Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik

(Department) Tübingen

Abteilung Innere Medizin III

(Schwerpunkte: Kardiologie und Kreislauferkrankungen)

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gawaz

Thrombozytäres bFGF (basic fibroblast growth factor) vermittelt endothelintegrative Funktionen von mesenchymalen Stammzellen *in vitro*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Claudia Amrei Froihofer, geb. Schirrmann

aus

München

2010

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. M. Gawaz
2. Berichterstatter:	Professor Dr. Dr. h.c. G. Ziemer

meiner großartigen Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 7

2. Material und Methoden 10

2.1 Material 10

2.1.1 Antikörper, Beschichtungen und andere Substanzen 10
2.1.2 Medien und Pufferlösungen 12
2.1.3 Geräte 13

2.2 Methoden 14

2.2.1 Thrombozytenisolation 14
2.2.2 Mesenchymale Stammzellisolation 14
2.2.3 Endothelzellisolation und Kultur 15
2.2.4 Adhärenzversuche 15
2.2.5 Flusskammerversuche 15
2.2.6 Versuche zur Interaktion 16
2.2.7 Proliferationsversuche 17
2.2.8 Migrationsversuche (Scratch-Assay) 17
2.2.9 Immunfluoreszenzmikroskopie 18
2.2.10 Integration von MSCs in endothelialen Monolayer 18
2.2.11 Rasterelektronenmikroskopie (Scanning Elektronen Mikroskopie (SEM)) 19
2.2.12 Zytoskelettbetrachtung 20
2.2.13 Durchflusszytometrie (FACS) 20
2.2.14 Statistische Analyse 20

3. Ergebnisse 21

3.1 Thrombozyten vermitteln die Adhäsion von MSCs auf Endothelzellen unter Flussbedingungen 21

3.2 Die Interaktion von MSCs mit Thrombozyten ist durch das Integrin $a_v ß_3$ vermittelt 27

3.3 Thrombozytäres bFGF induziert die Migration und Proliferation von MSCs 29

3.4 Thrombozyten fördern die Integration von MSCs in einen endothelialen Monolayer 37

4. Diskussion 43

5. Zusammenfassung 46

6. Abkürzungsverzeichnis 47

7. Literaturverzeichnis 49

8. Danksagung 53

9. Lebenslauf 55

1. Einleitung

Stammzellforschung ist in der heutigen Medizin sicher eines der vielversprechenderen, aber auch ethisch am meisten diskutierten Themen. Stammzellen bilden im erwachsenen Organismus gleichsam ein Reservoir, das verfügbar ist, um die unterschiedlichsten Arten von Ersatzzellen zu bilden. Die begrenzte Teilungsfähigkeit und Differenzierungsmöglichkeit adulter Stammzellen scheint für mesenchymale Stammzellen (MSC) angesichts ihrer einfachen Zuchtbedingungen und ihrer Multipotenz vernachlässigbar. MSCs kommen physiologisch im menschlichen Knochenmark zwischen 0,01% und 0,02% vor [1] und können in Zellen endo-, exo- und mesodermalen Ursprungs differenzieren. [2]

Vor diesem Hintergrund sowie dem Vorteil, dass mesenchymale Stammzellen dem Patienten selbst entnommen werden können und damit körpereigen und immunkompatibel sind, sind MSCs auch in das Blickfeld kardiovaskulärer Forschung gerückt. Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen heute die häufigste Morbiditäts- und Mortalitätsursache der westlichen Welt dar. In den USA z.B. sind kardiovaskuläre Erkrankungen für 40% aller Todesfälle verantwortlich. [3] Angesichts dieser Zahlen, die aufgrund demographischer Entwicklungen noch zunehmen werden, liegt es nahe, neue Therapiemöglichkeiten zu suchen. Obwohl in den letzten Jahrzehnten neue Therapieoptionen wie ACE-Inhibitoren und Aldosteronantagonisten etabliert wurden, bleibt die Entstehung von Arteriosklerose und deren Folgeerkrankungen wie Schlaganfälle und die akute und chronische Kardiomyopathie bisher nicht verhindert.

Beachtung erhielten MSCs vor allem nachdem es Makino et al gelungen war, MSCs in schlagende Kardiomyozyten in vitro zu differenzieren und Wang et al zeigen konnten, dass die Zahl zirkulierender MSCs nach einem Herzinfarkt deutlich erhöht ist. [4,5] Ebenso wegweisend konnte die Herzfunktion unter transplantierten MSCs in einem Ischämieversuch bei Ratten 4 Wochen nach induzierter Ischämie signifikant verbessert werden. [6]

Andere Studien hingegen zeigen, dass MSCs nicht nur in Linien mesodermalen Ursprungs differenzieren können, sondern auch zu Endothelzellen differenzieren können. [7]
Oswald et al. war es gelungen, eine Endothelzelldifferenzierung der MSCs in Kultur mit FCS und VEGF zu induzieren, wobei eine starke Expressionszunahme endothelspezifischer Marker wie z.B. KDR, FLT-1 (VEGF-Rezeptor 1 und 2) und vWF, sowie phänotypische und funktionelle Eigenschaften von Endothelzellen beobachtet wurden.
Erste Ansätze, Endothelzellschäden der Gefäßwand mit Hilfe der MSC zu reparieren und damit deren Integrität wieder herzustellen, zeigen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Wu et al. Dabei wurde ein ex vivo Zweikammermodell zur Reparatur von Endothelzellschäden verwendet, wobei in der oberen Kammer vaskuläre glatte Muskelzellen von Kaninchen (SMCs) und in der unteren Kammer Endothelzellen von Kaninchen mit humanen MSCs kokultiviert wurden. Die Expression von Flk-1 (VEGF-Rezeptor 2) und vWF wurde als Marker der endothelialen Differenzierung gesehen. Nach 5 Tagen konnte einerseits gezeigt werden, dass eine Expression von Flk-1 in einem Viertel der MSCs vorhanden war und damit eine Endothelzelldifferenzierung stattgefunden hatte, andererseits konnte eine Hemmung der Proliferation und Migration der SMCs unter Anwesenheit der MSCs beobachtet werden. [8]

Über Thrombozyten ist bekannt, dass sie sich innerhalb kurzer Zeit im Bereich von Gefäßwandschäden anlagern, damit den Defekt verschließen und einen Heilungsprozess initiieren. [9] Kürzlich konnte ein neuer durch Thrombozyten vermittelter Heilungsprozess beschrieben werden, wobei Thrombozyten die Adhäsion zirkulierender Progenitorzellen an Kollagen vermittelten und diese zu reifen Endothelzellen differenzierten. [10-12]
Nachdem MSCs sich sowohl in Kardiomyozyten als auch in Endothelzellen differenzieren können und sie ähnlich wie CD34+ hämatopoetische Stammzellen unter hohen Scherkräften in einer koordinierten Kaskade, an der Selektine und Integrine beteiligt sind, an der Gefäßwand interagieren können

[13], bleiben die jeweiligen Mechanismen immer noch unverstanden und Möglichkeiten der Einflussnahme eventuell ungenutzt.
In Anbetracht dessen und unserer früheren Ergebnisse stellten wir folgende Fragen:

- Vermitteln Thrombozyten die Adhäsion von MSCs an die Gefäßwand und wenn ja, über welche Mechanismen oder Oberflächenstrukturen geschieht dies?
- Können auch funktionelle Eigenschaften der MSCs wie die Proliferation und Migration durch Thrombozyten verbessert werden und welche Mechanismen bzw. Substanzen sind dies?
- Können Thrombozyten die Integration von MSCs in einen endothelialen Monolayer vermitteln?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper, Beschichtungen und andere Substanzen

Antikörper	Klon	Hersteller
anti-bFGF	FB-8	Sigma, Steinheim, Deutschland
anti-CD51	AMF7	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-CD11b	BEAR1	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-CD49d	9F10	BD Bioscience, Bedford, USA
anti- $a_v ß_3$	LM609	Chemicon International
anti-CD41	P2	Immunotech, Marseille, Frankreich
inhibierender Ak anti-CD61 ($ß_3$-Integrin)	SZ21	Immunotech, Marseille, Frankreich
7E3 (IgG1 mouse)	Zur Verfügung gestellt von Dr. Barry Coller, Mount Sinai Hospital, New York, NY	

Beschichtungen	Hersteller
Kollagen I	BD Bioscience, Bedford, USA
Fibronektin	BD Bioscience, Bedford, USA
Human plasma Vitronektin	Calbiochem, Deutschland

Substanz	Hersteller
DMEM	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
FCS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
L-Glutamin Nr. 25030	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin / Streptomycin	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PBS	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Hepes-Puffer	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
D-Glucose	Sigma, Steinheim, Deutschland
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
humanes IL-1ß	Tebu-Bio (Peprotech Inc.), New Jersey, USA
humanes TNF-a	Tebu-Bio (Peprotech Inc.), New Jersey, USA
Thrombin	Sigma, Missouri, USA
Hank`s Puffer	Cambrex, Verviers, Belgien
Cell Tracker Green CMFDA 0,5µM	Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, USA
Cell Tracker Red CMTPX 0,5µM	Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, USA
MINI-67 staining kit	Sigma, Missouri, USA
Entellan	Merck, Darmstadt, Deutschland
BSA	Sigma, Missouri, USA
RGD	Calbiochem, Deutschland
RED	Calbiochem, Deutschland

2.1.2 Medien und Pufferlösungen

Medien und Pufferlösungen	Zusammensetzung
MSC-Kulturmedium	DMEM + 10% FCS + 100 IU/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 1mM Glutamin
HAEC-Kulturmedium	EGM-2 BulletKit
Thrombozytenüberstand	Thrombozyteninkubation in DMEM über 24h, anschließend abzentrifugieren der Thrombozyten
Tyrodes-Puffer 10x	1000 ml Aqua dest. + 80 g NaCl + 10,15 g $NaHCO_3$ + 1,95 g KCl
Tyrodes-Hepes-Puffer (pH 7,4)	90 ml Aqua dest. + 0,1 g BSA + 0,1 g Glucose + 10 ml Tyrodes-Puffer 10x mit Hepes-Puffer auf pH 7,4 eingestellt
Tyrodes-Hepes-Puffer (pH 6,5)	Tyrodes-Hepes-Puffer pH 7,4 mit HCl auf pH 6,5 eingestellt
ACD-Puffer	500 ml Aqua dest. +12,5 g Natriumcitrat + 6,82 g Zitronensäure + 10 g Glucose mit NaOH auf pH 4,69 eingestellt

2.1.3 Geräte

Geräte	Hersteller
Flusskammer (Parallel-Plate-Flow Chamber)	Oligene, Berlin, Deutschland
Phasenkontrastmikroskop Axiovert 200	Zeiss, Jena, Deutschland
Rasterelektronenmikroskop (Scanning Elektronen Mikroskopie (SEM))	Cambridge Stereoscan, Cambridge, UK
Durchflusszytometer: Typ FACSCalibur	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA
Analysesoftware: Cellquest oder Cellquest Pro	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA
Brutschrank: HeraCell 240	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge: Heraeus Megafuge 1.0 R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zellzählautomat: Se 9000	Sysmex, Kobe, Japan
Perfusor fm	Braun, Melsungen, Deutschland
Chronolog Lumi Aggregometer	Fa. Chrono-Log

2.2 Methoden

2.2.1 Thrombozytenisolation

Wie auch schon in früheren Arbeiten beschrieben [11], wurden aus der Vena mediana cubiti gesunder Freiwilliger jeweils zu Versuchsbeginn eine Blutprobe gewonnen. Um keine zusätzlichen Plasmabestandteile, die die Versuche beeinflussen könnten, im Versuchsaufbau zu erhalten, wurde auf die Verwendung von plättchenreichem Plasma verzichtet und die Thrombozytenisolation durchgeführt. Auf eine besonders vorsichtige Handhabe, um eine Aktivierung und Aggregation auszuschließen, wurde stets geachtet. Die venöse Blutprobe wurde sogleich mit ACD-(Acetat-Citrat-Dextrose)Puffer sorgfältig gemischt, um eine ausreichende Gerinnungshemmung zu gewährleisten. Nach Zentrifugieren über 20 Minuten bei 430 g wurde das gewonnene, plättchenreiche Plasma (PRP) abgehoben, zu Tyrodes-Hepes-Puffer (pH 6,5) gegeben und erneut bei 900 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das entstandene Plättchenpellet in Tyrodes-Hepes-Puffer (pH 7,4) resuspendiert. Die Thrombozytenkonzentration wurde mittels eines Zellzählautomaten gemessen und anschließend je nach Versuchsbedingung auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

2.2.2 Mesenchymale Stammzellisolation

Als Ausgangsmaterial wurden Überschüsse von Knochenmarkaspiraten, die zu diagnostischen Zwecken abgenommen wurden, verwendet. Die heparinisierten Proben mit einem mittleren Volumen von 0,5ml wurden mittels Ammoniumchlorid-Lyse über 10 Minuten bei Raumtemperatur von Erythrozyten befreit. Nach einem Waschvorgang mit Hank`s Puffer wurden die Zellen in Medium aufgenommen und kultiviert.

