zweite Gruppe wurde durchgeführt, um den Einfluss des bekannten Stammzellfaktors SDF-1 α zu untersuchen. Hierzu wurde der M.cremaster mit SDF-1 α superfundiert.

Die dritte Gruppe wurde durchgeführt, um den Einfluss des bekannten Entzündungsfaktors

TNF α zu untersuchen. Hierzu wurde der M.cremaster mit TNF α superfundiert.

In einer weitere Gruppe wurde schließlich der Einfluß einer kombinierten Applikation von SDF-1 α und TNF α untersucht.

Versuchsgruppe	Empfänger	Spender	M.cremaster	Anzahl Tiere
Kontrolle	SCID-Maus	Mensch	0.9% NaCl	6
SDF-1 α	SCID-Maus	Mensch	SDF-1 α	6
TNF α	SCID-Maus	Mensch	TNF α	5
SDF-1 α /TNF α	SCID-Maus	Mensch	SDF-1 α /TNF α	6

Tab. 1. Übersicht Versuchsgruppen

3.5 Versuchsablauf

Nach der Operation wurde zunächst die Mikrozirkulation unter dem Intravitalmikroskop dargestellt, und es wurden nach dem Zufallsprinzip 5-8 postkapilläre Venolen bestimmt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Gefäßdurchmesser der ausgewählten Venolen

unterschiedlich waren. Die Durchmesser betragen somit zwischen 20 und 140 µm. In den Versuchsgruppen, wo eine Stimulation mit SDF-1α, TNFα bzw. SDF-1α + TNFα stattfand, wurde der Muskel mit diesen Mediatoren vorbehandelt (superfundiert), 15 Min. bevor die humanen CD133⁺ Stammzellen durch den, in der linken A. femoralis liegenden Katheter injiziert wurden. In der Kontrollgruppe wurde der Muskel mit 0,9% NaCl behandelt. Die Konzentration von SDF-1α war 200 ng/ml, während die Menge an appliziertem TNFα 2000 U betrug (beide Substanzen wurden im 0,9%NaCl gelöst). Die Applikation der Stammzellen erfolgte durch 5 Einzelinjektionen der isolierten CD133⁺ Stammzellen.

Das ``Rolling`` wurde im Anschluss an jede Injektion in vorher ausgewählte Venolen beobachtet. Hierbei wurde die Anzahl aller passierten Stammzellen (für 1 Minute) gezählt und die Fraktion der rollenden Stammzellen als Prozentsatz quantifiziert.

- *``Rolling`` (vorübergehende Adhäsion): Alle in der Beobachtung eines Gefäßquerschnitts erkennbaren CD 133⁺ Stammzellen, die sich sichtbar an der Gefäßwand rollend bzw. in direktem Kontakt hierzu fortbewegen und weniger als 30 Sekunden adhären sind, wurden als rollende Stammzellen definiert.*
- Die Anzahl fest haftender (adhärente) CD133⁺ Stammzellen wurden 20-25 Minuten nach der letzten Zelinjektion bestimmt. Die Anzahl adhärenter CD 133⁺ Stammzellen wurde als Zellzahl pro mm² quantifiziert.
- *Feste endotheliale Adhäsion: Alle in der Beobachtung eines Gefäßquerschnitts erkennbaren CD 133⁺ Stammzellen, die sich während einer Beobachtungszeit von 30 Sekunden nicht fortbewegen und dabei als am Gefäßendothel haftend zu identifizieren sind, wurden als adhären definiert.*

3.6 Fluoreszenzimmunohistochemie

3.6.1 Gewebeschnitte

Nach der intravitalmikroskopischen Untersuchung wurde der M. cremaster entnommen, mit Tissue Tek eingebettet, anschließend in Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Zur Detektion von CXCR4 in den Endothelzellen des M. cremaster wurde das Gewebe mit Hilfe eines Mikrotoms in 7 µm dicke Schnitte, bei einer Kammertemperatur von -23°C; geschnitten. Anschließend wurden je 2 Schnitte auf einen Objektträger aufgenommen. Die für Immunfärbung angefertigten Gewebeschnitte wurden bei -20 °C gelagert.

3.6.2 Grundlagen der Immunfärbung

Bei der Fluoreszenzimmunohistochemie wird ein bestimmtes Protein mit Hilfe eines spezifischen primären Antikörpers, an dessen Fc-Abschnitt ein sekundärer Antikörper bindet, der mit einem fluoreszierenden Agens gekoppelt ist, detektiert. So können die Strukturen wie z.B. CXCR4 unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

3.6.3 Immunfärbung des M.cremaster

Die Gewebeschnitte wurden zunächst für 5 Min. gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 20 Min. in 4% (PFA) Paraformaldehyd fixiert. Um das Formalin zu entfernen und die Rezeptorbindungsstellen zu befreien, wurden die Gewebeschnitte fünf Mal für jeweils 5,15,5,5,5 Min. gewaschen. Anschließend wurden sie mit einem DAKO PEN eingekreist um die Positiv- und Negativkontrolle getrennt zu behandeln (mit primärem Antikörper bzw. ohne primären Antikörper). Anschließend wurden die Schnitte für 30 Min. mit Protein Blocking-Reagenz (DAKO) inkubiert, um Proteinbindungsstellen die eine spezifische Bindung imitieren können, zu blockieren und damit falsche Signale zu vermeiden.

Zur Detektion von CXCR4 wurde ein primärer Antikörper (Rat anti Mouse CD184(CXCR4) Clone 2B11, eBioscience) in einer Konzentration von 1:100 verwendet. Die Antikörper-Verdünnung erfolgte mit dem Antibody dilution –Reagenz (eBioscience), von dessen Lösung je 50 µl auf jeden Schnitt aufgebracht wurden. Anschließend wurden die Gewebeschnitte in einer Feuchtkammer bei 4 °C, über Nacht inkubiert. Am zweiten Tag wurden die Schnitte zunächst 5x5 Min. in der PBS-Kammer, schüttelnd gewaschen bevor sie mit dem sekundären Antikörper (donkey anti rat IgG, Molecular Probes ALEXA Fluor 488) für 4 Stunden, in Dunkelheit bei 22°C inkubiert wurden. Die Konzentration von sekundären Antikörpern betrug 1:1000. Nach der Inkubationszeit erfolgte das Waschen der Schnitte 8x5 Min., schüttelnd in der PBS-Kammer. Danach wurden die Gewebeschnitte zur Zellkernfärbung mit DAPI (4,6-Diamidin-2 phenylindol-dihydrochlorid) für 10 Min. in einer Konzentration von 1:20000 inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 3x5 Min. gewaschen und zum Schluß erfolgte die Einbettung (Fluor Save, Calbiochem) und Abdeckung. Bei den Negativkontrollen wurde bei der Inkubation auf primäre Antikörper verzichtet.

3.6.4 Quantifizierung des CXCR4-Signals

Die ``Laser Scanning`` Mikroskopie (LSM) ist eine weit verbreitete Technik, die serielle optische Schnitte von Gewebeprobe, zur Verfügung stellt. Zur Visualisierung einzelner Strukturen werden Fluoreszenzfärbungen verwendet.

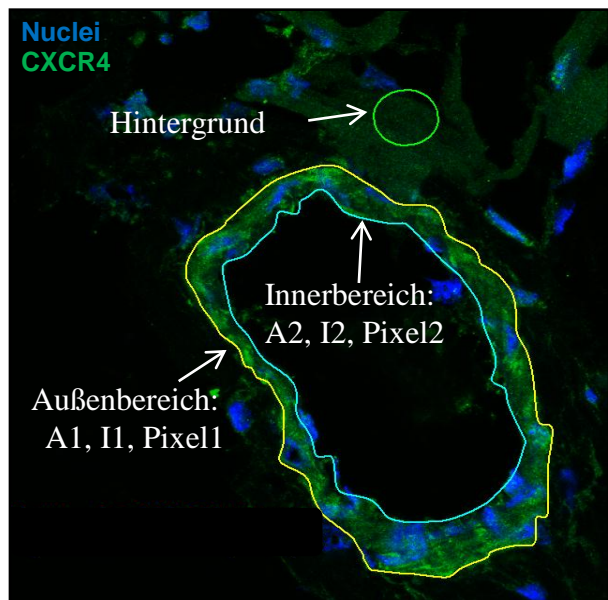
Die letzten Generationen von konfokalen Mikroskopen werden mit empfindlichen Detektoren geliefert und bieten eine Auflösung von bis zu 200 nm, womit weitere Details sichtbar gemacht werden können. Diese Funktionen ermöglichen es uns, LSM nicht nur für die Bildgebung und qualitative Analyse zu verwenden, sondern auch um quantitative Aussagen zu treffen. Zur Visualisierung und weiteren CXCR4 – Signalintensität-Quantifizierung der vorbereiteten Proben wurde das **LSM 780 ELYRA PS.1** Mikroskop (Carl

Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet.

Im LSM-Modus wurde Alexa Fluor mit einem 488 nm-Laser angeregt und mit dem 510 bis 550 nm Filter (Main dichoric beam splitter (MBS) 488) aufgenommen. Die Anregung von DAPI erfolgte mit einem 405 nm-Laser und wurde mit 415 bis 470 nm Sperrfilter (MBS 405) aufgenommen.

Alle Experimente wurden unter Verwendung eines 63x-Plan Apochromatobjektives (numerische Apertur (NA) = 1.4) mit Immersionsöl (Immersol™ 518F, Carl Zeiss) durchgeführt. Die Aufnahmeeinstellungen wurden nach initialer Etablierung für alle analysierten Proben konstant gehalten. (Tab. 2.)

	Channel 1 (Nuclei)	Channel 2 (CXCR4)
Laser line	405 nm	488 nm
MBS	405	488
Laser power	0.1 mW	0.675 mW
Gain	791	720
Offset	18	21
Pinhole	70 µm	72 µm



Tab. 2. LSM Akquisitionseinstellungen

Abb.8. Definierte Elemente der Intensität-Analyse

Die Bilder wurden als sogenannte ``z-Stacks``, bestehend aus 6 optischen Schnitten, (1µm) generiert. Danach wurden die ``Maximum Intensity Projections`` der ``z-Stacks`` gebildet und mit Hilfe der ``Histogramm view ZEN 2010D Software`` (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) analysiert. Die CXCR4-Expression wurde in Bezug auf die Intensität des Alexa Fluor 488-Signals analysiert.

Das Mikroskop führte nach der Definition von Elementen wie Hintergrund, Innenbereich, Außenbereich (siehe Abb. 8) automatisch die Berechnung folgender Werte durch: Pixel, den Perimeter und die Oberflächen sowie den Mittelwert der Signalintensität der oben genannten Oberflächen. Der Pixel, der als Quadrat oder Bildpunkt mit einer konstanten Oberfläche am Monitor erschien, weist dabei jeweils eine unterschiedliche Intensität in Abhängigkeit von der Stärke des Signals auf. Um eine totale Intensität der Oberfläche des Endothels zu erheben, wurde die durchschnittliche Intensität mit der Anzahl des Pixels multipliziert. Da wir nur die Intensität von der Endotheloberfläche ausrechnen wollten, haben wir von der gesamten Oberfläche des Gefäßes die Lumenoberfläche abgezogen. Wegen der unterschiedlichen Gefäßgrößen mit unterschiedlichen Endotheloberflächen wurde die totale Intensität immer durch eigene Oberfläche geteilt. Um ein reines Signal auszurechnen, wurde immer der gleiche Hintergrundwert, der sogenannte ``Threshold`` - Wert, (bis zu einer bestimmten Anzahl von Pixeln) vom Bild abgezogen.

Die Formel, mit der die totale Intensität pro μm^2 des CXCR4-Signals ausgerechnet wurde lautet:

$$\text{Intensität}/\mu\text{m}^2 = \frac{(\mathbf{I1} * \mathbf{Pixel1}) - (\mathbf{I2} * \mathbf{Pixel2})}{\mathbf{O1} - \mathbf{O2}}$$

O1 – Die Oberfläche (μm^2), definiert durch die äußere Grenze des Endothels

O2 - Die Oberfläche (μm^2) , definiert durch die innere Grenze des Endothels

I1 - Mittlere Intensität der Oberfläche 1

I2 - Mittlere Intensität der Oberfläche 2

Pixel 1 - Gesamtzahl der Pixel in der Oberfläche 1

Pixel 2 - Gesamtzahl der Pixel in der Oberfläche 2

LSM-Bilder wurden - wie oben beschrieben – von 15 verschiedenen Gefäßen von je 4 Mäusen pro Gruppe gesammelt und analysiert.

3.7 Statistik und Auswertung

Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe des t-tests des SigmaPlot 11-Programms durchgeführt. Ein p-Wert von <0.05 wurde als statistisch signifikant erachtet.

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der FACS-Analyse von isolierten humanen CD 133⁺ Stammzellen aus dem Knochenmark

Die FACS-Analysen der isolierten und in vivo verwendeten CD133⁺ Stammzellen, die zur Bestimmung des Viabilität- und Reinheitsgrades durchgeführt worden waren, zeigten eine Reinheit der humanen CD 133⁺ SZ von $82,85 \pm 2,33$ % und Viabilität von $94,61 \pm 1,54$ %.

