

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin  
und  
der Abteilung für Kardiologie  
der I. Medizinischen Klinik  
des Universitätsklinikums Mannheim

**Wirkung von rekombinantem humanem aktiviertem Protein C auf  
humane Endothelzellen und endotheliale Progenitorzellen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Carola Glasl  
Tierärztin aus Wasserburg am Inn

Berlin 2009

Journal-Nr.: 3304

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. J. Plendl  
Zweiter Gutachter: PD. Dr. M. Brückmann  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. M. Schmidt

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

angiogenesis, sepsis, protein C (MeSH), endothelial cells (MeSH), stem cells (MeSH), vascular endothelial growth factor C (MeSH), angiopoietin-2 (MeSH), endothelium, man, enzyme activation (MeSH), models, biological (MeSH), umbilical veins (MeSH)

Tag der Promotion: 22.09.2009

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-692-6

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2009

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für meine Mama:  
Du bist immer da, egal wo und wann.



## Inhalt

Inhalt .....	I
Abbildungen .....	IV
Tabellen .....	V
Abkürzungen .....	VI
1 Literaturübersicht .....	1
1.1 Einführung .....	1
1.2 Eigenschaften und Wirkungen von aktiviertem Protein C (APC) .....	1
1.2.1 Ursprungsort und Aktivierung von Protein C .....	1
1.2.2 Antikoagulative Wirkung von APC .....	2
1.2.3 Profibrinolytische Wirkung von APC .....	5
1.2.4 Indirekte und direkte antiinflammatorische Wirkung von APC .....	7
1.2.5 Antiapoptotische und proliferationssteigernde Wirkmechanismen von APC .....	9
1.2.6 Rezeptoren für APC .....	9
1.2.7 Dosisabhängigkeit der Wirkung von rekombinantem humanem (rh) APC .....	11
1.2.8 Indikationsgebiete von rhAPC .....	11
1.2.8.1 Einsatz von rhAPC in der Sepsistherapie .....	11
1.2.8.2 Weitere potentielle Indikationsgebiete von rhAPC .....	13
1.3 Vaskulogenese und Angiogenese .....	14
1.4 „Vascular endothelial growth factor-C“ (VEGF-C) .....	16
1.4.1 Überblick über die VEGF-Familie .....	16
1.4.2 Rezeptoren für VEGF-C .....	17
1.4.3 Biologische Wirkungen von VEGF-C .....	19
1.4.4 VEGF-C-assoziierte Erkrankungen .....	20
1.5 Angiopoietin-2 (Ang-2) .....	21
1.5.1 Die Angiopoietin-Familie .....	21
1.5.2 Ang-2 und sein Gegenspieler Angiopoietin-1 (Ang-1) .....	21
1.5.3 Der Angiopoietin-Rezeptor Tie-2 .....	22
1.5.4 Biologische Wirkung von Ang-1 und Ang-2 .....	23
1.5.5 Ang-2 und Tumorangio-genese .....	25
1.6 Überblick über weitere untersuchte Angiogenese-relevante Gene .....	25
1.7 Endotheliale Progenitorzellen (EPCs) .....	26
1.7.1 Definition und Abstammung der EPCs .....	26
1.7.2 Isolierung von EPCs .....	29
1.7.3 Charakterisierung von EPCs .....	30
1.7.4 Mobilisierung von EPCs .....	32
1.7.5 Medizinische Bedeutung der EPCs .....	32
1.8 Fragestellung und Ziel .....	35
2 Material und Methoden .....	36
2.1 Zellkultur .....	36
2.1.1 „Human umbilical vein endothelial cells“ (HUVECs) .....	36
2.1.1.1 Zellisolierung und Anlegen einer HUVEC-Primärkultur .....	36

2.1.1.2	Kultivieren und Passagieren von HUVECs.....	37
2.1.1.3	Durchführung der HUVEC-Experimente.....	38
2.1.2	EPCs .....	39
2.1.2.1	Isolierung von EPCs aus „buffy coats“ .....	39
2.1.2.2	EPC-Isolierung mit Voranreicherung von CD34-positiven MNCs aus „buffy coats“ .....	40
2.1.2.3	Kultivierung von EPCs .....	42
2.1.2.4	Durchführung der EPC-Experimente.....	42
2.2	Untersuchung der EPCs im Fluoreszenz-Mikroskop .....	43
2.3	“Fluorescence-activated cell sorting” (FACS)-Analyse von HUVECs und EPCs.....	45
2.4	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) <i>in vitro</i> kultivierter HUVECs und EPCs .....	47
2.4.1	Prinzip der Reversen Transkription und der Polymerase-Kettenreaktion.....	47
2.4.2	Fragestellung bei den RT-PCR-Versuchen .....	48
2.4.3	RNA-Extraktion .....	49
2.4.4	Messung der RNA-Konzentration.....	50
2.4.5	Reverse Transkription (RT).....	51
2.4.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR, semiquantitativ).....	51
2.4.7	Gelelektrophorese.....	55
2.4.8	Densitometrie.....	56
2.5	„Enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) .....	56
2.6	Real-Time RT-PCR (Super Array) mit EPC-Kulturen .....	58
2.6.1	Unterschied zwischen Real-Time RT-PCR und Endpunkt-RT-PCR .....	58
2.6.2	Die “ $\Delta\Delta$ Cycle Threshold” ( $\Delta\Delta$ Ct)-Methode .....	59
2.6.3	Versuchsdurchführung der Real-Time RT-PCR .....	61
2.7	Zellzählung der kultivierten EPCs .....	62
2.8	Materialien .....	64
2.8.1	Geräte.....	64
2.8.2	Spezielle Software .....	64
2.8.3	Verbrauchsmaterialien .....	65
2.8.4	Kulturmedien und -zusätze .....	65
2.8.5	Chemikalien und Reagenzien .....	66
2.8.6	Antikörper .....	67
2.8.7	Genspezifische Primer.....	68
2.8.8	Kommerziell erhältliche Reaktionskits .....	68
3	Ergebnisse.....	69
3.1	Morphologie und Eigenschaften der isolierten Zellkulturen .....	69
3.1.1	Zellmorphologie von HUVECs.....	69
3.1.2	Zellmorphologie von EPCs.....	70
3.1.3	Nachweis der Lipoprotein (LDL)-Aufnahme und der Lektin-Bindung der Ficoll-isolierten Zellen .....	70

3.2	Charakterisierung der EPCs und HUVECs anhand spezifischer Oberflächenstrukturen in der FACS-Analyse.....	71
3.3	Nachweis der Expression der Rezeptoren PAR-1, PAR-2, EPCR (CD201) und S1P1 (EDG-1) bei EPCs mittels RT-PCR.....	75
3.4	Nachweis der Rezeptoren PAR-1, PAR-2, EPCR und S1P1 auf der EPC- und HUVEC-Zelloberfläche mittels FACS-Analyse .....	77
3.5	Wirkung der rhAPC-Stimulation auf die Rezeptorenexpression bei EPCs.....	78
3.6	Wirkung von rhAPC auf die VEGF-C-mRNA-Expression bei HUVECs (RT-PCR) .....	80
3.7	Wirkung von rhAPC auf die endotheliale VEGF-C-Freisetzung (ELISA).....	82
3.7.1	Dosisabhängigkeit.....	82
3.7.2	Zeitabhängigkeit.....	83
3.8	Wirkung von rhAPC auf die Ang-2-mRNA-Expression bei EPCs (RT-PCR) .....	84
3.9	Wirkung von rhAPC auf die Expressionsraten von Angiogenese- und Arteriosklerose-relevanten Genen bei EPCs (Super Array-Screening).....	86
3.10	Wirkung von rhAPC auf die Zellproliferation von EPCs .....	87
4	Diskussion .....	90
4.1	Identifizierung von EPCs (Morphologie, Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse) .....	90
4.2	Expression der APC-relevanten Rezeptoren von EPCs (RT-PCR u. FACS) .....	93
4.3	Auswirkungen von rhAPC auf die Expressionsrate von APC-relevanten Rezeptoren von EPCs.....	93
4.4	Steigerung der VEGF-C-Expression und -Freisetzung in HUVECs durch rhAPC .....	95
4.5	RhAPC-abhängige Expressionssteigerung von Ang-2-mRNA in EPCs .....	98
4.6	Effekt von rhAPC auf das Genexpressionsprofil von EPCs (Super Array).....	100
4.7	Proliferationssteigerung von EPCs durch Stimulation mit rhAPC .....	108
4.8	Fazit.....	110
5	Zusammenfassung .....	112
6	Summary .....	114
7	Literatur .....	116
8	Anhang .....	139
8.1	Eigene Veröffentlichung.....	139
8.2	Danksagung.....	139
8.3	Selbständigkeitserklärung .....	140

## Abbildungen

Abbildung 1-1: Schema der Blutgerinnung und antikoagulative Wirkung von APC .....	4
Abbildung 1-2: Profibrinolytische Wirkung von APC .....	6
Abbildung 1-3: Indirekte und direkte antiinflammatorische Effekte von APC .....	8
Abbildung 1-4: Abstammung der EPCs .....	28
Abbildung 3-1: Humane Endothelzellen aus der Nabelvene ( <i>Vena umbilicalis</i> ) .....	69
Abbildung 3-2: EPCs, Ficoll-Dichtegradient-Zentrifugation aus „buffy coats“ .....	70
Abbildung 3-3: Nachweis der LDL-Aufnahme und Lektin-Bindung zur Identifizierung von EPCs .....	71
Abbildung 3-4: FACS: Expression von Oberflächenmolekülen mit zugehörigen Isotypkontrollen (EPCs nach Ficoll-Isolierung) .....	72
Abbildung 3-5: FACS: Expression von Oberflächenmolekülen (Überblick, EPCs) .....	73
Abbildung 3-6: FACS: Prozentualer Anteil positiver Zellen (Box-Blot-Darstellung, EPCs nach Ficoll-Isolierung) .....	74
Abbildung 3-7: FACS-Darstellung von CD146 (EPCs und HUVECs im Vergleich) .....	75
Abbildung 3-8: Endotheliale Progenitor-Zellpopulation (FACS) .....	75
Abbildung 3-9: Nachweis der PAR-1- und PAR-2-mRNA in EPCs (RT-PCR) .....	76
Abbildung 3-10: Nachweis der EPCR- und S1P1-mRNA in EPCs (RT-PCR) .....	77
Abbildung 3-11: Rezeptorennachweis auf EPCs und Vergleich mit HUVECs (FACS) .....	78
Abbildung 3-12: RT-PCR für PAR-1-mRNA nach Stimulation mit rhAPC (EPCs) .....	79
Abbildung 3-13: Densitometrische Auswertung der PAR-1-mRNA-Expression (EPCs) .....	79
Abbildung 3-14: RT-PCR für EPCR-mRNA nach Stimulation mit rhAPC (EPCs) .....	80
Abbildung 3-15: Densitometrische Auswertung der RT-PCR für VEGF-C-mRNA (HUVECs, Inkubation 8 h) .....	81
Abbildung 3-16: Densitometrische Auswertung der RT-PCR für VEGF-C-mRNA (HUVECs, Inkubation 24 h) .....	81
Abbildung 3-17: Dosisabhängige Steigerung der VEGF-C-Freisetzung durch rhAPC (HUVECs, ELISA) .....	82
Abbildung 3-18: Wirkung von rhAPC auf die VEGF-C-Freisetzung im Zeitverlauf (HUVECs, ELISA) .....	83
Abbildung 3-19: RhAPC-abhängige Steigerung der Expression von Ang-2-mRNA in EPCs (RT-PCR) .....	84
Abbildung 3-20: Densitometrische Auswertung der Ang-2-mRNA-Expression (EPCs) .....	85
Abbildung 3-21: Densitometrische Mittelwerte der Ang-2-mRNA-Expression (EPCs) .....	85
Abbildung 3-22: Effekt von rhAPC auf die Proliferation von EPCs .....	88
Abbildung 3-23: Darstellung der spenderspezifischen Schwankung der absoluten EPC-Zellzahlen .....	89
Abbildung 3-24: Effekt von rhAPC und VEGF auf die Proliferation von EPCs .....	89

## Tabellen

Tabelle 1-1: Überblick über weitere untersuchte Angiogenese-relevante Gene.....	25
Tabelle 2-1: Supplemente des HUVEC-Mediums.....	37
Tabelle 2-2: Stimulationsbedingungen der HUVEC-Versuche.....	38
Tabelle 2-3: Supplemente des EPC-Mediums.....	42
Tabelle 2-4: Stimulationsbedingungen der EPC-Versuche.....	43
Tabelle 2-5: Zur Identifizierung der EPC-Population eingesetzte Antikörper (FACS).....	46
Tabelle 2-6: Antikörper zum Nachweis APC-relevanter Rezeptoren auf EPCs (FACS).....	46
Tabelle 2-7: RT-Mastermix.....	51
Tabelle 2-8: PCR-Reaktionsansatz.....	52
Tabelle 2-9: PCR-Programm für GAPDH.....	53
Tabelle 2-10: PCR-Programm für VEGF-C.....	53
Tabelle 2-11: PCR-Programm für Ang-2.....	53
Tabelle 2-12: PCR-Programm für PAR-1.....	54
Tabelle 2-13: PCR-Programm für PAR-2.....	54
Tabelle 2-14: PCR-Programm für EPCR (CD201).....	54
Tabelle 2-15: PCR-Programm für S1P1 (EDG1).....	55
Tabelle 2-16: Real-Time RT-PCR: Annealing Mixtur (je RNA-Probe).....	61
Tabelle 2-17: Real-Time RT-PCR: RT-Cocktail (je RNA-Probe).....	61
Tabelle 2-18: Real-Time RT-PCR: cDNA-Cocktail (für alle Proben).....	62
Tabelle 2-19: Programm für die Real-Time RT-PCR (nach Angaben des Herstellers).....	62
Tabelle 2-20: Geräte.....	64
Tabelle 2-21: Spezielle Software.....	64
Tabelle 2-22: Verbrauchsmaterialien.....	65
Tabelle 2-23: Kulturmedien und -zusätze.....	65
Tabelle 2-24: Chemikalien und Reagenzien.....	66
Tabelle 2-25: Antikörper.....	67
Tabelle 2-26: Genspezifische Primer.....	68
Tabelle 2-27: Kommerziell erhältliche Reaktionskits.....	68
Tabelle 3-1: FACS: Prozentualer Anteil positiver Zellen (EPCs, Ficoll-Isolation).....	74
Tabelle 3-2: Beeinflussung der Genexpression durch rhAPC (Real-Time RT-PCR, EPCs) ..	86

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ac-LDL	acetylated low density lipoprotein
AMV	avian myeloblastis virus
Ang-2	Angiopoietin-2
ANGPTL	Angiopoietin-like
AP-1	Aktivator Protein-1
APC	aktiviertes Protein C
AVG	avarage
Bcl-2	B-cell-lymphoma-2
bFGF	basic fibroblast growth factor
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CAC	circulating angiogenic cells
CAM	Chorioallantoismembran
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
CXCL	Chemokin (C-X-C) Ligand
d	Tag
Da	Dalton
$\Delta$ Ct	delta cycle threshold
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
Dil	1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine-labeled
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Gemisch der 4 Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
Dtl.	Deutschland
EBM	Endothelzell Basal Medium
EC	Endothelzelle
ECGS	endothelial cell growth supplement
EDG1	endothelial differentiation sphingolipid G-protein coupled receptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFNA	Ephrin-A
EFNB	Ephrin-B
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ENA78	epithelial neutrophil activating protein 78
ENHANCE	extended evaluation of rhAPC
EPC	Endotheliale Progenitorzelle
EPCR	Endothelialer Protein C Rezeptor
EPHB	Ephrin-Rezeptor-B
EphR	Ephrinrezeptoren
EREG	Epiregulin
F	Faktor

## Abkürzungen

---

FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Flk-1	fetal liver kinase-1
Flt-1	fms-like tyrosine kinase
GAPDH	Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte monocyte-colony stimulating factor
GOI	gene of interest
GRO	growth-related oncogene
hbFGF	human basic fibroblast growth factor
HCG	humanes Choriogonadotropin
hEGF	human endothelial growth factor
HKG	housekeeping Gen
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IAP1	inhibitor of apoptosis-1
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IFNG/IFN $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleukin
IP-10	gamma interferon inducible protein 10
K	Kontrolle
KDR	kinase insert domain-containing receptor
KG	Körpergewicht
LEP	Leptin
LPS	Lipopolysaccharid
M	mol/l, molar
MACS	magnetic cell sorting
MAPK	Mitogen-aktivierbare Proteinkinase
MG	Molekulargewicht
MGSA	melanoma growth stimulating activity
MIF	macrophage migration inhibitory factor-1
MIP-1 $\alpha$	macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$
MMP-2	Matrix-Metalloproteinase-2
MNC	mononuclear cell
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NF- $\kappa$ B	Nuklear Faktor kappa B
nm	Nanometer
PAF	platelet derived factor
PAI-1	Plasminogen Aktivator-Inhibitor-1
PAR	Protease-aktivierbarer Rezeptor
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PF4	Plättchenfaktor 4
PLGF	placenta growth factor
Pos. K	Positivkontrolle
PROWESS	protein C worldwide evaluation in severe sepsis

## Abkürzungen

---

rhAPC	rekombinantes humanes aktiviertes Protein C
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
s.	siehe
S1P1	Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor1
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler der Mittelwerte
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAFI	Thrombin-aktivierbarer Fibrinolyse-Inhibitor
TF	tissue factor
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$
THBS	Thrombospondin
TIE-2	tyrosine kinase with Ig and EGF homology domains-2
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
t-PA	tissue-Plasminogen-Aktivator
TRMP-2	testosterone-repressed prostatic message-2
U/min	Umdrehungen pro Minute
u-PA	Urokinase-Plasminogen Aktivator
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF-C	vascular endothelial growth factor-C
VPF	vascular permeability factor
vs.	versus
vWF	von Willebrand Faktor

## **1 Literaturübersicht**

### **1.1 Einführung**

Bis heute stellt die Sepsis ein lebensbedrohliches Krankheitsbild dar, das trotz intensivmedizinischer Maßnahmen mit einer hohen Letalität von bis zu 50 % verbunden ist (Friedmann et al., 1998). In dem Bemühen, effektive Therapiestrategien in der Sepsis-Behandlung zu finden, gewann in den letzten Jahren das körpereigene aktivierte Protein C zunehmend an Bedeutung. Aktiviertes Protein C (APC) ist einer der wichtigsten physiologischen Inhibitoren der plasmatischen Blutgerinnung. Neben seinen antikoagulativen Eigenschaften besitzt es profibrinolytische und antiinflammatorische Wirkmechanismen (Esmon, 2000a), die eine ideale Ergänzung in der Behandlung systemischer Entzündungszustände und Koagulopathien darstellen. Die exogene Zufuhr von rekombinantem humanem APC (rhAPC) hat sich als Medikation zur Behandlung der akuten Sepsis bereits bewährt (Bernard et al., 2001). Das multifunktionale APC scheint jedoch auch bei anderen Indikationen einsetzbar zu sein.

In der folgenden Literaturübersicht werden die bis dato bekannten Effekte und Wirkmechanismen des APC erläutert (Brueckmann et al., 2006). Zudem werden die angiogenen Wachstumsfaktoren „vascular endothelial growth factor-C“ (VEGF-C) und Angiopoietin-2 (Ang-2) sowie deren Rezeptoren näher beschrieben und weitere Angiogenese-relevante Faktoren im Überblick dargestellt. Da die Wirkung von APC bisher noch nicht an endothelialen Progenitorzellen (EPCs) erforscht wurde, wird eine Einführung in die Thematik der EPCs geboten.

### **1.2 Eigenschaften und Wirkungen von aktiviertem Protein C (APC)**

#### **1.2.1 Ursprungsort und Aktivierung von Protein C**

APC ist eine Vitamin-K-abhängige Serinprotease (MG 62000 Da), die in der Leber, in vaskulären Endothelzellen (ECs) und Keratinozyten zunächst als inaktives Vorläuferprotein (Protein C) synthetisiert wird (Kisiel, 1979; Xue et al., 2007). Die Aktivierung des Protein C startet mit der spezifischen Bindung von Thrombin an Thrombomodulin, einem Rezeptorprotein an der EC-Oberfläche. Thrombin und Thrombomodulin fusionieren zum Thrombin-Thrombomodulin-Komplex, der Protein C binden und in seine aktive Form überführen kann (Esmon, 1989). Eine erleichterte Aktivierung findet statt, wenn Protein C bereits an den Endothelialen Protein C-Rezeptor (EPCR) gebunden ist (Stearns-Kurosawa et al., 1996).

Die physiologische Funktion des APC besteht in der Kontrolle und Regulation des Gerinnungssystems. Neben seiner antikoagulativen und profibrinolytischen Wirkung greift es auch ins Entzündungsgeschehen ein, indem es antiinflammatorische Effekte vermittelt (Yan et al., 1994; Bajzar, 1996; Esmon, 2000a).

Der Plasmaspiegel von Protein C liegt beim Menschen bei etwa 3 - 5 µg/ml, die aktive Form APC kommt beim gesunden Menschen in einer Konzentration von 2,3 ng/ml vor (Gruber et al., 1992; He et al., 2004). Die therapeutische Dosis im Rahmen der Sepsis-Therapie beträgt 24 µg/ml/h (Bernard et al., 2001). Rekombinant hergestelltes humanes APC (rhAPC) wird von der Firma Eli Lilly, Indianapolis, USA unter dem Namen „Xigris“ vertrieben; des Weiteren trägt rhAPC auch den generischen Namen „Drotrecogin alfa (aktiviert)“.

Die rekombinante Form des APC besitzt, ebenso wie die im Plasma vorliegende Form, eine Halbwertszeit von ca. 20 Minuten (Heeb et al., 1989; Esmon, 2002). Demgegenüber zeigt sich das nicht aktivierte Protein C mit einer Halbwertszeit von 10 Stunden deutlich stabiler (Okajima et al., 1990). Die kurze Haltbarkeit des APC im Organismus erklärt sich durch die Existenz verschiedener Plasmaserin-Proteasen, die APC entweder abbauen oder neutralisieren können, wie z.B. Protein C Inhibitor,  $\alpha$ 1-Antitrypsin,  $\alpha$ 2-Antiplasmin und „Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1“ (PAI-1) (Heeb et al., 1989; Scully et al., 1993; Esmon, 2002).

### 1.2.2 Antikoagulative Wirkung von APC

Die Aufrechterhaltung der Blutzirkulation ist abhängig von der kardiovaskulären Aktivität und der Funktionalität des Gerinnungssystems. Die Blutgerinnung gestaltet sich als ein komplex aufeinander abgestimmtes System von Koagulation und Fibrinolyse. APC verhindert eine übermäßige Aktivierung der Gerinnungskaskade und bestimmt als körpereigenes Antikoagulum maßgeblich die Stabilisierung des hämostatischen Gleichgewichts.

Zum besseren Verständnis der Angriffspunkte von APC, soll zunächst auf die Physiologie der Blutgerinnung (Abb. 1-1) näher eingegangen werden (Meyer, 1993): Der prokoagulative Mechanismus des exogenen Gerinnungssystems wird über die Freilegung von subendothelial gelegenen „tissue factor“ (TF) initiiert. Durch mechanische Verletzung der Endothelzellschicht, aber auch über eine gesteigerte Expression (z.B. induziert von den Zytokinen Interleukin-1 (IL-1) und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )) wird vermehrt TF freigesetzt. Auch im Rahmen einer Sepsis steigt der TF-Spiegel über Mikroläsionen des Endothels sowie nach reaktiver Überproduktion. Nach Kontakt des TF mit dem plasmatischen Gerinnungsfaktor VII (F VII) bildet sich ein aktiver Komplex, der den Gerinnungsfaktor X zu seiner aktiven Form Xa aktiviert. Faktor Xa wiederum überführt die inaktive Vorstufe Prothrombin in das aktive Thrombin.

Thrombin ist der zentrale Mediator der Blutgerinnung. Es vermittelt die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin und aktiviert Thrombozyten. Das über Thrombin entstandene Fibrin bildet die molekulare Grundlage des Blutgerinnsels, welches durch Quervernetzung über Faktor XIIIa an Stabilität gewinnt.

Thrombin kann über positive Rückkopplung seine eigene Generierung steigern. Dies geschieht über die Aktivierung des Gerinnungsfaktors F V zu F Va. Zusammen mit F Xa, Calcium und Phospholipiden bildet F Va den Prothrombinasekomplex, der die Aktivierung von Prothrombin weitaus effizienter vermitteln kann, als F Xa alleine. F X kann neben dem genannten TF/FVII-Komplex auch von den Faktoren VIIIa und IXa des endogenen Gerinnungssystems aktiviert werden, die mit Calcium und Phospholipiden den hochpotenten Tenasekomplex bilden. Die Entstehung dieses Komplexes ist wiederum von Thrombin abhängig, da es den F VIII in seine aktive Form überführt.

Thrombin steuert jedoch auch selbstregulatorisch inhibierende Effekte. Es limitiert seine überschießende Entstehung selbst, indem es zeitgleich antikoagulative Reaktionen einleitet. Dies geschieht durch die bereits erwähnte Bildung des Thrombin-Thrombomodulin-Komplexes, der das inaktive Vorläufer-Protein C in APC umwandelt (Esmon, 1989). Nach Dissoziation vom EPCR verbindet sich das APC mit seinem Kofaktor Protein S, das Vitamin-K-abhängig vor allem in Leber und Endothel synthetisiert wird. Gemeinsam bewirken beide Proteine eine Hemmung der Koagulationskaskade durch proteolytische Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa (Hesselvik et al., 1991; Rigby et al., 2004). Dies führt zu einer indirekten Hemmung der Thrombinbildung über Inhibierung des von F Va abhängigen Prothrombinase-Komplexes und des von F VIIIa abhängigen Tenase-Komplexes. Durch Verminderung des Thrombin-Spiegels wird die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin gehemmt und so eine überschießende Koagulation verhindert. Dieser negative Rückkopplungsmechanismus besitzt eine entscheidende Funktion in der Regulation der Blutgerinnung. Das APC nimmt in diesem Zusammenhang eine Schlüsselposition in der physiologischen Antikoagulation ein.

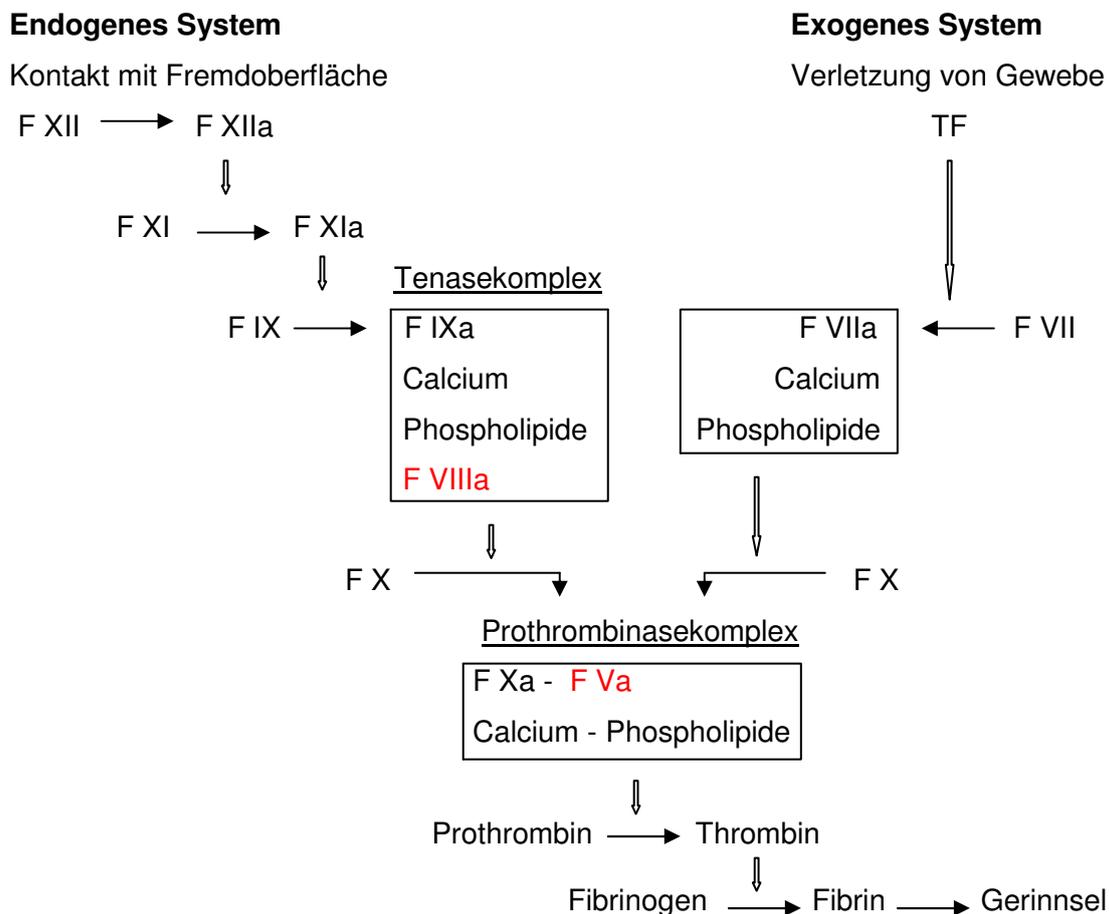
APC übt seine antikoagulative Wirkung besonders stark in der Mikrozirkulation aus, da hier in Relation zum Blutvolumen eine wesentlich höhere Endothelzelldichte vorliegt (Busch et al., 1982). Das Angebot an Thrombomodulin ist in der Mikrozirkulation dementsprechend erhöht, und damit auch die Voraussetzung zur APC-Synthese (Esmon; 1989; Esmon, 2001).

Störungen des gerinnungshemmenden APC-Wirkmechanismus verschieben das hämostatische Gleichgewicht in Richtung Koagulation und bewirken eine übersteigerte Aktivierung der Blutgerinnung, die mit gefährlichen thromboembolischen Komplikationen verbunden sein kann. Aktivierende Koagulopathien können erblicher oder erworbener Natur sein; sie können z.B. in einem Funktionsverlust, einer Minderproduktion oder im erhöhten Verbrauch von APC bestehen.

Die häufigste angeborene Störung ist eine Punktmutation des Faktor V-Gens, die zur Resistenz dieses Faktors gegenüber APC führt. Diese als „Faktor V Leiden Mutation“ bekannte Erkrankung kann mit ausgeprägten Thrombosierungen einhergehen (Dahlbäck et al., 1996). Lebensbedrohliche Thromboembolien werden auch durch erbliche, homozygote

Defekte des Protein C verursacht (Seligsohn et al., 1984). Der hereditäre Protein C-Mangel resultiert ebenfalls in einer erhöhten Thromboseinzidenz, besonders in den tiefen Bein- und Mesenterialvenen (Dreyfus et al., 1991). Des Weiteren kann der antikoagulative APC-Wirkmechanismus auch durch angeborene Defekte des Thrombomodulin und Antithrombin beeinträchtigt werden (Murin et al., 1998; Robetorye et al., 2001).

Erworbene Störungen des APC-Systems beziehen sich meistens auf Erkrankungen des Syntheseorgans für Protein, die Leber. Bei einem Leberparenchymschaden wird z.B. ein dysfunktionales Protein C synthetisiert (He et al., 2004). Auch die schwere Sepsis bedingt einen erworbenen Mangel an Protein C. Im Zuge der Sepsis ist einerseits der Verbrauch von Protein C und APC gesteigert, andererseits ist die Syntheseleistung der Leber verringert (Dhainaut et al., 2001). Zusätzlich hemmt die Aktivierung inflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$  und IL-1) die Produktion von Thrombomodulin. Dadurch kann das vorhandene Protein C schlechter zu APC aktiviert werden (Conway et al., 1998; Faust et al., 2001).



**Abbildung 1-1: Schema der Blutgerinnung und antikoagulative Wirkung von APC**

Vereinfachte Darstellung des endogenen und exogenen Systems der Blutgerinnung (modifiziert nach: Meyer, 1993). APC hemmt die Koagulationskaskade durch proteolytische Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren F Va und F VIIIa (rot markiert) und reduziert dadurch indirekt die Thrombin-induzierte Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin, dem Grundbestandteil eines Blutgerinnsels. F = Faktor

### 1.2.3 Profibrinolytische Wirkung von APC

Das hämostatische Gleichgewicht kann nicht nur durch Beeinflussung der Koagulation, sondern auch durch Modulation der Fibrinolyse reguliert werden. Als Gegenspieler der Koagulation hat das Fibrinolyse-System die Aufgabe, bereits gebildete Fibringerinnsel wieder aufzulösen. Der Hauptakteur in der Fibrinolyse ist das Plasmin. Diese Protease besitzt die Fähigkeit, Fibrinnetzwerke sowie Fibrinogen zu spalten. Die Entstehung von Plasmin wird durch den endothelialen „tissue-Plasminogen-Aktivator“ (t-PA) vermittelt. Dieser aktiviert das Vorläuferprotein Plasminogen zu Plasmin, wobei eine Bindung von Plasminogen an Fibrin notwendig ist. Plasminogen kann des Weiteren auch durch den „Urokinase-Plasminogen-Aktivator“ (u-PA) zu Plasmin aktiviert werden.