2.2.3 Endothelzellisolation und Kultur

Humane arterielle endotheliale Zellen (HAECs) wurden aus Proben humaner Iliakalarterien, die bei Organspenden verworfen wurden, isoliert, wie in früheren Publikationen schon beschrieben.[14] Nach mechanischer Entfernung der HAECs wurde eine Subkultivierung in gelatinebeschichteten Plastikflaschen durchgeführt, wobei ein modifiziertes EGM-2 BulletKit verwendet wurde.

2.2.4 Adhärenzversuche

Um das Adhärenzverhalten von MSCs an Thrombozyten unter statischen Bedingungen zu untersuchen, wurden Adhärenzversuche auf immobilisierten Thrombozyten durchgeführt. Dazu wurden 96-Well-Platten mit Fibronektin, Vitronektin und Kollagen I in einer Konzentration von 10µg/ml beschichtet. In einigen Wells wurden zusätzlich isolierte Thrombozyten in einer Konzentration von $2x10^8$/ml vorgelegt, über eine Stunde adhärent werden lassen und anschließend einmal mit PBS gewaschen, um nicht haftende Thrombozyten zu entfernen. Anschließend wurden mesenchymale Stammzellen in einer Konzentration von $7x10^4$/ml in die beschichteten Wells gegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurde dreimalig mit PBS gewaschen, um nicht haftende Zellen zu entfernen. Daraufhin wurden die Wells photographiert und die adhärenten MSCs quantifiziert.

2.2.5 Flusskammerversuche

Um Hinweise, die sich aus unseren Versuchen zur statischen Adhäsion ergeben haben, zusätzlich auch unter dynamischen Bedingungen zu untersuchen, wurden Flusskammerversuche durchgeführt. Dynamische Bedingungen zeichnen sich durch das Vorhandensein von Scherkräften aus, die sich z.B. in Blutgefäßen durch die vorherrschende Strömung einstellen, und beeinflussen damit biologische Funktionen zirkulierender und adhärenter Zellen. Um in vitro eine solche Situation der arteriellen Endstrombahn nachzuahmen, wurde eine Parallel-Platten-Flusskammer, wie in früheren Publikationen schon beschrieben [12], verwendet. Dazu wurden Deckgläser in

einer 6-Well-Platte mit Kollagen I, Fibronektin oder Vitronektin in einer Konzentration von 10µg/ml beschichtet und vollständig getrocknet. MSCs wurden in oben genanntem Kulturmedium resuspendiert ($2{,}5x10^5$/ml) und anschließend acht Minuten über die Beschichtungen perfundiert. Die Flussgeschwindigkeit wurde dabei so gewählt, dass Scherraten von 2000/s vorherrschten, wie sie arteriellen Scherraten entsprechen.

Um den Einfluss der Thrombozyten dabei zu verstehen, wurden bei einigen Experimenten zunächst Thrombozyten ($2x10^8$/ml), die in Tyrodes-Hepes-Puffer (pH 7,4) gelöst waren, bei gleichen Scherraten für zwei Minuten über die Beschichtungen perfundiert. Gleich im Anschluss wurden dann MSCs für acht Minuten perfundiert, wie eben beschrieben. Adhäsion und Rollen der Zellen wurden mittels eines Phasenkontrastmikroskops vergrößert und über eine digitale Videokamera aufgezeichnet. Die entstandenen Videoaufnahmen wurden später in Echtzeit ausgewertet, wobei sowohl adhärente als auch rollende MSCs gezählt wurden.

In weiteren Experimenten wurden die Deckgläser mit humanen arteriellen Endothelzellen, die 18 Stunden vor den Flusskammerversuchen mit Interleukin-1β (10µg/ml) oder Thrombozyten ($2x10^8$/ml) koinkubiert wurden, beschichtet. Mit diesen beschichteten Deckgläsern wurden anschließend Flusskammerversuche mit MSCs ($2{,}5x10^5$/ml) wie oben beschrieben durchgeführt.

2.2.6 Versuche zur Interaktion

Um bei der beobachteten Interaktion zwischen Thrombozyten und MSCs mögliche daran beteiligte Mechanismen zu finden, wurden MSCs in einer 96-Well-Platte zu einem Monolayer konfluent wachsen gelassen. Isolierte humane Thrombozyten ($1x10^8$/ml), die mit Rhodamin G (1:2000) für 30 Minuten gefärbt worden waren, konnten anschließend für 40 Minuten auf den immobilisierten MSCs adhärieren. Um nicht adhärierende Thrombozyten zu entfernen, wurde anschließend zweimalig mit PBS gewaschen. Die adhärenten Thrombozyten wurden unter Verwendung eines Rasters fluoreszenzmikroskopisch ausgezählt.

In Ansätzen mit dem blockierenden monoklonalen Antikörper 7E3 (10µg/ml) und den Peptiden RGD und RED wurden die MSCs zunächst für 30 Minuten damit vorinkubiert und erst dann wurden die Thrombozyten hinzugegeben.
Zusätzlich wurden einige Ansätze mit ADP-aktivierten Thrombozyten durchgeführt.

2.2.7 Proliferationsversuche

Um den Einfluss von Thrombozyten auf die Proliferation von MSCs zu untersuchen, wurden definierte Zellzahlen von MSCs (500/Well, 1000/Well und 2000/Well; gezählt mittels Neubauer Zählkammer) mit oder ohne isolierte Thrombozyten (2 x 10^8/ml) kultiviert. Um den Verlauf der Proliferation beurteilen zu können, wurden nach drei und fünf Tagen Photographien angefertigt und die Zellzahl von neun unabhängigen Gesichtsfeldern ermittelt. Nach fünf Tagen wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst und die Anzahl zusätzlich mittels Neubauer Zählkammer ermittelt.
In manchen Versuchen wurden zusätzlich blockierende monoklonale Antikörper (anti-bFGF, anti-CD51 als Kontrollantikörper) sowie TNF-a als Positivkontrolle hinzugegeben.

2.2.8 Migrationsversuche (Scratch-Assay)

MSCs wurden in einer 48-Well-Platte ausgelegt und bis zu 70-80% Konfluenz kultiviert. Dann wurde mit einer Plastikpipettenspitze eine Verletzung von annähernd 1mm Breite gesetzt. Nach einem anschließenden Mediumwechsel, um die gelösten Zellen zu entfernen, wurden isolierte Thrombozyten (0,1x10^8/ml bis 1x10^8/ml), die bei einigen Versuchen mit Thrombin (1U/ml) aktiviert wurden, sowie die blockierenden Antikörper anti-bFGF, anti-PDGF (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) und anti-CD49d als Kontrollantikörper in einer Konzentration von 5µg/ml hinzupipettiert, um spezifische Mediatoren, die bei der plättchenvermittelten Migration beteiligt sind, zu bestimmen. Das Aktivierungsprotein TNF-a diente als Positivkontrolle.

In weitergehenden Versuchen wurden konfluent gewachsene humane Endothelzellen und mesenchymale Stammzellen koinkubiert, anschließend wie oben beschrieben eine Verletzung gesetzt und das Medium gewechselt. Nach Zugabe der isolierten Thrombozyten ($0{,}1x10^8$/ml), Thrombozytenlysat oder von Thrombozytenüberstand, wurde deren Einfluss auf MSCs und Endothelzellen bezüglich der Wundheilung beobachtet. In einigen Ansätzen waren die MSCs vor Beginn der Endothelzellkokultur mit Thrombozyten ($1x10^8$/ml) über 24 Stunden vorinkubiert worden. Kontrollansätze, bei denen eine Kokultur der Endothelzellen mit MSCs ausblieb und isolierte Thrombozyten ($0{,}1x10^8$/ml) zum verletzten Endothelzellmonolayer gegeben wurden, wurden ebenfalls angelegt.

2.2.9 Immunfluoreszenzmikroskopie

Bei einem Teil der Migrationsversuche wurden die Zellen auf den endothelialen Marker vWF nach einem Standardprotokoll gefärbt und immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Dazu wurden die Zellen mit einer 2% Formaldehydlösung über 20 Minuten fixiert. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2% Glycin gewaschen, mit 0,2% Triton-X100 permeabilisiert und dann mit PBS, das einen PE-markierten anti-mouse-vWF-Antikörper (Dako, Deutschland) in einer Konzentration von 5µg/ml enthielt, über 30 Minuten inkubiert. Unspezifische Bindung wurde durch Bovines Serum Albumin (BSA 3%, 1h) verhindert. Die Ansätze wurden mittels Immunfluoreszenzmikroskopie ausgewertet.

2.2.10 Integration von MSCs in endothelialen Monolayer

Humane arterielle Endothelzellen (HAECs) wurden zu einem Monolayer wachsen gelassen. MSCs wurden mit Hilfe eines MINI-67 staining kit entsprechend der Herstelleranweisung gefärbt. Dazu wurde eine Zellsuspension mit dem PKH67 Farbstoff für 3-5 Minuten inkubiert und dann die Reaktion mit FCS gestoppt. Nach mehreren Waschvorgängen konnten die Zellen für die Experimente verwendet werden. Die gefärbten MSCs wurden zum

Endothelzellmonolayer gegeben und über drei Stunden koinkubiert. Danach wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd fixiert, gewaschen und mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Dabei wurden die MSCs anhand morphologischer Kriterien bewertet, wie in der Literatur erwähnt [15]: die MSCs entwickelten kleine zytoplasmatische Ausläufer, die mit den Endothelzellen in Kontakt traten. Beginnend mit diesen Ausläufern verbesserten die MSCs im Verlauf die Kontaktfläche und zeigten eine zunehmend flachere Zellmorphologie. Eine MSC wurde für integriert eingestuft, wenn einerseits eine vollständige Verzweigung und andererseits eine vollständige Abflachung, sodass Zellorganellen erkennbar waren, vorhanden waren.

Um herauszufinden ob die MSCs einen endothelialen Phänotyp zeigen, wurden die MSCs mit PKH67 gefärbt und zum endothelialen Monolayer gegeben. Nach drei Stunden wurden die Zellen auf CD31 (PECAM-1/CD31, Pharmingen, San Diego, USA) hin gefärbt und immunfluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

Um spezifische Mediatoren dieser thrombozytenvermittelten Integration zu identifizieren, wurden in einigen Versuchen blockierende monoklonale Antikörper wie anti-bFGF, anti-PDGF und anti-CD49d als Kontrollantikörper in einer Konzentration von je 5µg/ml hinzugegeben.

2.2.11 Rasterelektronenmikroskopie (Scanning Elektronen Mikroskopie (SEM))

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden MSCs sowohl mit, als auch ohne Thrombozyten ($2x10^8$Zellen/ml) 24 Stunden auf Deckgläsern kultiviert. Daraufhin wurden die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen, die Deckgläser mit 2% (w/v) Glutaraldehyd in PBS über eine Stunde fixiert und durch eine aufsteigende Ethanolreihe bis hin zu reinem Ethanol dehydriert. Nach Besprühen mit Gold-Palladium konnten rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt werden.

2.2.12 Zytoskelettbetrachtung

MSCs ($5x10^3$/ml) wurden auf Deckgläsern in Medium, in Thrombozytenüberstand, mit isolierten Thrombozyten ($1x10^8$/ml) und unter der Zugabe des blockierenden Antikörpers anti-bFGF für 240 Minuten kultiviert. Nach Fixierung und Phalloidinfärbung mit Alexa Fluo 488 und nach Eindecken mit Entellan folgte die Auswertung mittels Immunfluoreszenzmikroskopie, indem die gefärbten Zellen nach den Kriterien „round“ bzw. „aligned“ ausgezählt wurden. „Round“ stand hierbei für eine eher runde Zellmorphologie, bei der das Zytoskelett nach allen Richtungen ausgerichtet war. Eine Zelle, die als „aligned“ eingestuft wurde, stellte sich gerichtet und schmal dar und wies eine parallele Anordnung ihres Zytoskeletts auf.

2.2.13 Durchflusszytometrie (FACS)

Kultivierte MSCs wurden in einer Konzentration von $1x10^5$/ml mit frisch isolierten Thrombozyten in einer Konzentration von $1x10^8$/ml über 30 Minuten in einem konventionellen Aggregometer unter Agitation inkubiert. Nachdem mit Tyrodes-Puffer gewaschen wurde, wurden die MSCs mit einem FITC-markierten anti-CD41 Antikörper sowie mit anti-CD11b als Kontrollantikörper inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie ausgewertet. Dabei stellen CD41-positive MSCs mit Thrombozyten beladene MSCs dar.
Des Weiteren wurden MSCs auf die Expression von Adhäsionsrezeptoren auf ihrer Oberfläche mittels durchflusszytometrischer Messungen untersucht. Verwendet wurden FITC- oder PE-gelabelte Antikörper. Als Kontrollen dienten unspezifisch bindende Antikörper des gleichen Isotyps.

2.2.14 Statistische Analyse

Die gewonnenen Daten wurden mittels Student t-Test oder Varianzanalyse auf ihre statistische Aussagekraft hin untersucht. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung, $p<0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet und in den Abbildungen mit „ * “ markiert.