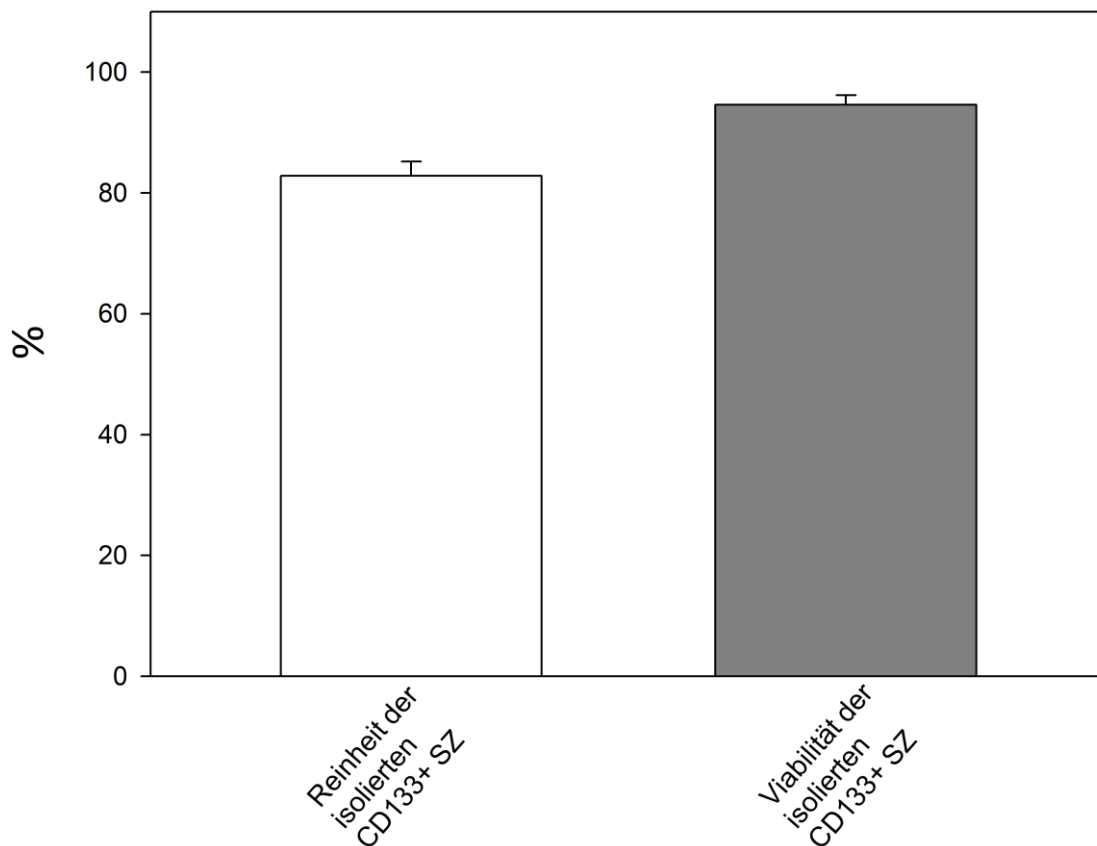


Abb. 9. Darstellung der FACS-Analyse zur Bestimmung des Reinheits- und Viabilitätsgrades der isolierten humanen CD 133⁺ Stammzellen.

4.2 Mikrozirkulatorische Ergebnisse

Die mit dem CapImage erhobenen mikrozirkulatorischen Parameter im postkapillären Bereich des M. cremaster zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Versuchsgruppen	Gefäßdurchmesser (μm)	Gefäßlänge (μm)	Blutflussgeschwindigkeit (mm/s)	Scherkraft (s^{-1})
Kontrolle	73,96 \pm 3,85	626,28 \pm 14,01	0,349 \pm 0,02	24 \pm 7
SDF-1 α	73,45 \pm 3,05	570,61 \pm 14,4	0,411 \pm 0,02	29 \pm 5
TNF α	65,08 \pm 4,74	603 \pm 32	0,429 \pm 0,02	33 \pm 8
SDF-1 α /TNF α	63,76 \pm 3,27	526,64 \pm 14,63	0,339 \pm 0,01	26 \pm 5

Tab. 3. Darstellung der erhobenen hämodynamischen Parameter im Bereich der Mikrozirkulation des M. cremaster.

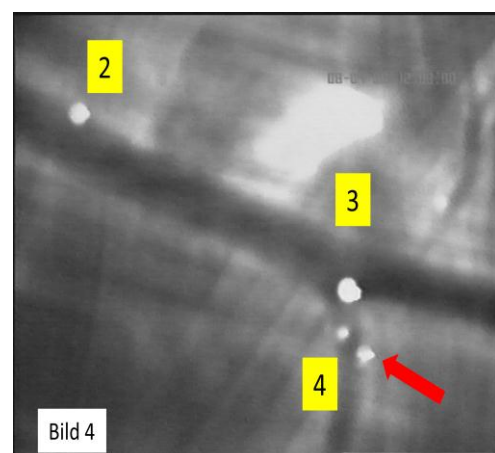
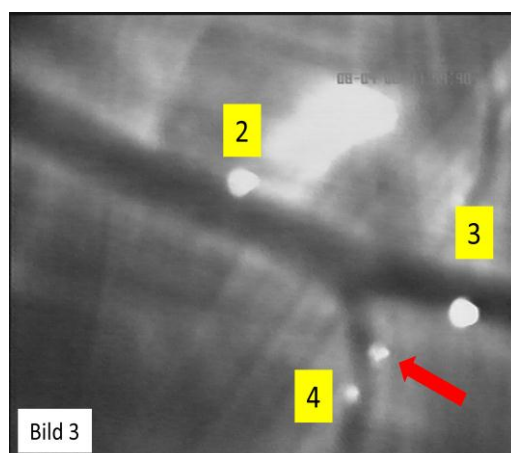
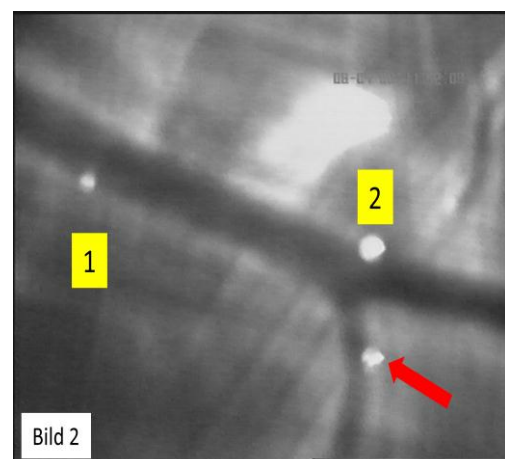
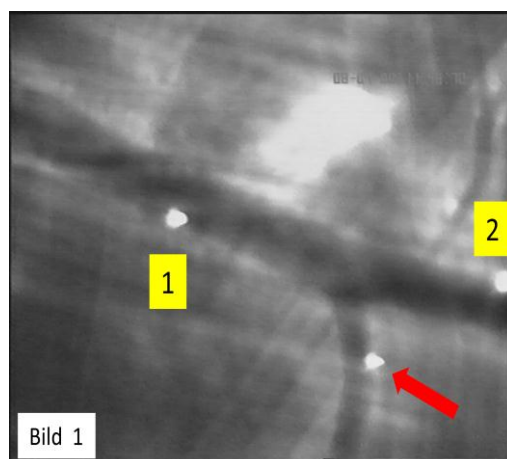
4.3 ``Rolling``-Analyse als Stammzellhoming- Parameter

4.3.1 ``Rolling`` in der Kontrollgruppe

Das ``Rolling`` fand in postkapillären Venolen des M.cremaster statt. Der Anteil der rollenden, humanen CD 133⁺ Stammzellen, betrug nach akutem arteriellen Bolus in der Kontrollgruppe $20,42 \pm 3,52 \%$.

4.3.2 ``Rolling`` in der SDF-1 α Gruppe

In dem, mit SDF-1 α behandelten Muskel, war nach der Bolus- Applikation der CD133⁺ Stammzellen eine deutliche Erhöhung des Anteils rollender CD 133⁺ Stammzellen in den postkapillären Venolen zu verzeichnen.



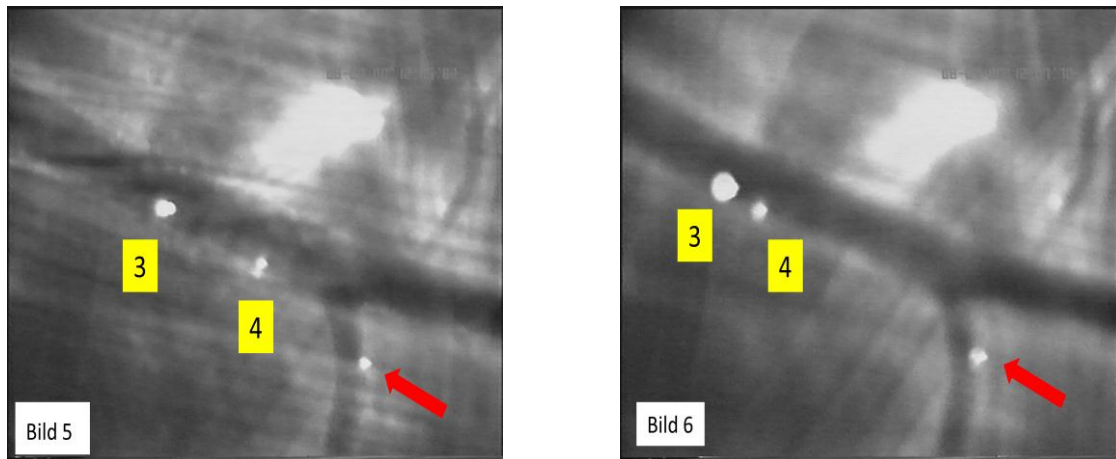


Abb.10. Bildmaterial aus den intravitalmikroskopischen Untersuchungen der SDF-1 α - Gruppe, wobei mehrere (4), sowohl rollende als auch adh rente (roter Pfeil) CD133⁺ Stammzellen, dargestellt sind. 20xVergr o erung.

Dieser Anteil war im Vergleich zu der Kontrollgruppe mehr als doppelt so groß und betrug $45,47 \pm 2,57$ % in ``SDF-1 α `` vs. $20,42 \pm 3,52$ % in ``Kontrolle``, $p < 0,001$.

4.3.3 ``Rolling`` in der TNF α -Gruppe

Nach Behandlung des M. cremaster mit TNF α wurde kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu der Kontrollgruppe gemessen. ($25,55 \pm 2,1$ % in ``TNF α `` vs $20,42 \pm 3,52$ % in ``Kontrolle``, $p=0,26$).

4.3.4 ``Rolling`` in der SDF-1 α /TNF α Gruppe

Bei der SDF-1 α /TNF α - Versuchsgruppe wurde ebenso eine signifikante Erhöhung des ``Rollings`` im Vergleich zu der Kontrollgruppe detektiert. Es wurde jedoch kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu der SDF-1 α - Gruppe beobachtet. Der Anteil der rollenden

CD133⁺ SZ betrug $42,72 \pm 5,08$ % in `` SDF-1 α /TNF α `` vs $20,42 \pm 3,52$ % in ``Kontrolle``,
p=0,005.

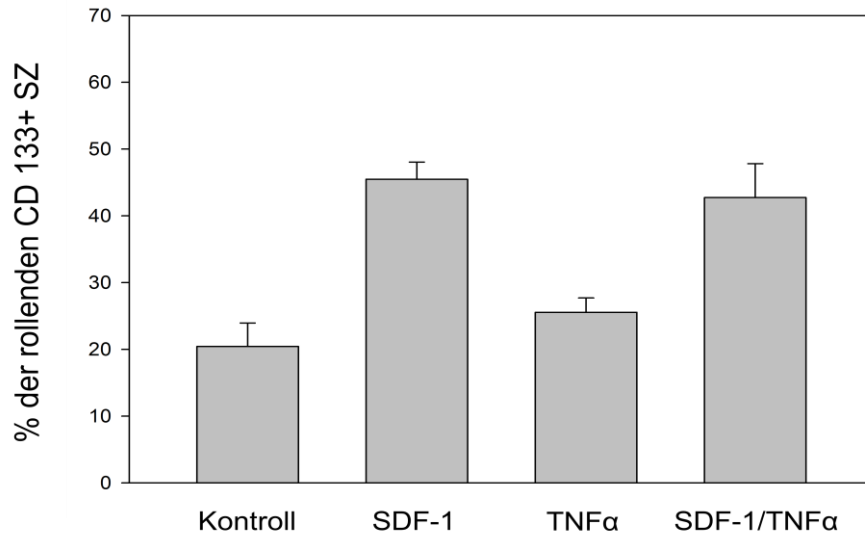


Abb.11. Darstellung des Prozentsatzes der rollenden CD133⁺ Stammzellen in den vier Versuchsgruppen.

4.4 ``Rolling`` als variabler Parameter

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten intravitalmikroskopischen Untersuchungen boten HinweiÙe, dass das ``Rolling`` als ein wichtiger Schritt des Stammzellhomings nicht nur ein Prozess ist, der stets in konstanter Form abläuft, sondern dass dieser Prozess in seiner Ausprägung variabel sein kann. Hierzu wurde die Geschwindigkeit des ``Rollings`` beobachtet und quantifiziert.

4.4.1 Geschwindigkeit des ``Rollings`` in der Kontrollgruppe

In den postkapillären Venolen des unbehandelten M.cremaster wurde eine umgehende, schnelle Interaktion zwischen den Stammzellen und den Endothelzellen beobachtet. Die Geschwindigkeit des ``Rollings`` in der Kontrollgruppe betrug $102,15 \pm 11,68 \mu\text{m/s}$.

4.4.2 Geschwindigkeit des ``Rollings`` in der SDF-1 α Gruppe

Die Geschwindigkeit des ``Rollings`` betrug in dieser Gruppe $47,29 \pm 3,76 \mu\text{m/s}$, und war damit signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ($47,29 \pm 3,76 \mu\text{m/s}$ in ``SDF-1 α `` vs. $102,15 \pm 11,68 \mu\text{m/s}$ in ``Kontrolle`` $p < 0,001$).

4.4.3 Geschwindigkeit des ``Rollings`` in der SDF-1 α /TNF α - Gruppe

Die Geschwindigkeit des ``Rollings``, die in dieser Versuchsgruppe gemessen wurde, zeigte noch niedrigere Werte als bei der SDF-1 α - Gruppe. Die Geschwindigkeit betrug $31,12 \pm 2,13 \mu\text{m/s}$. ($31,12 \pm 2,13 \mu\text{m/s}$ in ``SDF-1 α +TNF α `` vs. $102,15 \pm 11,68 \mu\text{m/s}$ in ``Kontrolle`` $p < 0,001$).

4.4.4 Geschwindigkeit des ``Rollings`` in der TNF α - Gruppe

Die Geschwindigkeit des ``Rollings``, die in dieser Versuchsgruppe gemessen wurde, zeigte noch niedrigere Werte als bei der SDF-1 α / TNF α - Gruppe. Die Geschwindigkeit des ``Rollings`` betrug $27,50 \pm 2,24 \mu\text{m/s}$, ($27,50 \pm 2,24 \mu\text{m/s}$ in ``TNF- α `` vs $102,15 \pm 11,68 \mu\text{m/s}$ in ``Kontrolle`` $p < 0,001$).