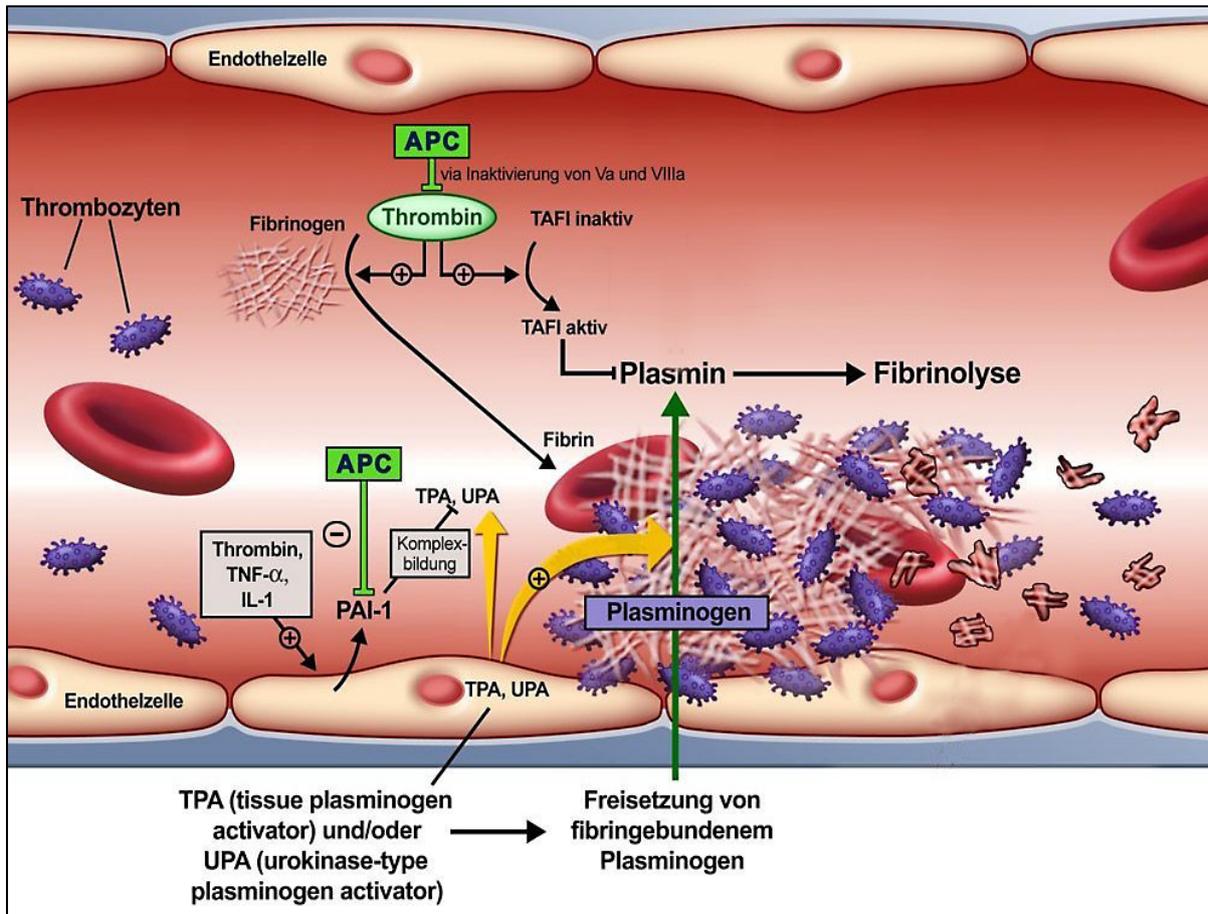
Neben den profibrinolytischen Plasminogenaktivatoren existieren auch Inhibitoren der Fibrinolyse. Hierzu zählen einerseits die Plasmininhibitoren und andererseits die Plasminogenaktivatorinhibitoren, wie der „Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1“ (PAI-1). PAI-1 kann unter Komplexbildung t-PA inaktivieren und somit die Bildung von Plasmin herabsetzen. Während eines Entzündungsgeschehens steigt die Konzentration von PAI-1 als Reaktion auf Thrombin und proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 und TNF- $\alpha$ , stark an. Auch Lipopolysaccharid (LPS) und Endotoxine bewirken im Verlauf einer Sepsis eine Erhöhung der PAI-1-Spiegel. Der von Thrombozyten, Megakaryozyten und ECs synthetisierte PAI-1 wird deshalb zu den Akute-Phase-Proteinen gerechnet (Sakata et al., 1986).

Die profibrinolytische Wirkung des APC (Abb. 1-2) setzt am Fibrinolyse-Inhibitor PAI-1 an, den es durch Komplexbildung inaktiviert. Dadurch wird der t-PA vor einer Inaktivierung durch PAI-1 geschützt und kann vermehrt Plasmin bilden. APC fördert die Fibrinolyse durch diesen Mechanismus auf indirekte Weise (van Hinsbergh et al., 1985; Esmon, 2001).

Neben der Inaktivierung von PAI-1 vermindert APC zusätzlich dessen Entstehung. Dies geschieht indirekt durch Hemmung der Bildung von Thrombin, das maßgeblich die endotheliale PAI-1-Freisetzung triggert (Bajzar et al., 2004).

Auch der „Thrombin-aktivierbare Fibrinolyse-Inhibitor“ (TAFI) wird indirekt durch APC gehemmt. Aktivierter TAFI entfernt die C-terminalen Lysin- und Argininreste von Fibrin und verhindert so die Anlagerung von Plasminogen und t-PA. Dadurch wird die Bildung aktiven Plasmins verlangsamt und dementsprechend auch der fibrinolytische Abbau des Gerinnsels (Bajzar et al., 1995 und 2004). Indem APC das zur Aktivierung des TAFI notwendige Thrombin herunterreguliert, kann es den TAFI indirekt hemmen.

APC vermag zusätzlich die t-PA-induzierte Lyse des Fibrinnetzes direkt zu beschleunigen (Hesselvik et al., 1991).



**Abbildung 1-2: Profibrinolytische Wirkung von APC**

Indirekt profibrinolytisch: APC steigert die Bildung des zentralen fibrinolytischen Faktors Plasmin durch Hemmung der Fibrinolyse-Inhibitoren PAI-1 und TAFI.

Direkt profibrinolytisch: APC beschleunigt die t-PA-induzierte Auflösung von Fibrinnetzen.

PAI-1 = Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1, t-PA = tissue-Plasminogen-Aktivator, TAFI=Thrombin-aktivierbarer Fibrinolyse-Inhibitor (entnommen aus: Brückmann et al., 2006; mit freundlicher Genehmigung des Verlages).

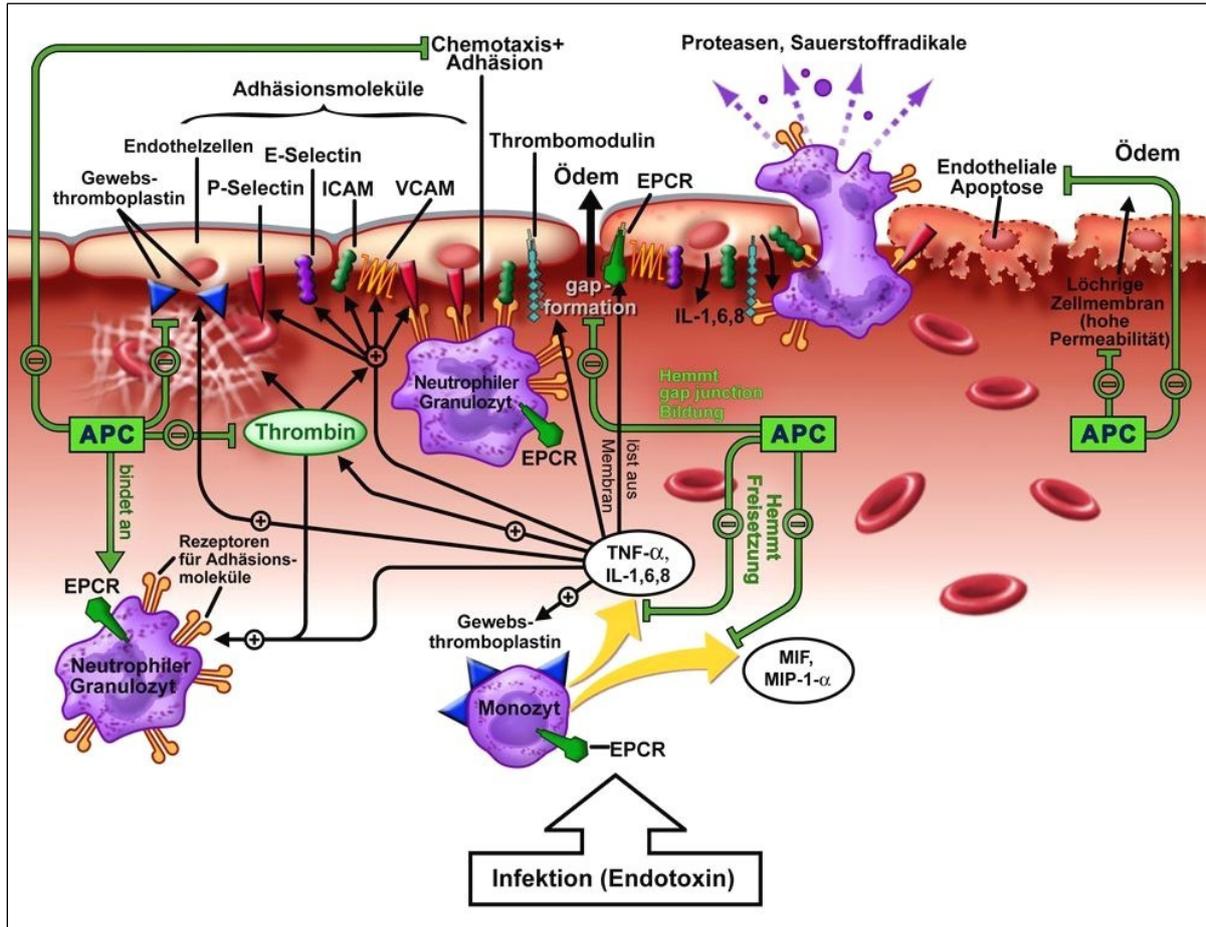
### 1.2.4 Indirekte und direkte antiinflammatorische Wirkung von APC

Die indirekte antiinflammatorische Wirkung des APC beruht auf seinem inhibierenden Einfluss auf die Thrombin-Entstehung. Da APC über die Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa die Bildung von Thrombin hemmt (siehe 1.2.2), werden auch die durch Thrombin hervorgerufenen proinflammatorischen Effekte vermindert (Esmon et al., 2000b).

APC hemmt beispielsweise die Thrombin-induzierte Aktivierung von Thrombozyten und ECs. Dadurch wird die Freisetzung proinflammatorischer Chemokine (z.B. IL-6 und IL-8) minimiert und die Chemotaxis von Monozyten und Neutrophilen gehemmt. Über Herabsetzung der Thrombinbildung vermindert APC auch die Expression des Adhäsionsmoleküls P-Selektin auf der Endothelzelloberfläche und hemmt so die P-Selektin-vermittelte Aktivierung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten (Sugama et al., 1992; Grinnel et al., 1994). Des Weiteren senkt APC die Thrombin-induzierte endotheliale Expression des „platelet derived factor“ (PAF), der neutrophile Granulozyten aktiviert (Bizios et al., 1986; Johnson et al., 1998) (Abb.1-3).

Die direkte antiinflammatorische Wirkung von APC scheint unabhängig von seiner antikoagulativen Wirkung zustande zu kommen und wird überwiegend über die endothelialen und monozytären Rezeptoren für APC (siehe 1.2.6) vermittelt.

So hemmt APC *in vitro* direkt die LPS- oder Interferon- $\gamma$ -induzierte, monozytäre Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  (Grey et al., 1994), „macrophage migration inhibitory factor-1“ (MIF-1) (Schmidt-Supprian et al., 2000) und „macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ “ (MIP-1 $\alpha$ ) (Brueckmann et al., 2004). In Endothelzell-Experimenten vermindert rhAPC die Aktivität des Transkriptionsfaktors „nuclear factor kappa B“ (NF- $\kappa$ B) und ebenso die Expression mehrerer von NF- $\kappa$ B regulierter Gene, z.B. der Zelladhäsionsmoleküle „vascular cell adhesion molecule-1“ (VCAM-1) und „intercellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1) sowie E-Selektin (Joyce et al., 2001) (Abb. 1-3). Dementsprechend wird auch die E-Selektin-vermittelte Leukozytenadhäsion an der Endothelzelloberfläche gehemmt (Grinnel et al., 1994). Eine durch APC verminderte LPS-induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B konnte auch in humanen Monozyten festgestellt werden, ebenso die Hemmung der Expression und Aktivierung des Transkriptionsfaktors „Aktivator Protein-1“ (AP-1), der eine entscheidende Rolle bei der Produktion des proinflammatorischen TNF- $\alpha$  spielt (White et al., 2000; Yuksel et al., 2002).



**Abbildung 1-3: Indirekte und direkte antiinflammatorische Effekte von APC**

Indirekt antiinflammatorisch: APC hemmt die Entstehung von Thrombin und antagonisiert dadurch einige der proinflammatorischen Thrombineffekte, wie z.B.: die Thrombin-induzierte Aktivierung von ECs und Thrombozyten sowie die endotheliale Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1, P- und E-Selektin.

Direkt antiinflammatorisch: APC hemmt die Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , MIF-1, MIP-1- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 in Monozyten.

EPCR = Endothelialer Protein C-Rezeptor; ICAM = „intercellular adhesion molecule“; IL = Interleukin; VCAM = „vascular cell adhesion molecule“; MIF-1 = „macrophage migration inhibitory factor-1“; MIP-1- $\alpha$  = „macrophage inflammatory protein-1- $\alpha$ “; TNF- $\alpha$  = Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (entnommen aus Brückmann et al., 2006; mit freundlicher Genehmigung des Verlages).

### 1.2.5 Antiapoptotische und proliferationssteigernde Wirkmechanismen von APC

Die antiapoptotischen Effekte von APC werden über spezifische APC-Rezeptoren vermittelt (siehe 1.2.6) und resultieren in einer Veränderung der endothelialen Expression von Apoptose-relevanten Genen. So wird die Expressionsrate von proapoptotischen Genen, wie Calcireticulin, „testosterone-repressed prostatic message-2“ (TRMP-2) und Bax in EC-Kulturen gehemmt, während antiapoptotische Gene, wie z.B. „inhibitor of apoptosis-1 (IAP1) vermehrt exprimiert werden. APC vermag ebenfalls die Aktivität des antiapoptotischen Transkriptionsfaktors „B-cell-lymphoma-2“ (Bcl-2) zu steigern (Joyce et al., 2001).

Des Weiteren hemmt APC die p53-induzierte Apoptose von ischämiegeschädigten zerebralen ECs und reduziert Caspase-3-abhängige proapoptotische Signaltransduktionswege. Über diese Mechanismen kommt dem APC auch eine potentiell neuroprotektive Wirkung zu (Cheng et al., 2003; Chen et al., 2006).

Das multifunktionale APC verfügt zudem über proliferatives Potential. Sowohl bei humanen ECs (Uchiba et al., 2004), als auch bei Keratinozyten (Xue et al., 2004) konnte *in vitro* eine Steigerung der Zellproliferation nachgewiesen werden. Über eine Aktivierung von Mitogen-aktivierbaren Proteinkinasen (MAP-Kinasen), die für die Regulation des Zellzyklus und das Zellwachstum bedeutsam sind, steigert APC die DNA-Synthese und damit auch die Proliferation. Zusätzlich konnte eine migrationsfördernde Wirkung bei Keratinozyten über eine Aktivitätssteigerung und vermehrte Expression der Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) festgestellt werden (Xue et al., 2004). Diese Effekte spielen eine wichtige Rolle bei der Reepithelialisierung in der Wundheilung.

### 1.2.6 Rezeptoren für APC

Die antiinflammatorischen und antiapoptotischen Effekte des APC werden in ECs über den G-Protein-gekoppelten, Protease-aktivierbaren Rezeptor-1 (PAR-1) vermittelt. APC kann den PAR-1 jedoch nur in Interaktion mit dem EPCR aktivieren, der als Korezeptor fungiert. So ist eine bereits vorhandene Bindung von APC an den EPCR Voraussetzung für die proteolytische Aktivierung des Rezeptors PAR-1 (Riewald et al., 2002). PAR-1 wird nicht nur auf ECs exprimiert, sondern auch auf glatten Muskelzellen, Kardiomyozyten, Thrombozyten, Fibroblasten, Zellen des Immunsystems und Nervenzellen (Ruf et al., 2003; Trejo et al., 2003).

Bisher wurden vier verschiedene PAR-Subtypen (**PAR-1 bis PAR-4**) identifiziert, die je nach Zellart variierende Expressionsmuster zeigen (Preissner et al., 2000). Über die PAR-Rezeptoren erfolgt eine Modulation von Rho-Kinasen, deren Funktion u. a. die intrazelluläre

Steuerung der Gentranskription beinhaltet (Zeng et al., 2004). Es bestehen Unterschiede in der funktionellen Bedeutung der vier PAR-Subtypen. Sowohl anti- als auch proinflammatorische Effekte können über PAR-Rezeptoren vermittelt werden. Im Verlauf einer Sepsis findet ein Wandel der endothelialen Expression von PAR-1 zu PAR-2 statt: PAR-1 wird überwiegend in der frühen Phase der anhaltenden systemischen Inflammation exprimiert, während PAR-2 erst zu einem späteren Zeitpunkt an Bedeutung gewinnt, da dieser Rezeptor durch proinflammatorische Zytokine induziert wird (Ruf, 2004). Als Ligand des murinen Protease-aktivierbaren Rezeptor-3 (PAR-3) übt APC direkt protektive Effekte aus, indem es antiapoptotische Signalwege in Neuronen aktiviert (Guo et al., 2004).

Da ein Großteil der APC-Wirkung über PAR-1 übertragen wird, ist er der zentrale Rezeptor für APC-vermittelte direkte Effekte. PAR-1 ist jedoch nicht spezifisch für APC; diverse weitere Proteasen, unter anderem Thrombin, können ihn ebenfalls aktivieren. Thrombin jedoch bewirkt proinflammatorische, dem APC entgegengesetzte Wirkungen am PAR-1-Rezeptor. APC hemmt über den PAR-1-Signaltransduktionsweg die Expression proinflammatorischer und proapoptotischer Gene; zeitgleich verstärkt es die Expression von antiinflammatorischen und antiapoptotischen Genen und stabilisiert so die endotheliale Barrierefunktion. Thrombin dagegen vermittelt genau das Gegenteil. Eine Erklärung für dieses Phänomen findet sich darin, dass APC bestimmte Kofaktoren auf der Endothelzelloberfläche mitaktiviert, wodurch die PAR-1-Signaltransduktion moduliert wird (Bae et al., 2007). Derartige Kofaktoren sind Thrombomodulin und der bereits erwähnte **EPCR** (Fukudome et al., 1994; Ruf et al., 2003). Dieser, zum Typ 1 der transmembranären Proteine zählende Rezeptor wird überwiegend von ECs exprimiert, befindet sich aber auch auf Monozyten und neutrophilen Granulozyten (Fukudome et al., 1994; Laszik et al., 1997). EPCR besitzt für APC und Protein C eine ähnliche Affinität und ist neben seiner Funktion als Kofaktor der PAR-1-Aktivierung maßgeblich an der Überführung von Protein C in seine aktive Form beteiligt. An EPCR gebundenes Protein C wird dem Thrombin-Thrombomodulin-Komplex präsentiert, was die Überführung in die aktive Protein C-Form wesentlich erleichtert (Stearns-Kurosawa et al., 1996). Die Mitbeteiligung des EPCR an der Vermittlung antiinflammatorischer Signale wurde im Tierexperiment mit Affen bestätigt. Nach Blockade des EPCR stieg die Letalitätsrate bei subletaler *E.-coli*-Infusion (Taylor et al., 1987), zeitgleich erfolgte eine signifikante Erhöhung der Serumspiegel der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8.

Ein weiterer von APC über „Rezeptoren-Crosstalk“ aktivierbarer Rezeptor ist der Sphingosin-1-Phosphat-1-Rezeptor (**S1P1**, früher: „endothelial differentiation sphingolipid G-protein coupled receptor“, EDG1). Es wird vermutet, dass APC über die Aktivierung von EPCR und PAR-1 die intrazelluläre Sphingosin-Kinase-1-Aktivität steigert und dadurch vermehrt Sphingosin-1-Phosphat gebildet wird. Dieses kann an den S1P1-Rezeptor auf ECs

binden und ihn über den Proteinkinase-3-Weg aktivieren. Der genaue Ablauf der APC-induzierten Transaktivierung von S1P1 ist jedoch noch nicht geklärt. S1P1 vermittelt protektive Effekte, die die Endothelzell-Integrität fördern (Feistritzer und Riewald, 2005; Finigan et al., 2005).

### **1.2.7 Dosisabhängigkeit der Wirkung von rekombinantem humanem (rh) APC**

Die Effekte von therapeutischen und supratherapeutischen rhAPC-Dosierungen können *in vitro* differieren. Dies erschwert die Übertragbarkeit der Resultate von *in vitro*-Experimenten, in denen häufig supratherapeutische rhAPC-Konzentrationen eingesetzt wurden. Beim Menschen kann unter therapeutischer rhAPC-Infusion eine mediane rhAPC-Plasmakonzentration von etwa 45 ng/ml erreicht werden (Macias et al., 2002). *In vitro* werden jedoch bisweilen Konzentrationen eingesetzt, die die erreichbaren Plasmaspiegel um ein Vielfaches überschreiten (500 ng/ml bis 200 µg/ml). Demnach sind die Ergebnisse dieser *in vitro*-Experimente nicht unmittelbar mit den *in vivo*-Untersuchungen vergleichbar. Beispielsweise bewirkt eine Stimulation mit einer supratherapeutischen APC-Konzentration von 2,75 µg/ml in „human umbilical vein endothelial cells“ (HUVECs) eine signifikante Steigerung der Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 auf mRNA- und Proteinebene (Hooper et al., 1998). Dagegen führen die bei Sepsispatienten erreichten Konzentrationen zu keiner Veränderung der IL-8-Plasmakonzentration (Dhainaut et al., 2003). Die IL-6-Plasmakonzentration fiel bei Sepsispatienten nach rhAPC-Applikation jedoch signifikant ab (Bernard et al., 2001).

Wichtig ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen, dass nicht nur APC, sondern auch z.B. Thrombin dosisabhängig ganz unterschiedliche Effekte über die Rezeptoren PAR-1 und EPCR vermitteln kann (Feistritzer u. Riewald, 2005). Demnach scheinen die Signaltransduktionswege dieser Rezeptoren, in Abhängigkeit von ihrer Ligandenkonzentration, zu variieren.

### **1.2.8 Indikationsgebiete von rhAPC**

#### **1.2.8.1 Einsatz von rhAPC in der Sepsistherapie**

Die bis heute gültige Definition der Sepsis wurde mit folgenden Worten von dem Mediziner Robert C. Bone (1941-1997) beschrieben: „Sepsis ist definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom, zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion“ (Quelle: [www.sepsis-gesellschaft.de](http://www.sepsis-gesellschaft.de)).

In den meisten Fällen wird eine Sepsis von Bakterien verursacht, seltener durch Pilze, Viren oder Parasiten. Charakteristisch für die akute Sepsis ist eine Dysbalance zwischen Koagulation und Fibrinolyse. Durch eine disseminierte intravasale Gerinnungsaktivierung

(DIC) entstehen mikrovaskuläre Thromben, die die Perfusion minimieren und letztendlich zum Organversagen führen können (v.a. von Nieren, Lunge, Herz) (Mammen, 1998).

Der systemische, septische Entzündungsreiz bewirkt die monozytäre Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, die endotheliale Zellschäden verursachen. Das dysfunktionale Endothel reagiert mit vermehrter Expression von prokoagulatorischen Faktoren, wie dem TF (Hack et al., 1989). TF aktiviert die exogene Gerinnungskaskade, wodurch Fibrin im Übermaß anfällt und sich in Gerinnseln organisiert (siehe 1.2.2). Der koagulative Effekt potenziert sich im Lauf der Sepsis, da während dieser Erkrankung der gegenregulierende Mechanismus in Form der Fibrinolyse entfällt. Über die Thrombin-abhängige Aktivierung von TAFI (Bajzar et al., 1995 und 2004) sowie eine gesteigerte Zytokin-induzierte Freisetzung von PAI-1 wird die Fibrinolyse gehemmt (Orbe et al., 1999) (siehe 1.2.3). Das Ungleichgewicht von Gerinnung und Fibrinolyse verstärkt sich zunehmend durch einen Abfall der Serumspiegel der natürlichen Antikoagulanzen Protein C und Antithrombin. Zeitgleich vermindern sich die Spiegel von profibrinolytischen Faktoren, wie z.B. Plasminogen. Dies ist auf einen gesteigerten Verbrauch sowie eine verringerte Syntheseleistung der Leber während der Sepsis zurückzuführen (Dhainaut et al., 2001; Mavrommatis et al., 2001). Die Aktivierung von Protein C wird zudem durch inflammatorische Zytokine (z.B. TNF- $\alpha$ ) über eine Expressionsverminderung von Thrombomodulin (Conway et al., 1988) und dem EPCR (Fukudome et al., 1994; Faust et al., 2001) erschwert.

Rund 90 % der Patienten mit schwerer Sepsis weisen bereits zu Beginn des septischen Geschehens erniedrigte Protein-C-Plasmawerte auf (Fisher u. Yan, 2000). Klinische Studien belegen eine Korrelation von niedrigen Protein-C-Spiegeln mit einer erhöhten Letalitätsrate bei Sepsispatienten. Protein C fungiert deshalb auch als prognostischer Indikator für die Überlebenschancen von Sepsispatienten (Fijnvandraat et al., 1995; Fisher und Yan, 2000).

Aufgrund dieser Erkenntnisse wird die exogene Substitution von APC als sinnvolle therapeutische Maßnahme in der akuten Sepsis angesehen. Die antikoagulativen und antiinflammatorischen Wirkmechanismen des körpereigenen Gerinnungsregulators senkten in verschiedensten Untersuchungen die Sterblichkeitsrate von Sepsis-Erkrankten. So konnte die Infusion von APC im Tiermodell mit Affen die letalen thromboembolischen Effekte einer durch *E. coli* induzierten Sepsis unterbinden (Taylor et al., 1987). In einer humanen Placebo-kontrollierten Phase-II-Studie bewirkte rhAPC bei Patienten mit schwerer Sepsis eine Normalisierung der Gerinnungsparameter sowie eine Abnahme der inflammatorischen IL-6-Spiegel (Hartman et al., 1998). In der weltweiten, multizentrischen Placebo-kontrollierten Phase-III-Studie („protein C worldwide evaluation in severe sepsis“, PROWESS) wurden an schwerer Sepsis erkrankte Patienten mit rhAPC (Xigris, 24  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Körpergewicht/h) über 96h behandelt. Das relative Risiko, an einer schweren Sepsis zu versterben, sank unter rhAPC/Xigris-Therapie um 19,4 %, das absolute Mortalitätsrisiko um 6,1 %. In der Patienten-

gruppe kam es zu einer stärkeren Abnahme von PAI-1 im Vergleich zur Placebogruppe; ebenso war ein rascherer Abfall der IL-6-Spiegel feststellbar (Dhainaut et al., 2003). Die Studie wurde nach einer Interimsanalyse nach Einschluss von 1690 Patienten vorzeitig abgebrochen, da es aufgrund der signifikant erhöhten Überlebensrate nicht mehr ethisch vertretbar erschien, Patienten mit schwerer Sepsis die rhAPC-Therapie vorzuenthalten. Die Inzidenz einer schweren Blutung war erwartungsgemäß in der rhAPC-behandelten Gruppe geringfügig höher, als in der Placebo-Gruppe (3,5 % versus 2 %,  $p = 0,06$ ) (Bernard et al., 2001).

Die im Anschluss weltweit an 2378 Sepsis-Patienten durchgeführte offene ENHANCE-Studie („extended evaluation of rhAPC“) bestätigte die Ergebnisse der PROWESS-Studie. Der ENHANCE-Studie wurde die Placebomortalität der PROWESS-Studie als „historische“ Kontrolle zugrunde gelegt. Bei vergleichbarer Reduzierung der 28-Tage-Letalität zeigte sich auch in der ENHANCE-Studie ein ähnlich erhöhtes Blutungsrisiko unter der Behandlung mit rhAPC/Xigris (Vincent et al., 2005).

Neuere Untersuchungen schreiben den antiinflammatorischen und antiapoptischen APC-Effekten (über die EPCR-/PAR-1-Interaktion) eine größere Bedeutung in der Reduzierung der Sepsissterblichkeit zu, als den klassischen antikoagulativen Wirkungen (Kerschen et al., 2007).

### **1.2.8.2 Weitere potentielle Indikationsgebiete von rhAPC**

Die vorläufig einzige Indikation zur Behandlung mit rhAPC ist eine schwere Sepsis mit mindestens zwei Organversagen (Europäische Zulassung) bzw. einem APACHE II-Score  $> 25$  (USA-Zulassung). Die Ergebnisse zahlreicher tierexperimenteller Untersuchungen verweisen jedoch auf weitere potentielle Indikationsbereiche. In verschiedenen Organ-systemen konnte eine Verbesserung der Reperfusion ischämischer Bezirke nachgewiesen werden, wie z.B.:

- Signifikante Verbesserung des zerebralen Blutflusses bei Mäusen in der Ischämie-abhängigen Hemisphäre nach fokaler zerebraler Ischämie (Fernandez et al., 2003)
- Steigerung der Mikrozirkulation bei intestinalen Ischämie-Reperfusions-Störungen bei Ratten (Schoots et al., 2004)
- Inhibierung der Stress-induzierten Schädigung der Magenmukosa bei Ratten durch Reduktion der TNF- $\alpha$ -Freisetzung und Steigerung der gastralen Durchblutung (Isobe et al., 2004)
- Abnahme der Neutrophilenaktivierung und Verbesserung von Ischämie-bedingten renalen Schäden bei Ratten (Mizutani et al., 2000)

In weiteren Tiermodellen zeigten sich folgende positive Effekte von APC oder rhAPC:

- Reduktion der Endotoxin-induzierten pulmonalen Entzündungsreaktion bei Ratte und Mensch (Nick et al., 2004)
- Protektive Wirkung bei Lungenfibrose, möglicherweise über profibrinolytische Effekte und geringere „platelet-derived growth factor“ (PDGF)-Expression in Bronchialepithelzellen (Shimizu et al., 2003)
- Abnahme der Leukozyten-Akkumulation und der pathologisch erhöhten TNF- $\alpha$ -Spiegel bei Ratten mit traumatisch bedingter Rückenmarksläsion (Taoka et al., 1998)

Aufgrund seiner Fähigkeit, eine systemische inflammatorische Reaktion abzumildern, wird als weitere potentielle Indikation für rhAPC die akute Pankreatitis in Betracht gezogen. Während die Behandlung der hämorrhagischen Pankreatitis wegen des erhöhten Blutungsrisikos unter rhAPC eher als ungeeignet erscheint, stellt die seröse Pankreatitis eine mögliche neue Indikation dar (Jamdar et al., 2005).

### 1.3 Vaskulogenese und Angiogenese

Die Entstehung von Blutgefäßen erfolgt primär über die Mechanismen Vaskulogenese und Angiogenese. Unter **Vaskulogenese** versteht man die *de novo*-Bildung von Blutgefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen. Während der frühen Embryonalentwicklung wandern Zellen aus dem Mesoderm unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren in den Dottersack ein und lagern sich dort zu extraembryonalen Blutinseln zusammen. In diesen Blutinseln können äußere Zellen, die sog. Angioblasten, als Endothelzellvorläufer von inneren Zellen abgegrenzt werden, die sich in hämatopoietische Stammzellen entwickeln. Aufgrund der räumlichen Nähe dieser beiden Zell-Linien wurde konstatiert, dass sie sich von einer gemeinsamen Stammzelle, dem Hämangioblasten, ableiten (Choi et al., 1998; Choi, 2002). Da die Angioblasten in ECs ausdifferenzieren können, bezeichnet man sie auch als endotheliale Vorläuferzellen bzw. endotheliale Progenitorzellen (EPCs). Durch Formierung dieser Vorläuferzellen in kapilläre Strukturen und ihre anschließende Ausreifung in ECs, entstehen erste primitive Gefäße, wie der Herzschlauch, die embryonale Aorta und die Dottersackvene (Risau und Flamme, 1995).

Vaskulogenese spielt sich hauptsächlich embryonal ab, wird aber auch im adulten Organismus, z.B. nach Traumata oder Gewebehypoxie, beobachtet (Asahara et al., 1997; Drake, 2003; Asahara und Kawamoto, 2004). Durch bestimmte Stimuli (z.B. Gewebeschämie) können EPCs aus dem Knochenmark rekrutiert werden und über die Zirkulation in Orte der Gefäßneubildung gelangen, wo sie proliferieren und zur Regeneration adulter Gewebe beitragen (siehe 1.7 Endotheliale Progenitorzellen).

Das zunächst primitive vaskuläre Netzwerk durchläuft anschließend in Form der **Angiogenese** einen Reifeprozess, der zur Verzweigung des Gefäßsystems führt. Dies geschieht durch die Aussprossung von Angioblasten oder ECs aus bereits existierenden Gefäßen („sprouting angiogenesis“). Eine weitere Form der Angiogenese stellt die sog. „Intussuszeption“ dar, wobei vorhandene Gefäße durch Einschnürung mittels einwachsender Endothelzellpfeiler geteilt werden (Risau, 1997).

Die Angiogenese gestaltet sich als ein kaskadenartiges komplexes Zusammenspiel von zellulären Komponenten, angiogenen Faktoren (v.a. VEGF), angiostatischen Faktoren (z.B. Angiostatin) und der extrazellulären Matrix (Ferrara, 1999; Carmeliet, 2000 und 2005). Im endothelialen Ruhezustand besteht ein ausgewogenes Verhältnis zwischen pro- und antiangiogenen Faktoren. Durch angiogene Stimuli, beispielsweise im Falle einer Gewebeischämie, wird dieses Gleichgewicht zu Gunsten der angiogenen Faktoren verschoben, wodurch die Gefäßpermeabilität steigt und Zell-Zellkontakte gelockert werden. Zunächst wird die zwischen der basalen Endothelzelloberfläche und der angrenzenden interstitiellen Matrix liegende Basalmembran durch endotheliale Proteasen abgebaut. Lokal wird die umgebende interstitielle Matrix aufgelöst, um Platz für einwachsende Gefäße zu schaffen. Erste ECs migrieren dann in Richtung eines angiogenen Stimulus und formieren sich, gefolgt von einer Proliferationsfront, zu einem endothelialen Strang. Die derartig gebildeten Kapillarsprossen können sich nach erneuter Degradation von Basalmembran und extrazellulärer Matrix verzweigen und über Lumen- und Anastomosenbildung zu einem kapillären Netzwerk auswachsen. Nach Beendigung der Proliferations- und Migrationsphase erfolgt ein gefäßstabilisierender Reifungsprozess, an dem periendotheliale Hilfszellen - glatte Muskelzellen, Perizyten und im Herzen Kardiomyozyten - maßgeblich beteiligt sind. Erst durch sie wird der Zusammenhalt zwischen den ECs derart gefestigt, dass das Gefäß den hämodynamischen Druckverhältnissen standhalten kann. Ruhendes Endothel wird durch die periendothelialen Hilfszellen stabilisiert, indem sie die Proliferation von ECs verhindern (Folkman und Shing, 1992; Carmeliet, 2000).

Während der embryonalen Organentwicklung ist die Angiogenese von essentieller Bedeutung; im erwachsenen Organismus spielt sie vor allem im Rahmen der Wundheilung, bei entzündlichen Prozessen und auch im weiblichen Reproduktionszyklus eine wichtige Rolle (Folkman und Singh, 1992). Eine Dysbalance angiogener Faktoren kann Ursache vielfältiger Erkrankungen sein, wie z.B. Psoriasis, rheumatoide Arthritis, proliferative Retinopathie, kardiovaskuläre Erkrankungen und tumoröse Entartung, die mit unkontrollierter, gesteigerter Angiogenese einhergehen. Auch eine übermäßige Angiogenesehemmung kann zu pathologischen Erscheinungen führen, wie Gewebeischämie, Bluthochdruck und Osteoporose (Carmeliet, 2003). Aufgrund der vielfältigen Erkrankungen, die mit Neovaskularisation assoziiert sind, wird seit einigen Jahren intensiv erforscht,

inwieweit eine Beeinflussung dieser gefäßbildenden Prozesse von therapeutischem Nutzen sein kann (Isner und Asahara, 1999).