3. Ergebnisse

3.1 Thrombozyten vermitteln die Adhäsion von MSCs auf Endothelzellen unter Flussbedingungen

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten einen zentralen Adhäsionsmediator für die Vermittlung von murinen und humanen zirkulierenden Stammzellen an freiliegendem Kollagen und an Gefäßläsionen darstellen. [11,12] Deshalb nahmen wir an, dass Thrombozyten ebenso die Adhäsion von MSCs an freiliegendes Kollagen vermitteln können. Überraschenderweise war die Adhäsion an immobilisierten Thrombozyten verglichen mit der Adhäsion an Kollagen allein nur geringfügig erhöht. (Abb.1.)

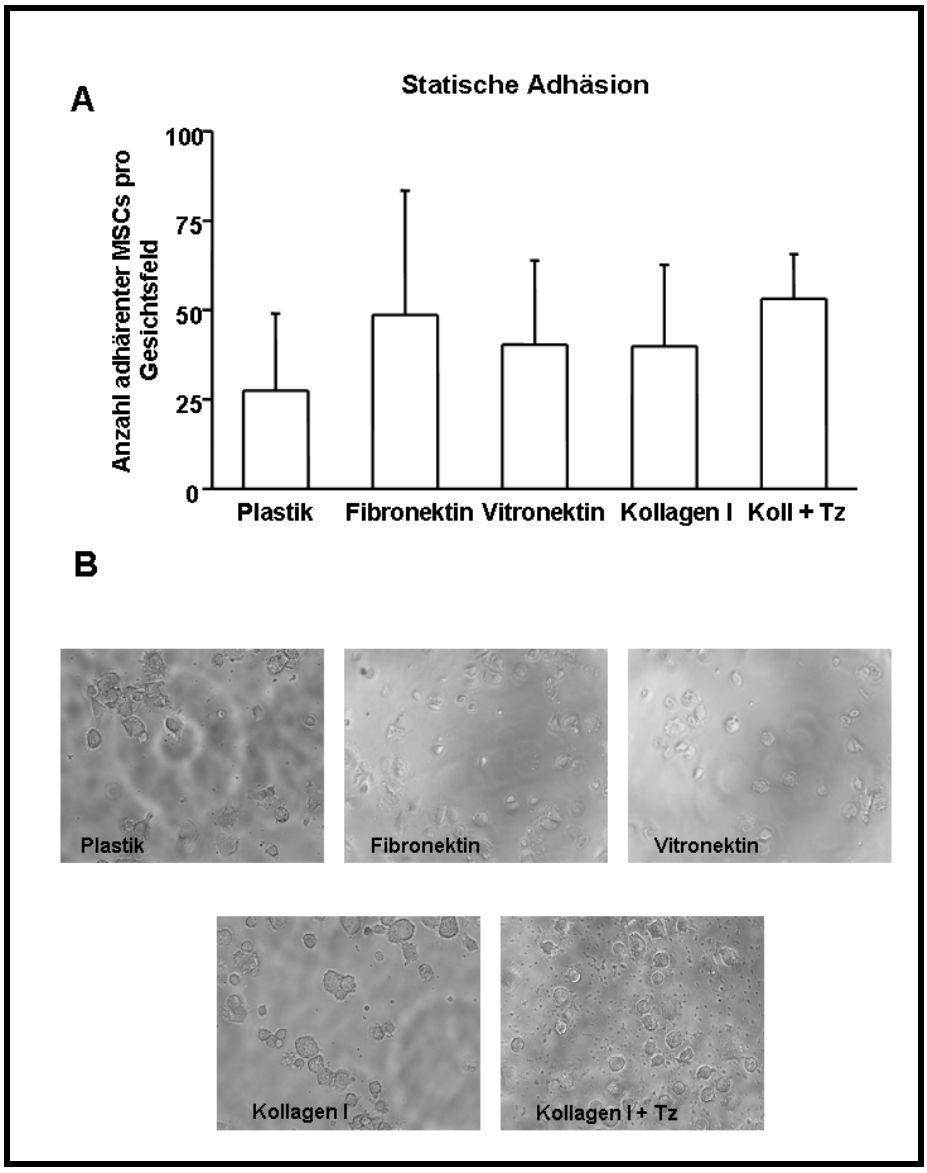

***Abb. 1.**:*

A: *Anzahl adhärenter MSCs pro Gesichtsfeld nach dreimaligem Waschen auf unterschiedlichen Beschichtungen, sowie unter dem Einfluss von Thrombozyten. (n = 4)*

B: *Repräsentative Beispielbilder dieser statischen Adhäsion*

Mit einem Flusskammersystem untersuchten wir die Adhäsion von MSCs unter arteriellen Scherkräften. Die ohnehin nur diskrete Zunahme der Adhäsion auf immobilisierten Thrombozyten unter statischen Bedingungen, ließ sich unter arteriellen Scherkräften nicht bestätigen.

Auf gleiche Art und Weise wurden humane arterielle Endothelzellen immobilisiert und mit Thrombozyten oder IL-1β behandelt. Interessanterweise war jetzt die Adhäsion auf Endothelzellen unter dem Einfluss der Thrombozyten im Gegensatz zum unbehandelten Endothel signifikant erhöht. Ein ähnlicher Anstieg der MSC-Rekrutierung konnte beobachtet werden, als die Endothelzellen mit IL-1β aktiviert wurden. (Abb. 2.)

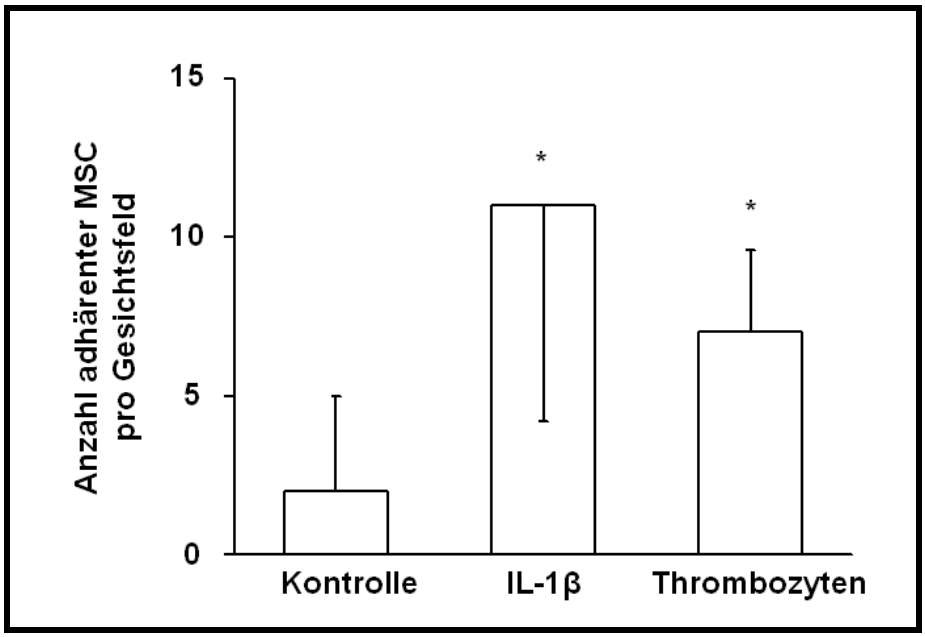

Abb. 2.:
*Anzahl adhärenter MSCs auf Endothel unter thrombozytärem Einfluss und bei Aktivierung mittels IL-1b. (n = 4; * p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle)*

Auch die Anzahl der rollenden MSCs auf Endothel in Anwesenheit von Thrombozyten oder bei Aktivierung mit IL-1β als Positivkontrolle war vermehrt. (Abb.3.)

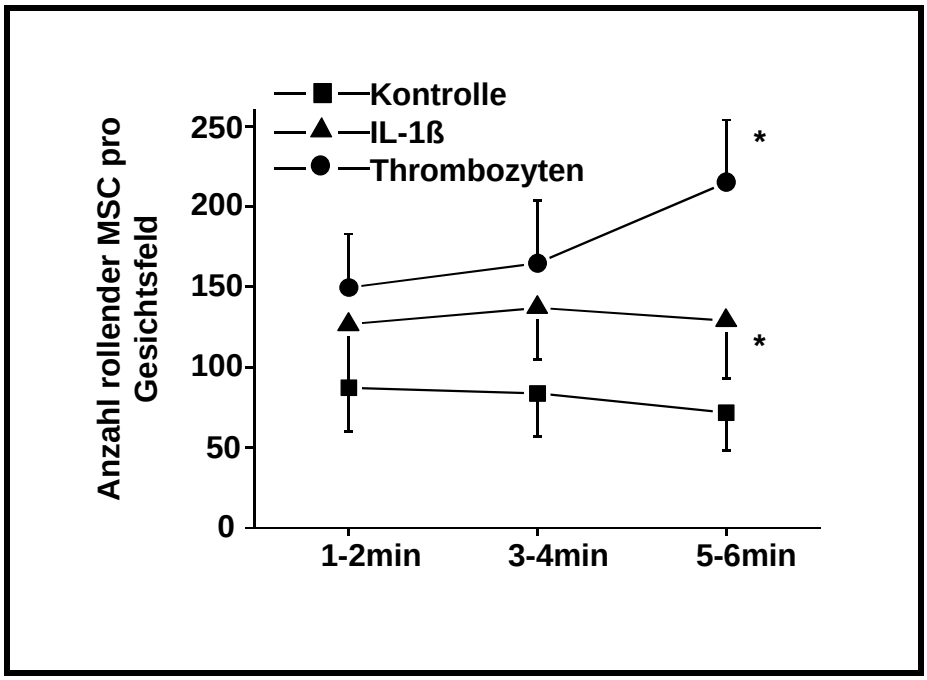

***Abb. 3.**:*
*Kinetik der Anzahl rollender MSCs auf Endothelzellen in definierten Zeitintervallen, sowohl unter dem Einfluss von Thrombozyten, als auch nach Aktivierung der Endothelzellen mit IL-1b. (n = 4; * p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle)*

Des Weiteren konnten wir vermehrte Koaggregation von Thrombozyten und MSCs unter Agitation nachweisen. Dazu wurde die Fluoreszenzintensität von anti-CD41, welcher ein monoklonaler Antikörper gegen den GPIIb/IIIa-Rezeptor auf Thrombozyten ist, gemessen. Nach Koinkubation von MSCs mit Thrombozyten konnte ein signifikanter Anstieg der CD41-positiven MSCs beobachtet werden, was unter Zugabe von Thrombin noch verstärkt nachweisbar war. Als Negativkontrolle wurde die Fluoreszenzintensität von CD11b gemessen, was auf Thrombozyten nicht exprimiert wird, und damit lediglich unspezifische Bindungen des Antikörpers darstellt. Hierbei zeigte sich hingegen keine Intensitätszunahme bei Koinkubation, sowie unter Thrombineinfluss. (Abb. 4.)

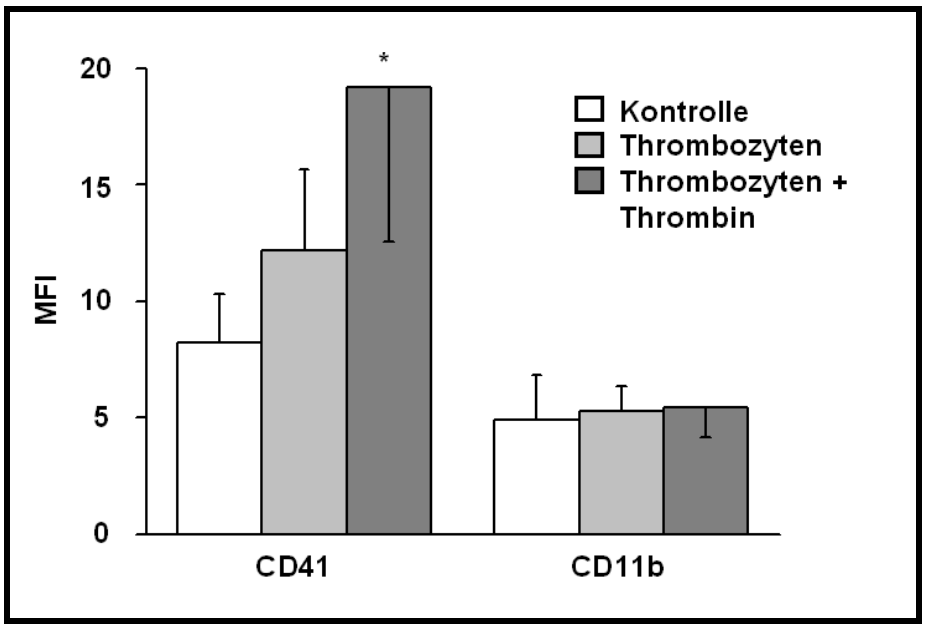

Abb. 4.:
Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität nachdem kultivierte MSCs zunächst mit Thrombozyten über 30 Minuten koinkubiert wurden und anschließend nach einem Waschvorgang mit Tyrodes-Puffer mit FITC-markiertem anti-CD41 bzw. anti-CD11b monoklonalem Antikörper inkubiert und mittels FACS-Analysen sichtbar gemacht wurden.
*(n = 5; * p<0,05 im Vergleich zur Pufferkontrolle)*

Mittels Elektronenmikroskopischer Aufnahmen (Scanning Electron Microscopy-SEM) konnten auf MSCs gebundene Thrombozyten deutlich sichtbar gemacht werden. (Abb. 5.)