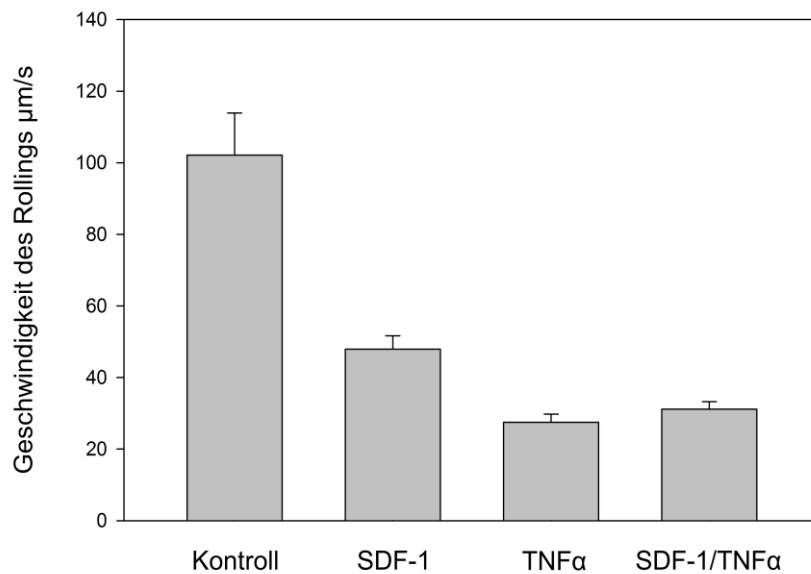


Abb.12. Darstellung der unterschiedlichen Rollingsgeschwindigkeitswerte in den vier Versuchsgruppen

4.5 Adhäsion-Analyse als Stammzellhoming- Parameter

4.5.1 Adhäsion in der Kontrollgruppe

Die Adhäsion der humanen CD133⁺ Stammzellen fand in den postkapillären Venolen des Gefäßsystemsystems statt.. In der Kontrollgruppe war die Stammzelladhäsion, am Endothel nur sehr gering ausgeprägt. Die Anzahl der adhärenenten CD 133⁺ humanen Stammzellen am Gefäßendothel der SCID- Maus betrug $2,22 \pm 1,04$ Zellen pro mm².

4.5.2 Adhäsion in der SDF-1α - Gruppe

Nach der Behandlung mit SDF-1α wurde eine Erhöhung der Anzahl der adhärenenten Stammzellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe festgestellt, die jedoch keine statistische

Signifikanz erreichte. Die Anzahl der adhärenen Stammzellen betrug $9,05 \pm 2,98$ Zellen/ mm^2 ($9,05 \pm 2,98$ Zellen/ mm^2 in ``SDF-1 α `` vs. $2,22 \pm 1,04$ Zellen pro mm^2 in ``Kontrolle``, $p = 0,056$).

4.5.3 Adhäsion in der TNF α - Gruppe

Nach der Behandlung mit TNF α wurde eine signifikante Erhöhung der Anzahl der adhärenen Stammzellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe festgestellt. Die Anzahl der adhärenen Stammzellen betrug $13,57 \pm 3,81$ Zellen/ mm^2 . ($13,57 \pm 3,81$ Zellen/ mm^2 in ``TNF α `` vs. $2,22 \pm 1,04$ Zellen pro mm^2 in ``Kontrolle``, $p = 0,01$)

4.5.4 Adhäsion in der SDF-1 α / TNF α - Gruppe

In dieser Gruppe war der Anstieg der Zahl adhärenen CD133 $^+$ Stammzellen, deutlich im Vergleich zu den anderen drei Gruppen. Die Anzahl der fest haftenden CD133 $^+$ Stammzellen betrug $28,19 \pm 6,3$ Zellen/ mm^2 . ($28,19 \pm 6,3$ Zellen/ mm^2 in ``SDF-1 α / TNF α `` vs. $2,22 \pm 1,04$ in ``Kontrolle`` $p < 0,01$).

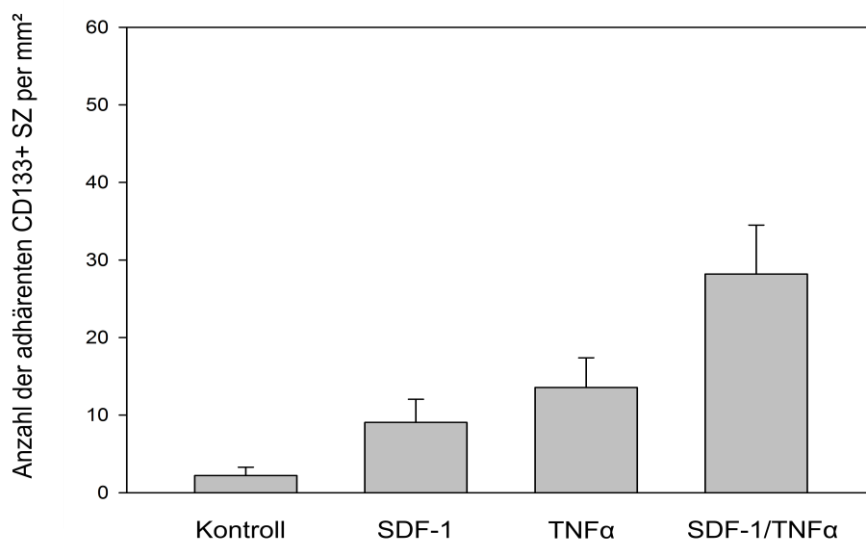


Abb.13. Quantitative Darstellung der adhärenen CD133 $^+$ SZ bei den vier Gruppen

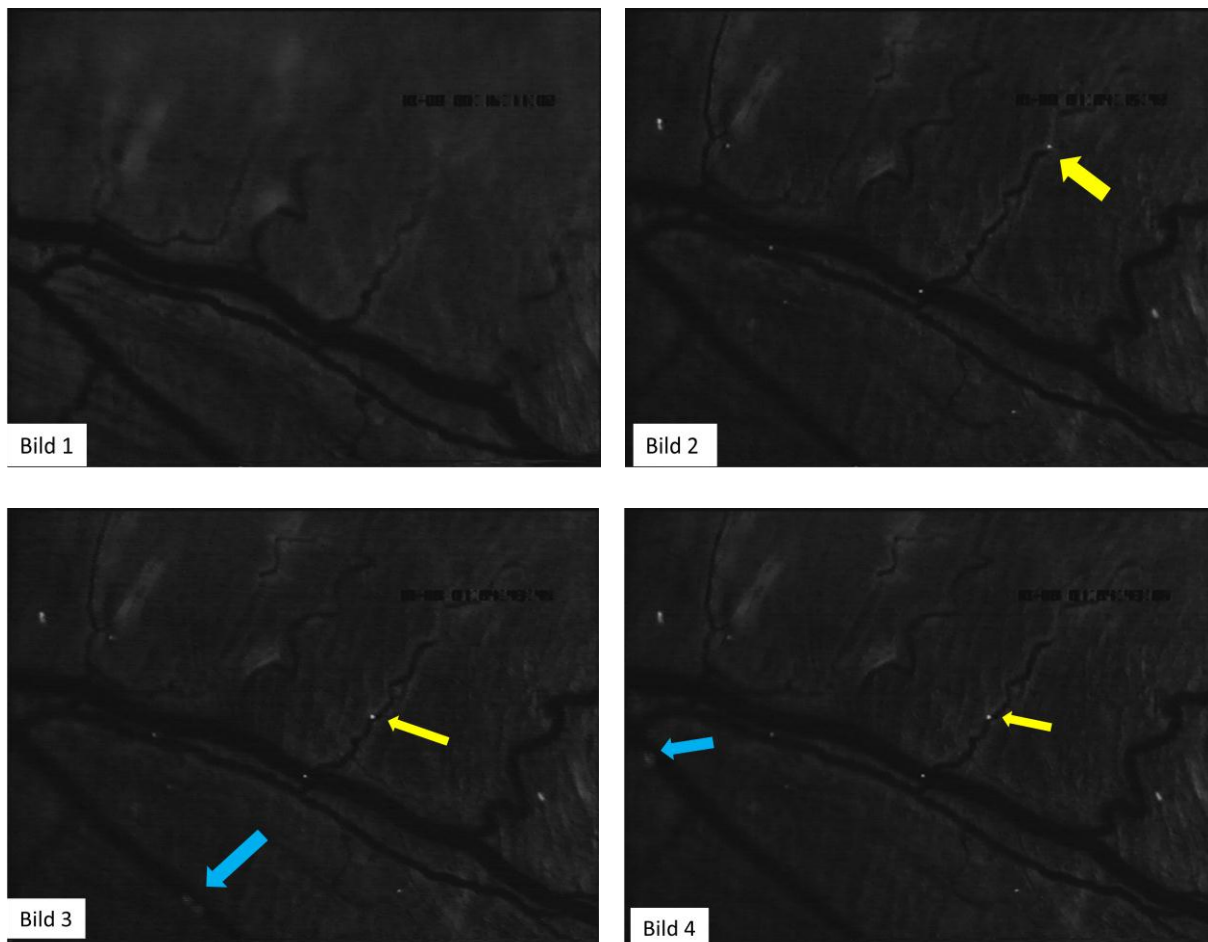


Abb. 14. Die dargestellten Bilder sind repräsentativ und charakteristisch für die SDF-1 α /TNF α Versuchsgruppe. Die Bilder zeigen das typische Adhäsionsverhalten von CD 133⁺ SZ in der SDF-1 α /TNF α - Versuchsgruppe. (10xVergrößerung)(blauer Pfeil passierende Stammzellen; gelber Pfeil rollende Stammzelle)

4.6 Expression von CD 44 und CXCR4 auf der CD 133⁺ Stammzelloberfläche

Die durchgeführten FACS - Analysen zur Bestimmung des Anteils der unbehandelten humanen CD 133⁺- Stammzellen, die CD44- und CXCR4- Rezeptoren, spontan auf ihrer Membranoberfläche exprimieren, ergaben folgende Ergebnisse.

CXCR4 exprimieren $71,7 \pm 3,49$ % von allen Stammzellen, die gleichzeitig CD133-Rezeptor exprimieren.

CD44 exprimieren $99,56 \pm 0,24$ % von allen Stammzellen, die gleichzeitig CD133-Rezeptor exprimieren.

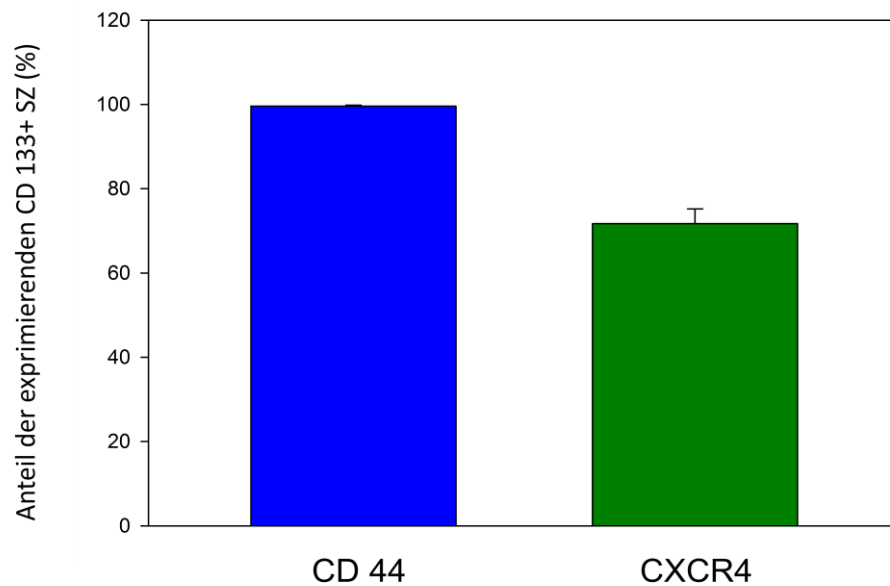


Abb.15. Quantitative Darstellung des Anteils aller CD 133⁺ Stammzellen, die CD44 bzw. CXCR4 auf ihrer Oberfläche tragen.

4.7 Expression des CXCR4-Rezeptors in den Endothelzellen

Während der Auswertung der Intensität der endothelialen CXCR4- Expression wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festgestellt. Im unbehandelten M. cremaster betrug die Intensität $308,16 \pm 52,43$ I/ μm^2 . In der SDF-1 α -Gruppe betrug die Intensität $1170,75 \pm 181,23$ I/ μm^2 ($p < 0,05$ vs Kontrolle). In der SDF-1 α /TNF α Gruppe war die Intensität mehr als 10-fach größer im Vergleich zu der Kontrollgruppe und betrug $3316,46 \pm 596,43$ I/ μm^2 . ($p < 0,001$ vs Kontrolle).

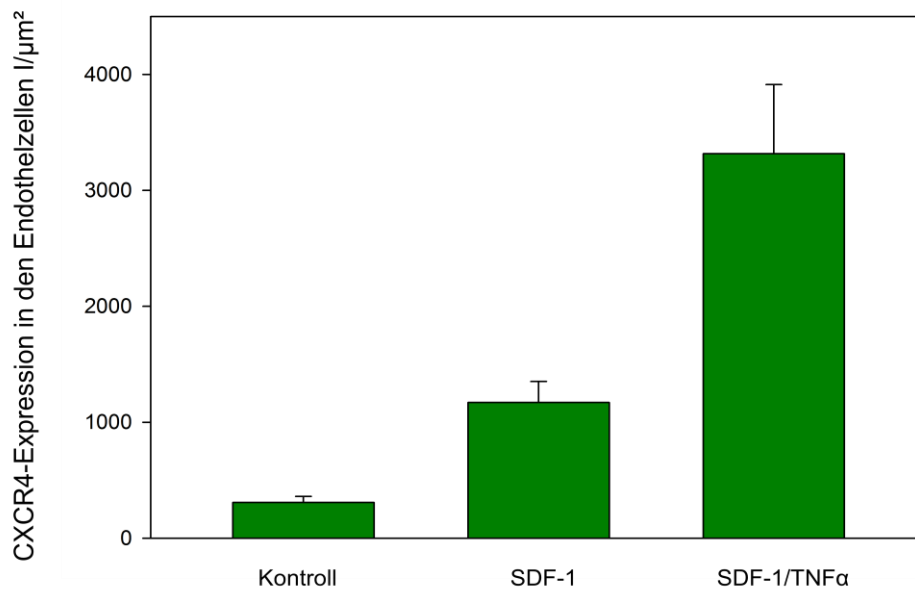


Abb.16. Quantitative Darstellung der Intensität der endothelialen CXCR4-Expression in den Versuchsgruppen ``Kontrolle``, ``SDF-1α`` und ``SDF-1α/TNFα``

Um detaillierter Aussagen zu der Intensität der Expression des CXCR4-Rezeptors (CD184) in den Endothelzellen zu erfahren, wurden die Blutgefäße nach ihrem Durchmesser in zwei weitere Gruppen eingeteilt und erneut untersucht. Die Gefäße, deren Durchmesser 20-70 μm betrug, wurden als Gruppe der ``kleinen Gefäße`` bezeichnet und die andere Gruppe wurde als ``große Gefäße`` (71-140 μm) bezeichnet. Die Blutgefäße wurden getrennt untersucht und anschließend quantifiziert.