Die in dieser Doktorarbeit untersuchten Zytokine VEGF-C (Joukov et al., 1996) und Ang-2 (Maisonpierre et al., 1997) zählen zu den Angiogenese-fördernden Faktoren. Auch eine Beteiligung an der Vaskulogenese wird diesen beiden Mediatoren zugeschrieben (Asahara et al., 1999b; Kalka et al., 2000b; Shintani et al., 2001; Hildebrand et al., 2004). Im Folgenden sollen die gefäßbildenden Effekte von VEGF-C und Ang-2 näher beschrieben werden.

## **1.4 “Vascular endothelial growth factor-C” (VEGF-C)**

### **1.4.1 Überblick über die VEGF-Familie**

Der Wachstumsfaktor „vascular endothelial growth factor-C“ (VEGF-C) wird mit sechs weiteren Vertretern zur VEGF-Familie gerechnet (Houk et al., 1991). Die Mitglieder dieser Familie gelten als Hauptinduktoren der physiologischen und pathologischen Angiogenese sowie der Vaskulogenese (Carmeliet et al., 1996; Ferrara, 1999; Carmeliet, 2000, Harry und Paleolog, 2003). VEGF-A wurde als erster Vertreter der VEGF-Gruppe entdeckt und ist bisher am besten erforscht. Erstmals erwähnt wurde das Glykoprotein von der Arbeitsgruppe um Senger et al. im Jahr 1983. Ihnen gelang die Isolierung eines permeabilitätssteigernden Mediators aus Tumorgewebe, den sie „vascular permeability factor“ (VPF) nannten (Senger et al., 1983). Unabhängig davon entdeckten Ferrara et al. ein endothelzellspezifisches Mitogen, das sie als „vascular endothelial growth factor“ (VEGF-A) bezeichneten (Ferrara et al., 1989). Nach Klonierung von VEGF und VPF zeigte sich, dass es sich um dasselbe Molekül handelte, dem zudem strukturelle Ähnlichkeit zu „platelet-derived growth factor“ (PDGF) nachgewiesen werden konnte (Keck et al., 1989).

VEGF-A gilt als Prototyp der VEGF-Familie. Seine stark angiogene Wirkung beinhaltet die Induktion der Endothelzell-Proliferation, -Migration und -Differenzierung, die Erhöhung der Kapillarpermeabilität sowie die Bildung tubulärer EC-Strukturen (Crowther et al., 1996; Ferrara und Davis-Smyth, 1997). In späteren Jahren wurden folgende weitere struktur- und funktionsverwandte Moleküle in die VEGF-Familie aufgenommen (Veikkola und Alitalo, 1999):

- „placenta growth factor-1 und -2“ (PLGF): Ihre Expression ist *in vivo* auf die Plazenta und gewisse Tumore beschränkt (Maglione et al., 1993). Sie verstärken die Wirkung von VEGF-A; vermitteln Angiogenese und Arteriogenese (Park et al., 1994)
- VEGF-B („VEGF-related factor“): ein schwaches Mitogen für ECs, mit vermehrter Expression in der Herz- und Skelettmuskulatur (Olofsson et al., 1998)

- VEGF-C: vor allem in stark vaskularisierten Geweben, wie Herz- und Skelettmuskulatur, exprimiert (Joukov et al., 1996); trägt essentiellen Anteil an der Entwicklung lymphatischer Gefäße und kann zur Angiogenese beitragen (Alitalo et al., 2005)
- VEGF-D (“c-fos induced growth factor”): lymphangiogener Faktor (Achen et al., 1998)
- In Orf- und Pseudokuhpockenviren vorkommendes sequenzverwandtes VEGF-E: hat ähnliche Bioaktivität wie VEGF-A, steigert Proliferation und Chemotaxis (Meyer et al., 1999)

#### 1.4.2 Rezeptoren für VEGF-C

Die Wirkung der VEGF-Mitglieder wird über hochaffine VEGF-Rezeptoren vermittelt, die vorwiegend auf ECs exprimiert werden, aber auch auf primitiven hämatopoietischen Stammzellen, Monozyten und Makrophagen zu finden sind (Kabrun et al., 1997, Plate und Warnke, 1997; Neufeld et al., 1999; Ziegler et al., 1999; Sawano et al., 2001). Die VEGF-Rezeptoren stammen aus der Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren (Neufeld et al., 1999). Diese sind charakterisiert durch ein strukturelles Grundgerüst aus sieben extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen, einer transmembranären Region und einer zyttoplasmatischen Tyrosinkinase-Domäne (Shibuya et al., 1990). Es existieren drei verschiedene VEGF-Rezeptortypen (Neufeld et al., 1999; Veikkola et al., 2000):

- VEGFR-1 (“flt-1, fms-like tyrosine kinase1”)
- VEGFR-2 (“flk-1/KDR, fetal liver kinase1/ kinase insert domain-containing receptor”)
- und VEGFR-3 (flt-4)

Die VEGF-Mitglieder besitzen unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu den einzelnen VEGF-Rezeptoren. VEGF-A bindet an VEGFR-1 und -2 (Ferrara und Davis-Smyth, 1997); VEGF-B sowie PLGF-1 und -2 können nur an VEGFR-1 binden (Park et al., 1994; Oloffson et al., 1998). VEGF-C und -D aktivieren spezifisch die VEGF-Rezeptoren-2 und -3 (Joukov et al., 1996; Achen et al., 1998), während VEGF-E nur an VEGFR-2 bindet (Meyer et al., 1999).

Da die einzelnen VEGF-Rezeptoren individuelle Effekte vermitteln bzw. in verschiedenen anatomischen Strukturen exprimiert werden, variieren die Wirkungen ihrer VEGF-Liganden bzw. ihr Wirkungsort. Zum Verständnis der biologischen Funktionen des in der vorliegenden Arbeit untersuchten VEGF-C, werden im Folgenden die Effekte seiner Zielrezeptoren VEGFR-2 und VEGFR-3 näher beschrieben.

Nach Liganden-Bindung dimerisieren die VEGF-Rezeptoren-2 und -3, wodurch in der Effektorzelle eine Autophosphorylierung von zyttoplasmatischen Tyrosinresten ausgelöst wird (Matsumoto und Cleason-Welsh, 2001; Cross et al., 2003). Der intrazelluläre Signal-

transduktionsweg setzt sich in einer Erhöhung der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration fort, wodurch die zytoskelettale Zellmorphologie verändert wird. Auf diese Weise wird die Zelle zur Mitose und Migration angeregt (Brock et al., 1991; Carmeliet, 2000). Diese proliferativen und migratorischen Signale bilden die Grundlage angiogener Prozesse.

Während VEGFR-2 sehr stark auf vaskulärem Endothel exprimiert wird, ist VEGFR-3 hauptsächlich auf lymphatischen Gefäßen lokalisiert (Veikkola et al., 2000). Die Aktivierung des VEGFR-2 übt auf ECs eine starke mitogene Wirkung aus und veranlasst Chemotaxis in ECs, Makrophagen und Mastzellen (Ferrara und Davis-Smyth, 1997; Gille et al., 2001). Auch endotheliale und hämatopoietische Progenitorzellen erfahren über VEGFR-2 proliferative, migratorische und chemotaktische Signale (Hattori et al., 2001). Zudem wird durch Aktivierung von VEGFR-2 die Durchlässigkeit von Gefäßwänden erhöht, wodurch Plasmaproteine ins umliegende Gewebe diffundieren können. Diese Plasmabestandteile bilden ein extravasales Fibrinnetz, das ein ideales Umgebungsmilieu für die Organisation neuer Blutgefäße bietet (Ferrara und Davis-Smyth, 1997).

VEGFR-2 vermittelt des Weiteren potente antiapoptotische Effekte auf ECs (Gerber et al., 1998) und hämatopoietische Vorläuferzellen (Gerber et al., 2002; Larrivée et al., 2003) und ist an deren Entwicklung und Differenzierung beteiligt. Dies belegen Untersuchungen an VEGFR-2-defizienten Mausembryonen, deren Embryonaltod am Entwicklungstag 8 bis 10 aufgrund fehlentwickelter ECs und hämatopoietischer Zellen eintritt (Shalaby et al., 1995).

Die Aktivierung von VEGFR-3 führt in ECs ebenfalls zur Mitose-Induktion und somit zur Proliferation. VEGFR-3 wird während der Embryogenese sowohl auf vaskulärem als auch auf lymphatischem Endothel exprimiert. Im adulten Organismus beschränkt sich seine Expression hauptsächlich auf die Lymphgefäße (Kaipainen et al., 1995) und einige fenestrierte Endothelien endokriner Organe (Kukk et al., 1996; Partanen et al., 2000). Angiogene Gefäßbildung vaskulären Endothels kann über VEGFR-3 demnach nur während der Embryonalzeit stattfinden. Die Anwesenheit des Rezeptors ist hier allerdings essentiell für die Bildung eines funktionalen kardiovaskulären Systems. So sterben VEGFR-3-knock-out-Mausembryonen bereits im Mutterleib aufgrund schwerwiegender kardiovaskulärer Fehlbildungen (Dumont et al., 1998).

Sobald die Entwicklung des vaskulären Systems abgeschlossen ist, verlagert sich die VEGFR-3-Expression noch während der Embryonalzeit auf das lymphatische Endothel und vermittelt die Entstehung des lymphatischen Netzwerks (Kaipainen et al., 1995). Die Aufgabe von VEGFR-3 im adulten Organismus besteht in der Aufrechterhaltung der strukturellen und funktionalen Integrität des lymphatischen Endothels (Mäkinen et al., 2001a). Dies geschieht u. a. über die Vermittlung antiapoptotischer Signale (Wang et al., 2004). Im Rahmen der Wundheilung werden verletzte Lymphgefäße über die Aktivität von VEGFR-3 rekonstruiert und so der Transport entzündlicher Vasate gewährleistet (Pavoonen et al., 2000).

VEGF-C bindet nicht an VEGFR-1. Dieser Rezeptor nimmt keinen direkten Einfluss auf die Proliferation von ECs; vielmehr kommt ihm eine wachstumsregulierende Rolle zu, indem er eine übermäßige VEGFR-2-Aktivierung verhindert (Bussolati et al., 2001).

### **1.4.3 Biologische Wirkungen von VEGF-C**

VEGF-C wirkt hauptsächlich auf lymphatische und vaskuläre ECs sowie auf hämatopoietische Vorläuferzellen, da diese Träger der Zielrezeptoren von VEGF-C sind. Des Weiteren werden auch Monozyten, Makrophagen und Mastzellen von dem Wachstumsfaktor beeinflusst (Kabrun et al., 1997; Neufeld et al., 1999; Sawano et al., 2001). Primär wird VEGF-C von Perizyten und glatten Muskelzellen gebildet und stimuliert ECs auf parakrinem Wege. Eine autokrine Stimulation ist jedoch auch möglich durch Produktion von VEGF-C in ECs (Zhao et al., 2007) oder EPCs (Hamada et al., 2000).

Die Expressionsorte von VEGF-C befinden sich physiologischer Weise in stark vaskularisierten Regionen, wie Herz, Plazenta, Ovar, Muskulatur und Darm (Joukov et al., 1996). VEGF-C wird als Vorläufer sezerniert, der erst nach proteolytischer Spaltung an die beiden Rezeptoren VEGFR-2 und -3 bindet und diese aktivieren kann (Joukov et al., 1997). Die biologischen Funktionen des VEGF-C ergeben sich aus den Effekten, die über VEGFR-2 und -3 vermittelt werden. Demnach ist VEGF-C in der frühen Embryonalzeit über beide VEGF-Rezeptoren an der Bildung des kardiovaskulären Systems beteiligt (Dumont et al., 1998). Nach Beendigung der embryonalen Vaskulogenese vermittelt VEGF-C als essentieller Faktor die Entstehung des lymphatischen Systems.

Über seine Affinität zum Neuropilin-Rezeptor-2 ist VEGF-C auch an der Frühentwicklung neuronaler Strukturen mitbeteiligt (Kärpanen et al., 2006). Fehlt VEGF-C in der Embryonalentwicklung, kommt keine Aussprossung lymphatischer Gefäße aus embryonalen Venen zustande. Interstitielle Flüssigkeit sammelt sich im Gewebe an und der Embryo stirbt an den Folgen erhöhten Gewebedrucks (Karkkainen et al., 2004).

Im adulten Organismus wird VEGF-C zum Erhalt der Struktur und Funktion des lymphatischen Endothels benötigt. Über VEGFR-3 beeinflusst VEGF-C die intrinsische phasische Pumpaktion von Lymphgefäßen. Durch VEGF-C kann die Flüssigkeitsbalance im Körper aufrechterhalten werden, indem überschüssige interstitielle Flüssigkeit zurück zum Blutstrom geleitet wird. Ein Ausfall von VEGF-C im adulten Organismus geht deshalb mit stark ausgeprägten Lymphödemen einher (Breslin et al., 2007). Nach Traumata oder bei erhöhtem Gewebedruck (Paavonen et al., 2000; Rutkowski et al., 2006) vermittelt VEGF-C über VEGFR-3 lymphangiogene Reparaturvorgänge (Jeltsch et al., 1997, Veikkola et al., 2001).

Über den VEGFR-2 kann VEGF-C auch im erwachsenen Organismus als angiogener Faktor wirken (Tille et al., 2003). Bei Ratten mit Ischämie des Hinterlaufs wurde nach Applikation von VEGF-C eine erhöhte Kapillardichte mit gesteigertem Blutfluss verzeichnet (Witzenbichler et al., 1998). Im Versuch an der Chorioallantois-Membran (CAM) von Hühnerembryonen zeigte VEGF-C stark proliferative und chemotaktische Effekte auf ECs sowie eine Erhöhung der Kapillarpermeabilität (Cao et al., 1998). Auch im Zellkulturversuch wirkte der Wachstumsfaktor chemotaktisch auf die Migration boviner ECs. Hierbei scheint VEGF-C parakrin einen Konzentrationsgradienten zu bilden, der eine zielgerichtete Migration der ECs einleitet (Joukov et al., 1996). Über chemotaktische Signale können auch Makrophagen und Monozyten rekrutiert werden (Skobe et al., 2001).

VEGF-C übt weiterhin über seine beiden Rezeptoren einen stabilisierenden Einfluss auf Endothelien aus. Zhao et al. detektierten antiapoptotische Effekte in retinalen ECs nach VEGF-C/VEGFR-2-Interaktion (Zhao et al., 2007). Bei Gewebehypoxie aktiviert VEGF-C über VEGFR-3 die Proteinkinase B/Akt, wodurch ein spezifisches Zellschutzprogramm gestartet wird und die Zellproliferation steigt (Mäkinen et al., 2001b; Wang et al., 2004).

Der Einfluss des Wachstumsfaktors auf hämatopoietische Vorläuferzellen besteht in ihrer Mobilisierung und der Induktion ihrer Differenzierung. Beide Effekte tragen zur vaskulogenen Gefäßneubildung bei. Über den VEGFR-2 kann VEGF-C EPCs aus dem Knochenmark mobilisieren und chemotaktisch in Gebiete der Gefäßbildung locken (Asahara et al., 1999b; Kalka et al., 2000b; Shintani et al., 2001). Nach Bildung kapillärer Strukturen werden die EPCs durch VEGF-C/VEGFR-2 zur Ausreifung in adulte ECs angeregt (Suzuki et al., 2005).

Die Expression der VEGF-C-mRNA wird *in vitro* durch inflammatorische Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-1 $\beta$  und IL-1 $\alpha$  gesteigert (Ristimäki et al., 1998). In Regionen mit erhöhtem Gewebedruck, z.B. bei Ödemen oder in bestimmten Tumoren lässt sich ebenfalls eine gesteigerte VEGF-C-Expression feststellen (Rutkowski et al., 2006; Jain, 2005). Eine Hypoxie-induzierte Synthesesteigerung, wie z.B. bei VEGF-A, konnte für VEGF-C jedoch nicht nachgewiesen werden (Enholm et al., 1997).

#### **1.4.4 VEGF-C-assoziierte Erkrankungen**

Neben der physiologischen Gefäßbildung wird VEGF-C auch mit der pathologischen Tumorangiogenese in Verbindung gebracht. In einer Vielzahl von Tumoren wird VEGF-C vermehrt synthetisiert und sezerniert, wodurch überschießendes Gefäßwachstum eingeleitet wird. In verschiedenen vaskularisierten Tumorgeweben kann eine hohe VEGF-C-Expression festgestellt werden (Valtola et al., 1999; Skobe et al., 2001; Hung et al., 2003). Durch Induktion von Angiogenese und Lymphangiogenese begünstigt VEGF-C zudem die Tumormetastasierung (Valtola et al., 1999; Skobe et al., 2001). Der Wachstumsfaktor kann in

diesem Zusammenhang als Tumormarker eingesetzt werden, da bei bestimmten Tumorarten, insbesondere nach Lymphknotenmetastasierung erhöhte VEGF-C-Serumspiegel nachweisbar sind (Mitsuhashi et al., 2005; Krzystek et al., 2007).

## **1.5 Angiopoietin-2 (Ang-2)**

### **1.5.1 Die Angiopoietin-Familie**

Angiopoietine zählen zur Gruppe der Angiogenesefaktoren. Ihre maßgebliche Beteiligung an der Bildung, Reifung und Aufrechterhaltung neuer Blutgefäße ist vielfach erforscht. Als erster Vertreter der Angiopoietin-Familie wurde 1996 Angiopoietin-1 (Ang-1) identifiziert (Davis et al., 1996). Im Jahr darauf entdeckten Maisonpierre et al. das dem Ang-1 eng verwandte Angiopoietin-2 (Ang-2), in welchem sie den endogenen funktionellen Antagonisten von Ang-1 erkannten (Maisonpierre et al., 1997). Ang-1 und -2 repräsentieren die wichtigsten Mitglieder der Angiopoietin-Familie. Die später beschriebenen Wachstumsfaktoren Angiopoietin-3 und Angiopoietin-4 (Valenzuela et al., 1999) beeinflussen die Angiogenese scheinbar in geringerem Ausmaß als Ang-1 und Ang-2.

### **1.5.2 Ang-2 und sein Gegenspieler Angiopoietin-1 (Ang-1)**

Wie bereits erwähnt, antagonisiert Ang-2 die Wirkung von Ang-1. Eine Überexpression von Ang-2 hat in der Embryonalentwicklung ebenso letale Folgen wie das Fehlen des Ang-1-Gens. In beiden Fällen treten schwerwiegende kardiovaskuläre Entwicklungsstörungen auf (Suri et al., 1996; Maisonpierre et al., 1997). Bei VEGF-defizienten Mäusen entstehen ähnliche Fehlbildungen, die Embryonen sterben jedoch zu einem früheren Entwicklungszeitpunkt ab (Carmeliet et al., 1996). Dies deutet darauf hin, dass VEGF in früheren Phasen der Angiogenese relevant ist, während die Angiopoietine zu einem späteren Zeitpunkt an Bedeutung gewinnen (Suri et al., 1996).

Ein eng aufeinander abgestimmtes Zusammenspiel von Ang-1 und Ang-2 ist entscheidend für ein gerichtetes Gefäßwachstum und den späteren Erhalt eines ruhenden Endothels. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Auswirkung von rhAPC auf die Ang-2-Expression in EPCs untersucht. Zum Verständnis der Effekte von Ang-2 ist es notwendig, auch auf die Aufgaben des Ang-1 näher einzugehen.

Ang-1 und Ang-2 sind nah verwandte Glykoproteine mit einer Länge von 498 (Davis et al., 1996) bzw. 496 Aminosäuren (Maisonpierre et al., 1997) und einem Molekulargewicht von ca. 75 kDa. Ihre Genloci befinden sich beim Menschen auf Chromosom 8 an Stelle 8q22.3-q23 bzw. 8p23 (Cheung et al., 1997).

Ang-1 wird von mesenchymalen Zellen gebildet, in erster Linie von Perizyten und glatten Muskelzellen, jedoch nicht von ECs (Davis et al., 1996; Suri et al., 1996; Kim et al 2000a).

Seine Wirkung ist parakriner Natur, da es an Endothelzell-Rezeptoren bindet. Während der Embryonalentwicklung wird Ang-1 besonders stark im Myokard gebildet, aber auch in vielen anderen Geweben, wie z.B. Gehirn und Lunge. Im adulten Organismus wird Ang-1 in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, wenngleich nur in geringen Mengen in Herz und Leber. In Gebieten mit Gefäßentwicklung umgibt es die neugebildeten Gefäße (Suri et al., 1996).

Ang-2 ist an der Spitze von sich verzweigenden Gefäßsprossen lokalisiert. Es wird vor allem von ECs gebildet, auf die es autokrine Wirkung entfaltet. Zusätzlich wird es auch von Perizyten und glatten Muskelzellen produziert (Maisonpierre et al., 1997; Mandriota und Pepper., 1998). Innerhalb der ECs wird Ang-2 in sog. Weibel-Palade-Körpern gespeichert und kann bei Bedarf schnell freigesetzt werden (Fiedler et al., 2004). Ang-2 übernimmt eine wichtige Aufgabe bei der physiologischen Gefäßumstrukturierung im neonatalen Auge (Hackett et al., 2000). Im adulten Organismus beschränkt sich die Ang-2-Expression auf Orte des physiologischen Gefäßbaus wie Ovarien, Uterus und Plazenta (Maisonpierre et al., 1997). Außerhalb des weiblichen Reproduktionstraktes ist Ang-2 nur unter pathologischen Bedingungen zu finden, z.B. im Rahmen tumorassoziierter Angiogenese (Holash et al., 1999) oder bei der Gefäßregeneration nach Gewebeischämie (Oh et al., 1999).

### **1.5.3 Der Angiopoietin-Rezeptor Tie-2**

Die Bindung aller Angiopoietine erfolgt an den transmembranären Tyrosinkinase-Rezeptor Tie-2 („tyrosine kinase with Ig and EGF homology domains“, auch Tek genannt). Dieser Rezeptor wird fast ausschließlich auf ECs und Zellen der frühen Hämatopoese, z.B. CD 34-positiven Zellen gebildet (Dumont et al., 1992; Iwama et al., 1993; Sato et al., 1995; Jones et al., 2001). Während Ang-1 als Agonist die Autophosphorylierung und damit Aktivierung des Tie-2-Rezeptors bewirkt, führt eine Bindung von Ang-2 in der Regel zur Blockierung des Rezeptors (Davis et al., 1996; Maisonpierre et al., 1997; Gale et al., 2002).

In Abhängigkeit von der Tie-2-tragenden Zellart besteht jedoch auch die Möglichkeit einer Rezeptor-aktivierenden Agonistenrolle von Ang-2. Beispielsweise findet in EPCs eine Tie-2-Aktivierung durch Ang-2 statt. In HUVECs kann Ang-2 jedoch nur dann als Agonist agieren, wenn es in sehr hohen Konzentrationen vorliegt. Eine Erklärung für dieses ambivalente Verhalten von Ang-2 findet sich in der Eigenschaft des Tie-2-Rezeptors, in einigen Zellarten (wie z.B. HUVECs) Heterokomplexe mit dem verwandten Tie-1-Rezeptor zu bilden. Diese Heterokomplexe erschweren die Aktivierung des Tie-2-Rezeptors, weshalb Ang-2 als Rezeptor-Antagonist fungiert, bzw. nur in sehr hohen Konzentrationen den Rezeptor aktivieren kann. Im Gegensatz dazu liegt Tie-2 in EPCs in ungebundener Form vor und kann leicht von Ang-2 aktiviert werden (Kim et al., 2006).

Ang-2 konkurriert mit Ang-1 um die Bindungsstelle am Rezeptor. Da beide Angiopoietine eine gleich große Bindungsaffinität zu Tie-2 aufweisen, kann Ang-2 seinen Gegenspieler nur dann kompetitiv vom Rezeptor verdrängen, wenn es im Überschuss vorliegt (Maisonpierre et al., 1997). Der Ausfall des Tie-2-Rezeptors führt zum embryonalen Fruchttod (Dumont, 1994; Sato et al., 1995).

#### 1.5.4 Biologische Wirkung von Ang-1 und Ang-2

Die Wirkungen von **Ang-1** beziehen sich in erster Linie auf die Reifung und Stabilisierung neu entstandener Blutgefäße. Es hat selbst keinen proliferativen Effekt auf ECs. Ebenso wenig kann es ECs zur Ausbildung tubulärer Strukturen anregen (Davis et al., 1996). Nur im Fall einer Überexpression von Ang-1 können direkt angiogene Prozesse induziert werden (Koblizek et al., 1998). Über die Signaltransduktionswege des Tie-2-Rezeptors veranlasst Ang-1 (v.a. in Gegenwart von VEGF) die Rekrutierung von Perizyten und glatten Muskelzellen (Asahara et al., 1998). Diese periendothelialen Hilfszellen lagern sich stabilisierend um neue Blutgefäße und festigen so den Zusammenhalt der ECs.

Ang-1 vermittelt zudem Endothel-/Matrix-Interaktionen, die eine Aufrechterhaltung der Gefäßintegrität gewährleisten (Suri et al., 1996). Über die Hemmung endothelialer Apoptosesignale (v.a. durch Erhöhung des spezifischen Zellschutzes Survivin) übt Ang-1 protektive Effekte auf ECs aus (Kwak et al., 1999; Papapetropoulos et al., 1999; Kim et al., 2000a). Fehlt Ang-1 in der Embryonalentwicklung, so bilden sich fenestrierte, durchlässige Blutgefäße mit mangelhafter Assoziation zur umgebenden Matrix (Suri et al., 1996).

**Ang-2** verhindert als Gegenspieler von Ang-1 in der Regel eine Aktivierung des endothelialen Tie-2-Rezeptors und verursacht so eine Auflockerung der Gefäßstruktur. Durch Wegfall der Tie-2-Effekte werden die Zell-Zell-Kontakte zwischen Perizyten und ECs sowie der ECs untereinander destabilisiert; zeitgleich wird die Assoziation zur extrazellulären Matrix gelockert bzw. zum Teil abgebaut (Hanahan, 1997). Das weitere Schicksal der ECs ist maßgeblich von der Gegenwart anderer angiogener Stimuli, wie VEGF und Ang-1, abhängig (Maisonpierre et al., 1997). Ang-1 sichert aufgrund der Apoptosehemmung das Überleben der ECs. Diese sind nun empfänglich für die Proliferations-induzierenden Signale von VEGF und können aus den fenestrierten Blutgefäßen neue Kapillarsprosse auswachsen lassen. Man bezeichnet diesen Prozess der Kapillarsprossung mit Einwachsen neuer Gefäße in umliegendes Gewebe auch als „sprouting“. Ohne die vorhergehende Ang-2-induzierte Destabilisierung der Gefäße wäre das „sprouting“ nicht möglich. Ang-2 leistet demnach einen essentiellen Beitrag zur Gefäßumstrukturierung.

Liegt Ang-2 jedoch ohne Koexpression von VEGF und Ang-1 vor, führt die Destabilisierung der interendothelialen Zellkontakte i. d. R. zur Apoptose der ECs und damit

zur vaskulären Regression (Hanahan, 1997; Holash et al., 1999). In Orten mit physiologischer Gefäßregression, wie z.B. in alternden Gelbkörpern (*Corpora lutea*) des Ovars oder in atretischen Follikeln findet sich demzufolge eine hohe Konzentration an Ang-2-mRNA, dagegen kaum VEGF. Befindet sich das *Corpus luteum* noch in Ausbildung, liegen sowohl hohe Ang-2- als auch VEGF-Spiegel vor (Maisonpierre et al., 1997). Abweichend davon wurde von der Gruppe um Kim et al. ein zytoprotektiver Effekt von hochkonzentriertem Ang-2 in Abwesenheit von VEGF in ECs festgestellt (Kim et al., 2000b).

Ang-2 kann bei einigen Zellarten auch als Tie-2-Agonist fungieren (siehe 1.5.3). In EPCs werden über Aktivierung des Tie-2-Rezeptors proangiogene Effekte vermittelt. Ang-2 stimuliert über Tie-2 die Formierung von EPCs in kapilläre Strukturen, erhöht das Überleben dieser Zellen und übt chemotaktische Reize auf sie aus (Kim et al., 2006). Des Weiteren fördert Ang-2 die Differenzierung von EPCs in ECs und steigert dadurch die Zellzahlen von Endothelzell-Kolonien (Hildbrand et al., 2004).

Neueren Untersuchungen zufolge soll Ang-2, in Abhängigkeit vom endothelialen Aktivierungszustand, sogar in HUVECs als Tie-2-Agonist Angiogenese und Zellprotektion vermitteln können (Teichert-Kuliszewska et al., 2000; Harfouche und Hussain, 2006).

Eine aktivierende Rolle scheint dem Ang-2 auch während der postnatalen Lymphangiogenese zuzukommen. Während Ang-2 für die embryonale Lymphangiogenese entbehrlich ist, übernimmt es eine essentielle Funktion bei der postnatalen Modellierung und Reifung der Lymphgefäße. Ang-2 zeigt sich in diesem Zusammenhang als obligater Partner der Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D. Ang-2-defiziente Mäuse entwickeln nach der Geburt schwerwiegende Defekte der Lymphgefäße und versterben aufgrund eines massiven chylösen Ascites in der zweiten Lebenswoche. Durch Gabe von Ang-1 können diese Defekte behoben werden. Dies lässt darauf schließen, dass Ang-2 während der postnatalen Lymphangiogenese als Tie-2-Aktivator fungiert (Gale et al., 2002; Veikkola et al., 2002).

Die Expression von Ang-2 wird von verschiedenen Faktoren, wie Hypoxie, Wachstumsfaktoren und Hormonen beeinflusst. In EC-Kulturen wurde ein 3,1- bis 5,6-facher Expressionsanstieg unter Hypoxie festgestellt. Steigernde Effekte zeigten des Weiteren die Zytokine VEGF, der basische Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) und TNF- $\alpha$  (Mandriota und Pepper, 1998; Oh et al., 1999; Kikrun et al., 2000; Kim et al., 2000c; Lin et al., 2000). Auch eine Stimulation mit humanem Choriogonadotropin (HCG) führte zur vermehrten Produktion von Ang-2 (Hazzard et al., 2000). Eine Verminderung der Ang-2-Expression bewirken Ang-1, „transforming growth factor- $\beta$ “ (TGF- $\beta$ ) und Ang-2 selbst. Die Expression des Tie-2-Rezeptors wird durch Ischämie und TNF- $\alpha$  erhöht (Lin et al., 2000).

### 1.5.5 Ang-2 und Tumorangiogenese

Angiopoietine spielen neben ihrer physiologischen Funktion auch eine wichtige Rolle bei diversen Erkrankungen, die mit fehlerhafter Blutgefäßentwicklung einhergehen. Insbesondere wird die Gefäßentwicklung im Tumorgewebe von Angiopoietinen entscheidend mitreguliert. Vor allem Ang-2 hat als Hypoxie-induzierbarer Wachstumsfaktor das Potential, den „angiogenetic switch“, sprich den Übergang eines Tumors von der avaskulären Form in die vaskuläre Form zu beeinflussen. (Holash et al., 1999). Der therapeutische Einsatz von Ang/Tie-2-Blockern verhindert bei einigen Tumorarten das Fortschreiten der Erkrankung (Lin et al., 1998).

### 1.6 Überblick über weitere untersuchte Angiogenese-relevante Gene

Die folgende Tabelle beinhaltet weitere Angiogenese-relevante Gene, die in der vorliegenden Arbeit in EPCs untersucht wurden. Anhand eines Genexpressionsprofils wurde erforscht, inwiefern rhAPC wichtige Mediatoren der Angiogenese auf Genebene beeinflussen kann. An dieser Stelle soll nur ein kurzer funktionaler Überblick gegeben werden. Genauere Informationen über Funktionsweise und Bedeutung im Angiogenese- und Entzündungsgeschehen werden bei der Besprechung der einzelnen Gene in der Diskussion geboten (siehe 4.6).

**Tabelle 1-1: Überblick über weitere untersuchte Angiogenese-relevante Gene**

Abkürzung	Name	Funktion
ANGPTL4	Angiopoietin-like 4	inhibiert Chemotaxis, Proliferation und Röhrenbildung von ECs
CXCL1	Chemokin (C-X-C) Ligand 1	wirkt chemotaktisch auf Neutrophile; mitogene Effekte
CXCL3	Chemokin (C-X-C) Ligand 3	wirkt chemotaktisch auf Neutrophile; mitogene Effekte
CXCL5	Chemokin (C-X-C) Ligand 5	wirkt chemotaktisch auf Neutrophile; mitogene Effekte
CXCL9	Chemokin (C-X-C) Ligand 9	wirkt chemotaktisch auf aktivierte T-Zellen; hemmt EC-Wachstum
CXCL10	Chemokin (C-X-C) Ligand 10	wirkt chemotaktisch auf aktivierte T-Zellen; hemmt EC-Wachstum
EDG1 (S1P1)	endothelial differentiation, Sphingolipid G-Protein-gekoppelter Rezeptor 1 (Sphingosin-1-Phosphat-1-Rezeptor)	steuert EC-Differenzierung, EC-Proliferation und -Apoptose
EFNA1	Ephrin-A1	vermittelt Zell-Zell-Kontakte, Gefäßreifung (arteriell-venös)
EFNB2	Ephrin-B2	vermittelt Zell-Zell-Kontakte, Gefäßreifung (arteriell-venös)

Abkürzung	Name	Funktion
EGF	epidermal growth factor	Mitogen für Fibroblasten und Keratinozyten
EPHB4	Ephrin Rezeptor 4	vermittelt Zell-Zell-Kontakte, Gefäßreifung (arteriell-venös)
EREG	Epiregulin	Mitogen für Fibroblasten und Keratinozyten
FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3	beteiligt an Mitogenese, Angiogenese und Wundheilung
IFNG	Interferon gamma	proinflammatorisches Zytokin; hemmt EC-Proliferation
LEP	Leptin (obesity homolog, Maus)	reguliert den Fettstoffwechsel, stark angiogene Wirkung
PDGF-A	platelet-derived growth factor alpha Polypeptid	Mitogen für periendotheliale Zellen, fördert Zellmigration
PF4	platelet factor 4 (Chemokin (C-X-C) Ligand 4)	wirkt chemotaktisch auf aktivierte T-Zellen; hemmt EC-Wachstum
THBS2	Thrombospondin-2	hemmt Wachstum und Proliferation von ECs
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor (TNF-Familie, Mitglied 2)	proinflammatorisches Zytokin, indirekt Angiogenese-fördernd
VEGF-A	vascular endothelial growth factor A	wirkt proliferativ und chemotaktisch auf ECs, direkt angiogen

## 1.7 Endotheliale Progenitorzellen (EPCs)

### 1.7.1 Definition und Abstammung der EPCs

Lange Zeit bestand die Annahme, dass die Gefäßbildung im adulten Organismus ausschließlich über den Prozess der Angiogenese, d.h. über die Proliferation, Migration und Remodellierung bereits bestehender Gefäße erfolgt (Folkman und Shing, 1992; Risau, 1997). Die Vaskulogenese, die Bildung von neuen Blutgefäßen aus EPCs bzw. Angioblasten, wurde als ein auf die Embryogenese beschränkter Vorgang erachtet (Flamme und Risau, 1992). Mit der Entdeckung von EPCs im peripheren Blut erwachsener Individuen wurde jedoch bewiesen, dass Vaskulogenese auch postembryonal stattfinden kann (Asahara et al., 1997 und 1999a). Den EPCs werden seither zahlreiche therapeutische Einsatzmöglichkeiten in der Reperfusion ischämischer Gebiete zugesprochen.