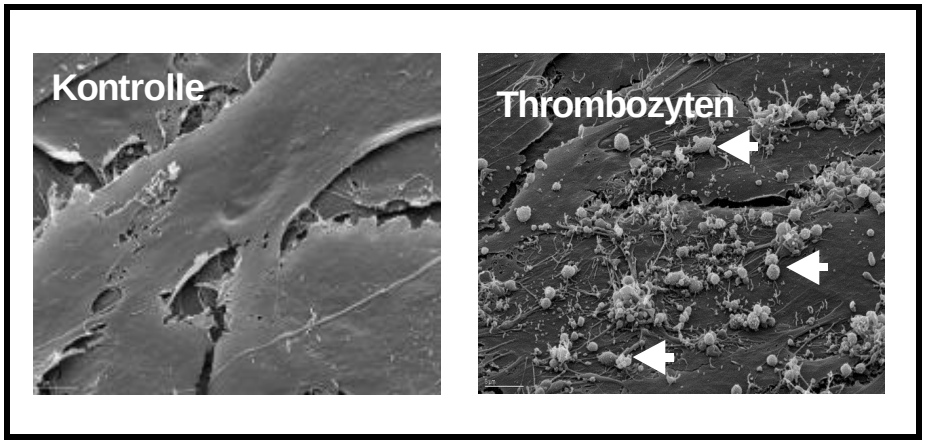

Abb. 5.:
Elektronenmikroskopische Aufnahmen adhärenter Thrombozyten.
→ zeigen auf adhärente Thrombozyten.

3.2 Die Interaktion von MSCs mit Thrombozyten ist durch das Integrin $a_v ß_3$ vermittelt

Frühere Untersuchungen konnten zeigen, dass die Adhäsion zirkulierender Stammzellen auf Thrombozyten oder Endothel durch die Integrine $ß_1$ und $ß_2$ vermittelt ist. [11,12,16] In FACS-Analysen zur Identifizierung von Oberflächenstrukturen auf MSCs konnten wir das Integrin $a_v ß_3$ nachweisen, welches ein etablierter Rezeptor bei Adhäsionsprozessen von Thrombozyten ist. Anti-CD51 erkennt dabei die v-Untereinheit und anti-CD61 die $ß_3$-Untereinheit des Vitronektinrezeptors. [17] Nicht exprimiert wird CD11b und CD18, was der Oberflächenstruktur MAC-1, dem $a_M ß_2$-Integrin entspricht. (Abb. 6.) Das Integrin $a_v ß_3$ ist damit ein möglicher Vermittler der beschriebenen Interaktion zwischen Thrombozyten und MSCs.

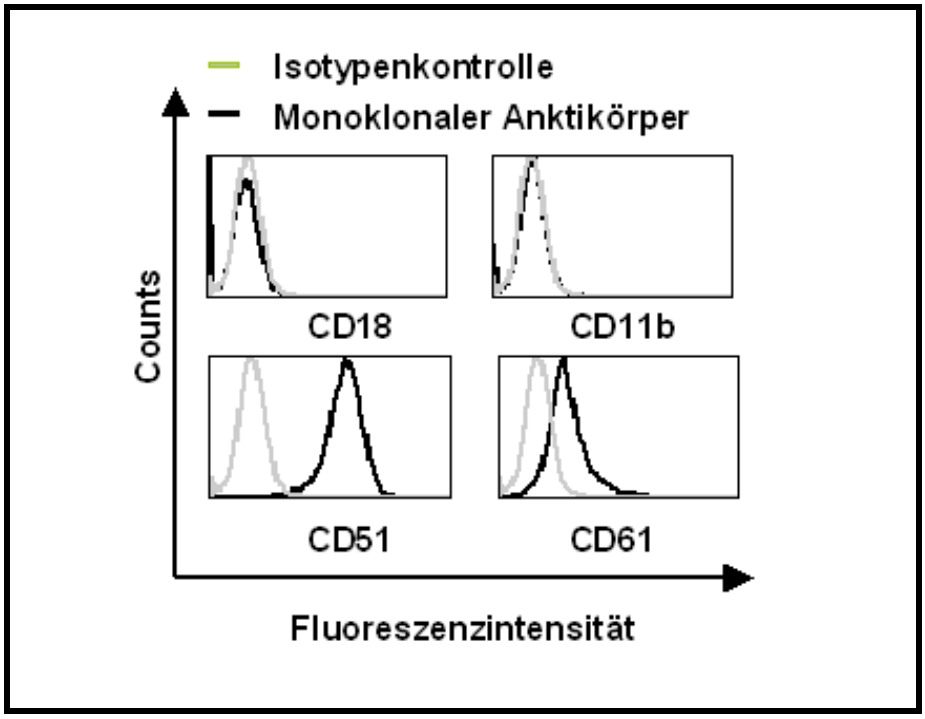

Abb. 6.:
Repräsentatives FACS-Histogramm, das die Expression der Adhäsionsrezeptoren auf der Oberfläche von MSCs zeigt, welche mittels FITC- oder PE-markierten monoklonalen Antikörpern sichtbar gemacht wurden. Entsprechende Isotypen-IgG wurden als Kontrollantikörper verwendet (graue Linie)

Um diesen Verdacht zu bekräftigen, wurden Adhärenzversuche unter Blockade des Vitronektinrezeptors $a_v ß_3$, sowie bei unterschiedlicher Thrombozytenaktivierung durchgeführt. Nachdem Thrombozyten mit ADP aktiviert wurden, trat vermehrte Adhäsion auf immobilisierten MSCs auf. Als jedoch Thrombozyten mit dem Peptid RGD oder dem blockierenden monoklonalen Antikörper 7E3 präinkubiert wurden [17], wurde diese Interaktion nahezu verhindert. Der monoklonale Antikörper 7E3 blockiert dabei die Fibrinogenbindungsstelle am GPIIb/IIIa-Rezeptor und erkennt die komplexierte Form von $a_v ß_3$. Bei Präinkubation mit dem Kontrollpeptid RED konnte die Interaktion jedoch nicht verhindert werden. (Abb. 7.)

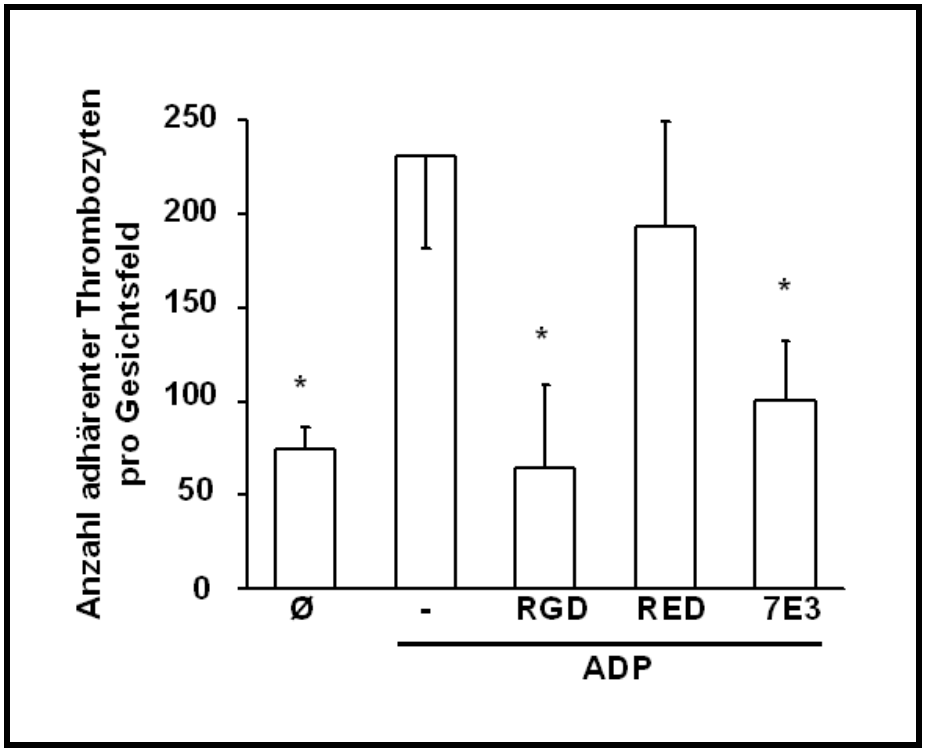

***Abb. 7.**:*
*Darstellung der Anzahl adhärenter Thrombozyten bei unterschiedlicher Aktivierung und Blockierung des Fibrinogenrezeptors $a_v ß_3$. (n = 4; * p<0,05)*

3.3 Thrombozytäres bFGF induziert die Migration und Proliferation von MSCs

Adhärierende Thrombozyten sezernieren bei Aktivierung unterschiedlichste stimulierende Verbindungen. [18] Um den Einfluss von Thrombozyten auf die Funktionalität von MSCs zu untersuchen, wurde die Migration und Proliferation von MSCs unter thrombozytärem Einfluss beobachtet.

Zunächst wurde die Proliferation der MSCs bei unterschiedlichen Ausgangsmengen von MSCs sowohl mit, als auch ohne Thrombozyten gemessen. MSCs sind bekannt für ihr niedriges Proliferationspotential. Unter dem Einfluss von Thrombozyten konnte jedoch ein Anstieg der Proliferationsrate um mehr als das Doppelte verglichen mit den Standardkulturbedingungen erreicht werden. Besonders deutlich zeigte sich dieser Effekt bei einer Ausgangszellmenge von $2x10^3$/Well. (Abb. 8A.) Bei einer Thrombozytenaktivierung mittels Thrombin konnte eine zusätzliche Steigerung dieser vermehrten Proliferation beobachtet werden. (Abb. 8B.)

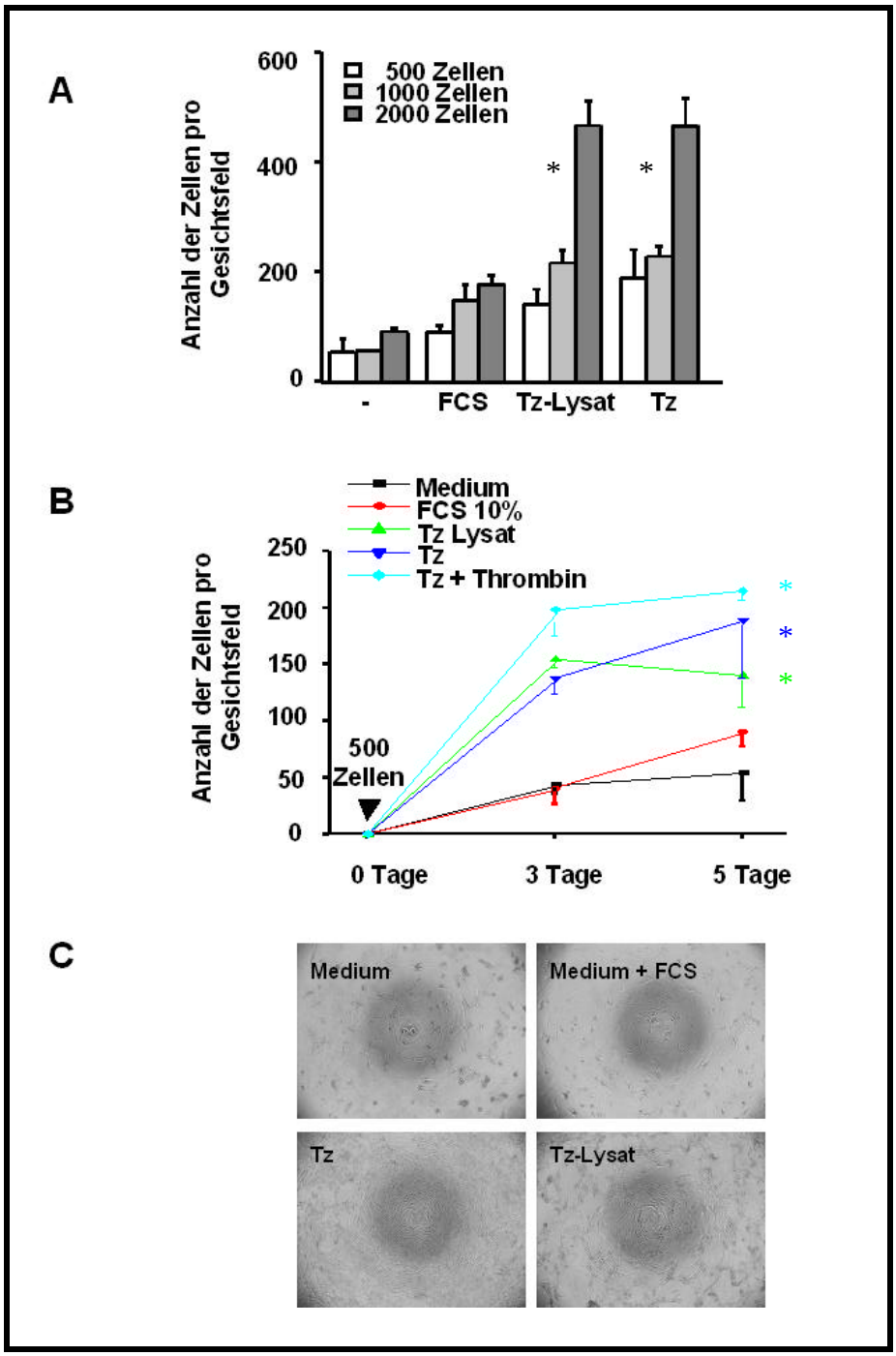

Abb. 8.:

A: *Darstellung der MSC-Proliferation bei unterschiedlichen Ausgangszellmengen und Kulturbedingungen.*
*(n = 4; * p<0,05 im Vergleich zu Medium allein)*

B: *Kinetik der fünftägigen MSC-Proliferation bei einer Ausgangszellmenge von 500 MSCs/Well und unter verschiedenen Kulturbedingungen.*
*(n = 4; * p<0,05 im Vergleich zu Medium allein)*

C: *Repräsentative Photographien der MSC-Proliferation bei einer Ausgangszellmenge von 500 MSCs/Well und unter verschiedenen Kulturbedingungen nach 3 Tagen.*

Um den Mechanismus dieser thrombozyteninduzierten Proliferation zu charakterisieren, wurden neben der beobachteten reinen MSC-Proliferation verschiedene blockierende monoklonale Antikörper verwendet. Verglichen mit der reinen MSC-Proliferation, die mit 100% gleichgesetzt wurde, zeigte interessanterweise ein Antikörper gegen bFGF einen um ca. 50% hemmenden Einfluss. Dahingegen konnte durch Präinkubation mit einem blockierenden Kontrollantikörper (anti-CD49d) keine signifikante Reduktion der thrombozyteninduzierten Proliferation beobachtet werden. (Abb. 9)

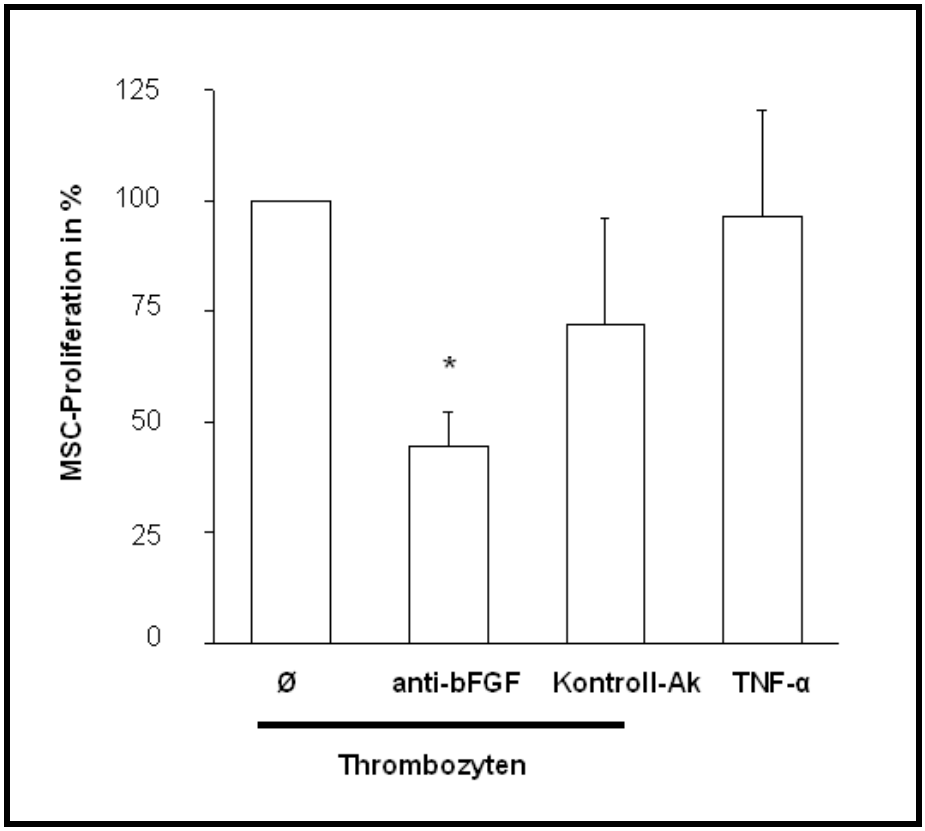

Abb. 9.:
*Darstellung der MSC-Proliferation unter dem Einfluss blockierender monoklonaler Antikörper. (n = 8; * p<0,05 im Vergleich zum Kontrollantikörper)*

Vergleichbar dem Effekt der Thrombozyten auf die MSC-Proliferation wurde die Migration der MSCs unter dem Einfluss der Thrombozyten untersucht. Isolierte Plättchen steigerten abhängig von Dosis und Aktivierung die Migration der MSCs in eine zuvor verursachte Zellwunde. Durch Verdopplung der Thrombozytenkonzentration von $0{,}5x10^8$/ml auf $1x10^8$/ml konnte die Zahl der einwachsenden MSCs nochmals fast um die Hälfte gesteigert werden. Bei zusätzlicher Aktivierung mittels Thrombin wurde die Zahl der migrierten MSCs verglichen mit der Anzahl bei einer Thrombozytenkonzentration von $0{,}5x10^8$/ml sogar verdoppelt. (Abb. 10.)

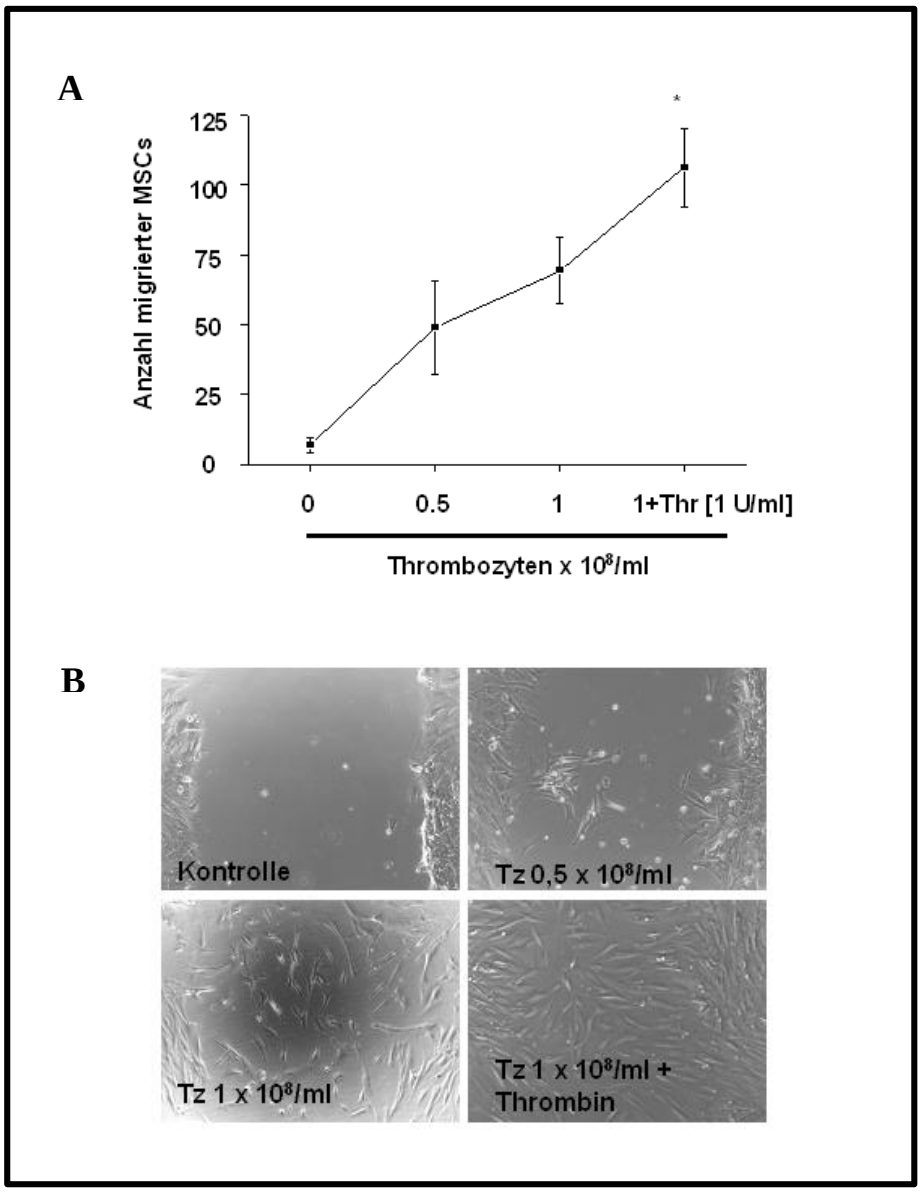

Abb. 10.:

A: *Darstellung der MSC-Migration bei unterschiedlichen Ausgangsmengen isolierter Thrombozyten, sowie unter Aktivierung mit Thrombin. (n = 3; * p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle)*

B: *Repräsentative Photographien der oben beschriebenen MSC-Migration bei unterschiedlichen Ausgangsmengen isolierter Thrombozyten, sowie unter Aktivierung mit Thrombin.*

Interessanterweise konnte diese thrombozyteninduzierte MSC-Migration durch Präinkubation mit dem blockierenden monoklonalen Antikörper gegen bFGF signifikant verringert werden. (Abb. 11.) Dieser Effekt war vergleichbar dem blockierenden monoklonalen Antikörper gegen PDGF, von dem bekannt ist, dass er die Migration glatter Muskelzellen und eEPCs fördert und hier als Positivkontrolle verwendet wurde. [12,19]

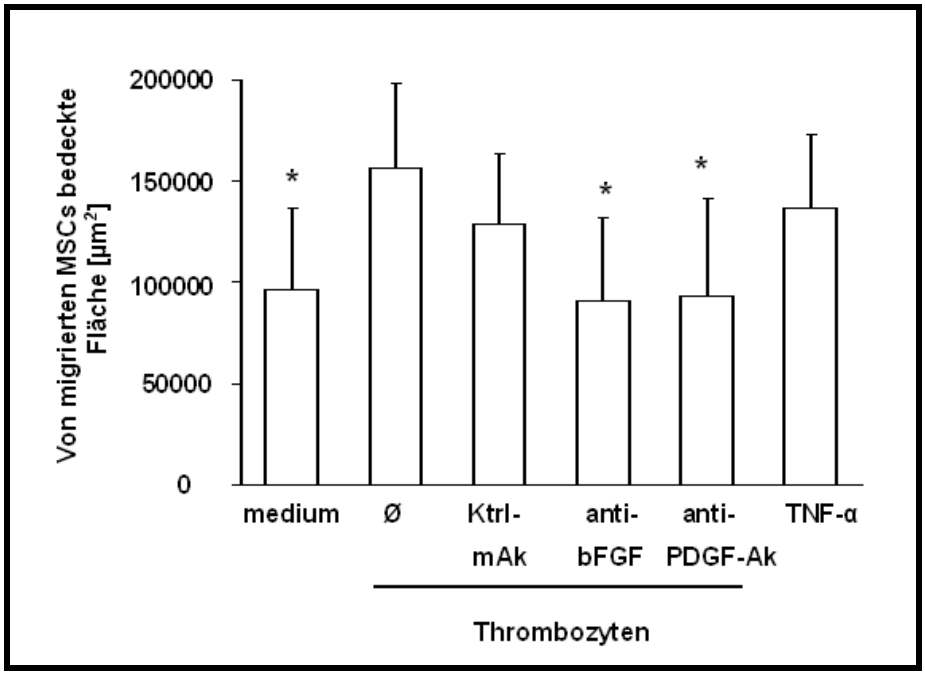

Abb. 11.:
Darstellung der durch MSC-Migration bewachsenen Fläche in µm² mit und ohne Thrombozyten und unter Zugabe verschiedener blockierender monoklonaler Antikörper.
*(n = 5 - 8; * p<0,05 verglichen mit Experimenten ohne Antikörper oder zum Kontrollantikörper anti-CD49d)*

Um den genauen Mechanismus der verstärkten Migration zu evaluieren, wurden die MSCs nach ihrem Phänotyp beurteilt. Schmidt et al. beschreiben eine parallele Ausrichtung der Aktinfilamente in Abhängigkeit eines bFGF-Gradienten.[20] Analog dazu wurde das mesenchymale Zytoskelett unter thrombozytärem Einfluss betrachtet.

Während die MSCs unter thrombozytärem Einfluss eine parallele Anordnung ihres Zytoskeletts zeigten, was eine Grundvoraussetzung für eine gerichtete Migration ist, konnte dies sowohl bei Fehlen der Thrombozyten als auch bei Zugabe des blockierenden monoklonalen Antikörpers gegen bFGF nicht beobachtet werden. Hier zeigte sich eine eher runde Zellform und eine „ungeordnete“ Ausrichtung. (Abb.12.)