4.7.1 Expression des CXCR4-Rezeptors in den ``großen Gefäßen`` (71-140 μm)

4.7.1.1 Kontrollgruppe

Das schwächste Signal, welches überhaupt detektiert wurde, war in der Kontrollgruppe bei den ``großen Gefäßen`` zu finden. Hier betrug die Intensität $254,3 \pm 47,85$ I/μm².

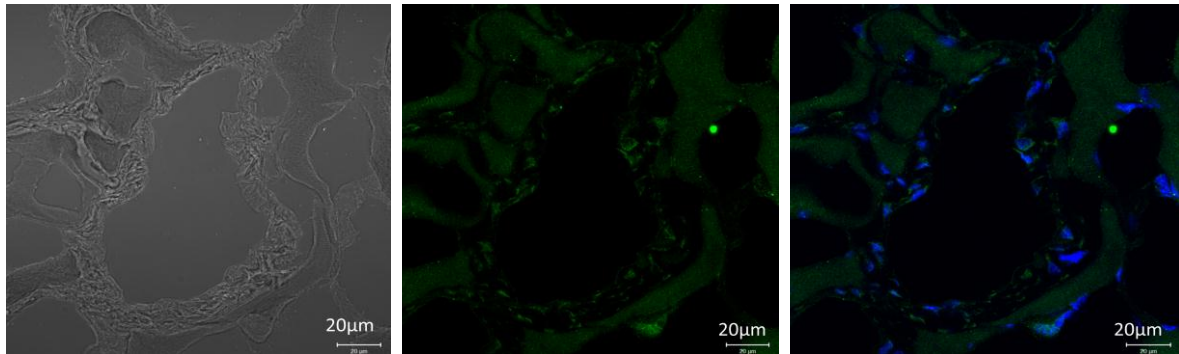


Bild1

Bild 2

Bild 3

Abb. 17. Die dargestellten Bilder sind repräsentativ für die Kontrollgruppe – „große Gefäße“ (71-140 μm). Das Bild 1, welches im Modus „transmitted light“ aufgenommen ist, stellt die Gefäßstrukturen und umgebenden Muskel- und Bindegewebe dar. Im Bild 2 ist nur der channel 2 ausgewählt, so dass nur das CXCR4-Signal dargestellt ist. Bild 3 präsentiert sowohl das CXCR4-Signal als auch das Signal der Endothelzellkerne (channel 2 + channel 1). Die Bilder 2 und 3 wurden im Modus „reflected light“ aufgenommen.

4.7.1.2 SDF-1 α - Gruppe

Das Signal, das in dieser Gruppe detektiert wurde, zeigte eine Erhöhung des CXCR4-Signalwertes in den Endothelzellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($598,62 \pm 106,39$ $\text{l}/\mu\text{m}^2$ in „SDF-1 α “ vs $254,3 \pm 47,85$ $\text{l}/\mu\text{m}^2$ in „Kontrolle“, $p = 0,012$).

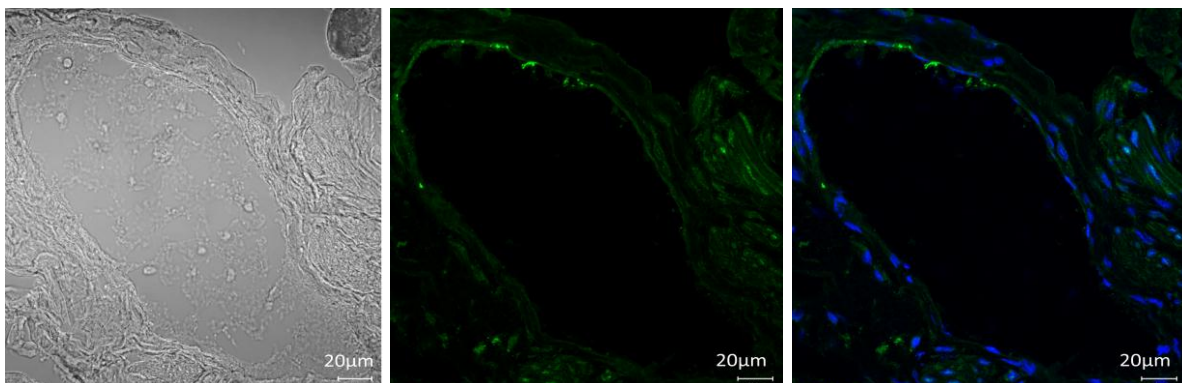


Bild1

Bild2

Bild3

Abb.18. Repräsentative Bilder für die SDF-1- Gruppe (``große Gefäße`` 71-140 μm)
- Das Bild 1, welches im Modus ``transmitted light`` aufgenommen ist, stellt die Gefäßstrukturen und umgebenden Muskel-und Bindegewebe dar. Im Bild 2 ist nur der channel 2 ausgewählt, so dass nur das CXCR4-Signal dargestellt ist. Bild 3 präsentiert sowohl das CXCR4-Signal als auch das Signal der Endothelzellkerne (channel 2 + channel 1). Die Bilder 2 und 3 wurden im Modus ``reflected light`` aufgenommen.

4.7.1.3 SDF-1 α /TNF α - Gruppe

Die Kombination von SDF-1 α und TNF α steigerte die Intensität des CXCR4 –Signales signifikant mehr als SDF-1 α allein ($872,34 \pm 176,06$ in ``SDF-1 α /TNF α `` vs $254,3 \pm 47,85$ $\text{l}/\mu\text{m}^2$ in ``Kontrolle``, $p = 0,004$).

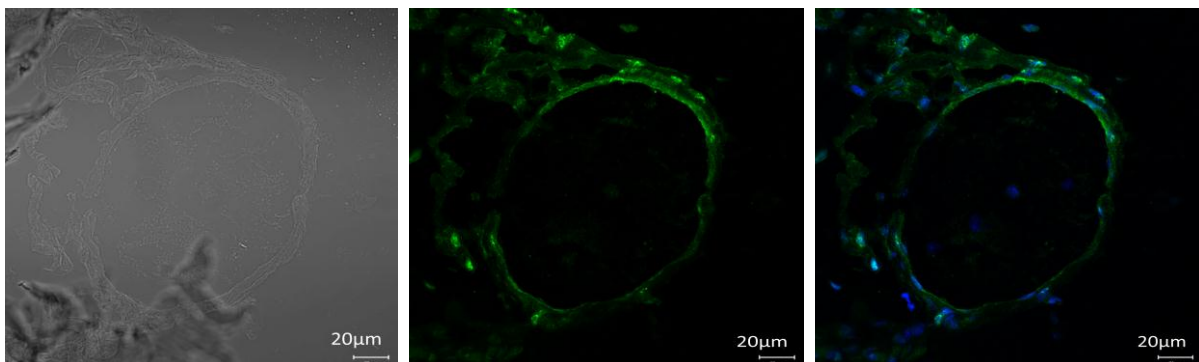


Bild1

Bild2

Bild3

Abb.19. Repräsentative Bilder für die SDF-1 α /TNF α - Gruppe (``große Gefäße`` 71-140 μm) Das Bild 1, welches im Modus ``transmitted light`` aufgenommen ist, stellt die Gefäßstrukturen und umgebenden Muskel-und Bindegewebe dar. Im Bild 2 ist nur der channel 2 ausgewählt, so dass nur das CXCR4-Signal dargestellt ist. Bild 3 präsentiert sowohl das CXCR4-Signal als auch das Signal der Endothelzellkerne (channel 2 + channel 1). Die Bilder 2 und 3 wurden im Modus ``reflected light`` aufgenommen.

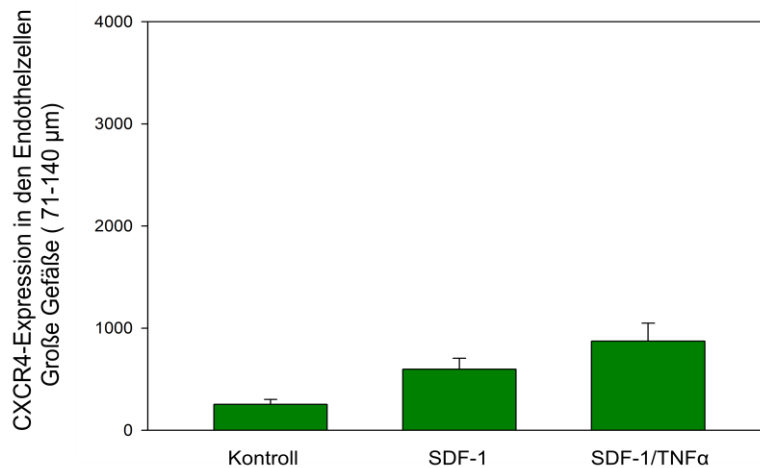


Abb.20. Quantitative Darstellung der Intensität der CXCR4-Expression in der Gruppe der ``großen Gefäßen`` (71-140 µm) Intensität/µm²

4.7.2 Expression des CXCR4-Rezeptors in den ``kleinen Gefäßen`` (20-70 µm)

4.7.2.1 Kontrollgruppe

Die CXCR4-Expression in den ``kleinen Gefäßen`` (20-70 µm) der Kontrollgruppe betrug $355,29 \pm 88,95$ I/µm².

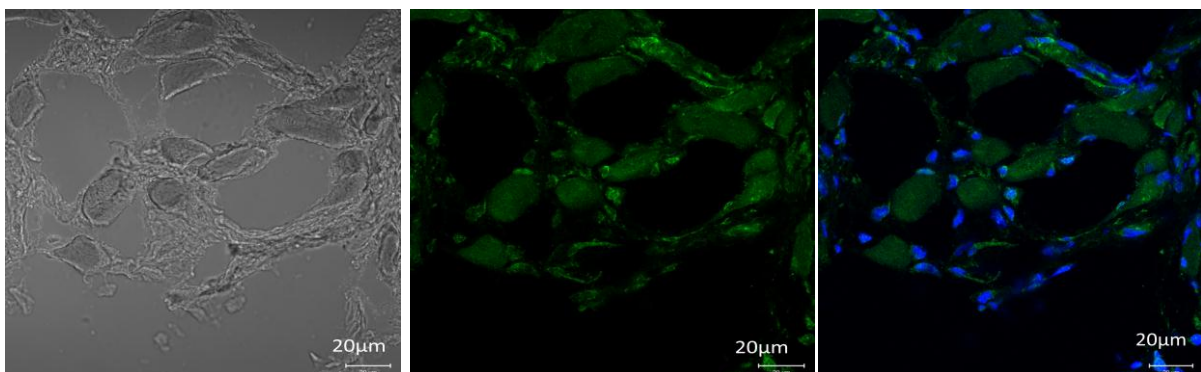


Bild1

Bild2

Bild3

Abb.21. Repräsentative Bilder für die Kontrollgruppe (``kleine Gefäße`` 20-70 µm)
Das Bild 1, welches im Modus ``transmitted light`` aufgenommen ist, stellt die

Gefäßstrukturen und umgebenden Muskel-und Bindegewebe dar. Im Bild 2 ist nur der channel 2 ausgewählt, so dass nur das CXCR4-Signal dargestellt ist. Bild 3 präsentiert sowohl das CXCR4-Signal als auch das Signal der Endothelzellkerne (channel 2 + channel 1). Die Bilder 2 und 3 wurden im Modus ``reflected light`` aufgenommen.

4.7.2.2 SDF-1 α - Gruppe

In der SDF-1 α -Gruppe wurde ein vielfach stärkeres Signal als in der Kontrollgruppe detektiert ($1671,37 \pm 194,83$ in ``SDF-1 α `` vs. $355,29 \pm 88,95$ $1/\mu\text{m}^2$ in ``Kontrolle``, $p < 0,001$).

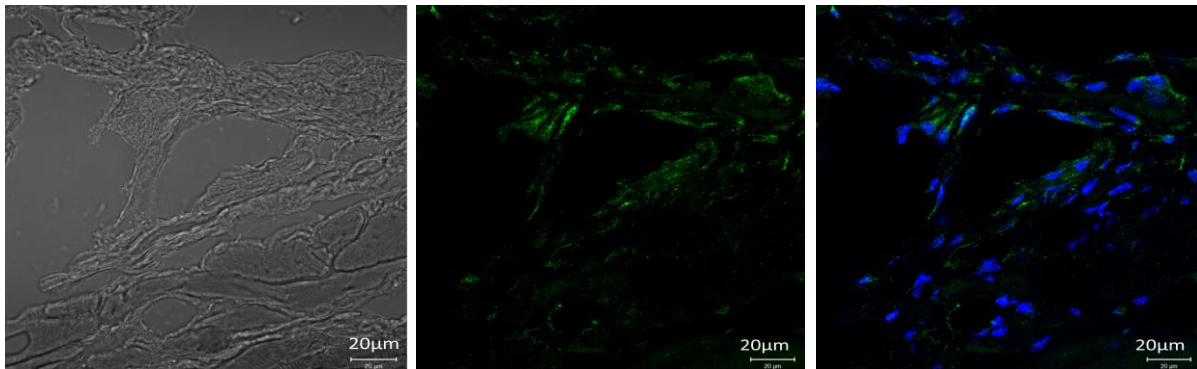


Bild1

Bild2

Bild3

Abb.22. Repräsentative Bilder für die SDF-1- Gruppe (``kleine Gefäße`` 20-70 μm)
Das Bild 1, welches im Modus ``transmitted light`` aufgenommen ist, stellt die Gefäßstrukturen und umgebenden Muskel-und Bindegewebe dar. Im Bild 2 ist nur der channel 2 ausgewählt, so dass nur das CXCR4-Signal dargestellt ist. Bild 3 präsentiert sowohl das CXCR4-Signal als auch das Signal der Endothelzellkerne (channel 2 + channel 1). Die Bilder 2 und 3 wurden im Modus ``reflected light`` aufgenommen.

4.7.2.3 SDF-1 α /TNF α -Gruppe

In der mit SDF-1 α /TNF α behandelten Versuchsgruppe wurde eine fast 14-fache, Erhöhung der Intensität der CXCR4-Expression in den Endothelzellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe festgestellt ($4945,87 \pm 441,55$ I/ μm^2 in ``SDF-1 α /TNF α `` vs $355,29 \pm 88,95$ I/ μm^2 in ``Kontrolle``, $p < 0,001$).