EPCs repräsentieren eine noch nicht vollständig ausgereifte Endothelzell-Vorstufe. Sie können durch bestimmte endogene und exogene Faktoren aus Gewebs- und Knochenmarksstammzellen an Orte der Gefäßbildung rekrutiert werden. Die endothelialen Vorläufer sind daher nicht nur im Knochenmark, sondern auch in der Blutzirkulation und in diversen Geweben (z.B. Gehirn, Leber und reproduktive Organe) nachweisbar (Shi et al., 1998; Asahara et al., 1999a; Asahara und Kawamoto, 2004). Durch Formierung zu kapillären Strukturen und anschließende Ausreifung in mature, funktionsfähige ECs vermitteln EPCs

die *de novo*-Bildung von Gefäßen in Sinne der Vaskulogenese (Lin et al., 2000; Urbich und Dimmeler, 2004). Im adulten Organismus erfolgt diese Form der Gefäßbildung während der physiologischen Geweberegeneration; sie kann jedoch auch durch pathologische Prozesse, z.B. bei Endothelschädigungen, Gewebehypoxie oder im Rahmen der Tumorangiogenese hervorgerufen werden.

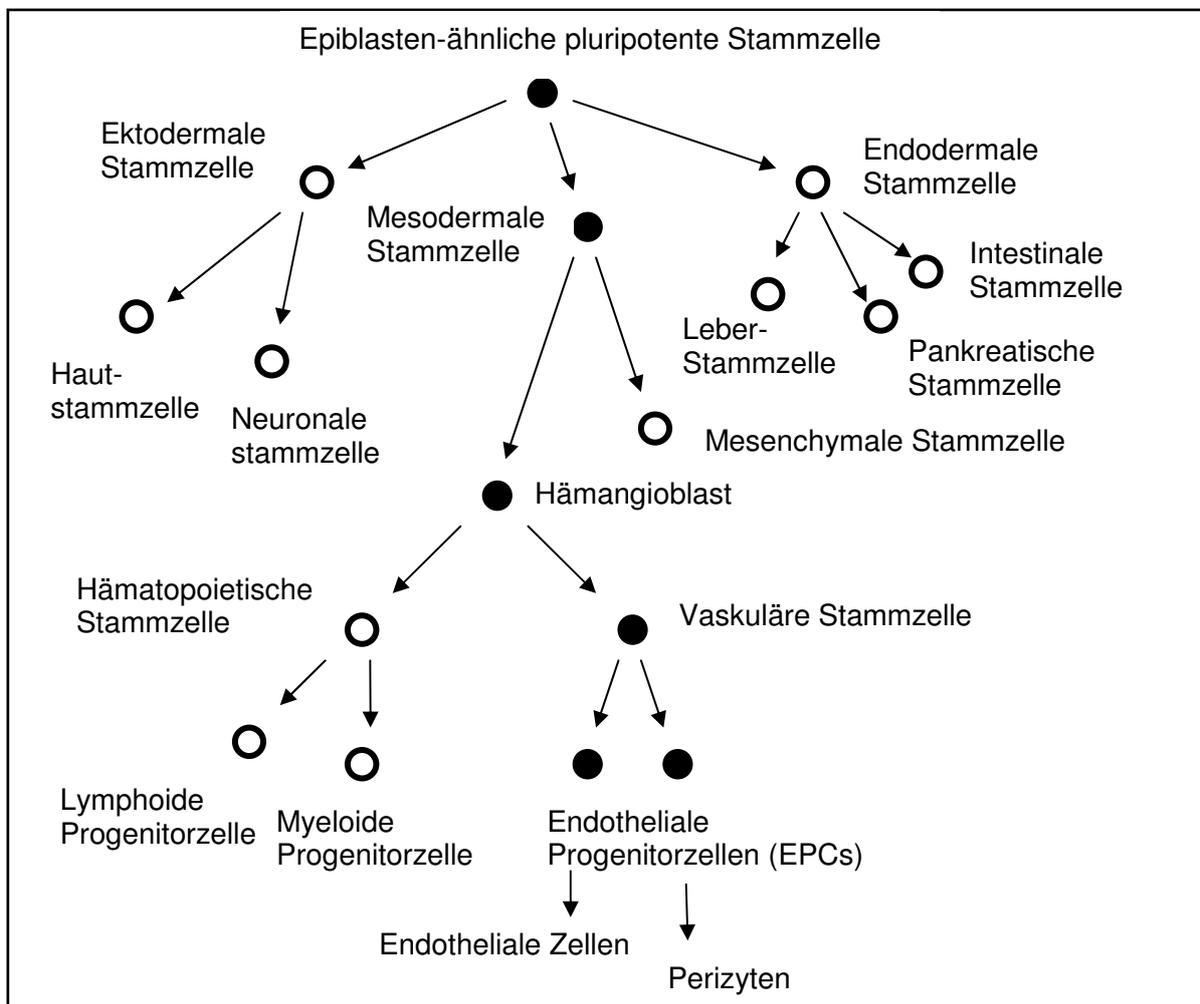
Die EPC leitet sich über den Hämangioblast von einer mesodermalen, pluripotenten Stammzelle ab (siehe Abb. 1.4). Der Hämangioblast wird als gemeinsamer Vorläufer für endotheliale Zellen und die Zellen des Blutes angesehen (Zon, 1995; Eichmann et al., 2002). Aus ihm differenzieren hämatopoietische und vaskuläre Stammzellen, wobei aus letzteren die EPCs hervorgehen. Die räumliche Nähe von endothelialen Vorläufern und hämatopoietischen Zellen während der embryonalen Vaskulogenese (Choi et al., 1998; Choi, 2002) sowie ihr weitgehend überschneidendes Genexpressionsprofil (Yano et al., 1997) identifizieren den Hämangioblast als gemeinsamen Vorgänger (siehe 1.3). Zudem können Hämangioblasten *in vitro* in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen sowohl in ECs als auch in hämatopoietische Zellen differenzieren (Pelosi et al 2002).

EPCs besitzen noch die stammzelltypische Fähigkeit zur Selbstreplikation (Asahara und Kawamoto, 2004; Urbich und Dimmeler, 2004), verfügen aber über ein geringeres Differenzierungspotential als Stammzellen. Progenitorzellen sind hinsichtlich ihrer späteren Entwicklungsrichtung determiniert; das heißt, ihr Aufgabenbereich ist bereits weitgehend festgelegt (Blau et al., 2001). Stammzellen sind dagegen in ihrer Funktion noch variabel; sie zeichnen sich durch eine zelllinienübergreifende Differenzierungsfähigkeit aus (Till und McCulloch, 1961). Je nach Differenzierungspotential können Stammzellen in totipotente, pluripotente und multipotente Zellen eingeteilt werden. Eine totipotente Stammzelle steht in der Entwicklungshierarchie an oberster Stelle, da aus ihr ein eigenständiges Individuum entstehen kann. Eine Stammzelle mit pluripotenter Differenzierungskapazität kann zwar in alle Zelltypen der drei Keimblätter differenzieren, ist jedoch nicht mehr in der Lage, einen autonomen Organismus hervorzubringen. Multipotenten Stammzellen ist in der Regel eine zellliniengerichtete Entwicklung mit spezifischer Funktion vorgegeben (Weissmann, 2000; Wobus, 2001). Die Präsenz der Stammzellen minimiert sich mit fortschreitender Embryonalentwicklung, jedoch bleiben auch beim Erwachsenen vereinzelt adulte Stammzellen erhalten, z.B. mit pluripotenter Kapazität (Young et al., 2004) oder in Form der Hämangioblasten mit multipotenter Kapazität (Gehling et al., 2000; Pelosi et al., 2002; Schattemann und Awad, 2004).

Die Einteilung der adulten Stammzellen erfolgt je nach Zelllinien in hämatopoietische und mesenchymale Stammzellen; zudem existieren „side-population“-Zellen, die zu EPCs und Zellen des Myokards differenzieren können (Jackson et al., 2001; Grove et al., 2004). Adulte hämatopoietische und mesenchymale Stammzellen sind in einer Vielzahl von Geweben, in

denen sie lebenslang residieren, identifiziert worden (v.a. Knochenmark und Blut) (Pittenger et al., 1999; Tuan et al., 2003). Ihre Funktion besteht in der physiologischen und pathophysiologischen Geweberegeneration durch Bildung von Progenitorzellen, aus denen organ-spezifische Ersatzzellen differenzieren (Bishop et al., 2002; Asahara und Kawamoto, 2004).

Im Jahr 2003 wurde nachgewiesen, dass mesenchymale und hämatopoietische Stammzellen die Fähigkeit der Transdifferenzierung besitzen; das heißt, sie können sich auch in gewebefremde Zellen entwickeln (Badorff et al., 2003). Zudem wurde die Möglichkeit der Dedifferenzierung entdeckt, wobei die Zellen eine Rückentwicklung auf ein primitiveres Stadium durchlaufen, um im Anschluss in verschiedene Gewebearten zu differenzieren (Blau et al., 2001). Die genaue Einteilung und Abstammung von Stamm- und Progenitorzellen wird dadurch zunehmend erschwert.



**Abbildung 1-4: Abstammung der EPCs**

EPCs differenzieren aus dem von einer mesodermalen Stammzelle abstammenden multipotenten Hämangioblasten, der als gemeinsamer Vorläufer von endothelialen und hämatopoietischen Zellen angesehen wird (modifiziert nach: Asahara und Kawamoto, 2004).

### 1.7.2 Isolierung von EPCs

EPCs lassen sich aus dem Knochenmark (Quirici et al., 2001), aus Nabelschnurblut (Nieda et al., 1997; Murohara et al., 2000; Smadja et al., 2006a) und peripherem Blut isolieren (Asahara et al., 1997). Auch die fetale Leber und Fett wurden als Ausgangsmaterial verwendet, wenn auch weitaus seltener (Planat-Benard et al., 2004). Da sich die Isolierung aus peripherem Blut am leichtesten realisieren lässt, wird diese Ressource sehr häufig genutzt. Der Anteil endothelialer Progenitorzellen an der Gesamtzahl mononukleärer Zellen („mononuclear cells“, MNCs) ist allerdings sehr gering und beträgt weniger als 0,01 % (Khan et al., 2005). Es empfiehlt sich daher die Isolation aus „buffy coats“, um ausreichende Zellzahlen zu erhalten. Über Stimulation des Spenders mit dem Zytokin „granulocyte-monocyte-colony stimulating factor“ (GM-CSF) (Takahashi et al., 1999) oder „granulocyte-colony stimulating factor“ (G-CSF) (Gehling et al., 2000) lässt sich die Zellausbeute steigern, weil dadurch der Übertritt von EPCs aus dem Knochenmark in peripheres Blut angeregt wird (siehe 1.7.4).

Da bislang noch keine einheitliche Methode zur Isolierung der EPCs etabliert wurde, variieren die Techniken innerhalb der verschiedenen Forschergruppen zum Teil beträchtlich (Smadja et al., 2007). Die Grundlage jeder Methode bildet jedoch die primäre Isolierung von MNCs mittels Ficoll-Dichtegradient-Zentrifugation (siehe 2.1.2.1). Viele Gruppen verwenden im weiteren Verlauf Magnet-gekoppelte spezifische Marker („microbeads“), mit deren Hilfe eine Anreicherung der EPCs und gleichzeitige Aussortierung fremder Zellen erreicht werden kann. So soll die Aussaat einer möglichst einheitlichen Zellpopulation gewährleistet werden. Beispielsweise werden häufig nach der Dichtegradient-Zentrifugation „CD34-microbeads“ eingesetzt (CD = „cluster of differentiation“), wobei je nach Forschergruppe unterschiedliche Ausgangsmaterialien verwendet wurden, z.B. peripheres Blut (Asahara et al., 1997), Knochenmark (Bageley et al., 2003) oder Nabelschnurblut (Bompais et al., 2004; Smadja et al., 2006a). Eine weitere Möglichkeit stellt die Voranreicherung der EPCs mittels „CD133-microbeads“ dar (Gehling et al., 2000). Andere Gruppen verzichten auf den Einsatz von Magnet-gekoppelten Markern und klassifizieren die nach Aussaat im spezifischen Endothelzellmedium adhärent gewachsenen Zellen als EPCs (Badorff et al., 2003).

Die Aussaat der Zellen erfolgt bevorzugt auf Fibronectin-beschichteten Kulturgefäßen. Man verspricht sich dadurch eine homogenere Zellpopulation, da CD34-positive MNCs auf Fibronectin besonders gut in EPCs ausdifferenzieren sollen (Asahara et al., 1997). Die Kultivierung der Zellen erfolgt in einem Spezialmedium, das den Bedürfnissen der EPCs angepasst ist und eher hemmend auf unerwünschte Zellfraktionen wirkt.

In den MNCs des peripheren Blutes befinden sich neben den EPCs noch andere Zellen mit dem Potential, in ECs auszudifferenzieren. Myeloide Zellen können beispielsweise unter

bestimmten Kulturbedingungen in ECs differenzieren. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass andere zirkulierende Progenitorzellen, wie die „side-population cells“, in ECs ausreifen (Jackson et al., 2001). Weiterhin können sich auch mature, von Gefäßen losgelöste ECs in der Zirkulation befinden und bei der Isolierung auswachsen (Urbich und Dimmeler, 2004). Aus diesen Gründen ist eine genaue Charakterisierung der isolierten Zellen essentiell, da nur so festgestellt werden kann, ob wirklich die gewünschte EPC-Population isoliert wurde.

### 1.7.3 Charakterisierung von EPCs

Zur Charakterisierung von EPCs wird die Ausprägung antigener Epitope auf ihrer Zelloberfläche genutzt. Spezifische Oberflächenproteine aus dem CD-System werden anhand der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (FACS) identifiziert (Bender et al., 1991; Khan et al., 2005). Die CD-Moleküle sind größtenteils membrangebundene Glykoproteine, deren individuelle biochemische und funktionelle Eigenschaften eine Abgrenzung verschiedener Zellen ermöglichen (Erber, 1990). Bisher besteht zwischen den Forschergruppen jedoch noch kein Konsens, durch welche Oberflächenantigene EPCs eindeutig zu identifizieren sind. So wird häufig eine relativ variable Zellpopulation unter dem Oberbegriff der EPCs eingeordnet, was die Vergleichbarkeit einzelner Ergebnisse erschwert.

Als allgemein anerkannte Antigene hämatopoietischer Stammzellen und endothelialer Progenitorzellen gelten **CD34** und der **VEGFR-2** (flk-1/KDR) (Asahara et al., 1997 und 1999a). CD34 ist ein Sialomuzin-ähnliches Glykophosphoprotein mit der Funktion eines Adhäsionsmoleküls (Sutherland et al., 1988; Krause et al., 1996). Etwa 4 % der Knochenmarkszellen sind positiv für CD34; im peripheren Blut befinden sich nur 0,2 % CD34-positive Zellen (Bender, 1991). CD34/VEGFR-2 doppelt-positive MNCs differenzieren *in vitro* bekanntermaßen in ECs (Asahara et al., 1997 und 1999a). Allerdings werden CD34 und VEGFR-2 nicht ausschließlich von hämatogenen Stammzellen und EPCs exprimiert; auch reife humane ECs besitzen diese Oberflächenantigene (Fina et al., 1990; Ziegler et al., 1999; Rafii, 2000).

Eine eindeutige Abgrenzung zwischen EPCs/hämatogenen Stammzellen und reifen ECs ermöglichte erst die Detektion des Markers **CD133** (Prominin, AC133). Hierbei handelt es sich um ein 120 kD großes, glykosyliertes Transmembranprotein mit noch unbekannter Funktion (Miraglia et al., 1997; Yin et al., 1997). CD133 ist ein früher hämatopoietischer Stammzellmarker, der von EPCs, jedoch nicht mehr von reifen ECs exprimiert wird (Yin et al., 1997; Peichev et al., 2000). Aus dem Knochenmark stammende EPCs sind eindeutig CD133-positiv. Die zirkulierenden EPCs im peripheren Blut exprimieren diesen Marker schwächer, da sie schon weiter in Richtung EC entwickelt sind (Hristov et al., 2003). Die Differenzierung von CD133-tragenden Zellen zu ECs wurde *in vitro* bewiesen, wodurch die

Zuordnung dieses Markers zum Oberflächenprofil der EPCs bestätigt wurde (Gehling et al., 2000).

Die Dreifachexpression von CD34, VEGFR-2 (KDR) und CD133 wird vielfach zur EPC-Charakterisierung eingesetzt (Gehling et al., 2000; Peichev et al., 2000; Quirici et al., 2001). In den meisten Untersuchungen bedient man sich jedoch einer Kombination aus nur zwei Markern, z.B. CD34/KDR (Asahara et al., 1997; Vasa et al., 2001; Strehlow et al., 2003) oder CD133/KDR (Gill et al., 2001). Eine eindeutige Unterscheidung zwischen EPCs und hämatopoietischen Stammzellen ist allerdings durch CD34, VEGFR-2 und CD133 nicht möglich, da beide Zellpopulationen die genannten Marker tragen. Zirkulierende EPCs beginnen jedoch mit zunehmender Reifung, spezifische Oberflächenantigene von ECs zu exprimieren. Deshalb ist es sinnvoll, zusätzlich zu den Stammzellmarkern endothelzell-spezifische Oberflächenantigene nachzuweisen (Iwami et al., 2004). Die einzelnen Forschergruppen verwenden hierzu unterschiedliche Marker in verschiedenen Kombinationen, wie z.B. PECAM-1 (**CD31**), Endoglin (**CD105**), „von Willebrand Faktor“ (**vWF**), **CD146**, die NO-Synthase, „vascular endothelial cadherin“ (VE-cadherin) oder, nach Stimulation, E-Selektin (Asahara et al., 1997; Kalka et al., 2000a; Dimmeler et al., 2001; Kaushal et al., 2001; Quirici et al., 2001; Hristov et al., 2003; Iwami et al., 2004).

Neben der FACS-Analyse lassen sich auch funktionale Eigenschaften von EPCs nachweisen, wie die Phagozytose von acetyliertem Low-Density-Lipoprotein (acLDL) und die Bindung des Lektins „*Ulex europaeus*-Agglutinin“ (Asahara et al., 1997; Dimmeler et al., 2001; Vasa et al., 2001) (siehe 2.2).

Des Weiteren erlauben auch morphologische Kriterien eine erste Zuordnung der isolierten Zellen (Asahara et al., 1997). *Ex vivo* vermehrte adulte EPC-Populationen zeichnen sich durch eine starke Heterogenität aus. Es lassen sich „frühe“ und „späte“ EPC-Subtypen unterscheiden (Hur et al., 2004), die beide die Fähigkeit zur Neoangiogenese besitzen und synergistisch zusammenwirken (Yoon et al., 2005). In Bezug auf das Tumorangiogenesegeschehen zeigen „frühe“ und „späte“ EPCs dasselbe vaskulogene Potential (Reyes et al., 2002). Die „frühen“ EPCs treten nach 4 bis 7-tägiger Kultivierung auf; sie besitzen spindelförmige Morphologie und tragen sowohl endotheliale als auch monozytäre Marker. Auffällig ist ihre starke Sekretion von Wachstumsfaktoren (Gulati et al., 2003; Hur et al., 2004). „Späte“ EPCs entwickeln sich erst nach 2 bis 3 Wochen; sie haben ein kopfsteinpflasterartiges Erscheinungsbild mit kleinen Kolonien. Charakteristisch für die „späten“ EPCs ist ein hohes Proliferationspotential. Sie exprimieren den Marker CD34, jedoch nicht mehr CD133 (Gulati et al., 2003; Hristov et al., 2003; Ingram et al., 2005).

### 1.7.4 Mobilisierung von EPCs

Die Zahl zirkulierender EPCs ist stark abhängig von bestimmten endogenen und exogenen Faktoren, die eine Progenitor-Freisetzung aus dem Knochenmark veranlassen können (Aicher et al., 2005). Als einer der stärksten Stimuli für diese Zell-Mobilisierung gilt die Gewebeischämie (Takahashi et al., 1999; Shintani et al., 2001; Park et al., 2004).

Die Ischämie-bedingte EPC-Freisetzung scheint über Zytokine, insbesondere über den Wachstumsfaktor VEGF, vermittelt zu werden. Bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt findet parallel zur EPC-Freisetzung ein starker Anstieg der VEGF-Plasmakonzentration statt (Shintani et al., 2001). Studien an Mäusen belegen die Mobilisierung endothelialer Progenitorzellen durch exogene Zufuhr von VEGF (Asahara et al., 1999b). Bei Patienten mit chronischer Myokardischämie erhöhte sich die Zahl der zirkulierenden EPCs nach VEGF-Genstransfer (Kalka et al., 2000b).

Weitere bekannte EPC-mobilisierende Faktoren sind:

- “granulocyte-monocyte-colony stimulating factor” (GM-CSF) (Takahashi et al., 1999)
- “granulocyte-colony stimulating factor” (G-CSF) (Huang et al., 2005; Powell et al., 2005)
- Angiopoietine (Hattori et al., 2001; Hildebrand et al., 2004)
- Erythropoietin (Heeschen et al., 2003; Bahlmann et al., 2004)
- HMG-CoA-Reduktasehemmer (Dimmeler et al., 2001; Llevadot et al., 2001)
- Östrogen (Iwakura et al., 2003; Strehlow et al., 2003)
- körperliches Training (Laufs et al., 2004)

### 1.7.5 Medizinische Bedeutung der EPCs

EPCs nehmen sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen an der Bildung von Gefäßen teil. Im Rahmen der Geweberegeneration können sie aus persistierenden Gewebs- und Knochenmarksstammzellen mobilisiert werden. Auch durch pathologische Prozesse, v.a. bei tumorösen Erkrankungen und Gewebeischämie (z.B. infolge von Entzündungen, Herzinfarkt, Traumata, Verbrennungen) kann eine Mobilisierung stattfinden (Gill et al., 2001; Shintani et al., 2001).

*Ex vivo* vermehrte EPCs können nach Transplantation zur Gefäßneubildung in ischämischen Geweben beitragen. Dieses regenerative Potential transplanteder EPCs wird auch als therapeutische Vaskulogenese bzw. therapeutische Angiogenese bezeichnet und wurde in diversen tierexperimentellen Ischämie-Modellen nachgewiesen.

In ersten Tierversuchen wurden Mäuse mit einseitiger Ischämie des Hinterlaufs eingesetzt. Nach intravenöser Transplantation von humanen EPCs konnte bei behandelten Tieren im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Kapillardichte mit deutlicher Durchblutungssteigerung in den Hinterläufen festgestellt werden. Zugleich verminderte sich die ischämiebedingte Nekroserate und Autoamputationen um 50 % im Vergleich zur Kontrolle (Kalka et al., 2000a). In einem ähnlichen Ischämie-Modell mit Ratten wurde ebenfalls eine gesteigerte Gefäßdichte nach Transplantation von humanen EPCs verzeichnet (Murohara et al., 2000). In Versuchen mit Diabetes-betroffenen Mäusen konnte durch lokale Injektion von CD34-positiven MNCs die Durchblutung im ischämischen Hinterlauf wieder hergestellt werden (Schatteman et al., 2000).

Weitere Studien befassten sich mit den Auswirkungen transplanteder EPCs auf die Regeneration von Myokardischämien. Ratten mit operativ induziertem Herzinfarkt erhielten eine intravenöse Infusion mit humanen, fluoreszenzmarkierten EPCs. Nach 7 Tagen wurden die Ratten euthanasiert und sezziert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigte sich eine Anreicherung der infundierten EPCs in den ischämischen Myokardgebieten und deren Einbau in neu entstandene Blutgefäße. Zudem verbesserte sich die linksventrikuläre Herzfunktion bei verminderter Myokardfibrose im Infarktareal (Kawamoto et al., 2001). Diese Ergebnisse bestätigten sich in einem vergleichbaren Ratten-Herzinfarktmodell einer weiteren Forschergruppe (Kocher et al., 2001).

Im Mausmodell konnte bewiesen werden, dass EPCs auch im Gehirn nach fokaler zerebraler Ischämie die Neubildung von Blutgefäßen übernehmen (Zhang et al., 2002). Die regenerativen Fähigkeiten der EPCs erstrecken sich weiterhin auf Reparaturvorgänge an geschädigtem Endothel. Durch Reendothelialisierung werden Lücken in der Endothelschicht geschlossen (Werner et al., 2002 und 2003). Auch im Hinblick auf eine Steigerung der Biokompatibilität von Gefäßprothesen können EPCs eingesetzt werden. Durch vorhergehende Aussaat von Knochenmarks-EPCs auf der Prothesenwand wird eine schnellere Endothelialisierung erreicht und die Gefahr einer postoperativen Thrombenbildung verringert (Bhattacharya et al., 2000; Kaushal et al., 2001).

Das therapeutische Potential der EPCs bei kardiovaskulären Erkrankungen des Menschen wurde erstmals an Patienten erforscht, die an schweren ischämischen Erkrankungen im Beinbereich litten. Durch Injektion von MNCs in die Wadenmuskulatur konnte bei diesen Patienten die Vaskularisation gesteigert werden, zudem waren verbesserte hämodynamische Parameter messbar. Es traten keine Gewebe-Ulzerationen auf (Tateishi-Yuyamo et al., 2002). Ähnliche Resultate erbrachten weitere Ischämie-Studien der Gruppe um Huang et al. aus den Jahren 2004 und 2005. In einer randomisierten Studie an Patienten mit schwerwiegender Gewebsischämie der unteren Extremitäten bestätigte sich das Vaskulogenesepotential der EPCs. Durch Injektion von G-CSF-mobilisierten MNCs aus

dem peripherem Blut konnte eine Durchblutungssteigerung im distalen Beinbereich erzielt werden, wodurch Amputationen verhindert wurden (Huang et al., 2004 und 2005).

Bei Menschen mit akutem Myokardinfarkt zeigte der Einsatz von EPCs ebenfalls positive Ergebnisse. Die intrakoronare Infusion von Progenitorzellen (aus Knochenmark und Blut) bewirkte eine deutliche Perfusionssteigerung im Infarktgebiet. Im Zuge der Behandlung erhöhte sich auch das linksventrikuläre Auswurfvolumen, woraus ein signifikant erniedrigtes Residualvolumen im linken Ventrikel resultierte (Lee et al., 2000). Im Rahmen der anschließenden BOOST-Studie („bone marrow transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration“) wurde eine signifikant gesteigerte Funktion des linken Herzventrikels bei behandelten Patienten gegenüber einer unbehandelten Kontrollgruppe festgestellt (Wollert et al., 2004). Die derartig verbesserte Herzfunktion blieb über ein Jahr erhalten, wobei weder arrhythmische Komplikationen auftraten noch eine reaktive Hypertrophie des Herzmuskels erkennbar war (Schächinger et al., 2004). Allerdings verzeichnete die Forschergruppe um Meyer et al. im selben Versuchsaufbau nur eine mäßige Funktionssteigerung und das Fehlen von positiven Langzeiteffekten (Meyer et al., 2006). Weitere Gruppen konnten im gleichen Modell keine Steigerung der Herzfunktion erkennen, obwohl sich die Infarktgröße verkleinert hatte (Janssens et al., 2006; Lunde et al., 2006). Eine mögliche Ursache für diese abweichenden Ergebnisse mag in dem Einsatz variierender Populationen mononukleärer Zellen liegen.

Neben der Beteiligung an der physiologischen Gefäßneubildung wird den EPCs auch ein Einfluss auf die Vaskularisierung von Tumoren zugeschrieben. So steht bei Krebserkrankungen die Zahl im Blut zirkulierender EPCs in direkter Proportionalität zu dem Grad der Tumorangiogenese (Shaked et al., 2005). Über die Freisetzung angiogener Faktoren bewirken Tumorzellen die Mobilisierung von EPCs und ihre anschließende Migration ins Tumorgefäßsystem (Rafii et al., 2002). Die Induktion von malignen Tumoren stellt eine potentielle Gefährdung bei der Transplantation von EPCs dar. Beispielsweise kann eine Transplantation von Wildmaustyp-EPCs bei murinen tumorresistenten Mutanten die Tumorangiogenese wieder herstellen (Leyden et al., 2001). Zugleich offenbaren sich aber auch mögliche Strategien in der Krebsbekämpfung, z.B. in Form von gentechnisch veränderten EPCs, die das Tumorwachstum eindämmen könnten. Über eine mögliche Bedeutung der EPCs als Tumormarker während der Krebstherapie wird diskutiert (Shaked et al., 2005).

## 1.8 Fragestellung und Ziel

Die antikoagulativen, antiinflammatorischen und zytoprotektiven Effekte von APC bzw. rhAPC wurden bereits vielfach in Endothelzellkulturen untersucht und auf molekularer Ebene beschrieben. In tierexperimentellen Versuchen wurde eine Beteiligung von rhAPC an der Reperfusion ischämischer Gewebe festgestellt. Einerseits wurde unter APC-Therapie eine Durchblutungssteigerung im Ischämiegebiet beobachtet (Fernandez et al., 2003; Schoots et al., 2004; Isobe et al., 2005), andererseits scheint rhAPC auch einen Einfluss auf die Entstehung neuer Blutgefäße zu haben. So förderte es z.B. die Vaskularisierung in kutanen Wunden bei Ratten (Jackson et al., 2005) und induzierte, nach Applikation in die Mäusekornea, die Bildung von Blutgefäßen (Uchiba et al., 2004). Im Hamster-Tiermodell steigerte rhAPC die mikrovaskuläre Kapillardichte (Hoffmann et al., 2004). Dieses angiogene Potential wurde *in vivo* beobachtet, die molekularen Mechanismen, über die rhAPC gefäßbildend wirkt, sind jedoch weitgehend unbekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, die gefäßbildenden Effekte des APC *in vitro* näher zu untersuchen und ihre molekularen Grundlagen zu erforschen. Um einen umfassenderen Einblick in die biologischen Wirkungen von rhAPC zu erhalten wurden neben den HUVEC-Kulturen als weitere Zellpopulation EPCs verwendet.

Da der Einsatz der EPCs nach wie vor keiner eindeutig etablierten Methode unterliegt, sollte besonderes Augenmerk auf die Isolierung und Charakterisierung dieser Zellpopulation gelegt werden. Über den Nachweis APC-relevanter Rezeptoren auf der EPC-Oberfläche sollte ermittelt werden, ob EPCs Zielzellen für APC sind. Des Weiteren wurde geprüft, ob rhAPC die Genexpression seiner essentiellen Rezeptoren in EPCs induziert.

Um das angiogene Potential von rhAPC zu ermitteln, sollte untersucht werden, ob rhAPC die Genexpression bzw. die Freisetzung proangiogener Mediatoren in HUVECs und EPCs beeinflussen kann. Zudem sollte erforscht werden, ob rhAPC über eine Proliferationssteigerung von EPCs die Bildung kapillärer Strukturen im Sinne der Vaskulogenese bewirken kann.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 “Human umbilical vein endothelial cells” (HUVECs)

##### 2.1.1.1 Zellisolierung und Anlegen einer HUVEC-Primärkultur

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung humaner Nabelvenen-Endothelzellen (HUVECs) dienten Nabelschnüre, die von der Sankt Hedwigs Klinik in Mannheim bereitgestellt wurden. Die Präparation fand unter einer Sterilbank (HERAsafe, Kendro Laboratory Products, Hanau, Dtl.) statt und wurde in Anlehnung an das Isolationsprotokoll von Jaffe et al. durchgeführt (Jaffe et al., 1973).

Zunächst erfolgte die äußerliche Reinigung der maximal einen Tag alten, ungekühlten Nabelschnüre. Hierzu wurden sterile Kompressen und 70 %-ige Ethanollösung verwendet. Während der Reinigung wurden die Nabelschnüre auf Perforationen und Quetschungen überprüft. Mit einem sterilen Einwegskalpell wurden dann die Nabelschnurenden gekürzt, um glatte Schnittflächen zu erhalten. An beiden Enden der Nabelschnur wurde nun die Öffnung der Nabelvene (*Vena umbilicalis*) aufgesucht und jeweils ein Dreiwegehahn eingeführt. Mit Hilfe von Kabelbindern wurden die Dreiwegehähne an der Nabelschnur fixiert.

Zur Entfernung des in der Vene befindlichen Blutes erfolgte eine mehrmalige Spülung mit steriler, calcium- und magnesiumfreier, phosphatgepufferter Salzlösung („phosphate buffered saline“, PBS). PBS wurde mittels einer Perfusorspritze über den Dreiwegehahn in die Nabelvene eingebracht und im Anschluss mit einer luftgefüllten Perfusorspritze wieder ausgespült. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis die Spüllösung nahezu klar war. Nun wurde die Nabelvene prall mit 37°C warmer Dispase-2-Enzymlösung gefüllt und 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Die enzymatische Aktivität der Dispase bewirkte die Ablösung der HUVECs von der Gefäßwand. Nach der Inkubation wurde die Nabelschnur vorsichtig geknetet, um eine stärkere Zellablösung zu erzielen. Im Anschluss wurde die Dispase-Zell-Suspension mit einer luftgefüllten Perfusorspritze aus der Vene gespült und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Die Nabelvene wurde dann mit Endothelzell-Medium (siehe 2.1.1.2) befüllt und noch einmal nachgespült, um eventuell verbliebene Zellen mit zu erfassen. Danach wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (5 min, 1500 U/min, 20°C), wobei ein Pellet aus ECs und wenigen Erythrozyten sedimentierte.

Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 15 ml erwärmtem Endothelzell-Medium (37°C) resuspendiert und in eine 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche (mit 2 %-iger Gelatine beschichtet) ausgesät.

### 2.1.1.2 Kultivieren und Passagieren von HUVECs

Die Kultivierung der HUVECs erfolgte im Inkubator (HERAcell, Kendro Laboratory Products, Hanau, Dtl.) bei einer Temperatur von 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und einer atmosphärischen CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5 %. Als Nährmedium diente supplementiertes Endothelzell-Medium (PromoCell, Heidelberg, Dtl.). Der separat gelieferte Supplementepack (PromoCell, Heidelberg, Dtl.) beinhaltete folgende Komponenten, die nach Angaben des Herstellers angemischt wurden (Tabelle 2-1):

**Tabelle 2-1: Supplemente des HUVEC-Mediums**

Supplemente	Endkonzentration bzw. Vol.-%
Fetales Kälberserum (FCS)	2 %
“human endothelial growth factor” (hEGF)	0,1 ng/ml
“human basic fibroblast growth factor” (hbFGF)	1 ng/ml
“endothelial cell growth supplement” (ECGS)	0,4 %
Hydrocortison	1 µg/ml
Amphotericin B	5 ng/ml
Gentamicin	50 µg/ml

24 Stunden nach der Isolierung wurde bei den bereits adhärennten HUVECs ein erster Mediumwechsel vorgenommen. Die nichtadhärennten Erythrozyten konnten auf diese Weise entfernt werden. Das Kulturmedium wurde jeweils im Abstand von 2 bis 3 Tagen gewechselt. Anhand eines Farbindikators konnte optisch eingeschätzt werden, inwieweit das Medium verbraucht war (Farbumschlag von rosa nach gelb, induziert durch pH-Wert-Senkung).