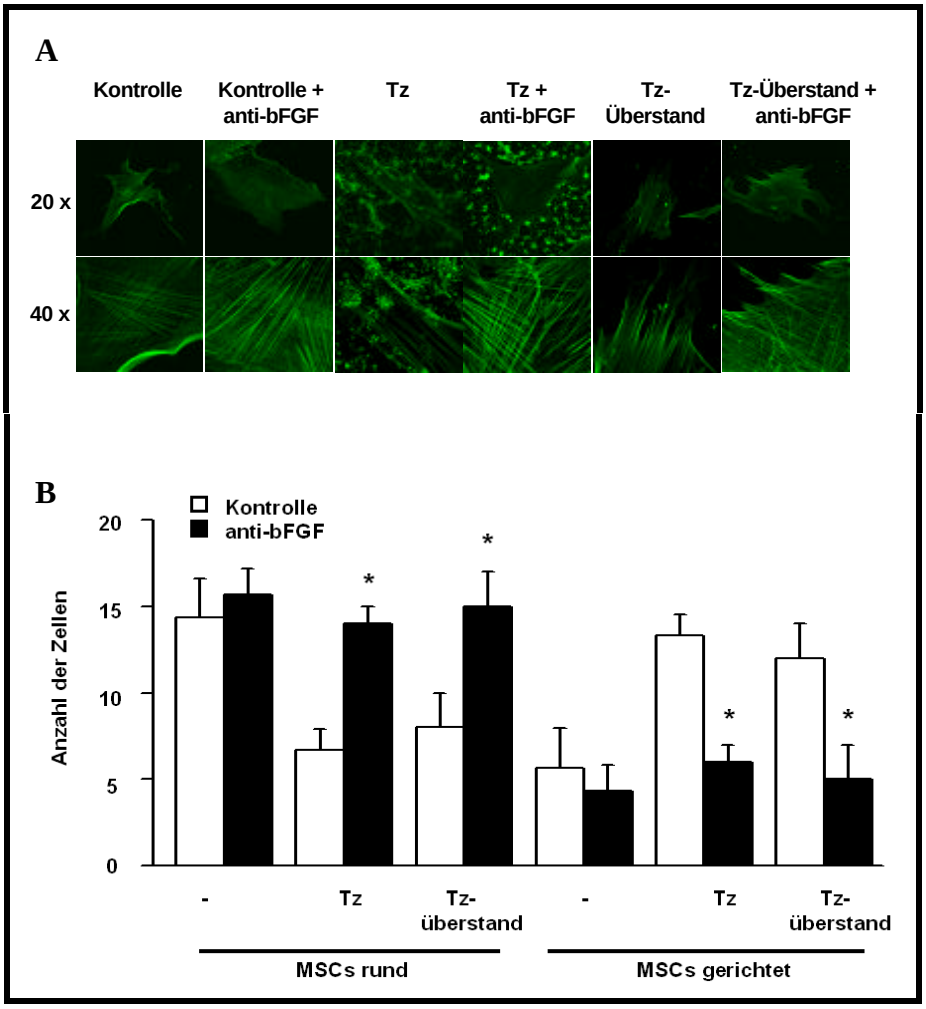

Abb. 12.:

A: *Repräsentative, fluoreszenzmikroskopische Photographien des mit Phalloidin gefärbten Zytoskeletts.*
Gezeigt werden einzelne MSCs bei 20-facher Vergrößerung zur Darstellung der Zellform und Detailbilder dieser Zellen bei 40-facher Vergrößerung zur Darstellung des jeweiligen Zytoskeletts.
Bei einigen Bildern wurde der blockierende monoklonale Antikörper gegen bFGF hinzugegeben.

B: *Dargestellt ist die absolute Anzahl der MSC, die sich nach Zuordnung bestimmter morphologischer Kriterien, in 10 unabhängigen Gesichtsfeldern mikroskopisch auszählen ließ. (n = 4; * p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle)*

3.4 Thrombozyten fördern die Integration von MSCs in einen endothelialen Monolayer

MSCs sind bekannt dafür, dass sie sich in Endothelzellen differenzieren und in endotheliale Monolayer integrieren können. [7,15] Darauf aufbauend untersuchten wir den Effekt von Thrombozyten bei der Integration von MSCs in einen endothelialen Monolayer. Für die direkte Interaktion von MSCs und Endothelzellen wurden gefärbte MSCs auf einen endothelialen Monolayer gesät. 30 Minuten nach Beginn der Kokultur treten die MSC in Kontakt mit den Endothelzellen und zeigen morphologische Veränderungen. So entwickelten die MSCs schnell zytoplasmatische Ausläufer, über die sie mit den Endothelzellen in Kontakt treten können und zeigten eine zunehmende Abflachung bis hin zur vollständigen Integration in den endothelialen Monolayer. (Abb. 13. Mitte)
Ein Teil der MSCs zeigte zusätzlich einen endothelialen Phänotyp, was durch den Expressionsnachweis von PECAM-1 verifiziert werden konnte. (Abb. 13. rechts)

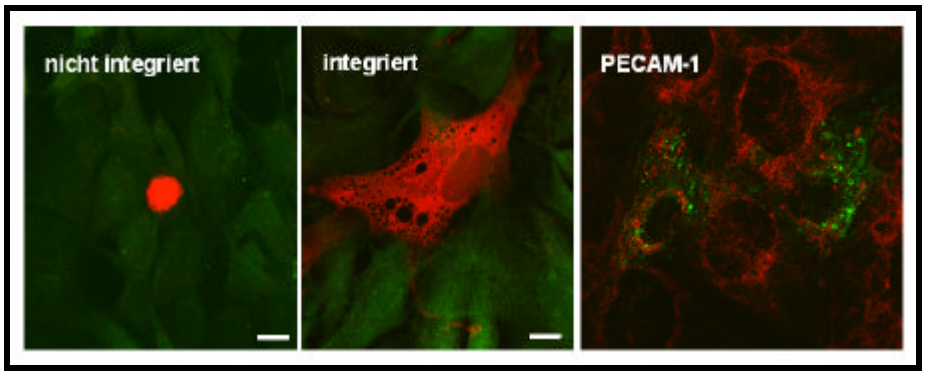

Abb. 13.:
Auf dem linken und mittleren Bild sind repräsentative Beispielphotographien fluoreszenzmarkierter integrierter bzw. nicht integrierter MSCs (rot) in Kokultur mit einem endothelialen Monolayer (grün) dargestellt.
Rechts sind integrierte MSCs (grün), die den endothelialen Marker PECAM-1 (rot) exprimieren, zu sehen.

Dabei integrierten sich unter Thrombozyteneinfluss ungefähr 70% mehr MSCs in den endothelialen Monolayer als ohne Thrombozyten. Bei Zugabe von blockierenden monoklonalen Antikörpern gegen bFGF oder PDGF wurde dieser Effekt nahezu verhindert. Keine Reduktion konnte jedoch bei Zugabe eines blockierenden monoklonalen Kontrollantikörpers (anti-CD49d) erzielt werden. (Abb. 14.)

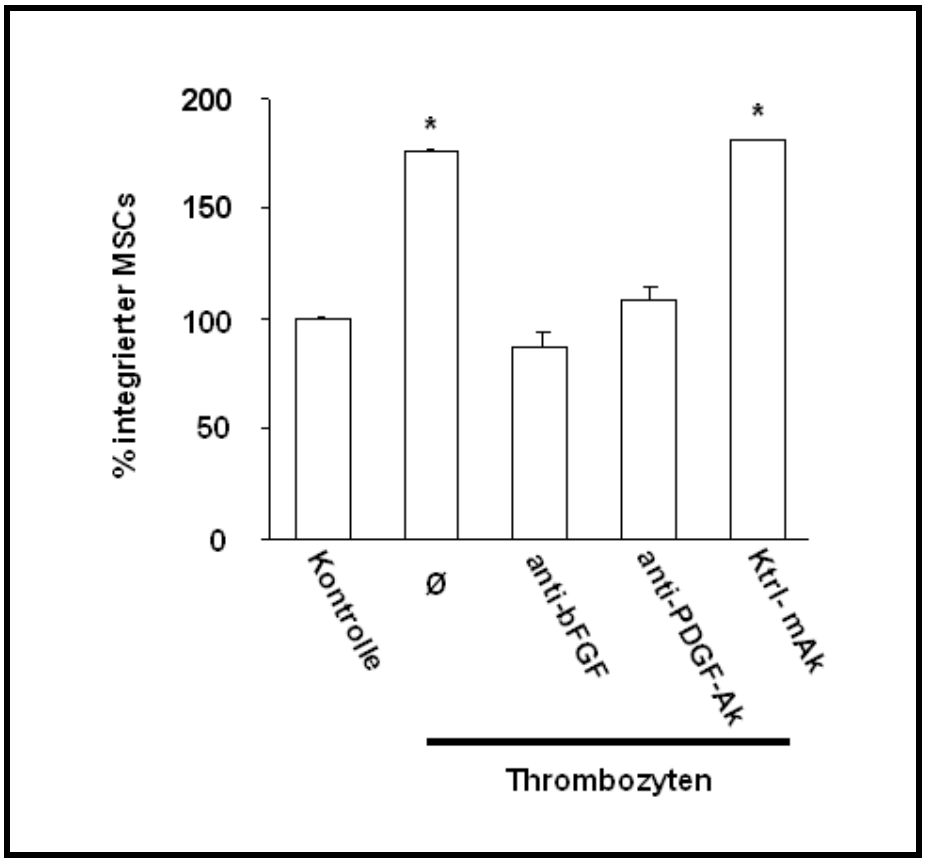

Abb. 14.:
*Dargestellt ist die prozentuale Zunahme integrierter MSCs verglichen mit der Kontrolle unter thrombozytärem Einfluss und verschiedenen blockierenden monoklonalen Antikörpern. (n = 4; * p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle)*

Um beurteilen zu können, ob diese Integration einen Einfluss auf die Wiederherstellung vaskulärer Integrität darstellt, wurde ein Scratch-Assay mit humanen arteriellen Endothelzellen durchgeführt.

In Versuchsansätzen mit isolierten MSCs, konnte eine diskrete Zunahme der Migration in die Zellwunde beobachtet werden. Dieser Effekt wurde verstärkt, indem Thrombozyten zur Kokultur hinzugegeben wurden. Eine nochmals verstärkte Zunahme der MSC-Migration konnte unter Zugabe von Thrombozytenüberstand oder unter 24-Stunden-Vorinkubation der MSCs mit Thrombozyten beobachtet werden. Thrombozytenzugabe ohne das Vorhandensein von MSCs zeigte keinerlei vermehrte Migration in die Zellwunde. (Abb. 15. + 16.)

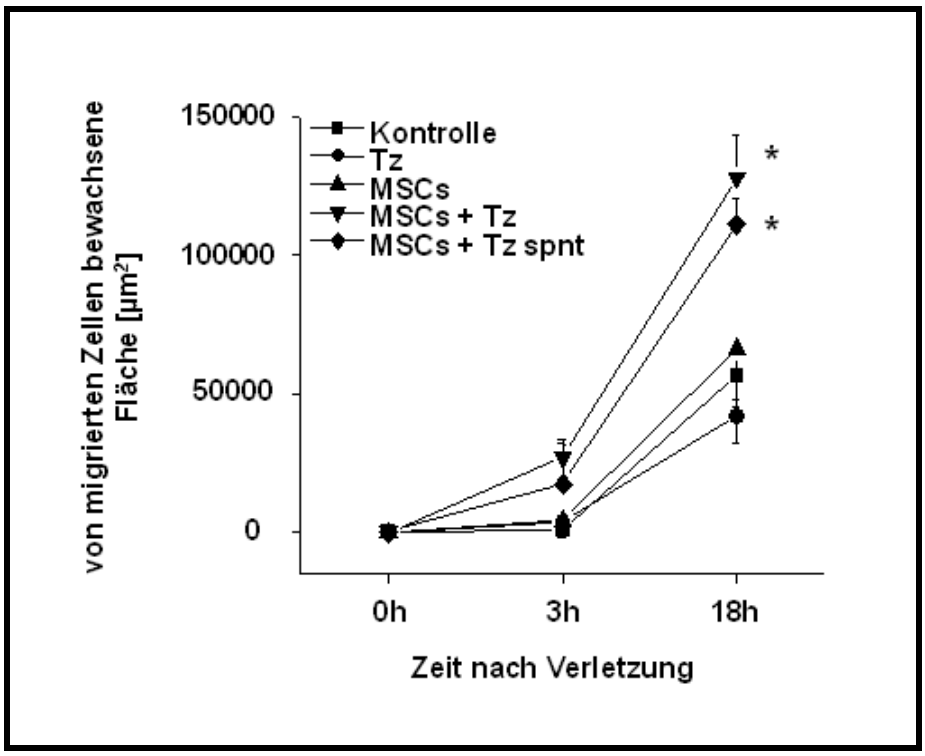

Abb. 15.:
Dargestellt ist die von migrierten Zellen bewachsene Fläche in µm² bei unterschiedlichem thrombozytären Einfluss. Dabei wurde ein Beobachtungszeitraum von 18 Stunden gewählt.
*(n = 4; * p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle)*