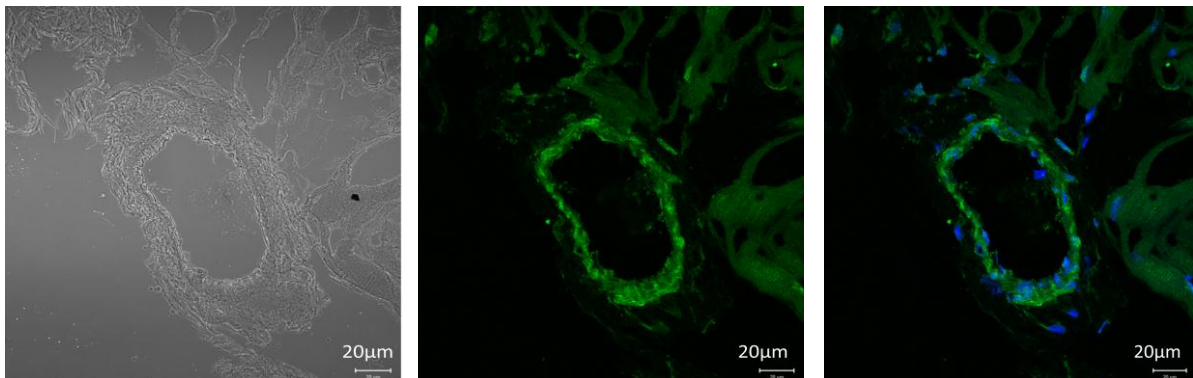


Bild1

Bild2

Bild3

Abb.23. Repräsentative Bilder für die SDF-1/TNF α -Gruppe (``kleine Gefäße`` 20-70 μm) Das Bild 1, welches im Modus ``transmitted light`` aufgenommen ist, stellt die Gefäßstrukturen und umgebenden Muskel-und Bindegewebe dar. Im Bild 2 ist nur der channel 2 ausgewählt, so dass nur das CXCR4-Signal dargestellt ist. Bild 3 präsentiert sowohl das CXCR4-Signal als auch das Signal der Endothelzellkerne (channel 2 + channel 1). Die Bilder 2 und 3 wurden im Modus ``reflected light`` aufgenommen.

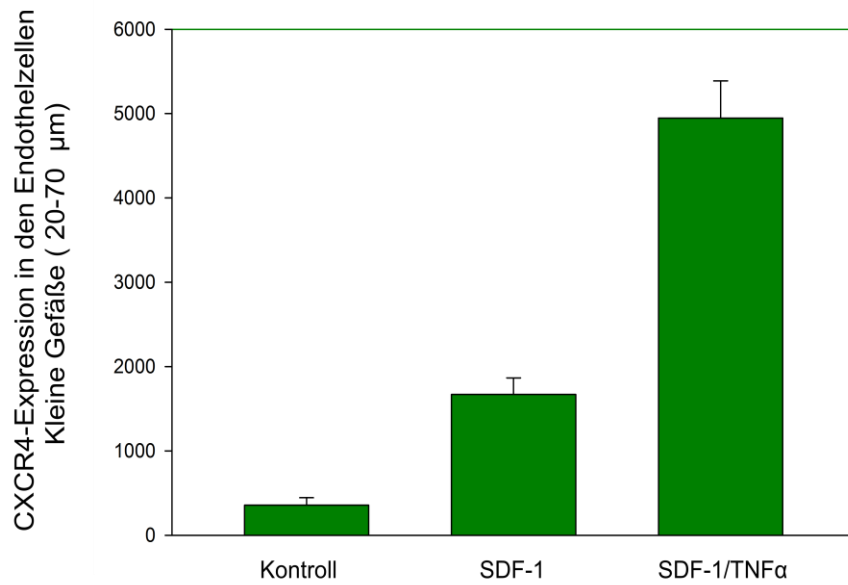


Abb.24. Quantitative Darstellung der Intensität der CXCR4-Expression in der Gruppe der "kleinen Gefäßen" (20-70 µm) Intensität/µm² .

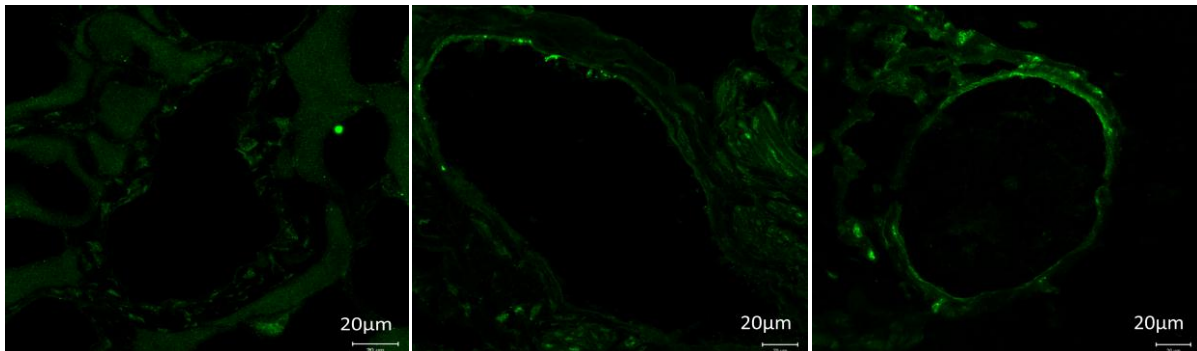


Bild 1 Kontroll

Bild 2 SDF-1

Bild 3 SDF-1/TNFα

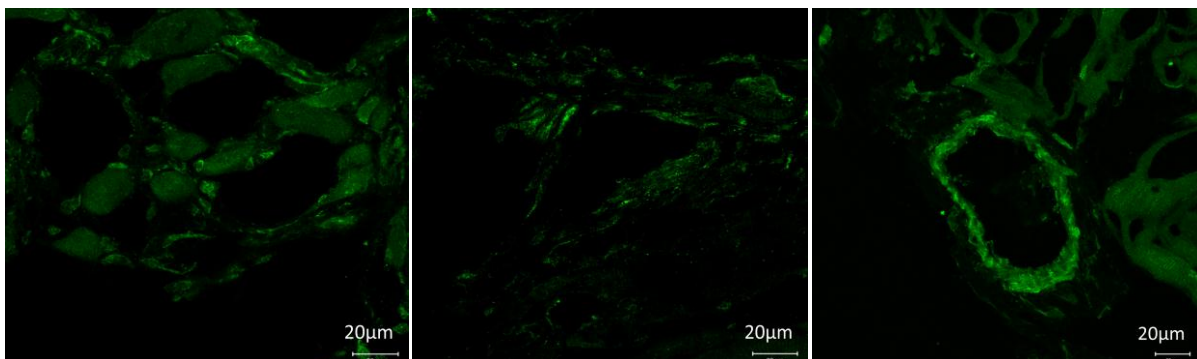


Bild 4 Kontroll

Bild 5 SDF-1

Bild 6 SDF-1/TNFα

Abb.25. Darstellung der endothelialen CXCR4-Signalstärke. Bilder 1- 3 sind

repräsentativ für die ``großen Gefäße`` (71-140 µm). Bilder 4 - 6 sind repräsentativ für die ``kleinen Gefäße`` (20-70 µm). Die Bilder wurden im Modus ``reflected light`` aufgenommen.

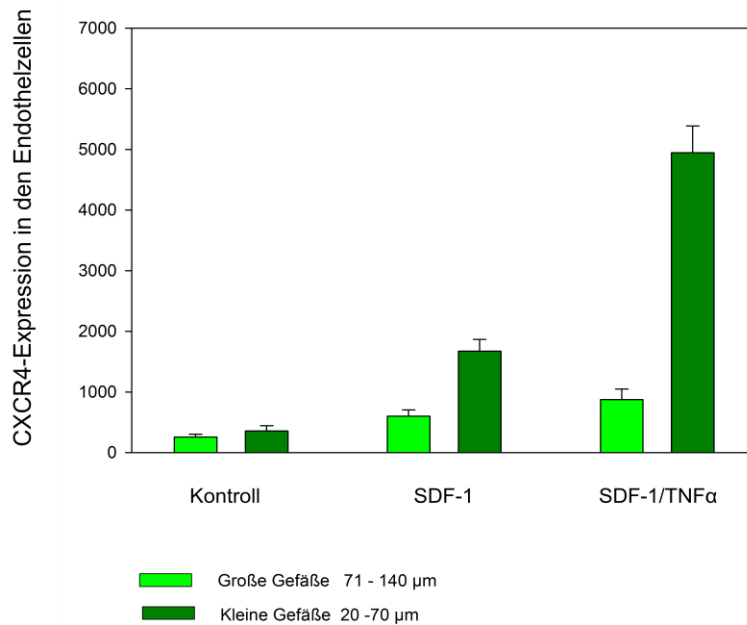


Abb.26. Quantitative Darstellung der Intensität CXCR4-Expression in Abhängigkeit vom Gefäßdurchmesser und der Vorbehandlung des M. cremaster.

4.8 Das endotheliale ``Rolling`` und die Adhäsion in Abhängigkeit des Gefäßdurchmessers

Zur Untersuchung der Abhängigkeit des ``Rollings`` und der endothelialen Adhäsion von der Gefäßgröße, wurden die entsprechenden Parameter selektiv innerhalb der Gruppen ``große Gefäße`` (71-140 µm) und ``kleine Gefäße`` (20-70 µm) gemessen.

In der Gruppe der ``großen Gefäßen`` zeigte sich eine unterschiedliche Ausprägung des Anteils rollender Stammzellen in Abhängigkeit der Vorbehandlung des Muskels ($16,19 \pm 3,62$ % in ``Kontrolle`` vs. $44,32 \pm 2,01$ % in ``SDF-1α`` vs. $44 \pm 4,41$ % in ``SDF-1α /TNFα``),

[`SDF-1α` vs. `Kontrolle`, $p < 0,001$]

Auch In der Gruppe der `kleinen Gefäßen` zeigte sich eine unterschiedliche Ausprägung des Anteils rollender Stammzellen in Abhängigkeit der Vorbehandlung des Muskels ($17,93 \pm 3,26$ % in „Kontrolle“ vs. $47,42 \pm 3,1$ % in `SDF-1α` vs. $40,85 \pm 4,01$ % in `SDF-1α/TNFα`), [`SDF-1α` vs. `Kontrolle`, $p < 0,001$]

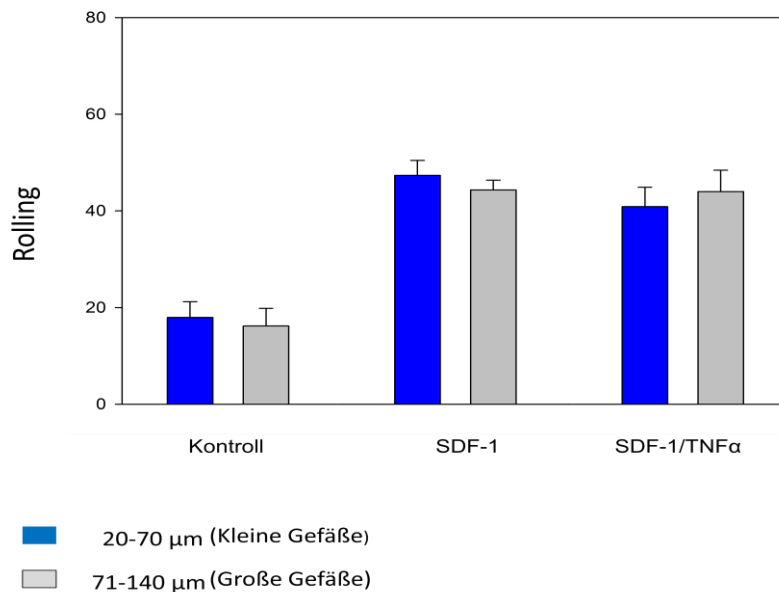


Abb.27. Quantitative Darstellung des endothelialen `Rollings` CD 133⁺ Stammzellen in Abhängigkeit der Gefäßdruchmessers und der Vorbehandlung des M. cremaster.

In der Gruppe der `großen Gefäße` zeigte sich eine unterschiedliche Anzahl fest adhärenter CD 133⁺ Stammzellen in Abhängigkeit von der Vorbehandlung des Muskels ($1,18 \pm 0,63$ SZ/mm² in `Kontrolle` vs. $6,99 \pm 1,65$ SZ/mm² in `SDF-1α` vs. $11,19 \pm 3,02$ SZ/mm² in `SDF-1α/TNFα`), [`SDF-1α` vs `Kontrollgruppe`, $p = 0,004$].

Auch in der Gruppe der `kleinen Gefäße` zeigte sich eine unterschiedliche Anzahl fest adhärenter CD 133⁺ Stammzellen in Abhängigkeit von der Vorbehandlung des Muskels ($2,68$

$\pm 2,06$ SZ/mm² in ``Kontrolle`` vs. $13,09 \pm 3,68$ SZ/mm² in ``SDF-1 α `` vs. $36,75 \pm 6,08$ SZ/mm² in `` SDF-1 α /TNF α ``) [``SDF-1 α `` vs ``Kontrollgruppe``, $p = 0,012$], [``SDF-1 α /TNF α `` vs ``SDF-1 α ``, $p = 0,002$].

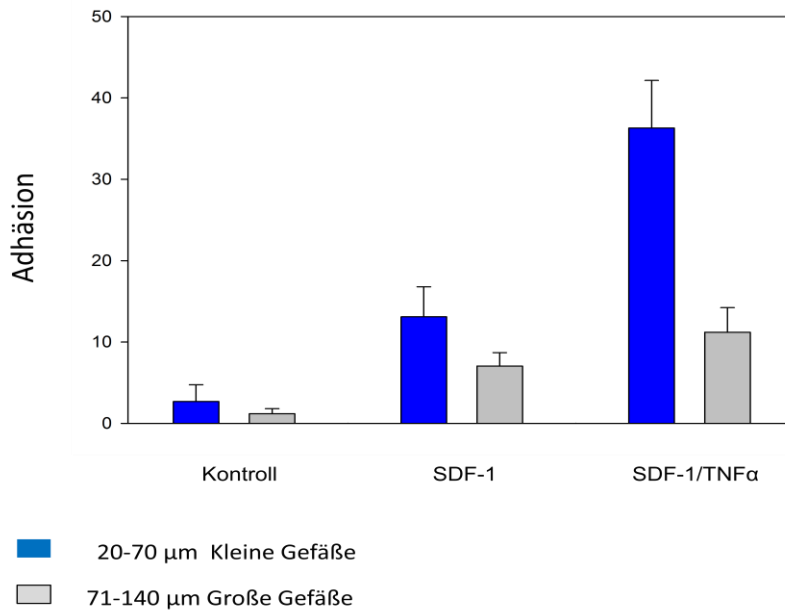


Abb. 28. Quantitative Darstellung der festen endothelailen Adhäsion CD 133⁺ Stammzellen in Abhängigkeit des Gefäßdurchmesser und der Vorbehandlung des M. cremaster.