Etwa 4 bis 5 Tage nach der Präparation zeigten die HUVECs in der 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche konfluentes Wachstum und konnten passagiert werden. Hierbei wurden die Zellen vom beschichteten Untergrund enzymatisch abgelöst und auf weitere Kulturgefäße verteilt, in denen sie wieder bis zur Konfluenz wachsen konnten. Durch das Passagieren erhält man die HUVECs länger vital; zeitgleich lässt sich die Zellzahl um ein Vielfaches erhöhen.

Zunächst wurde das Kulturmedium abgesaugt und die HUVECs mit 10 ml warmer PBS-Lösung (37°C) gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 4 ml erwärmter Trypsin-EDTA-Lösung überschichtet und für ca. 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Trypsin bewirkt das Ablösen der Zellen vom beschichteten Kulturgefäß. Durch vorsichtiges seitliches Beklopfen der Kulturflasche ließ sich der Ablösungsprozess beschleunigen. Nach mikroskopischer Kontrolle wurde die enzymatische Reaktion des Trypsins durch Zugabe von 10 ml Medium gestoppt. Hierbei bewirkte das im Medium enthaltene FCS die Inaktivierung des Enzyms Trypsin.

Danach wurde die Endothelzell-Suspension in ein Falcon-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (5 Minuten, 1000 U/min, Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Nach Verdünnung auf das gewünschte Endvolumen wurde die Zellsuspension (je 5 ml) auf gelatinisierte Petrischalen (Ø 10 cm) verteilt. Abhängig vom jeweiligen Versuch wurde eine Verdünnung zwischen 1:4 und 1:8 vorgenommen.

### 2.1.1.3 Durchführung der HUVEC-Experimente

Alle Experimente wurden unter sterilen Bedingungen mit HUVECs in der zweiten Passage durchgeführt. Die Zellen wurden nach dem Passagieren in Petrischalen (Ø 10 cm, 5 ml Medium) kultiviert. 24 Stunden vor jedem Experiment wurde das Kulturmedium der konfluent wachsenden Zellen entfernt und zur Vermeidung von Cortison-induzierten Wechselwirkungen durch cortisonfreies Medium ersetzt. Dieses Medium enthielt mit Ausnahme von Hydrocortison alle in Tabelle 2-1 aufgeführten Supplemente. Eine Stunde vor der Stimulation wurde das cortisonfreie Medium durch ein Versuchsmedium ersetzt, das weder Cortison noch Wachstumsfaktoren und FCS enthielt. Die antibiotischen und antimykotischen Zusätze des Supplementepacks waren weiterhin im Versuchsmedium enthalten.

Die Stimulation erfolgte durch Zugabe von rhAPC (Stocklösung 1 µg/µl, gelöst in Aqua dest., Eli Lilly, Indianapolis, USA) ins Versuchsmedium über den Zellen. Hierzu wurde je nach benötigter Stimulationskonzentration eine vorher errechnete Menge rhAPC-Lösung direkt ins Medium über den Zellen pipettiert. Durch vorsichtiges Schwenken der Petrischalen wurde das rhAPC dann gleichmäßig im Medium verteilt. Als Kontrolle wurden bei jedem Experiment unstimulierte HUVECs eingesetzt, die jeweils unter denselben Kulturbedingungen (Temperatur, Luftfeuchtigkeit, CO<sub>2</sub>-Konzentration, Medium, Inkubationszeit) angezüchtet wurden, wie die stimulierten Versuchszellen.

**Tabelle 2-2: Stimulationsbedingungen der HUVEC-Versuche**

Experiment	Endkonzentration im Medium	Inkubation
VEGF-C-mRNA-Expression (RT-PCR)	rhAPC: 50 ng/ml, 1 µg/ml, 20 µg/ml	4, 8, 24 h
VEGF-C-Freisetzung: Dosisabhängigkeit (ELISA)	rhAPC: 50 ng/ml, 500 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml und 20 µg/ml	24 h
VEGF-C-Freisetzung: Zeitabhängigkeit (ELISA)	rhAPC: 5 µg/ml	2, 4, 8, 12 und 24 h
Zellcharakterisierung (FACS)	unstimuliert	7 – 10 d

## 2.1.2 EPCs

### 2.1.2.1 Isolierung von EPCs aus „buffy coats“

Die Isolierung der EPCs erfolgte in Anlehnung an die Methode der Frankfurter Gruppe Urbich/Dimmeler (Dimmeler et al., 2001, Urbich et al., 2005) unter Einbeziehung eines von dieser Gruppe persönlich übermittelten Isolationsprotokolls.

Da EPCs nur in sehr geringer Anzahl im peripheren Blut vorkommen (< 0,01 % der MNCs), ist die Isolierung aus Vollblut wegen der minimalen Zellausbeute eher ungeeignet (Khan et al., 2005). Durch eine Anreicherung weißer Blutzellen kann im „buffy coat“ ein Vollblutvolumen von 500 ml auf 60 - 80 ml reduziert werden. Deshalb wurden „buffy coats“ (bezogen vom Transfusionszentrum Mannheim) als Ausgangsmaterial für die EPC-Isolierung verwendet. Alle Arbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt.

Zunächst wurden die MNCs aus dem „buffy coat“ über eine Ficoll-Dichtegradient-Zentrifugation (Ficoll-Isolierung) isoliert. Ficoll ist ein polysaccharidähnliches Makromolekül, das aufgrund seiner Dichte (1,007 g/ml) zur Auftrennung zellulärer Blutbestandteile eingesetzt wird. Hierbei wird der „buffy coat“ (1:1 verdünnt mit PBS) in einem speziellen Röhrchen (Leukosep mit Filter, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Dtl.) über die Ficoll-Lösung geschichtet und abzentrifugiert. Aufgrund ihrer höheren Dichte wandern Erythrozyten und Granulozyten durch die Ficoll-Lösung in den Röhrchenkonus und bilden dort ein rötliches Zellpellet. Die MNCs (Monozyten/Lymphozyten) können wegen ihrer geringen Dichte die Ficoll-Lösung nicht durchdringen und ordnen sich deshalb oberhalb des Leukosep-Filters in einer ca. 4 - 5 mm breiten, gelblich-weißen Bande an.

Zu Beginn der Isolierung wurden die Leukosep-Röhrchen (pro „buffy coat“ 4 Röhrchen) mit jeweils 15 ml Ficoll („Bicoll Separating Solution“, Biochrom AG, Berlin, Dtl.) befüllt. Danach wurde eine kurze Zentrifugation (1 min; 1000 U/min, Raumtemperatur) durchgeführt, wodurch die Ficoll-Lösung durch den Leukosep-Filter in den Röhrchenkonus gepresst wurde. Der „buffy coat“ wurde im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt und vorsichtig in die Röhrchen (je 30 ml pro Röhrchen) auf den Leukosep-Filter geschichtet. Dann erfolgte die Auftrennung der Zellfraktionen in einem 40-minütigen Zentrifugationsschritt (1600 U/min, 15°C). Die Zentrifugation fand bei ausgeschalteter Bremsfunktion statt, da abruptes Abbremsen die Monozyten-Bande aufwirbeln würde. Mit einer Pipette (5 ml) wurden die aus MNCs bestehenden Banden aus den Leukosep-Röhrchen abgesaugt und jeweils in ein mit 10 ml PBS befülltes Falcon-Röhrchen (50 ml) überführt. Durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren wurden die MNCs im PBS möglichst rasch suspensiert, um Verklumpungen zu vermeiden. Dann wurde das Falcon-Röhrchen bis zur 50 ml-Marke mit PBS aufgefüllt und bei eingeschalteter Bremse zentrifugiert (10 min, 1400 U/min, 15°C). Der Zellüberstand mit dem ausgewaschenen Ficoll wurde danach verworfen und das Zellpellet erneut in 10 ml PBS (37°C) resuspensiert. Um

die Ficoll-Lösung vollständig zu entfernen, wurden diese Waschschrirte bis zum Erreichen eines klaren Überstandes wiederholt. Vor der letzten Zentrifugation wurde die absolute Zahl der isolierten Zellen ermittelt. Hierzu wurde ein Aliquot aus dem in PBS resuspendierten Zellgemisch entnommen und im Verhältnis 1:10 mit „TÜRK'S Solution“ verdünnt. „TÜRK'S Solution“ färbt MNCs leicht rosa, wodurch das anschließende mikroskopische Auszählen in der Neubauer-Zählkammer erleichtert wird.

Eine optimale Zelldichte ist für die Kultivierung der EPCs von entscheidender Bedeutung. Eine zu hohe Zellzahl kann die Teilung der EPCs verhindern, während eine zu niedrige Zahl das Überleben der Zellen negativ beeinflusst. Deshalb wurden bezüglich der Zellzahlen die persönlich gegebenen Empfehlungen der Arbeitsgruppe Urbich/Dimmeler eingehalten.

Die KulturgefäÙe wurden vor der Aussaat mit humanem Fibronectin beschichtet (10 µg/ml, gelöst in PBS). Pro 12er-Well-Platte („well“ (engl.) = Vertiefung, Loch) wurden  $8 \times 10^6$  Zellen in 1 ml EBM-Medium (Cell Systems, St. Katharinen, Dtl.) ausgesät und in der 6er-Well-Platte  $20 \times 10^6$  Zellen in 2,5 ml Medium/Well. In Abhängigkeit von den Kulturbedingungen (siehe 2.1.2.3) erfolgte die Adhärenz und Ausdifferenzierung von EPCs.

### **2.1.2.2 EPC-Isolierung mit Voranreicherung von CD34-positiven MNCs aus „buffy coats“**

Die EPC-Isolierung unter zu Hilfenahme von CD34-gekoppelten Magnetmarkern („microbeads“) führte zu einer Voranreicherung hämatopoietischer Progenitoren. Hierbei wurden CD34-exprimierende Zellen aus dem über Ficoll isoliertem MNC-Pool extrahiert und somit eine relativ homogene Zellpopulation ausgesät, die unter spezifischen Kulturbedingungen (siehe 2.1.2.3) in EPCs ausdifferenzieren sollte. Allerdings ist die erreichte Zellzahl bei dieser Isolationstechnik sehr gering, da nur 0,05 - 0,2 % der Zellen im peripheren Blut CD34 exprimieren (Bender, 1991) und nicht jede CD34-positive Zelle in eine EPC ausdifferenziert. Die für die Versuche erforderlichen Zellzahlen konnten auf diese Weise nicht erreicht werden. Die Anreicherung wurde jedoch eingesetzt, um zu ermitteln, ob bei der Ficoll-Dichtegradient-Zentrifugation und bei der CD34-Anreicherung vergleichbare EPC-Populationen ausdifferenzieren.

Die Voranreicherung wurde mit dem „Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit“ („magnetic cell sorting“, MACS-Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Dtl.) durchgeführt. Die CD34-exprimierende Zellfraktion von MNCs des peripheren Blutes wurde durch Inkubation mit „microbead“-gekoppelten CD34-Antikörpern magnetisch markiert (Antikörper und Beads im Kit enthalten). Die Separation dieser markierten Zellen erfolgte im Magnetsäulchen des Kits, das in einem speziellen Ständer (MACS-Separator des Kits) einem magnetischen Feld ausgesetzt wurde. Die Zellen wurden im durchgängigen Röhrchen

am Magnetfeld vorbeigeführt, wobei die markierten Zellen aufgrund der magnetischen Anziehungskraft an der Röhrchenwand hafteten, während die CD34-negative Zellfraktion mit dem MACS-Puffer des Kits ausgewaschen wurde. Nach Aufhebung des magnetischen Feldes wurden die CD34-positiven Zellen mit einem Reinheitsgrad bis zu 98 % eluiert.

Zunächst wurde die in 2.1.2.1 beschriebene Ficoll-Dichtegradient-Zentrifugation aus dem „buffy coat“ durchgeführt. Die Zellzahl wurde auch hier vor dem letzten Wasch-Zentrifugationsschritt in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Das Zellpellet wurde nach der Zentrifugation in MACS-Puffer (bestehend aus 0,5 % BSA und 2 mM EDTA-Lösung in PBS; 300  $\mu\text{l}/10^8$  Zellen; EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure) suspensiert. Die Pufferlösung wurde vorher im Ultraschallbad (15 min) entgast, um übermäßige Blasenentwicklung während der Zelltrennung zu vermeiden.

Dem Zellgemisch wurde dann die im Kit enthaltene FcR-Blocking-Lösung (Human IgG, 100 $\mu\text{l}/10^8$  Zellen) zugesetzt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Nach kurzer Einwirkzeit (10 min, Raumtemperatur) wurden die gekühlten „CD34-microbeads“ (100  $\mu\text{l}/10^8$  Zellen) unter mehrmaligem Auf- und Abpipettieren zugegeben. In einer 30-minütigen Inkubation (bei 6 bis 12°C) erfolgte dann die Bindung der Antikörper an die CD34-positiven Zellen. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 1400 U/min, Raumtemperatur) und die Blocking-Lösung und die „microbeads“ mit dem Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde anschließend in MACS-Puffer (0,5 ml Puffer/ $10^8$  Zellen) aufgenommen und resuspensiert. Um Verklumpungen zu vermeiden, wurde die Zellsuspension durch ein Zellsieb (70  $\mu\text{m}$  Porengröße; Firma BD, Heidelberg, Dtl.) filtriert.

Das Magnetsälchen des Kits wurde in den zugehörigen MACS-Separator-Ständer eingespannt und mit 500  $\mu\text{l}$  MACS-Puffer ausgespült, bevor 500  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension in die Säule überführt wurden. Die Säule wurde dann dreimal mit jeweils 500  $\mu\text{l}$  MACS-Puffer gespült, um die nicht gebundenen CD34-negativen Zellen auszuwaschen. Danach wurden weitere 500  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension ins Magnet Röhrchen überführt und der Waschvorgang wiederholt. Die Spülung erfolgte mit Hilfe eines im MACS-Kit enthaltenen Stempels, mit dem der Puffer durch das Röhrchen gedrückt wurde. Die CD34-positiven Zellen verblieben magnetisch fixiert im Röhrchen, während die restliche Zellfraktion ausgewaschen wurde.

Zum Eluieren der fixierten Zellen wurde das Magnetsälchen aus dem MACS-Separator entnommen und aus dem magnetischen Feld entfernt, wodurch sich die CD34-positiven Zellen von der Röhrchenwand ablösten. Nach Zupipettieren von 1 ml MACS-Puffer wurde die Zellsuspension mit Hilfe des Stempels aus der Magnetsäule in ein Falcon-Röhrchen gedrückt. Zur Erhöhung des Reinheitsgrades wurde das Zellgemisch in ein frisches Magnetsälchen überführt und die magnetische Zelltrennung ein weiteres Mal wiederholt. Nach Ermittlung der Gesamtzellzahl (Neubauer-Zählkammer) erfolgte die Charakterisierung der Zellpopulation mittels FACS-Analyse (siehe 2.3).

### 2.1.2.3 Kultivierung von EPCs

Die EPCs wurden im substituierten „endothelial basal medium“ (EBM-Medium des „EGM bullet kit“, CellSystems, St. Katharinen, Dtl.) im Inkubator kultiviert. Mit Ausnahme des FCS (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Dtl.) waren die Komponenten des Zusatzes im „EGM bullet kit“ enthalten. Die Anmischung der Supplemente erfolgte nach Vorgabe des Herstellers (Tabelle 2-3).

**Tabelle 2-3: Supplemente des EPC-Mediums**

Supplemente	Endkonzentration bzw. Vol.-%
FCS	20 %
„epidermal growth factor“ (EGF)	10 µg/ml
„bovine brain extract“	3 µg/ml
Hydrocortison	1 µg/ml
Gentamicin	50 µg/ml

Die Zellen wurden am 3. Tag nach der Isolierung viermal mit PBS gewaschen, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Danach erhielten die EPCs frisches Medium (1 ml/Well einer 12er-Multiwellplatte). Da die Versuche am folgenden Tag stattfanden, war kein weiterer Mediumwechsel erforderlich.

### 2.1.2.4 Durchführung der EPC-Experimente

Für die Fluoreszenzmikroskopie (2.2) und die Experimente zur Proliferation (2.7) wurden die EPCs in 12er-Wellplatten ausgesät und unmittelbar danach mit rhAPC bzw. VEGF (Stocklösung 1 µg/µl, gelöst in Aqua dest, Cell Concepts, Umkirch, Dtl.) stimuliert. Hierzu wurde zu den in supplementiertem EBM-Medium (Tabelle 2-3) befindlichen Zellen rhAPC-Lösung oder VEGF-Lösung (Stimulationsbedingungen: Tab. 2-4) zupipettiert und die Kulturgefäße danach vorsichtig geschwenkt. Bei der Stimulationskonzentration 50 ng/ml wurde eine Verdünnung der rhAPC- bzw. VEGF-Lösung in EBM-Medium angefertigt und dann mit dieser Verdünnung stimuliert. Als Kontrolle wurden unstimulierte EPCs eingesetzt, die unter denselben Bedingungen kultiviert wurden, wie die stimulierten Versuchszellen (37°C, Luftfeuchtigkeit 95 %, atmosphärische CO<sub>2</sub>-Konzentration 5 %, EBM-Medium, gleiche Inkubationszeit). An den folgenden zwei Tagen wurde die Stimulation im Abstand von 24 Stunden zweimal wiederholt (ohne Mediumwechsel, rhAPC bzw. VEGF verbleiben im Kulturmedium). Am dritten Tag nach der Isolation wurde das Medium abgesaugt und die EPCs viermal mit PBS (37°C) gewaschen. Danach erhielten die Zellen frisches supplementiertes EBM-Medium und wurden erneut für 24 h stimuliert. Am vierten Tag nach der Isolierung erfolgte die Zellzählung bzw. die Durchführung der LDL-Aufnahme und Lektin-Bindung mit folgender Fluoreszenzmikroskopie.

Für den Super Array (2.6) wurden die EPCs in Petrischalen (Ø 10 cm) in supplementiertem EBM-Medium (Tab. 2-3) ausgesät und durch direkte Zugabe von rhAPC (Endkonzentration: 5 µg/ml) unmittelbar nach der Kultivierung stimuliert. Unstimulierte EPCs wurden als Kontrollzellen verwendet. Am folgenden Tag wurde wieder mit rhAPC stimuliert und ein weiteres Mal 24 Stunden später. Am dritten Tag nach der Isolierung wurden die Zellen viermal mit warmen PBS gewaschen, erhielten frisches EBM-Medium und wurden zum vierten Mal für 24 h stimuliert. Am vierten Tag nach der Isolierung erfolgte die RNA-Extraktion.

Für die RT-PCR-Experimente (2.4) wurden die EPCs in Petrischalen (Ø 10 cm) ausgesät und am 4. Tag nach der Isolation einmalig mit rhAPC für 6 Stunden stimuliert. Einen Tag vor der Stimulation wurden die Zellen viermal mit erwärmtem PBS gewaschen und auf ein supplementiertes EBM-Medium umgestellt (Tabelle 2-3), das kein Hydrocortison enthielt. Eine Stunde vor der Stimulation wurden die Zellen einmal gewaschen und erhielten ein un-supplementiertes EBM-Versuchsmedium, das als einzigen Zusatz Gentamicin enthielt. RhAPC wurde in dieses Medium hinzu pipettiert und durch Schwenken des Kulturgefäßes gleichmäßig verteilt. Nach der Inkubationszeit wurde die RNA der Zellen extrahiert. Beim Rezeptoren-Nachweis blieben die EPCs unstimuliert.

Die FACS-Analysen (2.3) wurden an unstimulierten EPCs am 4. Tag nach der Isolation durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in 12er-Multiwells in supplementiertem EBM-Medium.

**Tabelle 2-4: Stimulationsbedingungen der EPC-Versuche**

Experiment	Endkonzentration im Medium	Inkubation
LDL-Aufnahme/Lektin-Bindung (Fluoreszenzmikroskopie)	rhAPC: 50 ng/ml, 5 µg/ml	4 Tage, 4x stimuliert im 24 h-Abstand
Experimente zur Zellproliferation (Zellzählung)	rhAPC: 50 ng/ml, 5 µg/ml VEGF: 50 ng/ml	4 Tage, 4x stimuliert im 24 h-Abstand
Genexpressionsprofil, Super Array (Real-Time RT-PCR)	rhAPC: 5 µg/ml	4 Tage, 4x stimuliert im 24 h-Abstand
Rezeptoren-Nachweis (RT-PCR)	unstimuliert	4, 6 und 8 Tage
Rezeptoren-Expression (RT-PCR)	rhAPC: 50 ng/ml und 5 µg/ml	6 h, am 4.Tag nach der Isolation
Ang-2-Expression (RT-PCR)	rhAPC: 50 ng/ml und 5 µg/ml	6 h, am 4.Tag nach der Isolation
Zellcharakterisierung (FACS)	unstimuliert	4 Tage

## 2.2 Untersuchung der EPCs im Fluoreszenz-Mikroskop

Die Charakterisierung der EPC-Kulturen beinhaltete den Nachweis spezifischer funktionaler Eigenschaften, wie die Phagozytose von „low density lipoprotein“ (LDL) und die Fähigkeit, das Lektin „*Ulex europaeus*-Agglutinin“ auf der Zelloberfläche zu binden (Dimmeler et al., 2001). Durch eine Kopplung von fluoreszierenden Farbstoffen an LDL und

Lektin, ließen sich diese beiden Substanzen im inversen Fluoreszenz-Mikroskop detektieren. So konnte überprüft werden, ob die isolierten Zellen die geforderten Eigenschaften besitzen. Zeitgleich sollten die fluoreszierenden Zellen ausgezählt werden, um zu untersuchen, ob eine Stimulation mit rhAPC die Zellproliferation beeinflusst.

Die über Ficoll-Dichtegradient-Zentrifugation isolierten EPCs wurden in supplementiertem EBM-Medium in 12er-Multiwell-Platten ausgesät. Die Stimulation mit rhAPC erfolgte direkt nach der Isolation und an den darauf folgenden 3 Tagen (rhAPC 50 ng/ml und 5 µg/ml, pro Bedingung 3 Ansätze). Als Kontrolle zur Ermittlung der Proliferationsrate wurden unstimulierte EPCs eingesetzt. (Stimulationsbedingungen siehe 2.1.2.4).

Am vierten Tag nach der Isolierung wurde das EBM-Medium abgesaugt und die Wells viermal mit PBS gewaschen, um nichtadhärente Zellen zu entfernen. Danach wurde in jedes Well 1 ml frisches EBM-Medium pipettiert und die EPCs eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden zu jedem Well 2,4 µg/ml Dil-Ac-LDL (1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine-labeled acetylated low-density lipoprotein, Firma CellSystems, St. Katharinen, Dtl.) zupipettiert und durch vorsichtiges Schwenken der Platte einheitlich verteilt. Die Phagozytose des Fluorochrom-gekoppelten Lipoproteins fand während einer einstündigen Einwirkzeit im Inkubator (37°C) statt. LDLs sind Lipoproteine mit niedriger Dichte (1,019 - 1,063 g/ml). Sie bestehen aus Lipiden und Apolipoproteinen und dienen dem Transport von Cholesterol in periphere Zellen. EPCs inkorporieren das Dil-Ac-LDL und werden anhand des gekoppelten Markers Tetramethylindocarbocyanin als rot aufleuchtende Zellen im Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar.

Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, um überschüssiges Dil-Ac-LDL zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit Formaldehyd (4 % gelöst in PBS, 1 ml/Well, 10 min, Raumtemperatur) fixiert. Zur Schonung des lichtempfindlichen Fluoreszenzmarkers erfolgte die Fixierung im Dunkeln. Anschließend wurde die Lektin-Bindung durchgeführt (Lektin von *Ulex europaeus*; Sigma, Taufkirchen, Dtl.). Das pflanzliche Agglutinin Lektin ist ein Glykoprotein, das an membranständige Kohlenhydratstrukturen auf verschiedenen Zellen binden kann, unter anderem bindet es auch auf der EPC-Oberfläche. In jedes Well wurden 10 µg/ml Lektin (gekoppelt mit Fluorescein-Isothiocyanat, FITC) pipettiert und unter Lichtabschluss inkubiert (1 Stunde, Raumtemperatur).

Im Fluoreszenz-Mikroskop werden die Fluorochrome mit bestimmten Wellenlängen (Dil-Ac: 600 - 620 nm; FITC: 450 - 490 nm) angeregt und emittieren daraufhin Licht, welches langwelliger ist, als das Licht des Anregungsbereichs. Dieses emittierte Licht ist als Fluoreszenz sichtbar. Da der FITC-Marker grüne Fluoreszenz zeigt, Dil-Ac jedoch rot leuchtet, kann differenziert werden, welche Zellen LDL aufnehmen bzw. Lektin binden; außerdem können doppelt fluoreszierende Zellen detektiert werden. In der Literatur werden

EPCs fluoreszenzmikroskopisch als diejenigen Zellen identifiziert, die sowohl LDL aufnehmen, als auch Lektin binden können (Dimmeler et al., 2001).

Zur Ermittlung der Proliferationsraten wurden unter dem Fluoreszenz-Mikroskop in jedem Well an drei definierten Stellen digitale Fotos im Hellfeld und unter Fluoreszenz erstellt. Aufnahmen von mehreren Well-Arealen waren notwendig, da die Zelldichte in den Wells zur Mitte hin höher ist als in den Randgebieten. Mit Hilfe einer angefertigten Schablone konnte gewährleistet werden, dass an übereinstimmenden Stellen fotografiert wurde. So sollte ein optischer Vergleich der Zellzahlen ermöglicht werden. Anschließend wurden die doppelt Fluoreszenz-positiven Zellen auf den Fotos ausgezählt. Die verwendete Kamera war eine Leica DC500 mit der Software Icon IM50 (Leica Microsysteme, Vertrieb Bensheim, Dtl.).

### **2.3 “Fluorescence-activated cell sorting” (FACS)-Analyse von HUVECs und EPCs**

FACS ist ein von der Firma Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA) entwickeltes Durchflusszytometrie-Verfahren. Es ermöglicht die Charakterisierung und das Zählen von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Im FACS-Gerät (FACS-Calibur, Firma BD, Vertrieb Heidelberg, Dtl.) werden in Lösung befindliche Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren einzeln einen gebündelten Laserstrahl. Jede Zelle emittiert dabei Streulicht, wodurch Rückschlüsse auf Zellgröße (Vorwärtsstreulicht; „forward scatter“) und Zellgranularität (Seitwärtsstreulicht; „side scatter“) gezogen werden können. Spezifische Eigenschaften der Zellen lassen sich durch ihre Markierung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern ermitteln. Die Elektronen des Fluoreszenz-Farbstoffes werden durch den Laser angeregt, d.h. auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach der Laserstrahlpassage wird die überschüssige Energie in Form von Photonen wieder abgegeben. Diese Emissionen werden im FACS-Gerät gemessen, wobei sich die emittierte Photonenkonzentration proportional zur Menge der gebundenen Antikörper verhält (Quelle: [www.facsclab.toxikologie.uni-mainz.de](http://www.facsclab.toxikologie.uni-mainz.de)).

Über den Nachweis spezifischer Oberflächenmoleküle des CD-Systems können Zellen in der FACS-Analyse detektiert werden. Hierzu werden bekannte Oberflächenstrukturen einer nachzuweisenden Zellart mit spezifischen Fluorochrom-markierten Antikörpern „gefärbt“. Nur wenn die untersuchte Zellart diese Strukturen auf ihrer Oberfläche exprimiert, kann eine AK-Bindung stattfinden, die im FACS-Gerät als positives Fluoreszenz-Signal registriert wird.

Da die Isolierung der EPCs über verschiedene Methoden und Ausgangsmaterialien erfolgen kann, sollte in der FACS-Analyse sichergestellt werden, dass die verwendeten Isolationstechniken (Ficoll-Dichtegradient-Zentrifugation (2.1.2.1) und CD34-Anreicherung (2.1.2.2)) in Verbindung mit der spezifischen Zellkultivierung (2.1.2.3) zur Ausdifferenzierung in EPCs geführt haben. Die EPC-Charakterisierung wurde in Anlehnung an Identifikations-

kriterien der Gruppe Urbich/Dimmeler durchgeführt (persönliche Mitteilung). Zur Abgrenzung zwischen EPCs und HUVECs wurde auch ein Oberflächenprofil von HUVECs erstellt.

In der FACS-Analyse wurden folgende mit Phycoerythrin (**PE**) bzw. Flourescein-Isothiocyanat (**FITC**) markierte Antikörper (AK) eingesetzt (Tabelle 2-5):

**Tabelle 2-5: Zur Identifizierung der EPC-Population eingesetzte Antikörper (FACS)**

Direkt markierte Antikörper				
PE-markiert:	IgG	CD31	CD34	CD105
FITC-markiert:	IgG	CD133	CD146	vWF

Antikörper mit markiertem Sekundär-Antikörper	
FITC-markiert:	primär: VEGFR-2; sekundär: Kaninchen anti-Maus-FITC

Weiterhin wurde überprüft, ob EPCs auf ihrer Oberfläche spezifische Rezeptoren (PAR-1, PAR-2, EPCR und S1P1) exprimieren, die die Wirkungen des APC vermitteln. Hierzu wurden folgende AK verwendet (Tabelle 2-6):

**Tabelle 2-6: Antikörper zum Nachweis APC-relevanter Rezeptoren auf EPCs (FACS)**

Direkt markierte Antikörper				
PE-markiert:	IgG	PAR-1	PAR-2	CD201 (EPCR)

Antikörper mit markiertem Sekundär-Antikörper	
FITC-markiert:	primär: EDG1 (S1P1); sekundär: Ziege anti-Maus-FITC

Die Antikörperfärbung für FACS wurde wie folgt durchgeführt: Unstimulierte EPCs bzw. HUVECs wurden zunächst mit PBS gewaschen, um nichtadhärente Zellen zu entfernen. Die adhären Zellen wurden dann mit 1 mM EDTA/PBS-Lösung überschichtet und in einer 20-minütigen Inkubation (37°C) von den Kulturgefäßen abgelöst. Die Zellen wurden danach in ein Falcon-Röhrchen überführt und ihre Gesamtzellzahl in der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Nach Zentrifugation (10 min, 1400 U/min, Raumtemperatur) wurde das Zellpellet in einer entsprechenden Menge BSA-Lösung (1 %, gelöst in PBS) aufgenommen, um je 100 µl Zellsuspension mit 0,5 - 1 x 10<sup>6</sup> Zellen pro FACS-Röhrchen verteilen zu können. In Abhängigkeit von der Zellausbeute konnte eine variable Zahl von FACS-Röhrchen bestückt werden. In jedes Röhrchen wurden nachfolgend 2 µl Blocking-Lösung (FcR Blocking Reagent, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Dtl.) pipettiert und auf dem Vortex mit der Zellsuspension vermischt. Mit der Blocking-Lösung (5 min. Einwirkzeit, Raumtemperatur) wurden unspezifische Antikörperbindungen verhindert.

Nun erfolgte die Zugabe der Primär-AK, wobei direkt markierte und unmarkierte Primär-AK verwendet wurden. Die AK wurden größtenteils unverdünnt als vom Hersteller

gebrauchsfertig gelieferte AK-Lösung in die Zellsuspension ( $10^6$  Zellen/100  $\mu$ l je Röhrchen) pipettiert (20  $\mu$ l AK-Lösung/Röhrchen: IgG-PE, IgG-FITC, VEGFR-2, CD34, CD31, PAR-1, EPCR (CD201), EDG1 (S1P1); 10  $\mu$ l /Röhrchen: CD105, PAR-2; 5  $\mu$ l/Röhrchen: vWF) bzw. vorher mit PBS verdünnt und dann zupipettiert (CD133: 1:50, 50  $\mu$ l/Röhrchen; CD146: 1:10, 10  $\mu$ l/Röhrchen). Die unmarkierten AK (VEGFR-2 und EDG1) wurden mit Sekundär-AK (Kaninchen- bzw. Ziege anti-Maus-FITC 1:30 (1:5 vorverdünnt), 17  $\mu$ l/Röhrchen) markiert.

Bei den direkt markierten AK konnte ein PE-markierter AK gemeinsam mit einem FITC-markiertem AK in einem Röhrchen angesetzt werden. Die gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen ist möglich, weil über den Laserimpuls eine gemeinsame Anregung stattfindet, jeder Farbstoff aber ein eigenes Emissionsspektrum besitzt. Da bei der EPC-Isolierung relativ geringe Zellzahlen erreicht werden, ist es sinnvoll, mehrere AK gleichzeitig anzusetzen. So können möglichst viele Zellmerkmale in einer Messung erfasst werden. Bei jeder Messung wurden zusätzlich auch FACS-Röhrchen mit IgG-Isotypkontrollen (PE- und FITC-Isotypkontrollen, direkt-markiert) angesetzt. Bindet die IgG-Isotypkontrolle an die Zellen, so repräsentiert ihre Fluoreszenz die unspezifischen Bindungen. Die Fluoreszenzstärke der Isotypkontrolle wird jeweils von der Fluoreszenzstärke der CD-Antikörper subtrahiert und so die verfälschende Hintergrundfluoreszenz eliminiert.

Nachdem die Primär-AK zupipettiert waren, wurden die FACS-Röhrchen auf dem Vortex geschüttelt und unter Lichtausschluss inkubiert (30 min, 4°C). Im Anschluss wurden die nichtgebundenen Primär-AK ausgewaschen. Hierzu wurden die Röhrchen mit je 2 ml PBS/BSA-Lösung aufgefüllt und danach abzentrifugiert (10 min, 1400 U/min, Raumtemperatur). Die Zellen wurden dann in 500  $\mu$ l PBS/Formaldehyd-Lösung (1 %) resuspendiert und auf diese Weise fixiert. Zellen, die mit unmarkierten Primär-AK „gefärbt“ wurden, mussten vor der Fixierung noch mit markierten Sekundär-AK inkubiert werden (30 min, 4°C im Dunkeln). Danach wurden auch die Sekundär-AK ausgewaschen und die Zellen fixiert.

## **2.4 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) *in vitro* kultivierter HUVECs und EPCs**

### **2.4.1 Prinzip der Reversen Transkription und der Polymerase-Kettenreaktion**

Die RT-PCR ist eine kombinierte molekularbiologische Methode, bestehend aus der Reversen Transkription und der Polymerase-Kettenreaktion. Sie dient dem Nachweis der Expression spezifischer Gene. Die **Reverse Transkription** ist eine Reaktion, die eine mRNA-Probe („messenger ribonucleic acid“) für den Einsatz in der PCR vorbereitet. Da in der PCR als Ausgangsprodukt DNA („desoxyribonucleic acid“) benötigt wird, muss die isolierte Gesamt-RNA der Versuchszellen in DNA überführt werden. Dies geschieht mit Hilfe

des Enzyms „Reverse Transkriptase“, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Die reverse Transkriptase ist ein retrovirales Enzym, das die komplementäre Umschreibung von mRNA in doppelsträngige DNA katalysiert. Die so entstandene cDNA („complementary DNA“) kann dann in der nachfolgenden PCR eingesetzt werden.