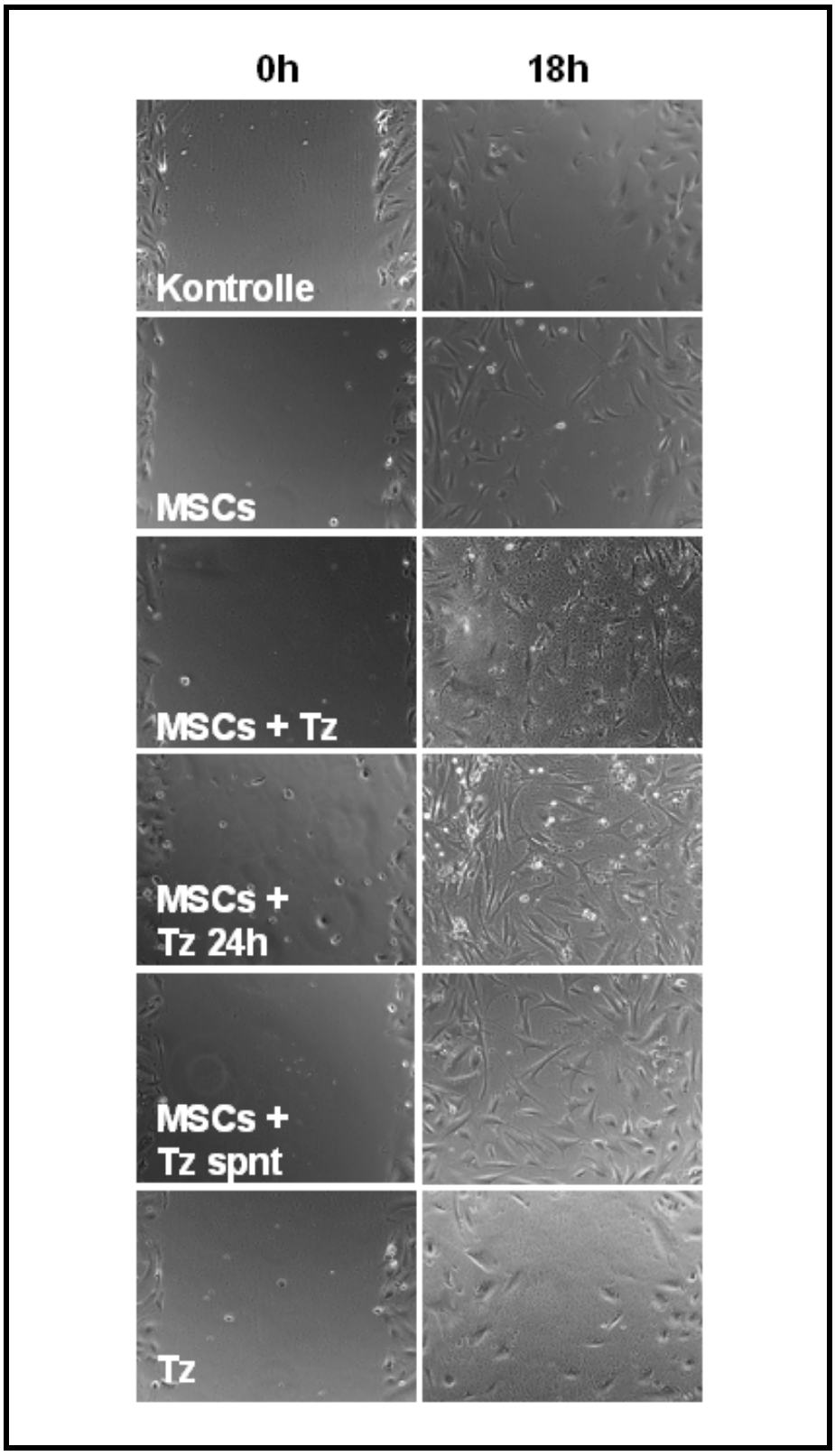

Abb. 16.:
Repräsentative Photographien der Migrationsversuche.

Um die Frage zu beantworten, ob die migrierten Zellen unter diesen experimentellen Bedingungen einen endothelialen Phänotyp annehmen, wurden die MSCs, nachdem sie in einigen Ansätzen Thrombozytenüberstand ausgesetzt waren, auf den endothelialen Marker vWF hin gefärbt. In allen Ansätzen konnten vom Wundrand migrierte Zellen vWF-positiv gefärbt werden, was auf migrierende endotheliale Zellen hindeutet. In Ansätzen, bei denen MSCs mit Thrombozytenüberstand behandelt worden waren, konnten zusätzlich innerhalb der jetzt verschlossenen Zellwunde vWF-positive Zellen beobachtet werden. Dies impliziert, dass ein Teil der MSCs, die die Zellwunde verschlossen haben, endotheliale Charakteristika erkennen lassen. (Abb. 17.)

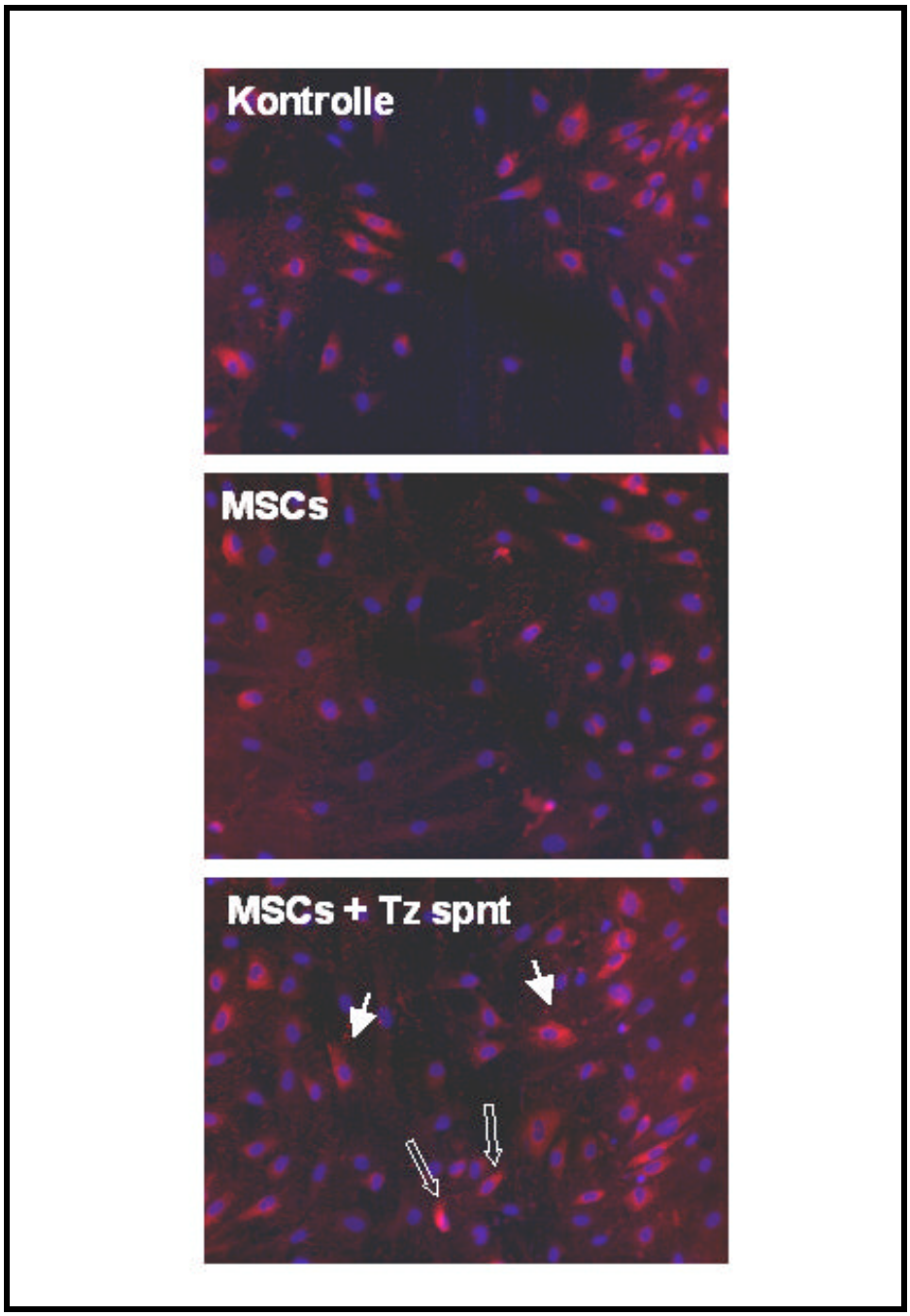

Abb. 17.:
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Inkubation der MSCs mit einem PE-konjugierten anti-vWF-Antikörper.
Im untersten Beispielbild, ein Ansatz, der mit Thrombozytenüberstand behandelt worden war, zeigen sich vWF-positive Zellen am Rand der Endothelzellwunde (gefüllte Pfeile) sowie innerhalb der migrierten Zellen (durchsichtige Pfeile).

4. Diskussion

Mesenchymale Stammzellen (MSC) sind pluripotente adulte Stammzellen, die im Knochenmark angesiedelt sind und sich neben Chondrozyten, Adipozyten, Osteozyten und Cardiomyozyten unter anderem in Endothelzellen und glatte Muskelzellen differenzieren können. [8,21,22] Einfache Kulturbedingungen und der Erhalt ihrer Pluripotenzität über viele Passagen hinweg haben MSCs für die regenerative Medizin interessant werden lassen.

Die gesteigerte Mobilisation aus dem Knochenmark und das vermehrte Vorkommen von MSCs im peripheren Blut nach einem Myokardinfarkt, unterstreichen dieses Potential. [23,24]

Obwohl Ruster et al. kürzlich zeigen konnten, dass humane MSCs koordiniertes Rollen und Adhäsionsverhalten auf Endothelzellen zeigen, ähnlich wie bei PBMCs oder $CD34^+$ hämatopoetischen Vorläuferzellen [13], sind die Mechanismen wie MSCs die Infarktareale erreichen, bisher noch nicht vollständig verstanden.

Mesenchymale Stammzellen sind attraktive Zellen für die Behandlung des Myokardinfarkts, da sie in glatte Muskelzellen differenzieren können und deshalb möglicherweise nekrotisches Gewebe regenerieren können. [4,24] In einem Rattenmodell mit induzierter myokardialer Ischämie verbesserte die Transplantation von MSCs signifikant die Linksherzfunktion und verkleinerte die Infarktgröße. [25] Ganz ähnlich verbesserte die Transplantation von MSCs in einem Rattenmodell mit dilatativer Kardiomyopathie die Linksherzfunktion und verminderte den linksventrikulären enddiastolischen Druck. [26] Für diese Verbesserung der kardialen Funktion war die Induktion einer Myogenese und Angiogenese durch MSCs verantwortlich.

Neuere Ansätze benutzen schon MSCs, die mit Vektoren transfiziert sind, um ihnen günstige Eigenschaften zu verleihen. Tang et al. transfizierten einen Hämoxygenase-1 (HO-1) Vektor in MSCs und waren damit fähig, die Toleranz gegenüber Reoxygenierungsverletzungen und das Überleben im infarzierten Myokard zu verbessern. [27] Ein anderer Ansatz versuchte, ischämische

Myokardschäden zu reduzieren, indem das VEGF-Gen in MSCs induziert wurde. [28]
Um das Homing der MSCs hin zum Myokardinfarkt zu untersuchen, wurden Studien zur Zelldarstellung durchgeführt. In einem Modell mit Schweinen wurden magnetisch markierte MSCs mittels Kernspintomographie sichtbar gemacht und nach Injektion im Infarktgebiet nachgewiesen. [29]

Nachdem kürzlich gezeigt werden konnte, dass Thrombozyten einen zentralen Adhäsionsmediator für die Vermittlung von murinen und humanen zirkulierenden Stammzellen an freiliegendem Kollagen und an Gefäßläsionen darstellen [11,12], sowie dem Wissen, dass Thrombozyten im Bereich der Mikrozirkulation eine führende Rolle bei der Rekrutierung zirkulierender, proinflammatorischer und regenerativer Zellen spielen [30,31], konnten wir in dieser Studie zeigen, dass Thrombozyten auch biologische Funktionen der MSCs ganz zentral beeinflussen.
Während eines Myokardinfarkts sind adhärente und thrombusformende Blutplättchen zentrale pathogenetische Faktoren in Herzkranzgefäßen und der Mikrozirkulation. Adhärente Thrombozyten exprimieren unterschiedliche Rezeptoren (z.B.: P-Selektin) auf ihrer Oberfläche, die die Adhäsion von neutrophilen und mononukleären Zellen regulieren. [32] In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass MSCs mit Thrombozyten über das $\alpha_v\beta_3$ Integrin interagieren, sowie Präinkubation mit 7E3 oder RGD, nicht aber RED, diese Interaktion verhindert. Darüber hinaus waren Thrombozyten fähig, ähnlich dem Ablauf einer IL-1β-induzierten Entzündung, Zellrollen und eine feste Adhäsion unter physiologischen Flussbedingungen zu steigern.
Des Weiteren konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass sich MSCs in vitro in Endothelzellen differenzieren. [7] Die humanen MSCs aus dem Knochenmark exprimierten endotheliale Marker wie KDR, FLT-1 und vWF und formten in einem Angiogeneseversuch kapillarähnliche Strukturen nach Exposition mit VEGF in vitro. [7] In unseren Versuchen waren isolierte Thrombozyten, die bekanntermaßen eine große Menge an unterschiedlichen Wachstumsfaktoren

in ihren Granula enthalten und auch freisetzen können, wie z.B. VEGF-A und bFGF [33], fähig, einen endothelialen Phänotyp zu induzieren.