5. Diskussion

5.1 Versuchsmodell und Xenotransplantation

Die effiziente Migration von Knochenmarkstammzellen zu einem ischämischen Myokard bildet die Grundlage einer möglichen therapeutischen Wirksamkeit von Stammzellen, die zur Regeneration des Herzgewebes verabreicht werden. Obwohl bereits bekannt ist, dass eine Reihe von Chemokinen im Rahmen einer Myokardischämie hochreguliert werden und die Stammzellmigration fördern, [32] sind die Knochenmark-Stammzellsubpopulationen, die im Rahmen klinischer Studien verwendet werden, nicht abschließend in Bezug auf ihrer *in-vivo* Migrationskapazität in Richtung von Chemokin-Gradienten, charakterisiert worden. im Rahmen klinischer Studien verwendet werden

Das Ziel dieser Arbeit war die *in-vivo* Untersuchung der Migrationskapazität der humanen CD 133⁺ Knochenmarkstammzellen, die seit mehreren Jahren u.a. in unserer Klinik zur Regeneration von ischämisch geschädigtem Herzmuskelgewebe appliziert werden.

Es wurde hierzu ein Tierversuchsmodell verwendet. Unter Verwendung von immuninkompetenten SCID Mäusen wurde das Homingverhalten von intraarteriell applizierten humanen CD 133⁺ Stammzellen in der Mikrozirkulation des M. cremaster mit Hilfe eines Intravitalmikroskops beobachtet. Als Schwerpunkt wurde hierbei zum Einen die Interaktion zwischen den humanen CD 133⁺ Stammzellen und den Gefäßendothelzellen eines knochenmarkfernen Skelettmuskelgewebes einer SCID-Maus beobachtet. Zum anderen wurde die Rolle dieser Endothelzellen beim ``Homing`` der humanen CD 133⁺ Stammzellen in einem peripheren Gewebe evaluiert. Das M. cremaster Versuchsmodell ermöglichte es, durch einfache Superfusion mit verschiedenen Mediatoren, Gewebssituationen, die z.B. einer Myokardischämie nahekommen, zu simulieren. [63]

Als eine wichtige Voraussetzung für die Sinnhaftigkeit eines solchen Xenotransplantation-Versuchsaufbaues ist eine Homologie der beteiligten Faktoren notwendig. Bisherige experimentelle Studien zum endothelialen ``Rolling`` und zur festen endothelialen Adhäsion von Stammzellen konnten eine hochgradige Sequenzhomologianalogie der maßgeblich beteiligten Moleküle (VCAM-1, LFA-1, ICAM-1, E-selektine, SDF-1 α , CXCR4) zwischen Menschen und Mäusen zeigen. [77] [78] [79] [80] [81]

5.2 ``Rolling`` als Stammzellhoming-Parameter

Das endotheliale ``Rolling`` wird definiert als der initiale Kontakt zwischen den Zellen, die sich im Kreislaufsystem befinden und mit den Gefäßendothelzellen. Das endotheliale ``Rolling`` von Leukozyten ist bereits relativ gut erforscht und die dafür verantwortlichen Moleküle sind größtenteils bereits benannt worden (z.B. Integrine und Selektine). In der letzten Zeit mehren sich Ergebnisse, die darauf hinweisen, dass das endotheliale ``Rolling`` von Stammzellen z.T. durch die selben Moleküle wie das leukozytäre ``Rolling`` vermittelt wird. [82] Dabei scheinen u.a. Selektine eine zentrale Rolle zu spielen. Sackstein et al. haben gezeigt dass das ``Rolling`` bei mesenchymalen SZ von der Interaktion zwischen den HCELL (Hematopoietic Cell E-selectin/L-selectin Ligand (CD44 glykoform)) und E-Selektinen vermittelt wird. Neben E-Selektinen, ist auch VLA-4 unter bestimmten Bedingungen als ein ``Rolling`` beeinflussendes Molekül beschrieben worden. [51][55]

In dieser Arbeit stellte sich heraus, dass eine lokale SDF-1 α -Stimulation, die Quantität des ``Rollings`` von humanen CD 133⁺ Stammzellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die Tatsache, dass einerseits fast alle (99,56 %) der humanen CD 133⁺ Stammzellen das CD44-Molekül exprimieren und andererseits andere

experimentelle [83], [84] Studien gezeigt haben, dass SDF-1 α zu einer Hochregulation von E-Selektine führt, legt nahe, dass u.a. die CD44-E-Selektin Interaktion für das SDF-1 α vermittelte endotheliale ``Rolling`` der CD 133⁺ Stammzellen verantwortlich sein könnte. Hinsichtlich der Quantität des ``Rollings``, zeigte eine kombinierte Behandlung mit SDF-1 α und TNF α keine weitere Erhöhung im Vergleich zu der SDF-1 α -Gruppe.

5.2.1 Rolling als variabler Parameter

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Qualität des endothelialen ``Rollings`` unterschiedlich sein kann. Bei der Messung der Geschwindigkeit des ``Rollings`` waren sowohl Geschwindigkeits- als auch morphologische Unterschiede der rollenden Stammzellen zwischen den Versuchsgruppen festzustellen. In der Kontrollgruppe wurde das schnellste ``Rolling`` erhoben. In der SDF-1 α -Gruppe war die Geschwindigkeit der rollenden Stammzellen signifikant langsamer im Vergleich zu der Kontrolle. Interessanterweise fand sich, in der Versuchsgruppe wo eine kombinierte SDF-1 α und TNF α -Stimulation des Endothels stattfand, eine nochmal um das doppelte reduzierte Geschwindigkeit des ``Rollings``, mit der Tendenz zum Adhären.

Der Grund aller diesen Unterscheide könnte darin liegen, dass TNF α eine *de novo*-Synthese- und Hochregulation von CXCR4 [86],[87] und Integrinen [88] bewirkt. Im Zusammenspiel mit der bereits o.g. SDF-1 α vermittelten Hochregulation von Selektinen und Integrinen scheint es zu einer Intensivierung der initialen Stammzell-Endothelinteraktion zu kommen, die sich als deutlich reduzierte Geschwindigkeit des endothelialen ``Rollings`` manifestiert.

5.2.2 CD 133 als ``Rolling``-beeinflussendes Molekül

In letzter Zeit konnte verschiedentlich gezeigt werden, dass die Moleküle, die für das ``Homing`` verantwortlich sind, sich an den Membran-Vorsprüngen (Mikrovilli) befinden. Bruehl et al. haben gezeigt, dass die Liganden die das endotheliale ``Rolling`` vermitteln, an den Spitzen der Mikrovilli verteilt sind.[85] Über die Funktion des CD 133-Moleküls ist zurzeit extrem wenig bekannt. Außer, dass CD 133 ausschließlich an den Membran-Vorsprüngen exprimiert wird, und ihm daher die Funktion als Organisator der Membran-Vorsprünge (Mikrovilli) zugeschrieben wird, ist fast nichts anderes zur Funktion dieses Moleküls bekannt.

Des Weiteren ist berichtet worden, dass CD 133 immer zusammen mit anderen Molekülen, die für das Homing verantwortlich sind (wie CD 44, ICAM-1, PSGL-1), an den Membran-Vorsprüngen exprimiert wird. [35] Experimentellen Studien aus unserer eigenen Abteilung aus dem Jahr 2008 [71], welche die Untersuchung der Interaktion von von autologen murinen c-kit (CD 117) Stammzellen mit Endothelzellen als Ziel hatten, haben die folgenden Ergebnisse gezeigt: Hinsichtlich der Adhäsion kamen die Autoren zu einem ähnlichen Ergebniss bezüglich der Anzahl fest adhärenter Stammzellen, wie in dieser Arbeit gezeigt. Im Gegensatz dazu, wiesen in der Kontrollgruppe nur 6%, in der SDF-1 α - Gruppe 12% und in der SDF-1 α / TNF α -Gruppe 14% der SZ ``Rolling`` auf. In dieser Arbeit sind jeweils 20%, 45% und 42% erhoben worden, d.h. die Verwendung von humanen CD133⁺ Knochenmarkstammzellen führte zu einer deutlichen Steigerung des Anteiles rollender Stammzellen.

Alle diese eindeutigen Ergebnisse und die oben genannten Befunde könnten ein deutliches Zeichen dafür sein, dass das CD 133-Molekül ein ``Rolling`` beeinflussendes Molekül ist. Die Tatsache, dass das Zellrolling als eine Methode zur Auswahl von Zellen mit therapeutischen und diagnostischen Anwendungen gilt [62],[61],[60] könnte zu dem Schluss führen, dass die CD 133⁺ Stammzellen geeignet zur Anwendung in der regenerativen Medizin sind.

5.3 Adhäsion als Stammzellhoming-Parameter

In dieser Arbeit stellte es sich heraus, dass SDF-1 α allein nicht in der Lage ist, eine suffiziente lokale Adhäsion von CD 133⁺ Stammzellen herbei zu führen. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach Kombination von SDF-1 α und TNF α eine signifikant höhere Zahl adhärenter CD 133⁺ Stammzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse passen zu der Tatsache, dass während einer entzündlichen/ischämischen Reaktion nicht nur SDF-1 α , sondern gleichzeitig andere Mediatoren wie z.B. u.a. TNF α sezerniert werden. Bisher ist mehrere Male bestätigt worden, dass SDF-1 α Adhäsionsmoleküle ,wie z.B. Integrine sowie Selektine, auf den Endothelzellen moduliert/hochreguliert. [59] Gleichzeitig ist berichtet worden, dass TNF α Adhäsionsmoleküle aus der Gruppe der Integrine hochreguliert. [72] [73] Es scheint eindeutig, dass es sich um eine additive Wirkung von SDF-1 α und TNF α bei der Adhäsion der humanen CD 133⁺ Stammzellen handelt. Dies wird noch im weiteren Text diskutiert.

5.3.1 Additive Wirkung von SDF-1 α und TNF α bei der Expression von Adhäsions-Molekülen

Derzeit ist bereits mehrfach belegt worden, dass TNF α Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 hochreguliert [73] [88] [54]. Hierbei ist es im Vorfeld teilweise gelungen, die Signalwege, durch die, TNF α , die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 hochreguliert, abzuklären.

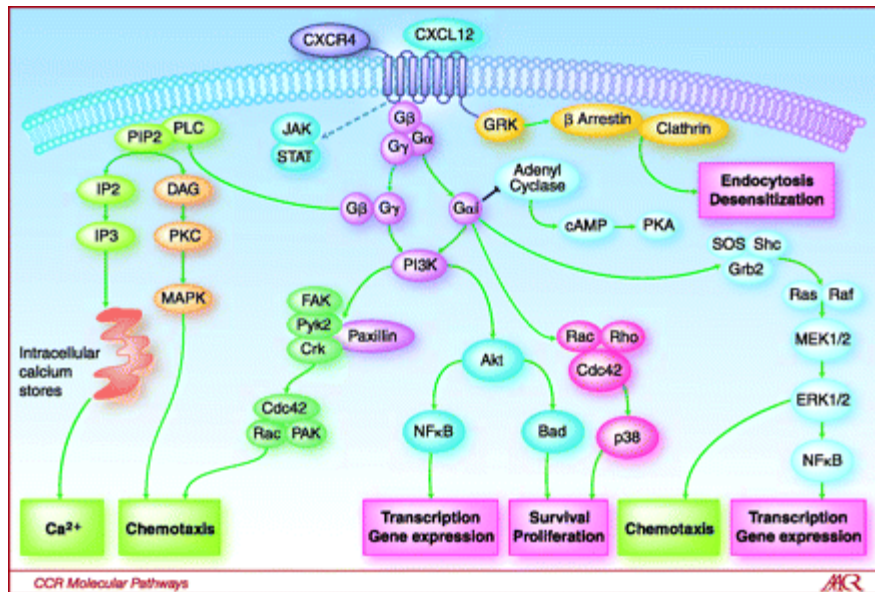


Abb.29. SDF-1α - CXCR4 – Signalwege [53]

Die durch TNFα bewirkte ICAM-1- und VCAM-1-Hochregulierung wird durch den NF-kB-Faktor vermittelt, bevor die entsprechenden Gene transkribiert werden [88]. Ein ähnlicher, NF-kB abhängiger Signalweg, ist für die CXCR4 vermittelte SDF-1α Wirkung beschrieben worden [Abb.29].

In der vorliegenden Arbeit konnte man nachvollziehen, dass da wo SDF-1α zusammen mit TNFα verwendet wurde, eine hochsignifikante Steigerung der endothelialen Adhäsion von humanen CD 133⁺ Stammzellen zu verzeichnen war im Vergleich zu der Gruppe in der SDF-1α allein verwendet wurde. Ursächlich für dieses Ergebnis könnte die Tatsache sein, dass sowohl SDF-1α als auch TNFα über NF-kB vermittelte Signalwege, die Expression von Adhäsionsmoleküle induzieren. Diese parallele Wirkung auf einem Signalwege mit identischer Endstrecke könnten danach zu einer ``Additiven Wirkung`` bei der Expression von Adhäsionsmolekülen führen. Des weitern könnte eine bereits nachgewiesene Hochregulation des CXCR4-Rezeptors durch TNFα [33] [86] [87] eine vermehrte SDF-1α - CXCR4 Interaktionen vermitteln, im Sinne einer ``feed forward`` Regulation.

5.4 Der endotheliale CXCR4-Rezeptor fördert die Adhäsion der humanen CD 133⁺ Stammzellen

Die Ergebnisse, die unter Verwendung der LSM - Mikroskopie erhoben wurden, weisen darauf hin, dass die schon beschriebene feste Adhäsion der humanen CD 133⁺ Stammzellen von dem endothelialen CXCR4-Rezeptor abhängig zu sein scheint. Die kombinierte SDF-1 α /TNF α Stimulation des Muskelgewebes führte zu einer mehr als zehnfachen Verstärkung des endothelialen CXCR4-Signals im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Diese Stärke des Signals wurde in der Versuchsgruppe gemessen, wo die Adhäsion der CD 133⁺ Stammzellen sehr stark ausgeprägt war.

Die Einteilung der Gefäße in sogenannte ``kleine`` (20-70 μ m Gefäßdurchmesser) und ``große`` (71-140 μ m Gefäßdurchmesser) und die getrennte Analyse der Adhäsion und endotheliale CXCR4-Expression führte zu dem Ergebnis, dass die Adhäsion der CD 133⁺ Stammzellen deutlich ausgeprägter (siehe Abb.28.) in den ``kleinen Gefäßen`` (Venolen) im Vergleich zu den ``großen Gefäßen`` (innerhalb einer Gruppe (SDF-1 α /TNF α)) war. Parallel dazu wurde festgestellt, dass in den ``kleinen Gefäßen`` (Venolen) das endotheliale CXCR4-Signal mehr als fünffach stärker als in den ``großen Gefäßen`` (innerhalb einer Gruppe (SDF-1 α /TNF α)) war (siehe Abb.26.).