In der **Polymerase-Kettenreaktion** wird eine DNA-Zielsequenz spezifisch vervielfältigt, wodurch ihre Nachweisempfindlichkeit erhöht wird. Durch das Enzym „DNA-Polymerase“ (z.B. Taq-Polymerase) wird die Neusynthese eines komplementären DNA-Stranges (in 5'- 3'-Richtung) anhand einer DNA-Matrize katalysiert. Zur Vervielfältigung eines genau definierten DNA-Abschnittes werden spezifische Oligonukleotide (Primer) benötigt, welche als Startermoleküle die Sequenz des zukünftigen PCR-Produkts flankieren. In wiederholten Replikationsschritten wird dieses PCR-Produkt dann um ein Vielfaches kopiert.

Die PCR besteht aus einer Serie von Zyklen, die sich jeweils aus drei Hauptschritten zusammensetzen. Die Zyklen werden, in Abhängigkeit von der eingesetzten cDNA-Menge, 20 bis 45-mal im Thermocycler wiederholt. Dem ersten Zyklus vorangeschaltet findet die initiale Denaturierung bei 94 °C bis 96 °C statt. Der erste Schritt eines jeden Zyklus besteht ebenfalls in einer hochtemperierten Denaturierung (94 °C bis 96 °C), in der die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Strängen aufgebrochen werden. Dadurch wird die DNA in Einzelstränge aufgetrennt. Während des zweiten Schrittes wird die Temperatur abgesenkt (55 °C bis 69 °C) und die spezifischen Primer lagern sich komplementär am 3'-Ende der Einzelstränge an (Annealing). Der dritte Schritt jedes Zyklus beinhaltet die Vervielfältigung der DNA-Fragmente (bei z.B. 72 °C, Amplifikation), wobei die DNA-Polymerase komplementäre Desoxyribonukleotide an der DNA-Matrize anlagert und zu einem Tochterstrang verbindet. Mit jedem Zyklus verdoppelt sich die Menge der DNA idealerweise, wodurch eine exponentielle Anreicherung der amplifizierten Zielsequenz („template-DNA“, doppelsträngig) erfolgt. Nach Ablauf der Zyklen endet die Reaktion in der finalen Elongation bei 72 °C. Danach werden die Proben im Thermocycler auf 4 °C gekühlt und hierbei die Polymerase inaktiviert.

#### **2.4.2 Fragestellung bei den RT-PCR-Versuchen**

Mit Hilfe der RT-PCR sollte bei HUVEC-Kulturen die VEGF-C-Expression nach Stimulation mit rhAPC untersucht werden. In Screeningexperimenten der Arbeitsgruppe wurde bereits eine rhAPC-abhängige Expressionssteigerung des Wachstumsfaktors VEGF-C in HUVECs festgestellt (Ergebnis nicht veröffentlicht). In dem hierbei eingesetzten Verfahren (Affymetrix® GeneChip Expressions Array; verwendeter GeneChip: „Human Genome U133 Plus 2.0 Array“; Firma Affymetrix, High Wycombe, USA) wurde die Genexpression von 38500 bekannten menschlichen Genen untersucht. Inwieweit rhAPC die

Expression einzelner Gene beeinflussen kann, wurde im Vergleich zwischen stimulierten HUVECs (rhAPC 5 µg/ml) mit einer unbehandelten Kontrollgruppe ermittelt. Da ein derartiges Screening-Verfahren nur als erste orientierende Hilfe für weiterführende präzisere Methoden gedacht ist, sollte die Auswirkung von rhAPC auf die endotheliale Genexpression von VEGF-C mittels RT-PCR genauer untersucht werden.

Hierzu wurden konfluent wachsende HUVECs (2. Passage) mit rhAPC in verschiedenen Konzentrationen (3 Ansätze pro Bedingung) und unterschiedlichen Inkubationszeiten stimuliert. Als Kontrolle wurden unstimulierte HUVECs eingesetzt, die unter den gleichen Bedingungen (Temperatur, Luftfeuchtigkeit, CO<sub>2</sub>-Gehalt, Medium, Zeit) kultiviert wurden. Der Versuch wurde an HUVECs von zwei verschiedenen Spendern durchgeführt (Durchführung und Stimulationsbedingungen siehe 2.1.1.3).

In EPC-Kulturen wurde untersucht, ob die Zellen die Rezeptoren PAR-1, PAR-2, EPCR und S1P1 tragen. Zeitgleich wurde ermittelt, zu welchem Inkubationszeitpunkt die Expression dieser Rezeptoren bei unstimulierten EPCs am stärksten ist (2 Spender je Rezeptor).

Um zu erforschen, ob rhAPC die Expressionsrate der APC-relevanten Rezeptoren bei EPCs beeinflusst, wurden die Zellen mit rhAPC in zwei verschiedenen Konzentrationen für 6 Stunden stimuliert (2 bis 3 Spender je Rezeptor). Unstimulierte EPCs dienten als Kontrolle. Nach demselben Schema wurde auch die Auswirkung von rhAPC auf die Ang-2-Expression in EPC-Kulturen untersucht (n = 3 Spender). Die genauen Stimulationsbedingungen sind unter 2.1.2.4 aufgeführt.

### **2.4.3 RNA-Extraktion**

Um Kontaminationen mit Ribonukleasen und freier DNA zu vermeiden, wurden alle Arbeitsflächen und Geräte vor der RNA-Isolation mit einer RNA- und DNA-spaltenden Lösung (DNA-Exitus Plus™, Applichem GmbH, Darmstadt, Dtl.) behandelt und es wurden nur zertifizierte RNase- und DNase-freie Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen verwendet.

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des Qiagen „RNeasy Mini Kits“ (Qiagen, Hilden, Dtl.) isoliert. Die Zellen wurden hierfür in Petrischalen (Ø 10 cm) kultiviert. Zunächst wurde der im Kit enthaltene Guanidiniumisothiocyanid-haltige Lyse-Puffer mit β-Mercaptoethanol (1 %) gemischt und die DNase-Stocklösung mit dem zugehörigen Puffer des Kits angesetzt.

Unter der Sterilbank wurde das Kulturmedium aus den Petrischalen vollständig abgesaugt und anschließend je Schale 600 µl des Lyse-Puffers zugegeben. Dieser Puffer bewirkt durch sofortige Proteindenaturierung zum einen die Ablösung der Zellen vom Boden, zum anderen die Zerstörung der Zellmembranen, wodurch RNA freigesetzt wird. Nach kurzer Einwirkzeit wurden die Zellen mit einem sterilen Zellschaber vom Petrischalenboden

abgekratzt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Das Zell-Lysat (600 µl pro Bedingung) wurde dann in Zentrifugationsröhrchen des Qiagen-Kits („qiashreder spin column“) überführt und zentrifugiert (2 min, 12000 U/min, Raumtemperatur). Durch die Zentrifugalkraft wurde das Lysat im Qiashreder durch eine Membran gepresst und so restliche intakte Zellmembranen zerstört. Nach der Zentrifugation wurde die Qiashreder-Membran aus dem Röhrchen entfernt und dem Lysat ein äquivalentes Volumen an 70 %-iger Ethanol-Lösung zugegeben. Aufgrund dieser Pufferbedingungen präzipitierte die RNA. Im Anschluss wurde das Gemisch auf die Silikat-Gel-Säule der im Kit enthaltenen „RNeasy mini column“ aufgebracht. Durch eine kurze Zentrifugation (15 sec, 12000 U/min, Raumtemp.) erfolgte die Bindung der RNA an die Silikat-Gel-Matrix und damit die Trennung vom übrigen Zell-Lysat, welches verworfen wurde. Eventuell an der Matrix haftende Zellfragmente wurden mit einem Wasch-Puffer des Kits ausgewaschen. Hierzu wurden jeweils 350 µl des Wasch-Puffers auf die Silikat-Gel-Säulen der RNeasy-Röhrchen pipettiert und dann abzentrifugiert (15 sec, 12000 U/min, Raumtemp.). Da die RNA in der Gel-Matrix gebunden blieb, konnte der Durchfluss verworfen werden. Nun wurden 80 µl der 12,5 %-igen DNase-Lösung direkt auf die Membran pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNase-Lösung spaltet restliche, in der Membran enthaltene DNA-Anteile. In drei Waschschrritten mit den im Kit enthaltenen Waschpuffern wurden die Rest-DNA-Fragmente dann entfernt. Im Anschluss wurde die Silikat-Gel-Säule in ein Auffangröhrchen („collection tube“) transferiert und mit 30 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O (H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>, DEPC = Diethylpyrocarbonat) benetzt. In der folgenden Zentrifugation (1 min, 12000 U/min, Raumtemp.) löste sich die RNA von der Silikat-Matrix. Das Eluat mit der gelösten RNA wurde danach in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt.

#### 2.4.4 Messung der RNA-Konzentration

Mit Hilfe eines Spektrometers (Biophotometer, Eppendorf GmbH, Hamburg, Dtl.) wurde der RNA-Gehalt der einzelnen Proben photometrisch ermittelt. Zur Messung der Absorption wurden 3 µl der RNA-Lösung mit 297 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> verdünnt. Als Leerwert-Kontrolle diente H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>. Die optische Dichte der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, wobei eine Absorption von 1 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml in Wasser entspricht. Zur Berechnung der RNA-Konzentration wurde folgende Formel verwendet:  
„RNA-Konzentration in µg/ml = 40 x A<sub>260nm</sub> x Verdünnungsfaktor“.

Der Reinheitsgrad der RNA wurde durch photometrische Messung bei den Wellenlängen 260 nm (Absorptionsmaximum von RNA) und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) bestimmt. Der Quotient aus beiden Absorptionen (A<sub>260nm</sub>/A<sub>280nm</sub>-Ratio) gibt das Verhältnis der vorhandenen RNA zu verunreinigenden Proteinbeimengungen an. Optimalerweise sollte dieser Quotient zwischen 1,8 und 2 liegen.

### 2.4.5 Reverse Transkription (RT)

Die RT wurde im Thermocycler „PTC-220 DNA Engine Dyad™“ (MJ Research, Boston, USA) durchgeführt. Um die vorgeschriebenen 3 µg Gesamt-RNA in der RT einsetzen zu können, wurden die Proben mit H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> auf 0,5 µg/µl verdünnt. Die Proben wurden auf Eis gestellt und während der weiteren Schritte stets gekühlt.

Pro Ansatz wurden jeweils 6 µl Gesamt-RNA-Probe in ein PCR-Röhrchen vorgelegt. Danach wurden in jedes Röhrchen 6 µl eines oligo(dT)<sub>15</sub>-Primers (25 µM) pipettiert. Die Proben wurden auf dem Vortex homogenisiert und der erste Schritt der RT (4 min, 72°C) im Thermocycler gestartet. Hierbei erfolgte das Aufschmelzen der mRNA-Sekundärstrukturen und die Anlagerung des zum Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende komplementären Primers an die RNA. Die Proben wurden danach im Gerät auf 4°C abgekühlt.

Für die anschließende RT-Reaktion wurde ein Mastermix aus folgenden Komponenten auf Eis angesetzt (aufgrund eventueller Pipettierverluste 33,65 µl je Probe) (Tabelle 2-7).

**Tabelle 2-7: RT-Mastermix**

RT-Mastermix	Volumen (33,65 µl)
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	20,3 µl
5x RT-Puffer	9,0 µl
dNTP-Mix (Desoxynucleosidtriphosphate Endkonzentration 220 µM)	1 µl
RNase-Inhibitor (92 Einheiten/Reaktion)	2,3 µl
BSA (Endkonzentration 100 ng/ml)	0,45 µl
AMV („avian myeloblastis virus“)	0,6 µl

In jede Probe wurden 33 µl RT-Mastermix pipettiert und homogenisiert. Im zweiten Schritt der RT (Thermocycler-Programm: 90 Minuten, 42°C; 10 Minuten, 94°C) erfolgte die tatsächliche Reverse Transkription mit anschließender Denaturierung der entstandenen DNA-RNA-Hybridhelix. Die so gewonnene cDNA wurde sofort für die PCR eingesetzt, oder alternativ bei -20°C aufbewahrt.

### 2.4.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, semiquantitativ)

Die in der RT entstandene cDNA wurde als Matrize für die Synthese der nachzuweisenden Zielsequenz eingesetzt. Diese cDNA spiegelt die mRNA-Ausstattung der Zellen zum Zeitpunkt der RNA-Isolation wieder. Wurde die untersuchte Zielsequenz zum Abnahmezeitpunkt vermehrt exprimiert, so gehen von ihr auch mehr Kopien in die PCR ein. Daraus resultiert eine größere Menge an gebildetem PCR-Endprodukt. In der nachfolgenden Gelelektrophorese lassen sich Unterschiede in der Genexpression im direkten Vergleich der Versuchsgruppen sichtbar machen.

Neben der Zielsequenz wurde für jede Probe in einem weiteren Ansatz auch die GAPDH-Sequenz im Thermocycler amplifiziert. Die GAPDH (Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase) ist ein ubiquitäres Enzym, das naturgemäß in allen Zellen exprimiert wird. Dieses als interne Kontrolle („housekeeping“ Gen) eingesetzte Enzym wird bei der Quantifizierung der Zielsequenz benötigt. Mit Hilfe der GAPDH-Expression kann kontrolliert werden, ob in den einzelnen Versuchsansätzen gleiche Mengen cDNA in der PCR eingesetzt wurden. Die Ermittlung des Quotienten von Zielsequenz-Expression zu GAPDH-Expression gibt die normalisierte, tatsächliche Expressionsrate des Zielgens an.

Zunächst wurden je Probe 2 µl cDNA in ein PCR-Röhrchen vorgelegt und auf Eis gestellt. Anschließend wurde ein gemeinsamer PCR-Reaktionsansatz (Tabelle 2-8) für alle Proben in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. Hierbei wurde das Enzym Taq-Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Dtl.) als letzte Komponente zugegeben und stets auf Eis gekühlt. Aus dem Gesamtansatz wurden dann jeweils 48 µl zu den vorgelegten 2 µl cDNA zugegeben.

Der PCR-Reaktionsansatz für eine Probe enthielt folgende Komponenten:

**Tabelle 2-8: PCR-Reaktionsansatz**

PCR-Reaktionsansatz	Volumen (48 µl)
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	39 µl
dNTP-Mix (Endkonzentration 200 µM)	1 µl
Primer (Endkonzentration 300 nM)	2 µl
10x PCR Puffer	5 µl
BSA (Endkonzentration 100 ng/ml)	0,5 µl
Taq-Polymerase (2,5 Einheiten/Ansatz)	0,5 µl

Als Positivkontrolle diente ein Ansatz mit 1 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> + 1 µl eines Gemisches von 150 ng „synthetischer doppelsträngiger DNA“ in 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>. Die Positivprobe für den VEGF-C-Nachweis und für den Ang-2-Nachweis wurde jeweils vom Hersteller der Primer geliefert (R&D Systems, Wiesbaden, Dtl.). Beim Rezeptoren-Nachweis lag die Positivkontrolle jeweils in Form von cDNAs aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe vor, in denen die gesuchten Sequenzen bereits nachgewiesen wurden. Als Negativkontrolle wurden 2 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> eingesetzt.

Für jedes nachzuweisende Gen wurde ein eigenes Programm von spezifischer Dauer und Temperatur im Thermocycler eingestellt (Tabellen 2-9 bis 2-15). Die Annealing-Temperatur ist beispielsweise vom Schmelzpunkt des eingesetzten Primers abhängig. Die Temperatur während der Amplifikation richtet sich nach dem Temperaturoptimum der Polymerase, während die Amplifikationsdauer von der Länge des DNA-Fragments abhängt.

Je mehr Zyklen in der PCR eingesetzt wurden, desto stärker zeigte sich in der Regel die Bande in der nachfolgenden Elektrophorese. Bei verschiedenen Spendern musste bisweilen in der Zyklenzahl variiert werden, weil die Expression der gesuchten Parameter individuellen Schwankungen unterlag. Deshalb waren meist mehrere PCRs zum optimalen Gen-Nachweis erforderlich. Die Temperatur wurde abschließend im Thermocycler auf 4°C heruntergekühlt. Das PCR-Produkt (doppelsträngige, lineare DNA) kann mehrere Stunden bis zur Auswertung bei dieser Temperatur aufbewahrt werden.

Übersicht über die verwendeten PCR-Programme (Primersequenzen siehe 2.8.7):

**Tabelle 2-9: PCR-Programm für GAPDH**

Zyklus	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	5 min	94 °C	1x
Denaturierung	30 s	94 °C	25-30x
Annealing	60 s	55 °C	
Amplifikation	120 s	72 °C	
Finale Elongation	5 min	72 °C	1x
Kühlung	unendlich ∞	4 °C	

**Tabelle 2-10: PCR-Programm für VEGF-C**

Zyklus	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	4 min	94 °C	1x
Denaturierung	45 s	94 °C	26x
Annealing	45 s	55 °C	
Amplifikation	45 s	72 °C	
Finale Elongation	10 min	72 °C	1x
Kühlung	unendlich ∞	4 °C	

**Tabelle 2-11: PCR-Programm für Ang-2**

Zyklus	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	5 min	94 °C	1x
Denaturierung	45 s	94 °C	40-44x
Annealing	45 s	55 °C	
Amplifikation	45 s	72 °C	
Finale Elongation	5 min	72 °C	1x
Kühlung	unendlich ∞	4 °C	

**Tabelle 2-12: PCR-Programm für PAR-1**

Zyklus	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	5 min	94 °C	1x
Denaturierung	30 s	94 °C	30-35x
Annealing	30 s	55 °C	
Amplifikation	45 s	72 °C	
Finale Elongation	5 min	72 °C	1x
Kühlung	unendlich ∞	4 °C	

**Tabelle 2-13: PCR-Programm für PAR-2**

Zyklus	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	5 min	94 °C	1x
Denaturierung	60 s	94 °C	30-35x
Annealing	60 s	55 °C	
Amplifikation	60 s	72 °C	
Finale Elongation	5 min	72 °C	1x
Kühlung	unendlich ∞	4 °C	

**Tabelle 2-14: PCR-Programm für EPCR (CD201)**

Zyklus	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	9 min	95 °C	1x
Denaturierung	30 s	95 °C	2x
Annealing	30 s	66 °C	
Amplifikation	40 s	72 °C	
Denaturierung	30 s	95 °C	2x
Annealing	30 s	64 °C	
Amplifikation	40 s	72 °C	
Denaturierung	30 s	95 °C	2x
Annealing	30 s	62 °C	
Amplifikation	40 s	72 °C	
Denaturierung	30 s	95 °C	2x
Annealing	30 s	60 °C	
Amplifikation	40 s	72 °C	
Denaturierung	30 s	95 °C	26-28x
Annealing	30 s	58 °C	
Amplifikation	40 s	72 °C	
Finale Elongation	7 min	72 °C	1x
Kühlung	unendlich ∞	4 °C	

**Tabelle 2-15: PCR-Programm für S1P1 (EDG1)**

Zyklus	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	5 min	94 °C	1x
Denaturierung	45 s	94 °C	30-35x
Annealing	45 s	69 °C	
Amplifikation	45 s	72 °C	
Finale Elongation	5 min	72 °C	1x
Kühlung	unendlich $\infty$	4 °C	

### 2.4.7 Gelelektrophorese

Zur optischen Detektion des PCR-Produktes wurde die horizontale Gelelektrophorese eingesetzt. Die negativ geladene DNA wandert auf einem Trägermedium im elektrischen Feld in die Richtung der positiv geladenen Anode. Es erfolgt eine Größenfraktionierung der DNA, wobei größere Fragmente stärker von der Netzstruktur des Trägermediums zurückgehalten werden, während kleinere Fragmente schneller zum positiven Pol wandern. DNA-Fragmente gleicher Länge bilden eine Bande im Gel, die später unter UV-Licht sichtbar gemacht wird. Oligonukleotide definierter Größe („100 bp ladder“, 1 µg/µl, Invitrogen, Merelbeke, Belgien) dienen als Längenstandard.

Als Trägersubstanz wurde Agarose in einer Konzentration von 2 % verwendet. Hierzu wurden 2 g Agarosepulver mit 100 ml Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) gemischt und unter mehrmaligem Aufkochen in der Mikrowelle vollständig gelöst. In das abgekühlte (ca. 35°C) luftblasenfreie Gel wurden 2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pipettiert, bevor es in die mit Kämmen versehene Elektrophoresekammer (10 cm<sup>2</sup>) gegossen wurde. Das Ethidiumbromid lagert sich in die DNA der Proben ein und lässt DNA-Banden im Gel unter UV-Licht fluoreszieren. Nach Auspolymerisierung des Gels (30 min) wurden die Kämmen entfernt und die Kammer mit TAE-Puffer befüllt, bis das Gel ca. 1 cm mit Flüssigkeit überschichtet war. Vor der Elektrophorese wurde jeweils 5 µl Stop-Lösung je DNA-Probe (50 µl) zugefügt, um weitere enzymatische Reaktionen auszuschließen. Die Stop-Lösung wurde angesetzt als Gemisch aus 5 ml Glycerin, 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), 1 ml SDS (Sodiumdodecylsulfat, 10 %), 1 ml Bromphenolblau-Lösung (1 %) und 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>. Nach kurzem Vortexen wurden jeweils 10 µl der PCR-Produkte sowie der Positiv- und der Negativkontrolle in separate Geltaschen pipettiert, wobei die blaue Färbung der Stop-Lösung als optische Pipettierhilfe diente. Durch die höhere Dichte der Stop-Lösung sinken die Proben auf den Grund der Geltaschen. Die erste Tasche des Gels wurde mit 10 µl des Längenstandards befüllt. Der verwendete Längenstandard bildet nach jeweils 100 Basenpaaren (bp) eine Bande und ermöglicht so die Größeneinschätzung des PCR-Produkts.

Der Elektrophoreselauf erfolgte bei konstanter Spannung (120 Volt) über 60 Minuten. Danach konnten die DNA-Banden unter UV-Licht im „Gel Jet Imager“ (INTAS, Hamburg, Dtl.) sichtbar gemacht werden. Im Abgleich mit der Basenpaarzahl der Banden des Standards wurde die Spezifität des PCR-Produkts ermittelt. Die Dokumentation erfolgte fotografisch und über digitale Speicherung (INTAS GDS® Gel Dokumentationssystem, Hamburg, Dtl.).

#### **2.4.8 Densitometrie**

Die densitometrische Auswertung wurde mit dem Computerprogramm AIDA 2.11 (Raytest GmbH, Straubenhardt, Dtl.) durchgeführt. Hierzu wurde um jede Bande ein Areal definierter Größe (in mm<sup>2</sup>) gelegt und die darin enthaltene Pixeldichte ermittelt. Die Pixeldichte der zu untersuchenden PCR-Produkte wurde mit der zugehörigen GAPDH-Pixeldichte ins Verhältnis gesetzt. Der Vergleich dieser Werte der Kontroll- und Versuchsgruppen ergab eine semiquantitative Aussage über die Erhöhung bzw. Erniedrigung des mRNA-Gehalts des untersuchten Gens.

#### **2.5 „Enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA)**

Die Quantifizierung von VEGF-C im Zellüberstand von HUVECs erfolgte mit dem Quantikine® „Human VEGF-C Immunoassay“ (R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Dtl.). In 2 verschiedenen Versuchsaufbauten wurden konfluent gewachsene HUVECs der 2. Passage mit rhAPC stimuliert. Als Kontrolle wurden unter den gleichen Bedingungen kultivierte, unstimulierte HUVECs eingesetzt. Für die Experimente wurden die Zellen auf Kortison- und FCS-freies Endothelzellmedium ohne Wachstumsfaktoren umgestellt; das rhAPC wurde ins Medium über den adhärennten Zellen zugegeben (siehe 2.1.1.3).

Im ersten Versuchsansatz wurde ermittelt, wie sich verschiedene Dosierungen von rhAPC auf die endotheliale Freisetzung des Wachstumsfaktors VEGF-C auswirken. Hierzu wurden HUVECs für 24 Stunden mit rhAPC in den Konzentrationen 50 ng/ml, 500 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml und 20 µg/ml inkubiert. Im zweiten Ansatz wurde die Zeitabhängigkeit der VEGF-C-Freisetzung unter konstanter rhAPC-Konzentration untersucht. Die Zellen wurden mit rhAPC (5 µg/ml) für jeweils 2, 4, 8, 24 und 48 Stunden stimuliert (Tab. 2-2). Im Anschluss wurden jeweils die Überstände zum Nachweis des VEGF-C-Gehalts abgenommen.

Für den VEGF-C-ELISA wurde zuerst der für die spätere Auswertung notwendige VEGF-C-Standard pipettiert (Reagenzien im ELISA-Kit enthalten). Die VEGF-C-Stocklösung (7 ng/ml) wurde in einer Verdünnungsreihe mit der „Calibrator Lösung“ des Kits angesetzt. In den 6 Verdünnungsstufen wurde die Ausgangskonzentration des VEGF-C jeweils halbiert, bis die Endkonzentration 109 pg/ml erreicht war. Im ELISA-Reader (Multiskan RC,

Labsystems, Vantaa, Finnland) wurde aus dieser Verdünnungsreihe eine Standardkurve erstellt, die eine genaue Bestimmung der VEGF-C-Konzentration in den Proben ermöglichte.

Das ELISA-Prinzip beruht auf einer spezifischen Antigen-Antikörper-Bindung (Ag/AK). Im hier eingesetzten VEGF-C-Immunoassay war der Boden einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit einer Trägersubstanz beschichtet, auf der ein spezifischer, gegen VEGF-C gerichteter Antikörper (anti-Maus, monoklonal) verankert ist. Ist VEGF-C in den Proben enthalten, so bindet es an den fixierten Antikörper, wodurch spezifische Ag-AK-Immunkomplexe entstehen. Ein zweiter, enzymmarkierter Antikörper mit hoher VEGF-C-Spezifität bindet im nächsten Schritt an diese Immunkomplexe (Sandwichmethode). Durch Zugabe eines chromogenen Substrates läuft eine enzymatische Farbreaktion ab, deren Intensität proportional zum VEGF-C-Gehalt der Proben ist.

Zuerst wurde in die verwendeten Wells je 100 µl „assay diluent“ des Kits vorgelegt. Dann wurden die Standards (50 µl pro Well; Doppelansatz) in die ersten 14 Wells pipettiert. Die restlichen Wells wurden mit den auf Eis gekühlten Proben (50 µl pro Well; 4 Ansätze pro Bedingung) belegt und danach mit einer selbstklebenden, durchsichtigen Folie des Kits versiegelt. In der nachfolgenden Inkubation (auf dem Kombischüttler, 2 Stunden bei Raumtemperatur) bindet das VEGF-C der Proben an die spezifische Antikörperbeschichtung der Wells. Im Anschluss wurden alle nicht gebundenen Peptide und Proteine in vier Waschschritten (Waschpuffer des Kits; 400 µl pro Well) eliminiert. Danach wurde der zweite, enzymmarkierte AK des Kits (polyklonal, markiert mit Meerrettich-Peroxidase; 200 µl pro Well) zugegeben. Nach 2-stündiger Inkubation (versiegelt auf dem Kombischüttler, Raumtemperatur) wurden diejenigen enzymmarkierten AK ausgewaschen, die keine Bindung eingehen konnten. Im Anschluss wurde in jedes Well 200 µl chromogenes Substrat (bestehend aus Hydrogenperoxid und Tetramethylbenzidin) pipettiert und inkubiert (30 min, Raumtemperatur). Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Chromogens erfolgte die Inkubation im Dunkeln. Abschließend wurde die Reaktion mit der schwefelsäurehaltigen Stop-Lösung des Kits (50 µl/Well) beendet.

Die Meerrettich-Peroxidase bewirkt mit dem Chromogen eine enzymatische Farbreaktion, deren Intensität eine exakte Quantifizierung des VEGF-C-Gehalts der Proben ermöglicht. Innerhalb von 30 Minuten wurde die Extinktion des Farbausschlags im ELISA-Reader photometrisch gemessen. Bei einer Wellenlänge von 450 nm konnte die Konzentration von VEGF-C im Zellüberstand durch Vergleich mit der Extinktion der Standardkurve ermittelt werden. Die Auswertung erfolgte mit der „Genesis Lite Software“ (Labsystems, Vantaa, Finnland).

## **2.6 Real-Time RT-PCR (Super Array) mit EPC-Kulturen**

Die Real-Time RT-PCR wurde eingesetzt, um das Genexpressionsprofil von rhAPC-stimulierten EPCs zu untersuchen. Im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrollgruppe sollte ermittelt werden, inwiefern rhAPC die Expression bestimmter Gene beeinflusst. Um möglichst viele Gene in einem Screening-Verfahren auswerten zu können, wurde das RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR Array System (Super Array, Firma Bioscience, Frederick, U.S.A) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Array, mit dem die simultane Quantifizierung mehrerer, zu einem Themenkomplex gehörender Gene möglich ist. Pro Array können 84 Gene untersucht werden, die bestimmten physiologischen Vorgängen bzw. Krankheitsbildern zugeordnet sind. In dieser Arbeit wurden der „humane Angiogenese“- und der „humane Arteriosklerose“-Super Array von Bioscience eingesetzt.

Die Primerpaare der Gene sind in lyophilisiertem Zustand in den Vertiefungen einer 96-Well-Platte aufgebracht (1 Gen/Well). Des Weiteren enthält der Super Array fünf „house-keeping“ Gene, drei RNA- und PCR-Qualitäts-Kontrollen, eine DNA-Kontrolle sowie die für die RT-PCR erforderlichen Reagenzien. In den Kontrollen wird die Reinheit der eingesetzten RNA und DNA überprüft, zudem wird die Effizienz der RT und der PCR ermittelt.

Für jeden Array wurden zwei Real-Time RT-PCR-Läufe durchgeführt. Im ersten Lauf wurden die stimulierten Proben (rhAPC 5 µg/ml, Stimulationsdurchführung siehe 2.1.2.4) ausgewertet und im zweiten Lauf, auf einer neuen 96-Loch-Platte, die unstimulierten Kontroll-Proben. Die Kontrollzellen wurden unter denselben Bedingungen inkubiert, wie die stimulierten Versuchszellen. Die Real-Time PCR erfolgte im „ABI Prism 7000 Sequence Detection System“ (Applied Biosystems, Darmstadt, Dtl.)

### **2.6.1 Unterschied zwischen Real-Time RT-PCR und Endpunkt-RT-PCR**

Ein PCR-Lauf lässt sich in drei Phasen einteilen. Zu Beginn steht die exponentielle Phase, in der in jedem Zyklus bei 100 %-iger Reaktionseffizienz eine Verdopplung der amplifizierten DNA stattfindet. In der nachfolgenden linearen Phase verlangsamt sich die Reaktion, da ein Verbrauch der reaktiven Komponenten eintritt. Die Plateau-Phase stellt den Endpunkt der Reaktion dar, in der aufgrund verbrauchter oder inaktiver Komponenten keine Steigerung der Produktmenge mehr stattfindet. Der eben genannte PCR-Verlauf ist bei der Real-Time RT-PCR und der traditionellen Endpunkt-RT-PCR identisch. Der wesentliche Unterschied beider Methoden liegt im Zeitpunkt der Messung. Bei der traditionellen RT-PCR erfolgt die Messung am Ende der Reaktion in der Plateauphase, während bei der Real-Time RT-PCR im gesamten Reaktionsablauf Daten erhoben werden (Schmittgen et al., 2000).

Jede Probe erreicht das Plateau in Abhängigkeit von ihrer Reaktionskinetik und der eingesetzten DNA-Menge. Bei der traditionellen Endpunkt-Messung lässt sich nicht mehr

nachvollziehen, nach welcher Zyklenzahl das Plateau erreicht wurde. Der Vergleich der Endprodukt-Mengen liefert bei dieser Methode Rückschlüsse auf die Menge der Ausgangs-DNA, wenngleich mit einer gewissen Ungenauigkeit.

Da in der Real-Time RT-PCR die DNA-Menge im Verlauf der gesamten Reaktion gemessen wird, kann innerhalb jedes einzelnen Zyklus die Menge der gebildeten DNA ermittelt werden. Ausgewertet werden die Messergebnisse zu Beginn der exponentiellen Phase, da hier eine direkte Relation zwischen Zyklenzahl und entstandenem DNA-Produkt besteht.

Die Detektion der DNA erfolgt über ihre Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff (hier „SYBR Green“), wobei das Amplikon während des Annealing-Schrittes oder am Ende der Amplifikation im doppelsträngigen Zustand messbar ist. Mit Hilfe von „SYBR Green“ kann zusätzlich die Spezifität der eingesetzten DNA überprüft werden. Da der Marker nur nach Bindung an doppelsträngige DNA (dsDNA) ein Fluoreszenzsignal abgibt (Giulietti et al., 2001), äußert sich der Übergang von einzelsträngiger DNA in dsDNA in stark ansteigender Fluoreszenz. Wird die dsDNA wieder aufgeschmolzen, zeigt sich die Dissoziation in einem Fluoreszenzabfall. Für jedes PCR-Fragment lässt sich in Abhängigkeit von Fluoreszenz und Temperatur eine spezifische Schmelzkurve mit einem einzigen Peak aufzeichnen. Zeigt die Kurve mehr als einen Peak, war die eingesetzte DNA kontaminiert (Schmittgen et al., 2000).

### **2.6.2 Die “ $\Delta\Delta$ Cycle Threshold” ( $\Delta\Delta$ Ct)-Methode**

Da sich die DNA-Menge in der exponentiellen Phase idealerweise nach jedem Zyklus verdoppelt, erfolgt zeitgleich eine proportionale Verstärkung des Fluoreszenzsignals. Die Relation von Fluoreszenzstärke und Zyklenzahl lässt sich für jedes vervielfältigte Gen in einer spezifischen Amplifikationskurve wiedergeben. Der Verlauf dieser Kurve zeichnet die in 2.6.1 beschriebenen Phasen der PCR nach. Mit Hilfe der Amplifikationskurven lässt sich für jede Probe der sog. Ct-Wert („cycle threshold“) am Anfang der exponentiellen Phase ermitteln. Dieser Wert entspricht der Anzahl an Zyklen, die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen, das signifikant über der Hintergrundfluoreszenz liegt (Pfaffl, 2004). Eine Probe mit mehr DNA-Kopien passiert dieses Fluoreszenzniveau bei einer niedrigeren Zyklenzahl (= kleinerer Ct-Wert), als eine Probe mit weniger DNA-Kopien. Die Software des ABI-Prism 7000 SDS-Gerätes legt die Höhe des Fluoreszenzniveaus automatisch fest und ermittelt so für jedes PCR-Produkt den Ct-Wert.