Schmidt et al. war die Identifikation von bFGF als Substanz eine gerichtete Migration zu kontrollieren, gelungen. [20] In ähnlicher Weise reduzierte die Inhibition von thrombozytärem bFGF in unseren Versuchen die Migration und verhinderte die Ausbildung eines „Migrationsphänotyps“. Zudem vermittelte thrombozytäres bFGF in unseren Versuchen eine vermehrte Proliferation der MSCs, was durch Inhibition dieses Wachstumsfaktors bestätigt wurde. Einen solch positiven Einfluss von bFGF auf die MSC-Proliferation ließ sich bei van den Bos et al. ebenfalls beobachten. [34]

Beachtenswerterweise scheinen Thrombozyten von Patienten mit idiopathischer Myelofibrose eine gestörte Speicherung und Sekretion von bFGF zu haben, was eine zentrale Rolle dieses Wachstumsfaktors in Bezug auf die Stammzellhomöostase nahe legt. [35]

Neben Migration, Proliferation und Stammzellhomöostase reguliert thrombozytäres bFGF, entsprechend unseren Ergebnissen, auch die Integration der MSCs in einen endothelialen Monolayer. Auch diese Ergebnisse decken sich mit den Daten früherer Publikationen, in denen MSCs über die Endothelbarriere transmigrieren [15] und liefern einen möglichen Mechanismus.

5. Zusammenfassung

Herzinfarktpatienten zeigen eine vermehrte Anzahl zirkulierender mesenchymaler Stammzellen (MSCs), die bekanntermaßen Myokard regenerieren und zu Endothelzellen differenzieren können. Die Mechanismen der MSCs um aus der Zirkulation heraus das Zielgewebe zu erreichen (sog. “homing“), sind weiterhin unbekannt.

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung der Thrombozyten auf die Rekrutierung der MSCs, deren Proliferation, deren Migration und deren Integration ins Endothel untersucht.

Mesenchymale Stammzellen, die das $\alpha_v\beta_3$-Integrin exprimieren, wurden bei hohen Scherkräften an humane arterielle Endothelzellen vermittelt, nachdem diese mit isolierten Thrombozyten oder IL-1β behandelt worden waren. Die Interaktion von Thrombozyten mit MSCs wurde durch Präinkubation mit dem β_3-blockierenden monoklonalen Antikörper 7E3 oder RGD, jedoch nicht mit RED, verhindert. Des Weiteren förderten Thrombozyten einen Migrationszelltyp der MSCs und verstärkten dosis- und aktivierungsabhängig die Migration der MSCs. Dieser Vorgang wurde über bFGF (basic fibroblast growth factor) vermittelt. Vergleichbar dazu induzierte thrombozytäres bFGF eine MSC-Proliferation. Die Koinkubation von MSCs mit Thrombozyten förderte die Integration in einen endothelialen Monolayer, was durch Präinkubation mit einem bFGF-blockierenden monoklonalen Antikörper signifikant reduziert wurde.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Thrombozyten eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung von MSCs an Endothel, am Einfluss auf deren Funktionen und bei der Förderung der Endothelintegration der MSCs zu spielen scheinen.

6. Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADP	Adenosindiphosphat
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovines Serumalbumin
EGM-2	Endothelial Growth Medium
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting (Durchflusszytometrie)
FCS	Fetal Calf Serum (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Flk-1	VEGF-Rezeptor
FLT-1	VEGF-Rezeptor
HAECs	Human Arterial Endothelial Cells
IL	Interleukin
KDR	VEGF-Rezeptor
Ktrl	Kontrolle
MAC-1	Makrophagen – 1- Antigen
MACS	Murine mikrovaskuläre Endothelzellen die mittels “Magnetic Activated Cell Sorting” isoliert wurden
mAk	monoklonaler Antikörper
MSC	Mesenchymal Stem Cell
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphat Buffered Saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PE	Phycoerythrin
PRP	Platelet Rich Plasma
RED	Arginin-Glutamin-Asparagin Säure
RGD	Arginin-Glycin-Asparagin Säure
SMC	Smooth Muscle Cells (glatte Muskelzelle)
spnt	supernatant (Überstand)
TNFα	Tumornekrosefaktor α

Tz	Thrombozyten
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	von Willebrand Faktor

7. Literaturverzeichnis

[1] Fibbe WE, Noort WA. Mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cell transplantation. Ann N Y Acad Sci 2003; 996: 235-44.

[2] Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. Circ Res 2004; 95(1): 9-20.

[3] Jain M, Pfister O, Hajjar RJ, Liao R. Mesenchymal stem cells in the infarcted heart. Coron Artery Dis 2005; 16(2): 93-7.

[4] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. J Clin Invest 1999; 103(5): 697-705.

[5] Wang Y, Johnsen HE, Mortensen S, Bindslev L, Ripa RS, Haack-Sorensen M et al. Changes in circulating mesenchymal stem cells, stem cell homing factor, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. Heart 2006; 92(6): 768-74.

[6] Dai W, Hale SL, Martin BJ, Kuang JQ, Dow JS, Wold LE, Kloner RA. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. Circulation 2005; 112(2): 214-23.

[7] Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M, Werner C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. Stem Cells 2004; 22(3): 377-84.

[8] Wu X, Huang L, Zhou Q, Song Y, Li A, Jin J, Cui B. Mesenchymal stem cells participating in ex vivo endothelium repair and its effect on vascular smooth muscle cells growth. Int J Cardiol 2005; 105(3): 274-82.

[9] Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. Nat Med 2002; 8(11): 1227-34.

[10] Daub K, Langer H, Seizer P, Stellos K, May AE, Goyal P et al. Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells. FASEB J 2006; 20(14): 2559-61.

[11] Massberg S, Konrad I, Schurzinger K, Lorenz M, Schneider S, Zohlnhoefer D et al. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha

and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. J Exp Med 2006; 203(5): 1221-33.

[12] Langer H, May AE, Daub K, Heinzmann U, Lang P, Schumm M et al. Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro. Circ Res 2006; 98(2): e2-10.

[13] Ruster B, Gottig S, Ludwig RJ, Bistrian R, Muller S, Seifried E et al. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. Blood 2006; 108(12): 3938-44.

[14] Axel DI, Brehm BR, Wolburg-Buchholz K, Betz EL, Koveker G, Karsch KR. Induction of cell-rich and lipid-rich plaques in a transfilter coculture system with human vascular cells. J Vasc Res 1996; 33(4): 327-39.

[15] Schmidt A, Ladage D, Steingen C, Brixius K, Schinkothe T, Klinz FJ et al. Mesenchymal stem cells transmigrate over the endothelial barrier. Eur J Cell Biol 2006; 85(11): 1179-88.

[16] Chavakis E, Aicher A, Heeschen C, Sasaki K, Kaiser R, El MN et al. Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. J Exp Med 2005; 201(1): 63-72.

[17] Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Reininger A, Adelsberger H, Gebhardt A, Schomig A. Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. Circulation 1997; 96(6): 1809-18.

[18] Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. Cardiovasc Res 2004; 61(3): 498-511.

[19] Massberg S, Vogt F, Dickfeld T, Brand K, Page S, Gawaz M. Activated platelets trigger an inflammatory response and enhance migration of aortic smooth muscle cells. Thromb Res 2003; 110(4): 187-94.

[20] Schmidt A, Ladage D, Schinkothe T, Klausmann U, Ulrichs C, Klinz FJ et al. Basic fibroblast growth factor controls migration in human mesenchymal stem cells. Stem Cells 2006; 24(7): 1750-8.

[21] Fang LJ, Fu XB, Sun TZ, Li JF, Cheng B, Yang YH, Wang YX. [An experimental study on the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into vascular endothelial cells]. Zhonghua Shao Shang Za Zhi 2003; 19(1): 22-4.

[22] Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S, Matsumoto T et al. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. Cardiovasc Res 2005; 66(3): 543-51.

[23] Fukuda K, Fujita J. Mesenchymal, but not hematopoietic, stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction in mice. Kidney Int 2005; 68(5): 1940-3.

[24] Kawada H, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H et al. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. Blood 2004; 104(12): 3581-7.

[25] Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004; 287(6): H2670-H2676.

[26] Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. Circulation 2005; 112(8): 1128-35.

[27] Tang YL, Tang Y, Zhang YC, Qian K, Shen L, Phillips MI. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector. J Am Coll Cardiol 2005; 46(7): 1339-50.

[28] Zhou WW, Hu JG, Yang JF, Lin L, Zhou XM, Tang T. [Angiogenic effect of bone marrow mesenchymal stem cells transfected with human VEGF gene on myocardial infarcts in rats]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 2006; 31(5): 763-6, 771.

[29] Kraitchman DL, Tatsumi M, Gilson WD, Ishimori T, Kedziorek D, Walczak P et al. Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction. Circulation 2005; 112(10): 1451-61.

[30] Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. J Clin Invest 2005; 115(12): 3378-84.

[31] Langer H, Gawaz M. [The role of platelets for the pathophysiology of acute coronary syndromes]. Hamostaseologie 2006; 26(2): 114-8.

[32] Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. Cell 1994; 76(2): 301-14.

[33] Brunner G, Nguyen H, Gabrilove J, Rifkin DB, Wilson EL. Basic fibroblast growth factor expression in human bone marrow and peripheral blood cells. Blood 1993; 81(3): 631-8.

[34] van den BC, Mosca JD, Winkles J, Kerrigan L, Burgess WH, Marshak DR. Human mesenchymal stem cells respond to fibroblast growth factors. Hum Cell 1997; 10(1): 45-50.

[35] Le Bousse-Kerdiles MC, Martyre MC. Involvement of the fibrogenic cytokines, TGF-beta and bFGF, in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis. Pathol Biol (Paris) 2001; 49(2): 153-7.

8. Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz, der mir diese spannende Grundlagenarbeit ermöglicht hat, möchte ich mich für die Betreuung als Doktorvater herzlich bedanken. Sein Interesse an grundlegenden thrombozytären Eigenschaften, seine Offenheit für Kooperationen und die vielen wertvollen Hinweise, haben diese Arbeit in dieser Form erst möglich werden lassen.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Dr. med. Harald Langer, dessen andauerndes Engagement und begeisternder Optimismus mich immer wieder ermutigt und angespornt haben und damit maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Wilhelm Bloch von der Kölner Hochschule für Sportmedizin, den ich während meines Aufenthaltes in Köln kennen lernen durfte und der eine Kooperation mit seiner Arbeitsgruppe möglich machte.

Darunter möchte ich vor allem Frau Dr. rer. nat. Caroline Steingen danken, die mich herzlich empfangen hat und mit Neugierde und Tatendrang zum Gelingen unserer Kooperation beigetragen hat.

Des weiteren gilt mein Dank Herrn Dr. med. Ingo Müller und der gesamten Arbeitsgruppe aus der Kinderklinik Tübingen ohne deren enge Zusammenarbeit und Unterstützung diese Ergebnisse nicht möglich gewesen wären.

Bedanken möchte ich mich auch bei Heike Runge, die mir anfangs alle notwendigen Techniken beigebracht hat, bei Iris Schäfer, die mir unermüdlich bei allen anfallenden Problemen bereitwillig geholfen hat und bei Sarah Gehring, mit der eine Zusammenarbeit stets zuverlässig möglich war.

9. Lebenslauf

persönliche Daten:

Name:	Claudia Amrei Froihofer, geb. Schirrmann
Geburtsdaten:	geb. am 14.05.1982 in München
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet

Schulausbildung:

1988 – 1992:	Grundschule in Brackenheim-Dürrenzimmern
1992 – 2001:	Zabergäu-Gymnasium in Brackenheim Abschluss: Abitur im Juli 2001
Aug.2001 – Feb.2002:	Au-pair in Neuseeland. Nebenher 4 Monate Sprachschule an der „Capital Language Academy“ Abschluss: Cambridge Advanced Exam im Dezember 2001

Studium:

SS 02 – WS 08/09:	Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität in Tübingen. Abschluss der Ärztlichen Vorprüfung im März 2004

Famulaturen:

04.09.04 – 03.10.04	Innere Medizin im Krankenhaus Travemünde der Sana Kliniken Lübeck GmbH
07.03.05 – 10.04.05	Kinder- und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie der Heckscher-Klinik in München
01.08.05 – 31.08.05	Poliklinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Universitätsklinik Tübingen
07.08.06 – 23.08.06	Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsklinik Tübingen
01.10.06 – 15.10.06	Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsklinik Tübingen

Praktisches Jahr:

26.02.07 – 17.06.07	Allgemeinmedizin bei Dr. med. Utz-Friedrich Blickle in Neckartailfingen
18.06.07 – 27.01.08	Innere Medizin und Chirurgie am Klinikum Sindelfingen-Böblingen
28.10.2008	Ärztliche Prüfung (2. Staatsexamen)