Diese Ergebnisse stützen die o.g. Hypothese, dass neben stammzellseitigen Faktoren, die endotheliale Aktivierung mit Hochregulation vom CXCR4, eine bedeutende Rolle bei der endothelialen Adhäsion der humanen CD 133⁺ Stammzellen spielt.

5.5 Die neue Methodik der Quantifizierung des Endothelsignals

Mit Hilfe eines modernen konfokalen Mikroskops (LSM 780 ELYRA PS1 microscope Carl Zeiss, Jena, Germany) und seiner Eigenschaften wurde in dieser Arbeit eine neue Methodik zur hochpräzisen Quantifizierung von endothelialen Fluoreszenzsignalen entwickelt. Die Einzelheiten dieser Methode sind im dritten Kapitel beschrieben worden.

6. Zusammenfassung

Bereits, seit mehreren Jahren werden humane CD 133⁺ Stammzellen im Rahmen regenerativer Therapiekonzepte zur Behandlung der Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt verwendet und untersucht. Das Zielwanderungspotential dieser Zellpopulation nach erfolgter Isolation aus dem humanen Knochenmark, als eine wesentliche Voraussetzung für die erfolgreiche Besiedelung eines Zielgewebes, ist bisher noch nicht ausreichend untersucht. Die Fragestellung dieser Arbeit war daher die Untersuchung der Zielwanderungs- oder Homingkapazität humaner CD 133⁺ Knochenmarkstammzellen in knochenmarksfernem Gewebe *in vivo* nach intraoperativer Isolation. Dabei erfolgten einerseits Untersuchungen im Gewebe unter physiologischen Bedingungen, sowie andererseits unter ischämisch-entzündliche Bedingungen, welche durch die lokale Applikation spezifischer Mediatoren nachempfunden wurden. Hierzu wurde intravitalmikroskopische Untersuchungen am M. cremaster Modell unter Verwendung von SCID-Mäusen durchgeführt. Dabei wurden das endotheliale ``Rolling`` und die feste endotheliale Adhäsion der humanen CD 133⁺ Stammzellen als zentrale Teilschritte und Parameter des effektiven Stammzellhoming analysiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass humane CD 133⁺ Stammzellen, nach intraoperativer Isolation, als Xenotransplantat eine spontane Fähigkeit zur Zielwanderung außerhalb des Knochenmarks aufweisen. Jedoch wird das Ausmaß der effektiven Migration durch SDF-1 α und TNF α deutlich verstärkt. Durch diese Mediatoren werden die humanen CD 133⁺ Stammzellen von entzündlich-ischämischem Gewebe angelockt. Durch diese Mediatoren erfolgt eine entzündlich-ischämischem Gewebsaktivierung, v.a. im Bereich des Gefäßendothels. Dieser Endothelaktivierung, mit Hochregulation des CXCR4 - Rezeptors, kommt eine Schlüsselrolle bei der

erfolgreichen CD 133⁺ Stammzell - Endothelinteraktion zu. Zur Detektion bzw. Quantifizierung des CXCR4-Rezeptor-Signals in den Endothelzellen wurde eine neue hochpräzise Methode entwickelt, welche bisher weder im Inland noch im Ausland so verwendet worden ist (siehe Kapitel 3 und 5).

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen ein relevantes Migrationspotential humaner CD 133⁺ Knochenmarkstammzellen nach intraoperativer Isolation in knochenmarksfernem Zielgewebe *in vivo*. Es erscheint daher gerechtfertigt diese Subpopulation der weiteren Testung im Rahmen experimenteller und klinischer Studien zu unterziehen.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Efficacy of Intramyocardial Injection of Angiogenic Cell Precursors for Ischemic Cardiomyopathy A Case Match Study Kitipan V. Arom, Permyos Ruengsakulrach, and Vibul Jotisakulratana Innovations (Phila). 2008 Jan;3(1):38-45.
- [2] Morrison, Shah et al. 1997, Regulatory mechanisms in stem cell biology. Cell 88: 287–298
- [3] Stauffacher W., Vallotton M.B., Leuthold M., Rückzug der «Medizinisch-ethischen Richtlinien für die ärztlich assistierte Fortpflanzung» der SAMW Schweizerische Ärztezeitung 2002; 2002;83(5):216 ISSN: 0036-7486
- [4] Zaruba MM, Franz WM: Role of the sdf-1-cxcr4 axis in stem cell-based therapies for ischemic cardiomyopathy. Expert Opin Biol Ther. 10(3):321-335;2010.
- [5] Evans M, Kaufman M. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. 1981;9:154-156.
- [6] Martin G. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981;78:7634-7638.
- [7] Wagers A, Weissman I. Plasticity of adult stem cells. Cell. 2004;116:639-648.
- [8] Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, et al. Intrakoronare autologe Knochenmarkstransplantation Zell-Transfer nach Myokardinfarkt: Die BOOST randomisierten, kontrollierten klinischen Studie. Lancet 2004; 364:141-8.

- [9] Schächinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, *et al.* Transplantation von Vorläuferzellen und Regeneration Verbesserung in akuten Myokardinfarkt: Final Ein-Jahres-Ergebnisse der TOPCARE-AMI-Studie. *J Am CollCardiol* 2004; 44:1690-9
- [10] Silva GV, Perin EG, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, *et al.* Katheterbasierte transendocardial Lieferung von autologen Knochenmark abgeleitet mononukleären Zellen in Patienten für eine Herztransplantation gelistet. *Tex Herz Inst J* 2004; 31:214-9
- [11] Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, *et al.* Auswirkungen der intrakoronare Infusion von peripheren Blutstammzellen-Zellen mit Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor auf linksventrikulären systolischen Funktion und der Restenose nach koronarer Stentimplantation bei Myokardinfarkt mobilisiert: Die MAGIC Zelle randomisierten klinischen Studie. *Lancet* 2004; 363:751-6.
- [12] Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, Mansour S, De Bruyne B, De Bondt P, *et al.* Intrakoronare Injektion von CD133-positive bereichert Knochenmark Vorläuferzellen fördert Herz-Recovery nach einem frischen Myokardinfarkt: Machbarkeit und Sicherheit. *Circulation* 2005; 112: 1178-83.
- [13] Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, *et al.* Autologe Knochenmark-Stammzellen-Transplantation für Myokardregeneration *Lancet* 2003; 361:45-6
- [14] Herreros J, Prosper F, Perez A, Gavira JJ, Garcia-Velloso MJ, Barba J, *et al.* Autologe intramyokardialen Injektion von kultivierten Skelettmuskel-Stammzellen bei Patienten mit nicht-akuter Myokardinfarkt. *Eur Heart J* 2003; 24:2012-20
- [15] Chen SL, Fang WW, Qian J, Ye F, Liu YH, Shan SJ, *et al.* Verbesserung der Herzfunktion nach Transplantation von autologen Knochenmarktransplantation

mesenchymalen Stammzellen bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt. Chin Med J (Engl) 2004; 117:1443-8

[16] Katritsis DG, Sotiropoulou PA, Karvouni E, Karabinos I, Korovesis S, Perez SA, *et al.* Transkoronare Transplantation von autologen mesenchymalen Stammzellen und Endothelzellen Vorfahren in infarzierten menschlichen Myokard Katheter CardiovascInterv2005;. 65:321-9

[17] Klein HM, Ghodsizad A, Marktanner R, Poll L, T Voelkel, Mohammad Hasani MR, *et al.*Intramyokardialen Implantation von CD133 + Stammzellen verbesserte Herzfunktion ohne Bypass-Operation. Herz Surg Forum 2007; 10: E66-9

[18] Balogh L, Czuriga I, Hunyadi J, Galuska L, Kristóf E, Edes I. Auswirkungen der autologen Knochenmark CD34 +-Stammzellen auf die linksventrikuläre Funktion nach Myokardinfarkt. OrvHetil 2007; 148:243-9

[19] Tomita S, Li RK, Weisel RD. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. Circulation 1999;100:247-56.

[20] Li RK, Mickle DA, Weisel RD, Zhang J, Mohabeer MK. In vivo survival and function of transplanted rat cardiomyocytes.Circ Res 1996;78:283-8

[21] Li ZQ, Zhang M, Jing YZ, Zhang WW, Liu Y, Cui LJ, *et al.* The clinical study of autologous peripheral blood stem cell transplantation by intracoronary infusion in patients with acute myocardial infarction (AMI).Int J Cardiol 2007;115:52-6

[22] Fargeas, C.A., D. Corbeil, and W.B. Huttner (2003) *AC133 antigen, CD133, prominin-1, prominin-2, etc.: prominin family gene products in need of a rational nomenclature.* Stem Cells 21(4): p. 506-508.

[23] Yin, A.H., S. Miraglia, E.D. Zanjani, G. Almeida-Porada, M. Ogawa, A.G. Leary, J

Olweus, J. Kearney, and D.W. Buck (1997) *AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells*. Blood 90(12): p. 5002-5012.

[24] In vivo imaging of leukocyte trafficking in blood vessels and tissues; Thorsten R Mempel, M Lucila Scimone, J Rodrigo Mora and Ulrich H von Andrian ; Current Opinion in Immunology 2004, 16: 406-417

[25] The future of cell therapy for acute myocardial infarction; Noel M. Caplice. Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2006 Mar;3 Suppl 1:S129-32

[26] Cardiac stem cell therapy; Registered trials and a pilot studie in patients with dilated cardiomyopathy ; Prof. G. Steinhoff et al. Herz 2011 ;36(2):121; ISSN: 0340-9937

[27] How do stem cells finding their way home; Lapidot et al 2005. Blood September 15, 2005 vol. 106 no. 6 1901-1910

[28] Dzierzak E. Hematopoietic stem cells and their precursors: developmental diversity and lineage relationships. Immunol Rev. 2002;187: 126-138.

[29] Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. Science. 2000;287: 1442-1446.

[30] Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, Johnson FL, Weissman IL. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells.Science. 2001; 294: 1933-1936

[31] T.Nagasawa, T.Nakajima, K.Tachibana, H.Lisaza, CC Bleul and O.Yoshia et al. Molecular cloning and characterisation of a murine pre B-cell growthstimulating factor / stromal cell derivated factor 1 receptor , a murine homology of human immunodeficiency virus 1 enterycoreceptorfusicin 1996; Proc Natl Acad Sci USA 93:14726–14729, pmid:8962122.

- [32] Gyongyosi M, Hemetsberger R, Wolbank S, Kaun C, Posa A, Marian T, Balkay L, Emri M, Galuska L, Mikecz P, Petrasi Z: Imaging the migration of therapeutically delivered cardiac stem cells. *JACC Cardiovasc Imaging*. 3(7):772-775;2007.
- [33] TNF- α respecifies human mesenchymal stem cells to a neural fate and promotes migration toward experimental glioma. ; Egea V, von Baumgarten L, Schichor C, Berninger B, Popp T, Neth P, Goldbrunner R, Kienast Y, Winkler F, Jochum M, Ries C. *Cell Death Differ*. 2011 May;18(5):853-63. Epub 2010 Dec 3.
- [34] Adhesion molecules involved in transendothelial migration of human hematopoietic progenitor cells ; C. Voermans, P.M.L. Rood, P.L. Hordijk, W.R. Gerritsen C.E. van der Schoot M.D. Ph.D. *Stem Cells*. 2000;18(6):435-43.
- [35] Bauer, N., A.-V. Fonseca, M. Florek, D. Freund, J. Jászai, M. Bornhäuser, C.A. Fargeas and D. Corbeil. New insights into the cell biology of hematopoietic progenitors by studying prominin-1 (CD133). *Cells Tiss Org*. 188: 127-138
- [36] Janich, P. and D. Corbeil. GM₁ and GM₃ gangliosides highlight distinct lipid microdomains within the apical domain of epithelial cells. *FEBS Lett*. 581: 1783-1787
- [37] Röper*, K., D. Corbeil* and W.B. Huttner. (*joint first authors). Distinct lipid microdomains within the apical plasma membrane of polarized epithelial cells. A potential role of the lipid bilayer in the retention of prominin in microvilli. In *Protein, Lipid and Membrane Traffic: Pathway and Targeting*. Edited by Jos A.F. Op den Kamp. IOS Press. NATO Science Series. Vol. 322: 73-84
- [38] Maw, M.A., D. Corbeil, J. Koch, A. Hellwig, J.C. Wilson-Wheeler, R.J. Bridges, G. Kumaramanickavel, S. John, D. Nacarrow, K. Röper, A. Weigmann, W.B. Huttner and M.J. Denton. A frameshift mutation in prominin (mouse)-like 1 causes human retinal degeneration. *Hum. Mol. Genet*. 9: 27-34

- [39] Marzesco, A-M., P. Janich, M. Wilsch-Bräuninger, V. Dubreuil, K. Langenfeld, D. Corbeil and W.B. Huttner. Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J. Cell Sci.* 118: 2849-2858
- [40] BONNANO G, MARIOTTI A, PROCOLI A et al.: Human cord blood CD133 + cells immunoselected by a clinical-grade apparatus differentiate in vitro into endothelial and cardiomyocyte-like cells. *Transfusion* (2007) 47:280-289
- [41] The Stem Cell Movement; Nicola Smart, Paul R. Riley *Circulation Research*. 2008; 102: 1155-1168
- [42] Targeting stem cell niches and trafficking for cardiovascular therapy ; Nicolle Kränkel^a, Gaia Spinetti^b, Silvia Amadesi^c, Paolo Madeddu^c *Pharmacology & Therapeutics* ; Volume 129, Issue 1, January 2011, Pages 62–81
- [43] The role of chemokines in mesenchymal stem cell homing to myocardium. *Stem Cell Rev.* 2012 Mar;8(1):243-50. Wu_Y, Zhao_RC.
- [44] CXCR4-SDF-1 signaling, locomotion, chemotaxis and adhesion ; Magda Kucia et al. ; *Jurnal of Molecular Histology* 35: 233-245, 2004
- [45] Butcher, E.C. (1991). *Cell* 67, 1033-1036
- [46] Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994;76: 301-314.
- [47] Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*. 1996;272: 60-66.