Der Ct-Wert verhält sich zur DNA-Ausgangsmenge der Proben indirekt proportional. Er wird zur relativen Quantifizierung der Genexpression in der sog.  $\Delta\Delta$ Ct-Methode eingesetzt. Hier wird nicht die absolute DNA-Ausgangsmenge bestimmt, sondern die relative Expression eines Zielgens durch Normalisierung auf ein nichtreguliertes „housekeeping“ Gen ermittelt. Danach wird die relative Expression des Zielgens der stimulierten Probe mit derjenigen der

unbehandelten Kontrollprobe verglichen. Das Ergebnis gibt an, um welchen Faktor die Genexpression der behandelten Probe (hier: rhAPC-Stimulation) im Vergleich zur Kontrollgruppe (unstimulierte Probe) gestiegen oder auch gesunken ist (Pfaffl, 2004).

$\Delta\Delta$ Ct-Methode: (nach Anwendungsprotokoll des Super Arrays Kits)

Der Ct-Wert jedes Zielgens (Ct GOI; GOI = „gene of interest“) wird mit dem Ct-Durchschnittswert der fünf nicht-regulierten „housekeeping“ Gene (Ct AVG HKG; AVG HKG = „average housekeeping genes“) normalisiert, um den  $\Delta$ Ct-Wert zu erhalten. Die Amplifikations-Effizienz der Zielgene muss hierbei annähernd derjenigen der „housekeeping“ Gene entsprechen.

$$(1) \Delta\text{Ct} = \text{Ct GOI} - \text{Ct AVG HKG}$$

Nun werden die normalisierten  $\Delta$ Ct-Werte der experimentellen Proben ( $\Delta$ Ct expt; Stimulation mit rhAPC) mit den zugehörigen Kontrollproben ( $\Delta$ Ct control; unstimuliert) in Relation gesetzt:

$$(2) \Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct expt} - \Delta\text{Ct control}$$

Die Expressionsrate (level = L) jedes Gens lässt sich aufgrund der indirekten Proportionalität des Ct-Wertes zur DNA-Ausgangsmenge und wegen der Verdopplung der DNA-Menge pro Zyklus mit folgender Formel darstellen:

$$(3) L = 2^{-\text{Ct}}$$

Um die Expressionsrate eines Zielgens (GOI) auf ein „housekeeping“ Gen (HKG) zu normalisieren, werden ihre beiden Expressionsraten dividiert.

$$(4) 2^{-\text{Ct (GOI)}} : 2^{-\text{Ct (HKG)}} = 2^{-\Delta\text{Ct}}$$

Der relative Expressionsunterschied (Ratio) zwischen der rhAPC-stimulierten Probe und einer Kontroll-Probe lässt sich errechnen, indem für jedes Zielgen die normalisierte Expressionsrate des stimulierten Ansatzes durch diejenige der zugehörigen Kontrollprobe dividiert wird ( $\Delta\Delta$ Ct entspricht  $\Delta$ Ct expt -  $\Delta$ Ct control, s.o.).

$$(5) 2^{-\Delta\text{Ct expt}} : 2^{-\Delta\text{Ct control}} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Ist die Ratio („fold change“) größer als 1, kann das Ergebnis als eine x-fache Hochregulierung interpretiert werden; bei einem Ergebnis < 1, wird eine dementsprechende x-fache Herabregulierung der Expression konstatiert.

### 2.6.3 Versuchsdurchführung der Real-Time RT-PCR

EPCs (Petrischalen, Ø 10 cm) wurden direkt nach ihrer Kultivierung mit rhAPC (5 µg/ml) stimuliert sowie im Abstand von je 24 Stunden an den folgenden 2 Tagen. Am 3. Tag nach der Isolation wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen und nach Zugabe von frischem Medium erneut stimuliert (siehe 2.1.2.4). Unstimulierte EPCs dienten als Kontrolle. Die RNA-Extraktion erfolgte am 4. Tag nach der Isolation mit dem Qiagen „RNeasy Mini Kit“ (2.4.3). Die RT wurde mit dem im Super Array enthaltenen „RT<sup>2</sup> First Strand Kit“ durchgeführt. Zunächst wurde für jede RNA-Probe eine Annealing Mixtur in einem PCR-Röhrchen angesetzt (Tabelle 2-16). Da DNA durch DEPC zerstört werden kann, wurde DEPC- und RNase-freies H<sub>2</sub>O (dd H<sub>2</sub>O) verwendet.

**Tabelle 2-16: Real-Time RT-PCR: Annealing Mixtur (je RNA-Probe)**

Annealing-Mixtur nach Angabe des Herstellers	Menge bzw. Volumen
Gesamt-RNA	1 µg
P2 Primer & External Control Mix	1 µl
mit RNase- und DEPC-freiem H <sub>2</sub> O auffüllen	10 µl Endvolumen

Danach erfolgte das Aufschmelzen der Sekundärstrukturen (70°C, 3 min; laut Hersteller des Super Array) im Thermocycler „PTE220 DNA Engine Dyad™ (MJ Research, Boston, USA). Für den zweiten Teil der RT wurden folgende Reagenzien des Super Array angesetzt (Tabelle 2-17):

**Tabelle 2-17: Real-Time RT-PCR: RT-Cocktail (je RNA-Probe)**

RT-Cocktail nach Angabe des Herstellers	Volumen (10 µl)
RT Puffer	4 µl
RNase- und DEPC-freies H <sub>2</sub> O (dd H <sub>2</sub> O)	4 µl
RI (RNase Inhibitor)	1 µl
G38 (RT Enzyme Mix II)	1 µl

Der RT-Cocktail wurde zu den gekühlten RNA-Proben zugegeben und gut durchmischt. Danach wurden die Proben im Thermocycler inkubiert (60 min, 37°C; laut Hersteller). Zur Degradierung der RNA und Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurden die Proben abschließend auf 95°C (5 min) erhitzt. Zu jedem Reaktionsgemisch wurden noch 91 µl dd H<sub>2</sub>O pipettiert und auf Eis gestellt. Der Cocktail für die nachfolgende Real-Time PCR wurde für alle Proben eines Laufs gemeinsam angesetzt (Tabelle 2-18). Im Super Array Master-Mix ist der Fluoreszenzfarbstoff „SYBR Green“ bereits enthalten.

**Tabelle 2-18: Real-Time RT-PCR: cDNA-Cocktail (für alle Proben)**

PCR-cDNA-Cocktail nach Angabe des Herstellers	Volumen 2550 µl
2x Super Array PCR Master-Mix	1275 µl
cDNA (verdünnt in dd H <sub>2</sub> O)	102 µl
dd H <sub>2</sub> O	1173 µl

Im Anschluss wurde die 96-Well-Platte des Super Array beladen. In jedes Well wurden 25 µl des PCR-cDNA-Cocktails pipettiert, wobei stets frische Pipettenspitzen verwendet wurden. Danach wurde die Platte mit einer selbstklebenden Plastikabdeckung (im Super Array-Kit enthalten) verschlossen und auf Eis gestellt, bis das ABI Prism SDS-Gerät (Applied Biosystems, Darmstadt, Dtl.) startklar war. Die Detektion der „SYBR Green“-Fluoreszenz erfolgte innerhalb der 40 Zyklen jeweils während des Annealing-Schrittes.

**Tabelle 2-19: Programm für die Real-Time RT-PCR (nach Angaben des Herstellers)**

Zyklenzahl	Zeit	Temperatur
1	10 Minuten	95 °C
40	15 Sekunden 1 Minute	95 °C 60 °C

Zur Auswertung der Messergebnisse wurde die spezifische Software des RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR Array System (Bioscience, U.S.A.), unter Verwendung der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode, eingesetzt.

## 2.7 Zellzählung der kultivierten EPCs

Durch Zellzählungen sollte überprüft werden, ob eine Stimulation mit rhAPC die Proliferation von EPCs beeinflussen kann. Für jedes Experiment ( $n = 12$ ) wurden EPCs verschiedener Spender über Ficoll-Dichtegradient-Zentrifugation isoliert und im supplementiertem EBM-Medium ausgesät (2.1.2.1 und 2.1.2.3). Die von Urbich/Dimmeler (Universität Frankfurt, Dtl.) mündlich vorgegebene Zellzahl von  $8 \times 10^6$  Zellen je Well einer 12-Wellplatte wurde eingehalten. Unmittelbar nach der Zellaussaat erfolgte die erste Stimulation mit rhAPC (50 ng/ml und 5 µg/ml). Als Vergleich wurden EPCs mit dem bekanntermaßen proliferationssteigernden Wachstumsfaktor VEGF (50 ng/ml) stimuliert. Für jede Bedingung wurden je nach Zellausbeute 3 bis 6 Wells angesetzt. Als Kontrolle dienten unstimulierte EPCs, die unter den gleichen Kulturbedingungen angezchtet wurden, wie die stimulierten Versuchszellen. Die Stimulation mit rhAPC und VEGF wurde an den folgenden zwei Tagen (im Abstand von je 24 Stunden) zum zweiten und dritten Mal in den o.g. Konzentrationen durchgeführt (ohne Mediumwechsel). Am dritten Tag wurde das EBM-Medium entfernt und jedes Well viermal mit PBS gewaschen. Danach wurde in die Wells jeweils 1 ml frisches

supplementiertes EBM-Medium pipettiert und zum vierten Mal mit rhAPC und VEGF für 24 h stimuliert. Am 4. Tag nach der Isolierung wurde die Anzahl der EPCs pro Well bestimmt (Stimulationsdurchführung siehe auch 2.1.2.4).

Zuerst wurde eine Methode der Zellzählung angewandt, bei der pro auszuzählendem Well drei mikroskopische Fotografien von definierten Bereichen angefertigt wurden. Mittels einer Schablone wurde jedes Well in 3 Abschnitte eingeteilt und jeweils in der Mitte eines Abschnittes ein Bild erstellt. Durch Vergleich der Zellzahlen an übereinstimmenden Stellen auf den Wells sollten stimulationsbedingte Unterschiede ermittelt werden. Problematisch erwies sich hierbei das ungleiche Verteilungsmuster der Zellen in den Wells. Während im Well-Zentrum eine dichte Anordnung der Zellen vorherrschte, waren die Zellen zum Rand hin relativ dünn gewachsen. Auch eine mehr ins Zentrum verlagerte Anordnung der Fotografien erbrachte keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Daher wurde in den folgenden Experimenten eine komplette trypsin-katalysierte Ablösung der Zellen vom Fibronectin-beschichteten Untergrund vorgenommen. Ihre anschließende Auszählung in der Neubauer-Zählkammer erwies sich als optimale Methode mit vergleichbaren Ergebnissen.

Zunächst wurde das Medium über den Zellen entfernt und jedes Well viermal mit PBS gewaschen. Mit 1 ml warmer Trypsin-EDTA-Lösung erfolgte dann die enzymatische Ablösung der EPCs. Die Multiwell-Platten wurden zur Erreichung des Trypsin-Temperatur-optimums in den Inkubator verbracht. Im Gegensatz zu HUVECs lösten sich die EPCs relativ schlecht vom beschichteten Untergrund ab. Deshalb wurde eine verhältnismäßig lange Trypsin-Einwirkzeit (10 min) gewählt. Da die Zellen nach dem Zählen verworfen wurden, spielten Trypsin-bedingte Zellschädigungen hier keine Rolle. Durch genaue Einhaltung einer konstanten Einwirkzeit konnten vergleichbare Zell-Mengen pro Well abgelöst werden. Wiederholtes Auf- und Abpipettieren nach der Inkubation (10 x pro Well) sollte die Zell-ablösung verbessern. Danach wurde die Trypsin-Reaktion mit 1 ml FCS-haltigem Medium pro Well abgestoppt. Das Zellgemisch jedes Wells wurde noch weitere 20-mal auf- und abpipettiert, bevor der Inhalt der Wells jeweils einzeln in Falcon-Röhrchen überführt wurde. Nach Anfärbung mit „TÜRKS-Solution“ (Verdünnung von 100 µl Zellsuspension im Verhältnis 1:10) wurden die Zellen in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm „In Stat“, wobei der p-Wert im ANOVA-Test (gepaart) in Verbindung mit dem Student-Newman-Keuls Post Test ermittelt wurde (siehe 3.10).

## 2.8 Materialien

### 2.8.1 Geräte

**Tabelle 2-20: Geräte**

Geräte	Hersteller
Densitometrie: Fuji Image-Reader LAS	Fuji Film Europe GmbH, Düsseldorf, Dtl.
Elektrophoresegerät „Power Station 300“	Axon Labor Technik, Kaiserslautern, Dtl.
ELISA-Reader: LabSystems Multiskan RC	Labsystems, Vantaa, Finnland
FACS-Gerät: FACScan FACSalibur	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Dtl.
Fluoreszenzmikroskop: Leica DC500	Leica Mikrosysteme Vertrieb, Bensheim, Dtl.
Gelelektrophorese: Gel <i>Jet Imager</i>	INTAS, Hamburg, Dtl.
Kombischüttler: Otto KL2	Gebrüder Buddeberg GmbH, Mannheim, Dtl.
Mikroskop: Leica DM IL	Leica Mikrosysteme Vertrieb, Bensheim, Dtl.
Neubauer Zählkammer (Kat.-Nr. 717806)	Firma Brand, Wertheim, Dtl.
PCR-Elektrophoresekammer Model B2	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Dtl.
PCR-Gerät: PTC-220 DNA Engine Dyad™ Peltier Thermal Cycler	MJ Research™, Boston, U.S.A.
Photometer: Bio Photometer	Eppendorf GmbH, Hamburg, Dtl.
Pipetten: Eppendorf Reference	Eppendorf GmbH, Hamburg, Dtl.
Pipettierhilfe: Pipetus-akku	Migge Laborbedarf-Vertrieb, Heidelberg, Dtl.
Real-Time RT-PCR-Thermo Cycler: ABI Prism 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt, Dtl.
Sterile Arbeitsbank: HERAsafe	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Dtl.
Ultratiefkühlschrank (-86 °C)	Sanyo Fischer GmbH, Schwerte, Dtl.
Vortex: Heidolph Reac control	Gebrüder Buddeberg GmbH, Mannheim, Dtl.
Wasserbad: Memmert	Heinse+Ziller, Würzburg, Dtl.
Zellkulturinkubator: HERAcell	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Dtl.
Zentrifuge: Biofuge Primo R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Dtl.

### 2.8.2 Spezielle Software

**Tabelle 2-21: Spezielle Software**

Software	Hersteller
AIDA 2.11 Software® (Densitometrie)	Raytest GmbH, Straubenhardt, Dtl.
Genesis Lite Software, ELISA Multiskan RC	Labsystems, Vantaa, Finnland
GraphPad Instat®	GraphPad Software, Inc., San Diego, U.S.A.
INTAS GDS® Gel Dokumentationssystem	INTAS, Hamburg, Dtl.
Microsoft® Office Paket	Microsoft GmbH, Dtl., Unterschleißheim, Dtl.
Sequence Detection Software Version 1.2.3.	Applied Biosystems, Darmstadt, Dtl.

### 2.8.3 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2-22: Verbrauchsmaterialien**

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Dreiwegehähne (Kat.-Nr. 394602)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Dtl.
Eppendorf T.I.P.S.	Eppendorf AG, Hamburg, Dtl.
FACS-Tube (Polystyren, Kat.-Nr. 4-2052-2)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Dtl.
Kabelbinder	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Dtl.
Kompressen, steril (Kat.-Nr. 12065)	Lohmann & Rauscher, Rengsdorf, Dtl.
Leukosep-Röhrchen (Kat.-Nr. 227290)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Dtl.
Mikrotiterplatten Nunc®	Nunc GmbH + Co.KG, Wiesbaden, Dtl.
Multiwell-Platte (12er, Kat.-Nr. 353046)	Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg, Dtl.
Nitrilhandschuhe	Semperit Technische Produkte GmbH, Wien, Österreich
Perfusorspritzen (50 ml, Kat.-Nr. 300136)	Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg, Dtl.
Petrischalen (10 cm, Kat.-Nr. 633171)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Dtl.
Pipetten (5, 10, 20 ml)	Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg, Dtl.
Reaktionsgefäße (RT- /Real-Time-RT-PCR)	Eppendorf GmbH, Hamburg, Dtl.
Skalpell (Einweg)	Produkte für die Medizin AG, Köln, Dtl.
Vinylhandschuhe	Meditrade GmbH, Kieferfeiden, Dtl.
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> )	Gebr. Buddeberg GmbH, Mannheim, Dtl.
Zellschaber (Einweg, Kat.-Nr. 353085)	Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg, Dtl.
Zellsieb (70 µm Porengröße)	Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg, Dtl.
Zentrifugationsröhrchen(Falcon 15ml, 50ml)	Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg, Dtl.

### 2.8.4 Kulturmedien und -zusätze

**Tabelle 2-23: Kulturmedien und -zusätze**

<b>Medium und Supplemente der HUVEC-Kulturen</b>	<b>Hersteller</b>
Anitbiotikum: Gentamicin (Kat.-Nr. C-42060)	PromoCell GmbH, Heidelberg, Dtl.
Antimykotikum: Amphotericin B (Kat.-Nr. C-42040)	PromoCell GmbH, Heidelberg, Dtl.
Endothelial cell basal medium (EBM-Medium; Kat.-Nr. C-22110)	PromoCell GmbH, Heidelberg, Dtl.
Supplemente Pack : (Kat.-Nr. C-39210)	PromoCell GmbH, Heidelberg, Dtl.
<b>Medium und Supplemente der Endothelialen Progenitorzell-Kulturen</b>	<b>Hersteller</b>
Antibiotikum: Gentamicin (Kat.-Nr. C-42060)	Promocell GmbH, Heidelberg, Dtl.
EGM bullet kit: (Kat.-Nr. CC-3124)	CellSystems, St. Katharinen, Dtl.
Fetales Kälberserum (Kat.-Nr. 10270-106)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Dtl.

## 2.8.5 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2-24: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Agarose-Pulver	Sigma®, Taufkirchen, Dtl.
Aqua dest. Spüllösung, steril (Kat.-Nr. EPM062F-605)	DeltaSelect GmbH, Dreieich, Dtl.
β-Mercaptoethanol (Kat.-Nr. M-3148)	Sigma®, Taufkirchen, Dtl.
Bicoll Separating Solution (Kat.-Nr. L6115)	Biochrom AG, Berlin, Dtl.
Bromphenolblau (1%)	Sigma®, Taufkirchen, Dtl.
BSA (20 mg/ml, Kat.-Nr. 711454)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Dtl.
Desinfektionsmittel: <i>Antifect Liquid</i>	Schülke u. Mayr, Norderstadt, Dtl.
Dil-Ac-LDL (Kat.-Nr. #4003)	CellSystems, St. Katharinen, Dtl.
Dispase-2-Lösung (Kat.-Nr. 295825)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNA-Exitus Plus™-Lösung (Kat.-Nr. A70891000)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Dtl.
„DNA ladder“ (100bp, Kat.-Nr. 15628-019)	Invitrogen, Merelbeke, Belgien
DNA-Polymerase, <i>E.coli</i> 10 U/μl (Kat.-Nr. 18010-025)	Invitrogen, Merelbeke, Belgien
dNTP Mix, 10 mM (Kat.-Nr. 18427-013)	Invitrogen, Merelbeke, Belgien
EDTA 0,5 M	Merck AG, Darmstadt, Dtl.
Ethanol (70 %)	J.T. Baker, Deventer, Holland
Ethidiumbromid, 10 mg/ml (Kat.-Nr. 15585-01)	Invitrogen, Merelbeke, Belgien
FcR Blocking Lösung (Kat.-Nr. 130-046-702)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Dtl.
Formaldehyd (4 %)	Sigma®, Taufkirchen, Dtl.
Gelatine Lösung 2%, Typ B (Kat.-Nr. G1393)	Sigma®, Taufkirchen, Dtl.
Humanes Fibronectin (1mg/ml, Kat.-Nr.F-0895)	Sigma®, Taufkirchen, Dtl.
H <sub>2</sub> O-DEPC (Diethylpyrocarbonat, Kat.-Nr. 9920)	Ambion, Huntington, U.K.
PBS (Dulbecco's w/o CaCl <sub>2</sub> und MgCl <sub>2</sub> ) (Kat.-Nr. 14190-094)	Invitrogen, Merelbeke, Belgien
PCR-Puffer (10x)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Recombinantes humanes aktiviertes Protein C (rhAPC = rgAPC, "research grade APC, non- human use"; LY203638, Lot-No: CT05358)	Eli Lilly, Indianapolis, U.S.A.
Reverse Transkriptase AMV („avian myeloblastis virus“, Kat.-Nr. 1495062)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Dtl.
RNase Inhibitor, 40 U/μl (Kat.-Nr. 10777-019)	Invitrogen, Merelbeke, Belgien
RT-Puffer (5 x)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
SDS (10 %, Sodiumdodecylsulfat)	Sigma®, Taufkirchen, Dtl.
Stop Lösung (ELISA)	R&D Systems, Wiesbaden, Dtl.
TAE-Puffer, 50x (Kat.-Nr. A1691)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Dtl.
Taq DNA-Polymerase (Kat.-Nr. 1146165)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Trypsin-EDTA-Lösung (Kat.-Nr. 25300-054)	Invitrogen, Merelbeke, Belgien

<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
TÜRK'S Solution (Kat.-Nr. 1.09277.0100)	Merck AG, Darmstadt, Dtl.
<i>Ulex europaeus</i> Agglutinin (Kat.-Nr. L-9006)	Sigma®, Taufkirchen, Dtl.
VEGF (= Rekombinantes humanes (rh) VEGF <sub>165</sub> ) (Kat Nr: 100-200, Lot #020410)	Cell Concepts, Umkirch, Dtl.

## 2.8.6 Antikörper

**Tabelle 2-25: Antikörper**

<b>Primär-Antikörper (direkt markiert)</b>	<b>Hersteller</b>
CD31-PE (Kat.-Nr. 555446) Maus (IgG1κ) anti human, monoklonal	BD Pharmingen, Heidelberg, Dtl.
CD34-PE (Kat.-Nr. 555822) Maus (IgG1κ) anti human, monoklonal	BD Pharmingen, Heidelberg, Dtl.
CD105-PE (Kat.-Nr. FAB10971P) Maus (IgG1κ) anti human, monoklonal	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Dtl.
CD133-FITC (Kat.-Nr. 363-040) Maus (IgG1) anti human, monoklonal	Hölzel Diagnostika, Köln, Dtl.
CD146-FITC (Kat.-Nr. MAB16985F) Maus (IgG1) anti human, monoklonal	Chemicon, Temecula, U.S.A
CD201 (EPCR)-PE (Kat.-Nr. 557950) Maus anti human, monoklonal	BD Pharmingen, Heidelberg, Dtl.
PAR-1 (ATAP-2)-PE (Kat.-Nr. sc-13503 PE) Maus anti human, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, U.S.A.
PAR-2 (SAM-11)-PE (Kat.-Nr. sc-13504 PE) Maus anti human, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, U.S.A.
vWF-FITC (Kat.-Nr. SP1313F) Schaf anti human, polyklonal	Acris-Antibodies, Hiddenhausen, Dtl.
<b>Primär-Antikörper (unmarkiert)</b>	<b>Hersteller</b>
EDG1 (S1P1) (Kat.-Nr. MAB2016) Maus (IgG2B) anti human, monoklonal	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Dtl.
VEGFR-2/KDR (Kat.-Nr. 101-M22) Maus anti human, monoklonal	ReliaTech GmbH, Braunschweig, Dtl.
<b>Sekundär-Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
FITC-Konjugat-IgG2B (Kat.-Nr. M32501) Ziege anti mouse, polyklonal	Caltag Laboratories, Burlingame, C.A., U.S.A, Vertrieb Invitrogen
IgG-FITC (Kat.-Nr. F 0261) Kaninchen anti Maus, polyklonal	DakoCytomation, Hamburg, Dtl.
<b>Isotypkontrollen</b>	<b>Hersteller</b>
FITC-Konjugat-IgG1 (Kat.-Nr. 556028) Maus anti human, monoklonal	BD Pharmingen, Heidelberg, Dtl.
Isotypkontrolle IgG1 -FITC (Kat.-Nr. 278-040) Maus anti human, monoklonal	Hölzel Diagnostika, Köln, Dtl.
Isotypkontrolle IgG1κ -PE (Kat.-Nr. 555749) Maus, anti human, monoklonal	BD Pharmingen, Heidelberg, Dtl.

## 2.8.7 Genspezifische Primer

**Tabelle 2-26: Genspezifische Primer**

Primer	Hersteller
Ang-2 human/Maus PCR Primer Pair (Kat.-Nr. RDP-52)	R&D Systems, Wiesbaden, Dtl.
oligo(dT)15-Primer, 25 µM (Kat.-Nr. 814270)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Dtl.
VEGF-C human/Maus PCR Primer Pair (Kat.- Nr. RDP-56)	R&D Systems, Wiesbaden, Dtl.
GAPDH: Sense Primer: 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3' Antisense Primer: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'	Applera Deutschland GmbH, Weiterstadt, Dtl.
PAR-1: Sense Primer: 5'-CAG TTT GGG TCT GAA TTG TGT CG-3' Antisense Primer: 5'-TGC ACG AGC TTA TGC TGC TGA C-3'	Applera Deutschland GmbH, Weiterstadt, Dtl.
PAR-2: Sense Primer: 5'-TGG ATG AGT TTT CTG CAT CTG TCC-3' Antisense Primer: 5'-CGT GAT GTT CAG GGC AGG AAT G-3'	Applera Deutschland GmbH, Weiterstadt, Dtl.
EPCR: Sense Primer: 5'-ATG TCT TCT TCG AAG TGG CTG-3' Antisense Primer: 5'-GAG TGC CGT TGT AGG CAT TG-3'	Applera Deutschland GmbH, Weiterstadt, Dtl.
S1P1 (EDG1): Sense Primer: 5'-GCA AGA ACA TTT CCA AGG CCA GCC-3' Antisense Primer:5'-GGG TGT GGG ATG TAC AGGGCATCC-3'	Applera Deutschland GmbH, Weiterstadt, Dtl.

## 2.8.8 Kommerziell erhältliche Reaktionskits

**Tabelle 2-27: Kommerziell erhältliche Reaktionskits**

Reaktionskit	Hersteller
<b>ELISA-Kit:</b>	
Human VEGF-C Immunoassay, Quantikine® (Kat.-Nr. DVEC00)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Dtl.
<b>Real-Time-PCR-Kits:</b>	
RT <sup>2</sup> ProfilerPCR Array System „Human Angiogenesis“: PAHS-024	SuperArray Bioscience, Frederick, U.S.A.
RT <sup>2</sup> ProfilerPCR Array System „Human Atherosclerosis“: PAHS-038	SuperArray Bioscience, Frederick, U.S.A..
<b>RNA-Extraktions-Kit:</b>	
RNesay Mini Kit (Kat.-Nr. 74106)	Qiagen GmbH, Hilden, Dtl.
RNase-free DNase Set (Kat.-Nr. 79254)	Qiagen GmbH, Hilden, Dtl.
<b>Zell-Isolations-Kit:</b>	
MACS Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit (Kat.-Nr. 130-046-702)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Dtl.

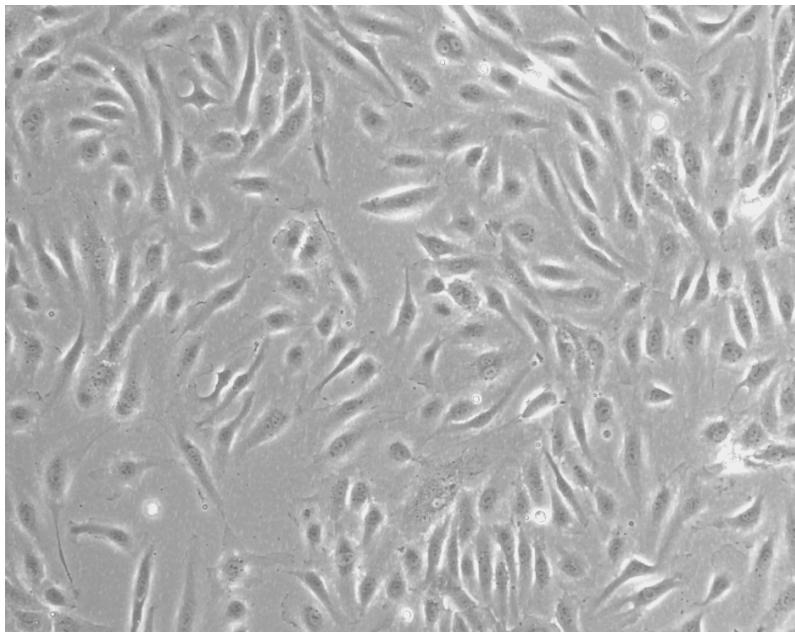
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Morphologie und Eigenschaften der isolierten Zellkulturen

##### 3.1.1 Zellmorphologie von HUVECs

Abbildung 3-1 zeigt aus der menschlichen Nabelvene (*Vena umbilicalis*) isolierte Endothelzellen („human umbilical vein endothelial cells“, HUVECs). Die Isolierung erfolgte nach der modifizierten Methode der Forschergruppe um Jaffe et al. (Jaffe et al., 1973). Die HUVECs wurden im supplementierten Endothelzell-Medium (siehe 2.1.1.2) kultiviert. Für die Experimente wurden Zellen der Passage 2 verwendet.

Die im Phasenkontrastmikroskop am Tag 3 nach der Präparation fotografierten HUVECs zeigen die typische Anordnung einschichtig gewachsener, spindelförmiger ECs.



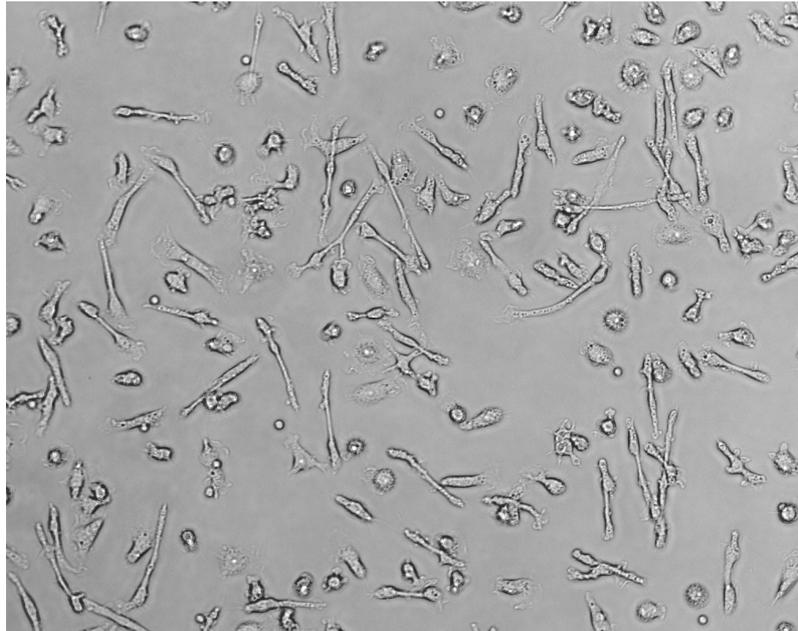
**Abbildung 3-1: Humane Endothelzellen aus der Nabelvene (*Vena umbilicalis*)**

HUVECs der ersten Passage, kurz vor der Konfluenz (Phasenkontrastmikroskop).

### 3.1.2 Zellmorphologie von EPCs

Abbildung 3-2 zeigt EPCs 4 Tage nach der Isolation. Die Zellen wurden aus einem „buffy coat“ über Ficoll-Dichtegradient-Zentrifugation (Ficoll-Isolierung, siehe 2.1.2.1) isoliert und in supplementiertem „endothelial basal medium“ (siehe 2.1.2.3) kultiviert.

Die am 4. Tag nach der Isolation fotografierten Zellen besitzen die charakteristische Morphologie früher EPCs, die von den Gruppen um Gulati und Hur als schmale, spindelförmige Zellen beschrieben wurden (Gulati et al., 2003; Hur et al., 2004).



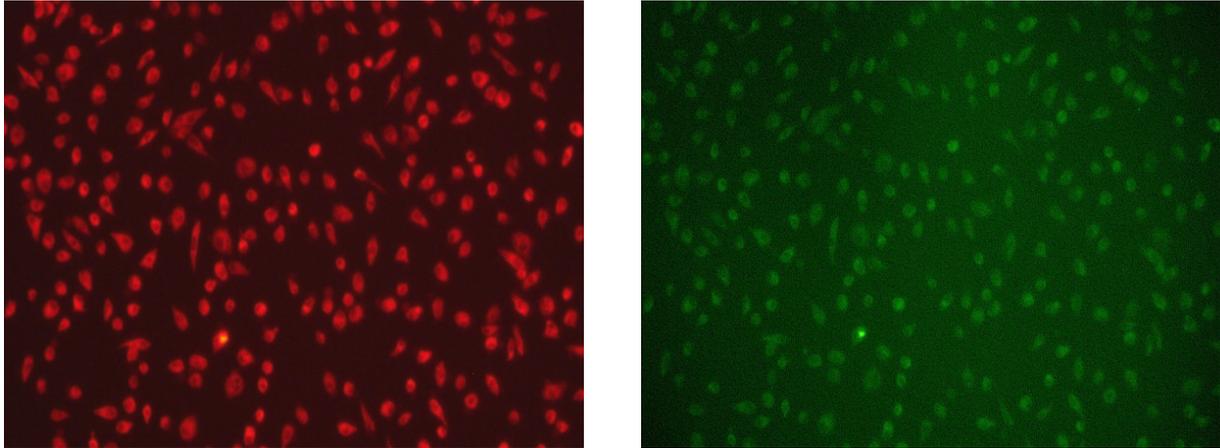
**Abbildung 3-2: EPCs, Ficoll-Dichtegradient-Zentrifugation aus „buffy coats“**

Zellmorphologie 4 Tage nach der Isolierung, (Phasenkontrastmikroskop)

### 3.1.3 Nachweis der Lipoprotein (LDL)-Aufnahme und der Lektin-Bindung der Ficoll-isolierten Zellen

Zur Identifizierung und Charakterisierung der über Ficoll isolierten Zellpopulation sollte überprüft werden, ob die Zellen charakteristische funktionale Eigenschaften (LDL-Aufnahme und Lektinbindung) endothelialer Progenitorzellen besitzen.

Nach Inkubation mit Fluorochrom-gekoppeltem LDL und -Lektin konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden, dass die isolierten Zellen das Lipoprotein LDL aufgenommen haben und die Lektin-Bindung an ihre Oberfläche erfolgte (Abbildung 3-3).



**Abbildung 3-3: Nachweis der LDL-Aufnahme und Lektin-Bindung zur Identifizierung von EPCs**

EPCs vier Tage nach der Ficoll-Isolierung, unter roter und grüner Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop fotografiert.

Links: Die Zellen haben LDL inkorporiert und zeigen die rote Fluoreszenz des Dil-Ac.

Rechts: Dieselben Zellen haben auch FITC-gekoppeltes Lektin gebunden und fluoreszieren grün.