- [48] Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, 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;95: 3289-3296.
- [49] Peled A, Grabovsky V, Habler L, Sandbank J, et al. The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. *J Clin Invest*. 1999;104: 1199-1211
- [50] Peled A, Petit I, Kollet O, et al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science*. 1999;283: 845-848.
- [51] The Bone Marrow Is Akin to Skin: HCELL and the Biology of Hematopoietic Stem Cell Homing ; *Journal of Investigative Dermatology* (2004) 122, 1061–1069; doi:10.1111/j.0022-202X.2004.09301.x ; Robert Sackstein
- [52] Directing stem cell homing ; Sophia Khaldoyanidi ; *Cell Stem Cell* 2 2008; 198-
- [53] CXCL12(SDF-1)/CXCR4 Pathway in cancer ; Beverly A. Teicher and Simon P. Fricker ; *Clin. Cancer Res*. 2010; 16:2927-2931.
- [54] Tumor necrosis factor-alpha up-regulates the expression of CCL2 and adhesion molecules of human proximal tubular epithelial cells through MAPK signaling pathways. ; Ho AW, Wong CK, Lam CW. ; *Immunobiology*. 2008;213(7):533-44. Epub 2008 Feb 20
- [55] Timothy A. Springer: *On A Roll with Cell Adhesion Molecules* ; Springer of Harvard Medical School.
- [56] The stem cell niches in bone ; Tong Yin and Linheng Li ;, the *Journal of clinical investigation*. 116: 1195-1201 (2006)

- [57] Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization ; Bruno Nervi, Dan C. Link and John F. DiPersio *Journal of cellular biochemistry* 99:690-705 (2006)
- [58] Molecular Mechanisms Involved in Mesenchymal Stem Cell Migration to the Site of Acute Myocardial Infarction ;Katarina Kollar,¹ Matthew M. Cook,¹ Kerry Atkinson,^{1,2} and Gary Brooke ; *International Journal of Cell Biology* Volume 2009 (2009), Article ID 904682, 8 pages doi:10.1155/2009/904682
- [59] Chemoattractants Induce a Rapid and Transient Upregulation of Monocyte $\alpha 4$ Integrin Affinity for Vascular Cell Adhesion Molecule 1 Which Mediates Arrest ;Jason R. Chan^a, Sharon J. Hyduk^a, and Myron I. Cybulsky^a ;Published May 14, 2001 // *JEM* vol. 193 no. 10 1149-1158.
- [60] Narasipura S.D., Wojciechowski J.C., King M.R. P-Selectin coated microtube for enrichment of CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells from human bone marrow. *Clin. Chem.* 2008;54:77–85.
- [61] Karnik R., Hong S., Langer R. Nanomechanical control of cell rolling in two dimensions through surface patterning of receptors. *Nano Lett.* 2008;8:1153–1158.
- [62] Greenberg A.W., Hammer D.A. Cell separation mediated by differential rolling adhesion. *Biotechnol. Bioeng.* 2001;73:111–124.
- [63] Importance of the SDF-1:CXCR4 Axis in Myocardial Repair; Marc S. Penn ; *Circulation research* 2009, 104:1133-1135
- [64] The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis ; Isabelle Petit, David Jin and Shahin Rafii ; *Trends Immunol.* 2007 Jul;28(7):299-307
- [65] Ruddle NH, Waksman BH (December 1968).

Cytotoxicity mediated by soluble antigen and lymphocytes in delayed hypersensitivity. 3. Analysis of mechanism. *J. Exp. Med.* 128 (6): 1267–79

[66] Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72 (9): 3666–70.

[67] Cardiomyocytes overexpressing TNF-alpha attract migration of embryonic stem cells via activation of p38 and c-Jun amino-terminal kinase. ; Chen Y, Ke Q, Yang Y, Rana JS, Tang J, Morgan JP, Xiao YF. ; *FASEB J.* 2003 Dec;17(15):2231-9.

[68] Maury, C. P., Teppo, A. M. (1989) Circulating tumour necrosis factor-alpha (cachectin) in myocardial infarction. *J. Intern. Med.* 225,333-336

[69] Halawa, B., Salomon, P., Jolda-Mydlowska, B., Zysko, D. (1999) Levels of tumor necrosis factor (TNF-alpha) and interleukin 6 (IL-6) in serum of patients with acute myocardial infarction. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 101,197-203

[70] Bahra, P., Rainger, G. E., Wautier, J. L., Nguyet-Thin, L., Nash, G. B. (1998) Each step during transendothelial migration of flowing neutrophils is regulated by the stimulatory concentration of tumour necrosis factor-alpha. *Cell Adhes. Commun.* 6,491-501

[71] Endothelial NOS is required for SDF-1 α /CXCR4-mediated peripheral endothelial adhesion of c-kit⁺ bone marrow stem cells ; Alexander Kaminski¹, Nan Ma¹, Peter Donndorf¹, Nicole Lindenblatt^{2,3}, Gregor Feldmeier¹, Lee-Lee Ong¹, Dario Furlani¹, Christian A Skrabal¹, Andreas Liebold¹, Brigitte Vollmar² and Gustav Steinhoff ; *Laboratory Investigation* (2008) 88, 58–69; doi:10.1038/labinvest.3700693;

[72] Chandrasekharan UM, Siemionow M, Unsal M, *et al.* TNF- α receptor-II is required for TNF- α -induced leukocyte-endothelial interaction *in vivo*. *Blood* 2007;109:1938–1944.

- [73] Sumaquin R, Sarelius IH. TNF- α 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;291:2116–2125.
- [74] The mouse mutation severe combined immune deficiency (*scid*) is on chromosome 16 G. C. Bosma, M. T. Davison, N. R. Ruetsch, H. O. Sweet, L. D. Shultz und M. J. Bosma; *Immunogenetics* ;Volume 29, Number 1, 54-57
- [75] The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses.; Bosma MJ, Carroll AM. ; *Annu Rev Immunol.* 1991;9:323-50.
- [76] Basiswissen rund um die Fluoreszenz ;© 2002 Christian Linkenheld
- [77] Hammel M, Weitz-Schmidt G, Krause A, Moll T, Vestweber D, Zerwes HG, et al. (2001).Species-specific and conserved epitopes on mouse and human E-selectin important for leukocyte adhesion. *ExpCell Res* 269, 266 – 274.
- [78] On the species specificity of the interaction of LFA-1 with intercellular adhesion molecules ; SC Johnston, ML Dustin, ML Hibbs and TA Springer; Center for Blood Research, Boston, *J Immunol.* 1990 Aug 15;145(4):1181-7
- [79] Rat and mouse VCAM-1 sequences have been published and each molecule has been found to be approximately 75% identical to the human molecule. ; Hession, C et al. 1992 *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 187:584.
- [80] Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, *et al.* (August 1995). "Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene". *Genomics* 28 (3): 495–500.
- [81] Deloukas P, Earthrowl ME, Grafham DV, *et al.* (May 2004). "The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 10". *Nature* 429 (6990): 375–81.

- [82] Relationship between selectin-mediated rolling of hematopoietic stem and progenitor cells and progression in hematopoietic development. ;Greenberg AW, Kerr WG, Hammer DA. ; blood. 2000 Jan 15;95(2):478-486
- [83] Differential effect of E-selectin antibodies on neutrophil rolling and recruitment to inflammatory sites ; Ramos CL, Kunkel EJ, Lawrence MB, Jung U, Vestweber D, Bosse R, McIntyre KW, Gillooly KM, Norton CR, Wolitzky BA, Ley K Blood. 1997 Apr 15;89(8):3009-18.
- [84] Identification of E-selectin as a novel target for the regulation of postnatal neovascularization: implications for diabetic wound healing. ;Liu ZJ, Tian R, An W, Zhuge Y, Li Y, Shao H, Habib B, Livingstone AS, Velazquez OC. ;Ann Surg. 2010 Oct;252(4):625-34.
- [85] Bruehl R.E., Springer T.A., Bainton D.F. Quantitation of L-selectin distribution on human leukocyte microvilli by immunogold labeling and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 1996;44:835–844.
- [86] The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha regulates chemokine receptor expression on ovarian cancer cells. ; Kulbe H, Hagemann T, Szlosarek PW, Balkwill FR, Wilson JL.; Cancer Res. 2005 Nov 15;65(22):10355-62
- [87] Involvement of tumor necrosis factor- α in the upregulation of CXCR4 expression in gastric cancer induced by *Helicobacter pylori* ; Chenghai Zhao^{1*}, Xiaomei Lu¹, Xianmin Bu², Ning Zhang¹ and Wei Wang¹ ;*BMC Cancer* 2010, 10:419
- [88] Knockdown of TNFR1 by the sense strand of an ICAM-1 siRNA: dissection of an off-target effect ; Paul R. Clark,^{1,2,4*} Jordan S. Pober,^{1,2,3,4} and Martin S. Kluger ; Nucleic Acids Res. 2008 March; 36(4): 1081–1097

8. Anhang

I Thesen

1. Das Homingverhalten der humanen CD 133⁺ Stammzellen wurde in den Gefäßen des M.cremaster, dessen Eigenschaften ein in-vivo Modell ermöglichen, mit Hilfe der intravitalen Mikroskopie beobachtet.
2. Zu diesem Zweck wurden SCID-Mäuse, die eine fehlende zelluläre Immunität aufweisen, verwendet, um Immun-Reaktionen zu verhindern, während die humanen CD 133⁺ Stammzellen im Sinne eines Xenotransplantates verwendet wurden.
3. Das Human-Maus-Modell, welches in unserem Fall verwendet wurde, ist sinnvoll, da die Moleküle, die für das endotheliale ``Rolling`` und die endotheliale Adhäsion verantwortlich sind (SDF-1 α , CXCR4, E-Selektine, VCAM-1, ICAM-1), eine Sequenzhomologie von 73 – 99% aufweisen.
4. Humane CD 133⁺ Stammzellen zeigen eine spontane ``Homing``- Neigung, während unter lokaler Behandlung mit SDF-1 α und TNF α diese Zielwanderung vielfach verstärkt wird.
5. Dem stammzellseitige CD 133-Molekül könnte eine Rolle bei der Vermittlung des initialen Stammzellrollings zukommen.
6. Die Adhäsion der humanen CD 133⁺ Stammzellen findet vorrangig in den kleinen Venolen, die einen Gefäßdurchmesser von 20 – 70 μ m haben, statt.

7. Dem auf Endothelzellen exprimierten CXCR4-Rezeptor kommt eine zentrale Rolle bei der Vermittlung der endothelialen Adhäsion humaner CD 133⁺ Stammzellen zu.
8. Die erhobenen Ergebnisse deuten auf eine additive Wirkung von SDF-1 α und TNF α bei der Vermittlung der endothelialen Adhäsion von humanen CD 133⁺ Stammzellen hin.
9. Neben SDF-1 α , ist TNF α ein wichtiger Stammzellhomingsfaktor der humanen CD 133⁺ Stammzellen.
10. In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Methode zur hochpräzisen Quantifizierung des CXCR4-Rezeptor-Signals in den Endothelzellen entwickelt.

II Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die, der medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit, in der Klinik für Herzchirurgie und in der Forschungsgemeinschaft für kardialen Gewebs- und Organersatz (FKGO) unter Betreuung von Herrn Prof.Dr.med.habil. Gustav Steinhoff selbstständig angefertigt und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Rostock, Februar 2013

Dritan Useini

III Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Prof. Dr. med. habil. Gustav Steinhoff, der mir eine Doktorarbeit in Deutschland und eine Ausbildungsstelle in der Uni- Klinik für Herzchirurgie in Rostock ermöglichte. Herrn Prof. Steinhoff habe ich diese Arbeit gewidmet.

Ich möchte mich bei Herrn Dr.med. Peter Donndorf bedanken der als Betreuer in jeder Zeit zur Seite stand.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei Frau Dr.med.vet. Martina Kretschmer bedanken für die hervorragende Hilfe bei sprachlichen Korrekturen dieser Arbeit.

Herzlich bedanke ich mich bei meiner Frau, Dr.Blerta Beluli, die mich während der ganzen Zeit unterstützt hat.

Schließlich bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeitern der FKGO, ohne deren Hilfe es viel schwerer gewesen wäre.

IV Liste häufig verwendeter Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
CD	Cluster of differentiation
CFDA	Carboxyfluoreszin-Diacetatester
FACS	Fluorescence activated cell sorting
HA	Hyaluronsäure
HCELL	Hematopoietic Cell E-selectin/L-selectin Ligand
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
KM	Knochenmark
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LSM	Laser scanning microscopy
MACS	Magnetic cell sorting
NF-kB	Nuclear Factor-Kappa B
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
RT	Raumtemperatur
SDF-1 α	Stromal cell-derived factor 1 alpha

SZ	Stammzellen
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VLA 4/5	Very Late Antigen-4/5

V Lebenslauf

Name: Dritan Useini (Naxhaku)
Geboren am: 8.April.1983 in Ohrid / Mazedonien
Eltern: Avni und Merita Useini (Naxhaku)
Nationalität: albaner
Familienstand: verheiratet

Ausbildung: Grundschule in Ohrid

Mittlere Ausbildung in ``Niko Nestor`` - Struga ; Gymnasium, Richtung

Naturwissenschaften-Mathematik 1997-2001

Hochschulausbildung – Medizinische Fakultät

``St. Kyrill und Methodius`` Skopje ; Oktober 2001-November 2008

Berufserfahrung in dem Fachkrankenhaus für Orthopädie und Traumatologie

``St Erazmo`` - Ohrid; Dezember 2008-November 2009

Berufserfahrung in dem Fachkrankenhaus für Herzchirurgie ``Filip Vtori`` -

Skopje; Dezember 2009- November 2010

Doktorand im Referenz- und Translationszentrum für kardiale

Stammzelltherapie –Rostock; Mai 2011- November 2011

unter Prof.Dr.med habil. Gustav Steinhoff

Seit Dezember 2011 Assistenzarzt in der Uni-Klinik und Poliklinik

für Herzchirurgie; Rostock

Uni-Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie; Rostock
2013

Approbation - Landesamt für Heilberufe M-V; 18.02.2013

Veröffentlichungen:

Peter Donndorf, **Dritan Useini**, Cornelia Lux, Brigitte Vollmar, Evgenya Delyagina, Michael Laupheimer, Alexander Kaminski and Gustav Steinhoff ; Analysing migratory properties of human CD 133⁺ stem cells in vivo after intraoperative sternal bone marrow isolation; Cell Transplantation 2013; 22(9): 1627-35

Donndorf P, Ludwig M, Wildschütz F, **Useini D**, Kaminski A, Vollmar B, Steinhoff G; Intravital microscopy of the microcirculation in the mouse cremaster muscle for the analysis of peripheral stem cell migration. J Vis Exp. 2013 Nov 5;(81)

Dritan Useini, Peter Donndorf, Cornelia Lux, Evgenya Delyagina, Alexander Kaminski and Gustav Steinhoff ; Endothelial CXCR4 promotes sufficient homing of human CD 133⁺ stem cells *in vivo* - Fraunhofer Life Science Symposium 2012 – Leipzig (Poster Presentation)