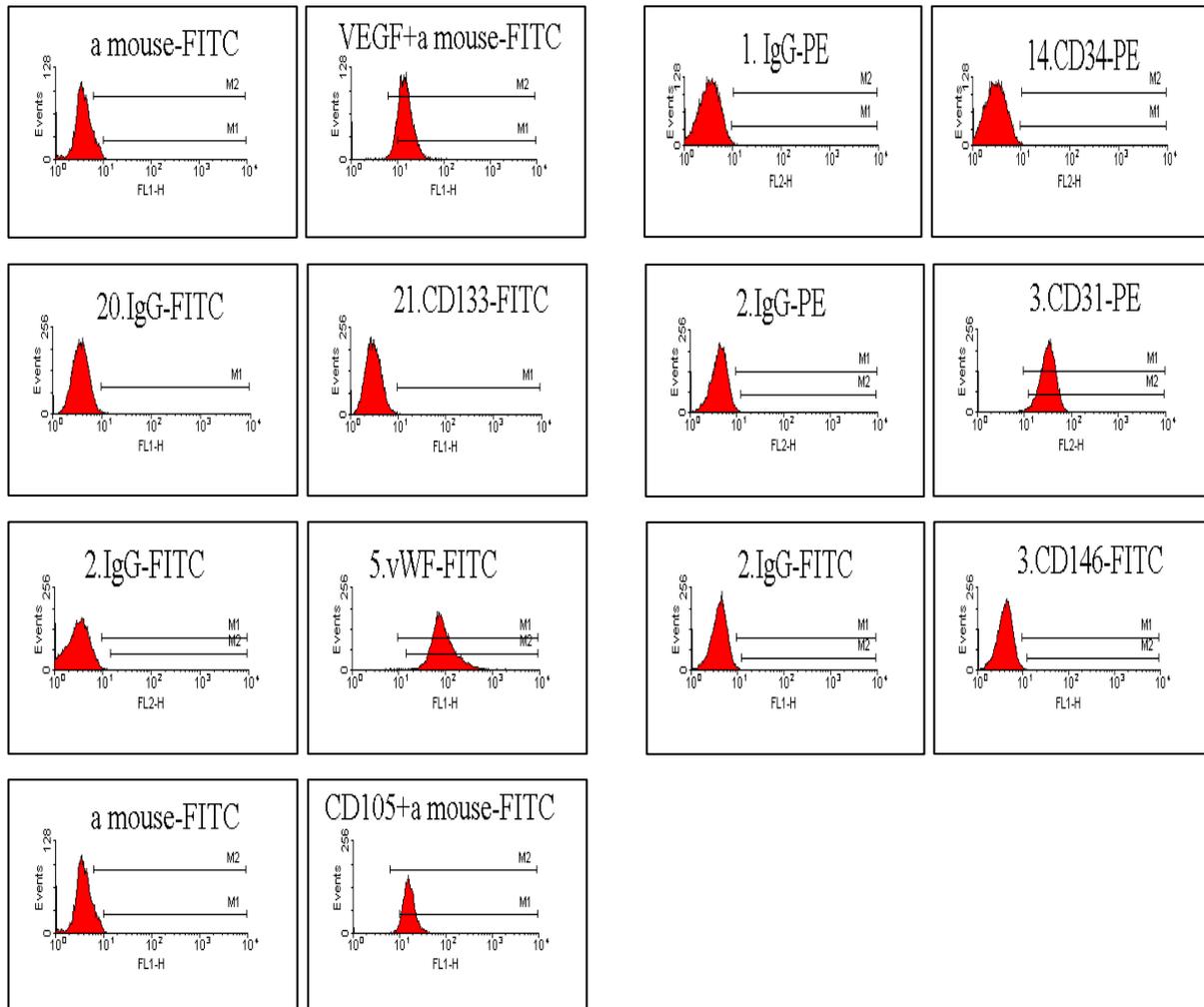
### **3.2 Charakterisierung der EPCs und HUVECs anhand spezifischer Oberflächenstrukturen in der FACS-Analyse**

Um die Identität der EPCs zu bestätigen, wurden charakteristische Oberflächenmoleküle dieser Zellen mittels FACS-Analyse nachgewiesen. Ob eine Differenzierung in die gewünschte Progenitorzelllinie stattgefunden hat, wurde am Vorhandensein der spezifischen Oberflächenmarker **VEGFR-2**, **CD34**, **CD133**, **CD31**, **CD105** und **vWF** überprüft. Die Zellen wurden zudem auf das Adhäsionsmolekül **CD146** getestet.

In den FACS-Messungen wurden EPC-Populationen, die über zwei verschiedene Isolationstechniken gewonnen wurden, miteinander verglichen. So wurden zum einen über Ficoll-Dichtegradient-Zentrifugation isolierte Zellen (siehe 2.1.2.1) und zum anderen mit „CD34-microbeads“ angereicherte Zellen (siehe 2.1.2.2) untersucht.

Der Marker CD34 wurde weitaus stärker in der angereicherten Zellfraktion exprimiert als in Zellen nach alleiniger Ficoll-Isolierung. Die CD34-angereicherten EPCs zeigten sich zudem CD133-positiv, während die Ficoll-isolierten EPCs den Marker CD133 nur sehr schwach exprimierten. Die EPC-Oberflächenmoleküle VEGFR-2, CD31 und vWF konnten jedoch bei beiden Isolationsvarianten in vergleichbaren Ausprägungen nachgewiesen werden (CD105 nur in Ficoll-Isolierung getestet). Das Adhäsionsmolekül CD146 wurde von beiden Zellpopulationen nur sehr schwach bzw. nicht exprimiert (Abb. 3-4 bis 3-6; Tab. 3-1).

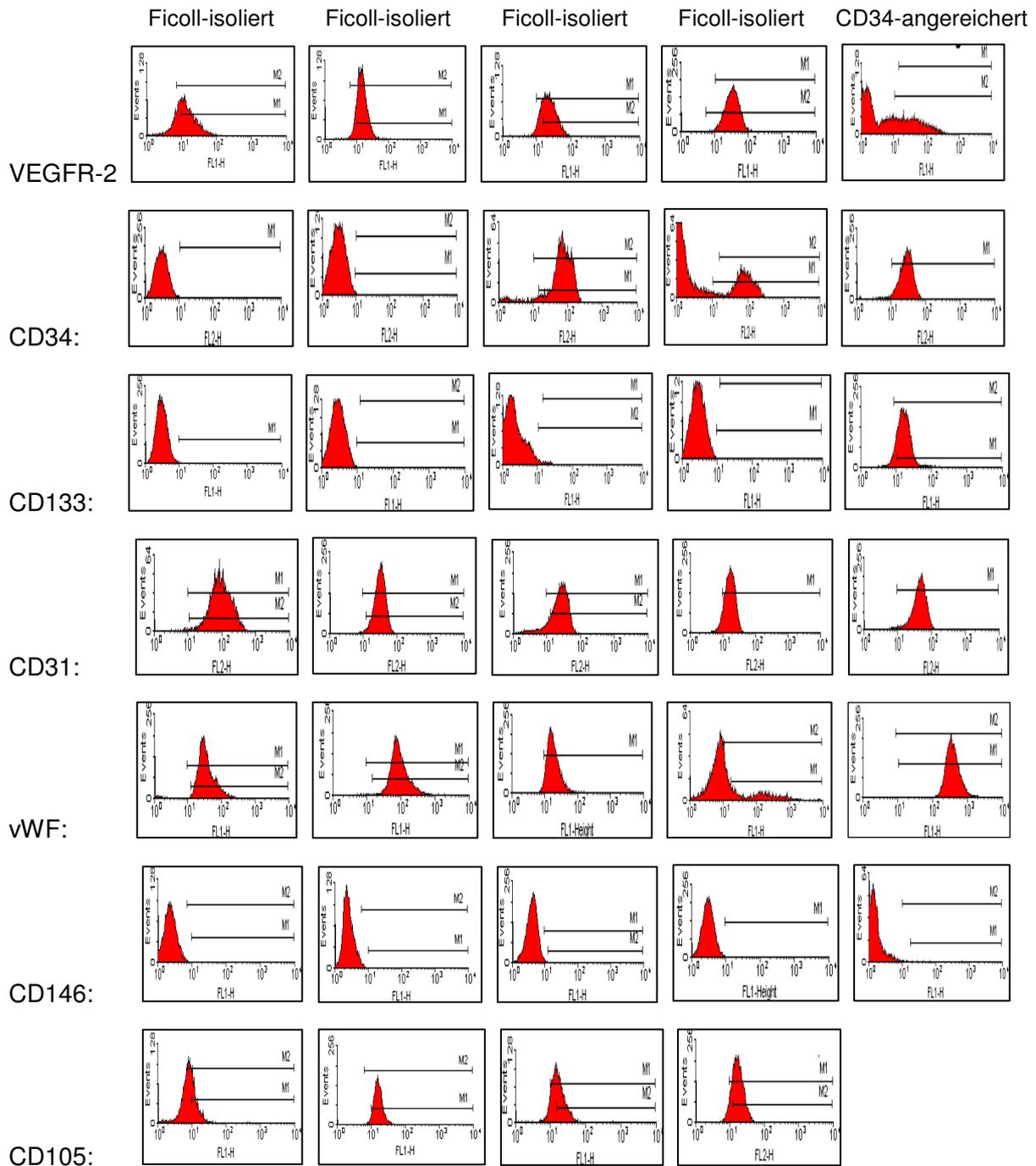
Für die weiteren Experimente wurden herkömmlich über Ficoll isolierte Zellen eingesetzt, da die Zellausbeute nach CD34-Anreicherung zu gering war. Auch HUVECs wurden per FACS-Analyse untersucht. Es sollte ermittelt werden, inwieweit sich die Oberflächenexpressionsprofile von EPCs und HUVECs überschneiden bzw. voneinander abgrenzen. Es konnte nachgewiesen werden, dass HUVECs den Marker CD146 exprimieren (Abb. 3-7), nicht jedoch CD133. Die Oberflächenantigene VEGFR-2, CD34, CD31, CD105 und vWF wurden gleichermaßen von HUVECs und Ficoll-isolierten EPCs exprimiert (nicht abgebildet).



**Abbildung 3-4: FACS: Expression von Oberflächenmolekülen mit zugehörigen Isotypkontrollen (EPCs nach Ficoll-Isolierung)**

Die Fluoreszenz (x-Achse) wird gegen die Zellzahl (y-Achse) dargestellt, wobei M1 den Schwellenwert ( $10^1$ ) Fluoreszenz-positiver Zellen anzeigt. Der M2-Wert wird durch die Messung einer Isotypkontrolle ermittelt. Zeigt die Isotypkontrolle positive Fluoreszenz, so handelt es sich um unspezifische Bindungen. M2 gibt die optimierte Prozentzahl positiver Zellen an, da hier die Hintergrundfluoreszenz berücksichtigt wurde.

FACS-Histogramme der Moleküle VEGFR-2, CD34, CD133, CD31, vWF, CD146 und CD105 mit jeweils zugehöriger Isotypkontrolle. Markierung mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC bzw. PE. (VEGF im Histogramm = VEGFR-2).

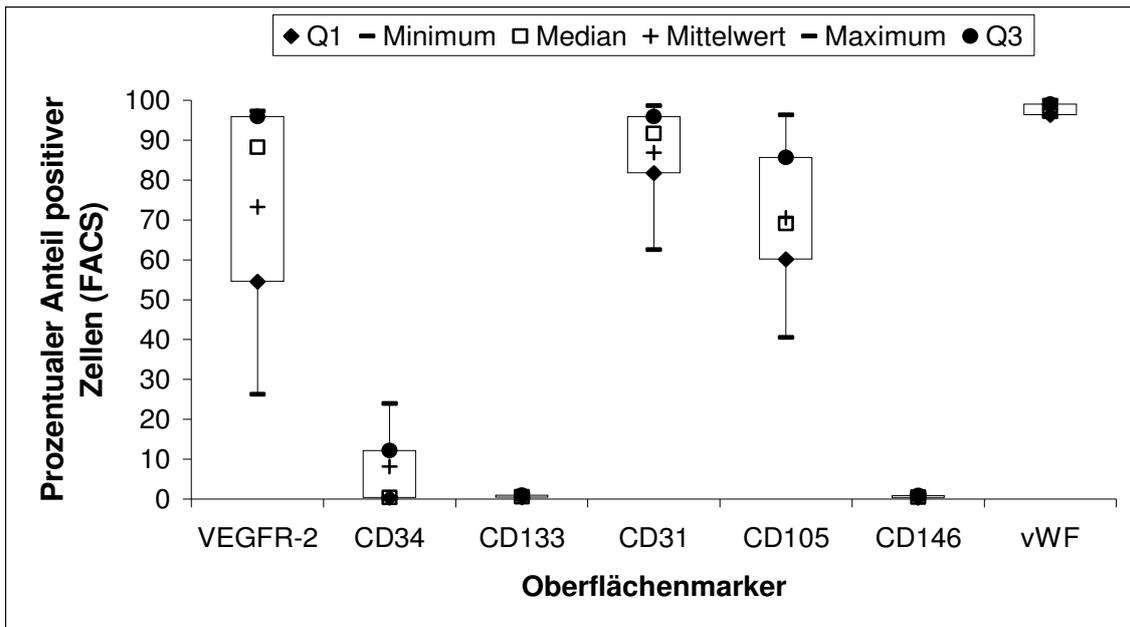


**Abbildung 3-5: FACS: Expression von Oberflächenmolekülen (Überblick, EPCs)**

Spalten 1-4 links: Ficoll-isolierte Zellen waren positiv für VEGFR-2/KDR, CD34, CD31, vWF und CD105. CD133 und CD146 wurden sehr schwach bzw. nicht exprimiert.

Rechte Spalte: CD34-angereicherte EPCs exprimierten CD34 stärker und waren darüber hinaus CD133-positiv, bei vergleichbarer Expression aller weiteren Marker (CD105 nicht gemessen).

Repräsentative FACS-Histogramme aus Messungen von 18 Spendern (n = mind. 5 verschiedene Spender pro Oberflächenmarker). Die jeweils zugehörigen Isotypkontrollen sind als M2-Wert in den Histogrammen erkennbar. M1 ist der Schwellenwert fluoreszenz-positiver Zellen. (EPCs 4 Tage nach Isolierung).



**Abbildung 3-6: FACS: Prozentualer Anteil positiver Zellen (Box-Blot-Darstellung, EPCs nach Ficoll-Isolierung)**

EPCs wurden mit Antikörpern markiert, die spezifisch an charakteristische EPC-Oberflächenstrukturen binden (VEGFR-2/KDR, CD34, CD133, CD31, CD105, CD146, vWF). Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgte mittels FACS-Analyse.

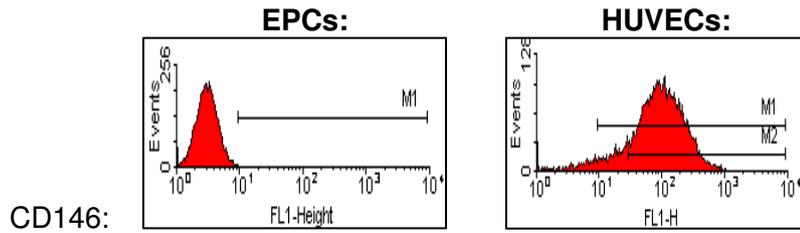
Die untersuchten Marker wurden bei Ficoll-isolierten EPCs in relativ konstanter Ausprägung exprimiert. CD133 und das Adhäsionsmolekül CD146 wurden von Ficoll-isolierten EPCs nur sehr schwach bzw. nicht exprimiert.

Dargestellt ist die Prozentzahl positiver, d.h. Marker-exprimierender Zellen (n = mind. 5 verschiedene Spender je Oberflächenmarker, Q1 = 25%-Quartil, Q3 = 75%-Quartil).

**Tabelle 3-1: FACS: Prozentualer Anteil positiver Zellen (EPCs, Ficoll-Isolation)**

Marker	Mittelwert	Median
VEGFR-2	73,2 %	88,2 %
CD34	8,2 %	0,4 %
CD133	0,7 %	0,6 %
CD31	77 %	90 %
CD105	71 %	69 %
CD146	0,6 %	0,5 %
vWF	97 %	96,5 %

Tabellarische Darstellung der positiven, Marker-exprimierenden Zellen (Mittelwert und Median, n = mind. 5 Spender je Oberflächenmarker).

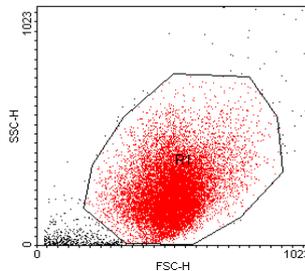


**Abbildung 3-7: FACS-Darstellung von CD146 (EPCs und HUVECs im Vergleich)**

Abgrenzung zwischen „frühen“ EPCs (4 Tage nach der Isolierung) und HUVECs anhand des Oberflächenmoleküls CD146:

Links: „Frühe“ EPCs waren CD146-negativ bzw. nur sehr schwach positiv

Rechts: HUVECs exprimieren das Adhäsionsmolekül CD146 auf ihrer Zelloberfläche



**Abbildung 3-8: Endotheliale Progenitor-Zellpopulation (FACS)**

Darstellung einer EPC-Population (rot). Die Population wird mit einem „gate“ abgegrenzt, um eine Miterfassung von Zelldebris (schwarz) in der FACS-Messung zu vermeiden.

### **3.3 Nachweis der Expression der Rezeptoren PAR-1, PAR-2, EPCR (CD201) und S1P1 (EDG-1) bei EPCs mittels RT-PCR**

Um die Wirkung von rhAPC auf EPCs nachzuweisen, wurde zunächst ermittelt, ob EPCs die für die APC-Signaltransduktion relevanten Rezeptoren exprimieren. Zudem sollte der Zeitpunkt der maximalen physiologischen Rezeptorexpression unter Kulturbedingungen bestimmt werden.

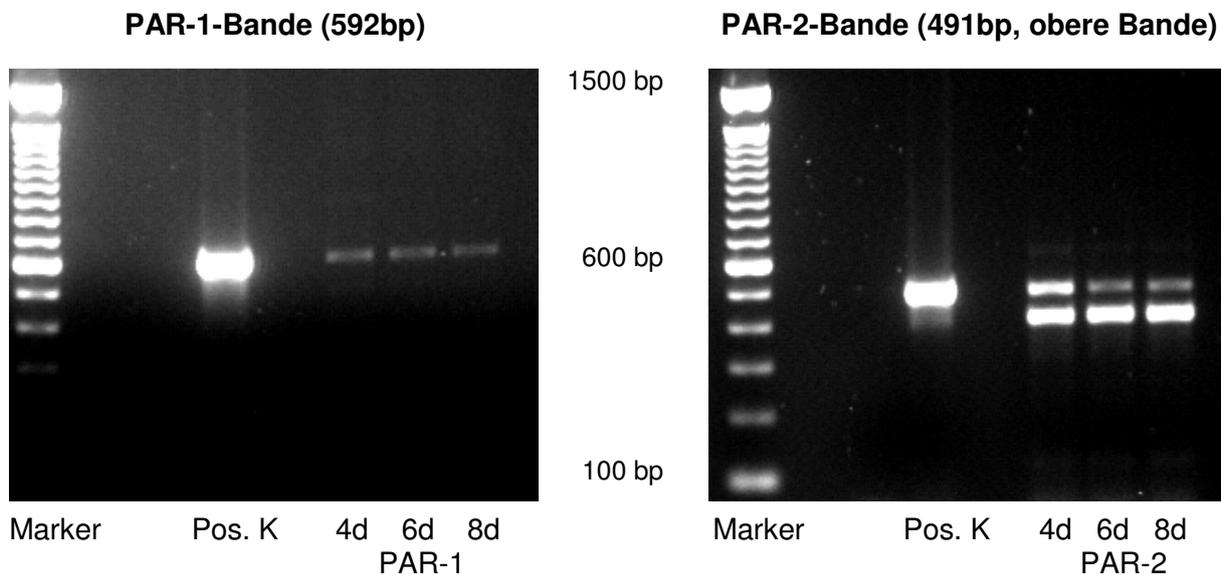
Für jeden der untersuchten Rezeptoren wurden Zellen von 2 unterschiedlichen Spendern verwendet. Die mRNA unstimulierter EPCs wurde jeweils 4, 6 und 8 Tage nach der Zellisolierung extrahiert. Nach Durchführung der RT-PCR mit anschließender Gelelektrophorese konnte die mRNA von allen vier APC-relevanten Rezeptoren in EPCs nachgewiesen werden.

Im Agarose-Gel waren die Banden jeweils auf der für die verwendeten Primer spezifischen Basenpaar-Höhe lokalisiert (PAR-1: 592 bp, PAR-2: 491 bp, EPCR: 141 bp und S1P1: 888 bp).

Die Ermittlung der physiologischen Expressionsstärke diente als Grundlage für nachfolgende Stimulationsversuche, in denen die Auswirkung von rhAPC auf die Expression APC-relevanter Rezeptoren in EPCs untersucht werden sollte.

Maximale Expressionsraten zeigten sich in unstimulierten EPCs bei den Rezeptoren PAR-2 und EPCR sowie in schwächerem Maße auch bei PAR-1 am 4. Tag nach der Zell-Isolierung (Abbildung 3-9 und 3-10). Die Expression des Rezeptors S1P1 (EDG-1) unterlag keinen erkennbaren zeitabhängigen Veränderungen (Abbildung 3-10).

Für die folgenden Experimente wurde daher der 4. Tag nach der Zell-Isolierung als Stimulationstag gewählt.

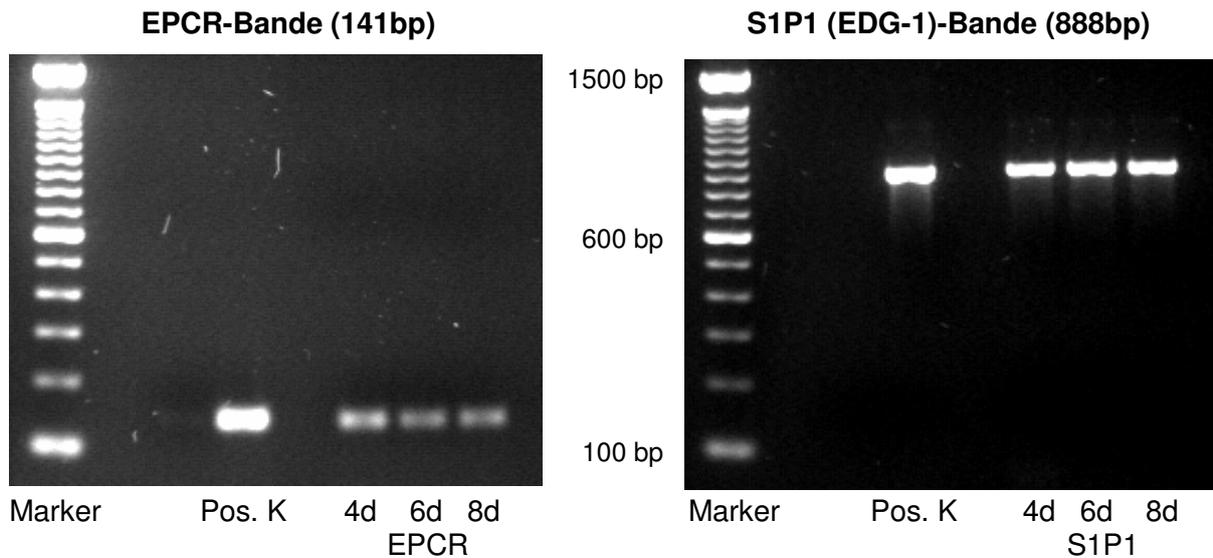


**Abbildung 3-9: Nachweis der PAR-1- und PAR-2-mRNA in EPCs (RT-PCR)**

EPCs exprimieren konstitutiv die mRNA der Rezeptoren PAR-1 und PAR-2. Repräsentative Ergebnisse aus je zwei Experimenten mit unterschiedlichen Spendern (Marker = Längenstandard, Pos. K = Positivkontrolle).

Links: Nachweis der PAR-1-mRNA (592bp); Expressionsmaximum tendenziell am 4. Tag nach der Isolierung.

Rechts: Nachweis der PAR-2-mRNA (491bp, obere Bande); Expressionsmaximum am 4. Tag nach der Isolierung.



**Abbildung 3-10: Nachweis der EPCR- und S1P1-mRNA in EPCs (RT-PCR)**

EPCs exprimieren die mRNA der Rezeptoren EPCR (CD201) und S1P1 (EDG-1). Repräsentative Ergebnisse aus je zwei vergleichbaren Experimenten mit unterschiedlichen Spendern (Marker = Längenstandard, Pos. K = Positivkontrolle).

Links: EPCR-mRNA (141bp); Expressionsmaximum am 4. Tag nach der Isolierung.

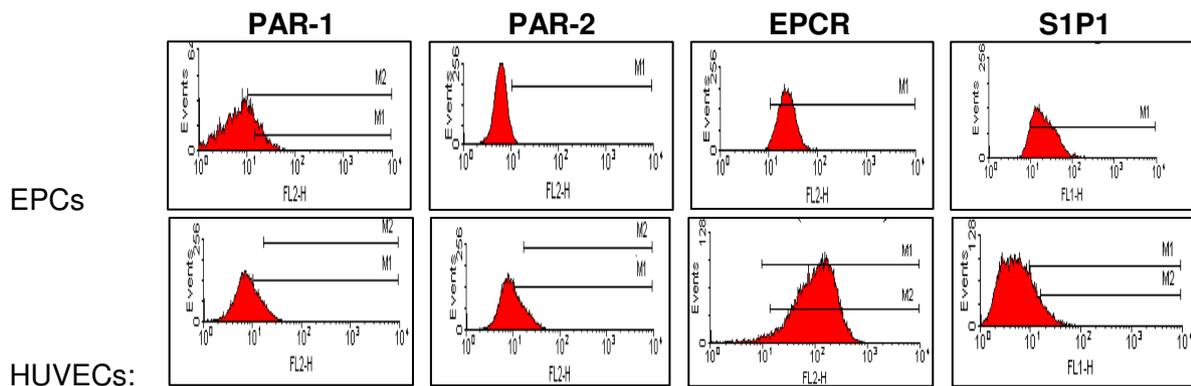
Rechts: Nachweis der S1P1-mRNA (888 bp); keine zeitabhängigen Expressionsunterschiede erkennbar.

### 3.4 Nachweis der Rezeptoren PAR-1, PAR-2, EPCR und S1P1 auf der EPC- und HUVEC-Zelloberfläche mittels FACS-Analyse

Nachdem die Expression der APC-relevanten Rezeptoren bei EPCs auf Genebene nachgewiesen wurde, sollte ihre Existenz auch auf der EPC-Oberfläche bestätigt werden.

In der FACS-Analyse konnte bewiesen werden, dass EPCs die Rezeptoren PAR-1, EPCR (CD201) und S1P1 (EDG1) konstitutiv auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Der Rezeptor PAR-2 konnte nicht auf der EPC-Oberfläche detektiert werden bzw. lieferte nur ein sehr schwaches positives Signal (Abbildung 3-11).

Zum Vergleich der Rezeptoren-Expression zwischen EPCs und HUVECs wurde auch eine FACS-Untersuchung bei HUVECs durchgeführt. Hierbei wurde bestätigt, dass HUVECs alle vier APC-relevanten Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, wobei ähnliche Expressionsstärken bei EPCs und HUVECs (PAR-2 stärker auf HUVECs nachweisbar) festgestellt wurden (Abbildung 3-11).



**Abbildung 3-11: Rezeptorennachweis auf EPCs und Vergleich mit HUVECs (FACS)**

Obere Reihe: Die Rezeptoren PAR-1, EPCR und S1P1 werden auf der Zelloberfläche von EPCs exprimiert. Der Rezeptor PAR-2 zeigte kaum nachweisbare Fluoreszenz.

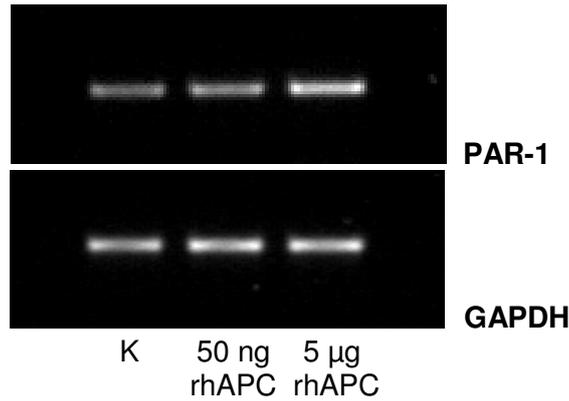
Untere Reihe: Ähnliche Ausprägung der untersuchten Rezeptoren auf der HUVEC-Oberfläche im Vergleich zu EPCs (PAR-2 stärker von HUVECs exprimiert).

Maximale Expressionen unterschiedlicher Spender (EPCs:  $n = 5$ , HUVECs:  $n = 3$ ). Die zugehörigen Isotypkontrollen sind nicht abgebildet, aber als M2-Wert in den Histogrammen dargestellt. Bei fehlendem M2-Wert entspricht der M1-Wert dem M2-Wert.

### 3.5 Wirkung der rhAPC-Stimulation auf die Rezeptorenexpression bei EPCs

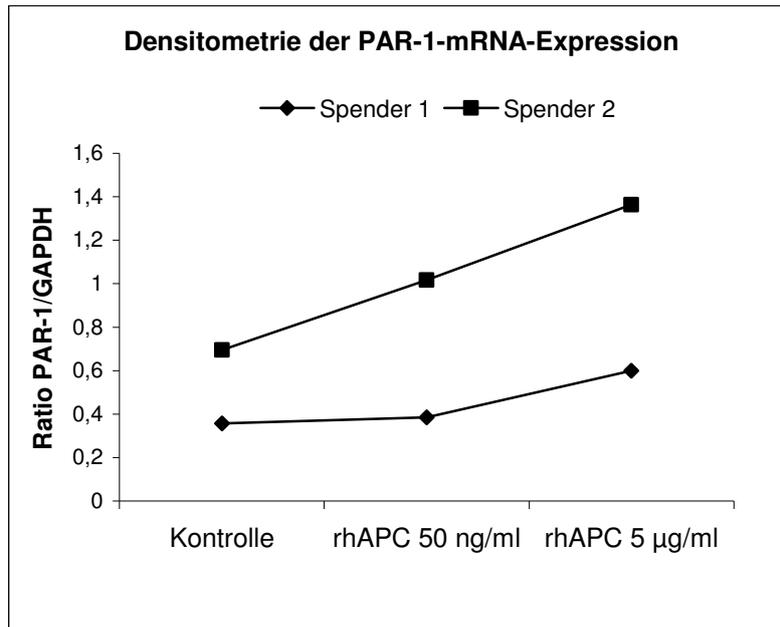
In Stimulationsversuchen wurde überprüft, ob rhAPC (50 ng/ml, 5  $\mu$ g/ml, 6 h) einen Einfluss auf die Expressionsraten der Rezeptoren PAR-1, PAR-2, EPCR und S1P1 in EPCs ausübt. In den Experimenten wurden EPCs von 2 bis 4 Spendern pro Rezeptor eingesetzt. Als Kontrollzellen wurden unten den gleichen Bedingungen kultivierte, unstimulierte EPCs verwendet. Mittels RT-PCR und elektrophoretischer Auftrennung im Agarose-Gel wurden die Expressionsraten der Rezeptoren ermittelt und danach densitometrisch ausgewertet.

Die Genexpression des Rezeptors PAR-1 zeigte sich nach Stimulation mit rhAPC im Vergleich zur Kontrolle bei beiden rhAPC-Konzentrationen erhöht. Hierbei bestand eine Korrelation zwischen der rhAPC-Konzentration und der Expressionsstärke (Abbildung 3-12 und 3-13). Da jedoch nur 2 Versuchsergebnisse vorliegen, wurde auf eine statistische Auswertung der Ergebnisse verzichtet. Auf die Expressionsraten der Rezeptoren PAR-2, S1P1 (Ergebnisse nicht dargestellt) und EPCR (Abbildung 3-14) übte die Stimulierung mit rhAPC keinen erkennbaren Einfluss aus.



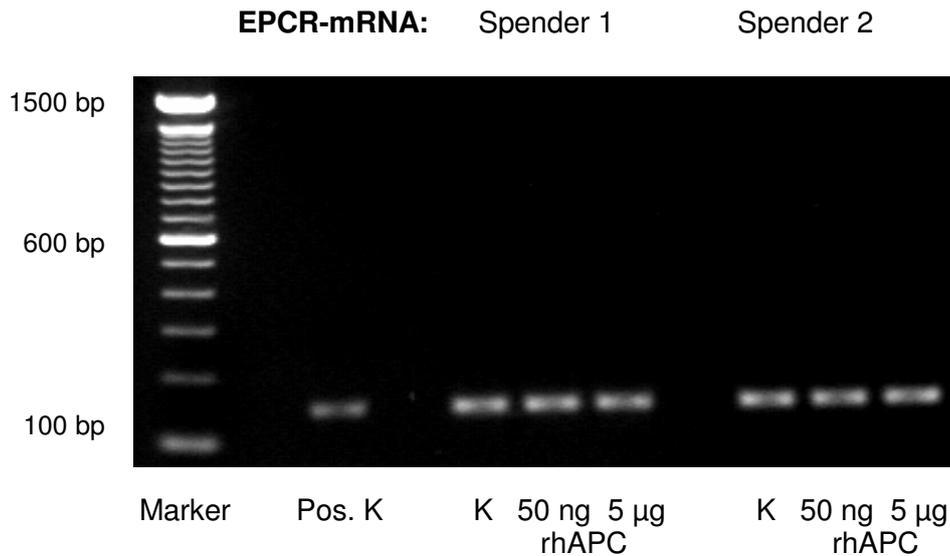
**Abbildung 3-12: RT-PCR für PAR-1-mRNA nach Stimulation mit rhAPC (EPCs)**

RhAPC (50 ng/ml und 5 µg/ml, Inkubation 6 h) steigert die mRNA-Expression des Rezeptors PAR-1 in EPCs, bei konstanter Expression des „housekeeping“ Gens GAPDH. Repräsentatives Ergebnis aus n = 2 vergleichbaren Untersuchungen mit unterschiedlichen Spendern (K = Kontrolle, unstimulierte EPCs).



**Abbildung 3-13: Densitometrische Auswertung der PAR-1-mRNA-Expression (EPCs)**

Die Stimulation mit rhAPC (50 ng/ml und 5 µg/ml; Inkubation 6 h) steigert in EPCs die mRNA-Expression des Rezeptors PAR-1 im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen. Dargestellt sind die Ergebnisse von 2 unterschiedlichen Spendern.



**Abbildung 3-14: RT-PCR für EPCR-mRNA nach Stimulation mit rhAPC (EPCs)**

RhAPC (50 ng/ml und 5 µg/ml, Inkubation 6 h) zeigt keinen Einfluss auf die Expression der EPCR-mRNA in EPCs. Dargestellt sind 2 repräsentative RT-PCR-Ergebnisse aus  $n = 4$  vergleichbaren Versuchen mit verschiedenen Spendern (Marker = Längenstandard, Pos. K = Positivkontrolle).

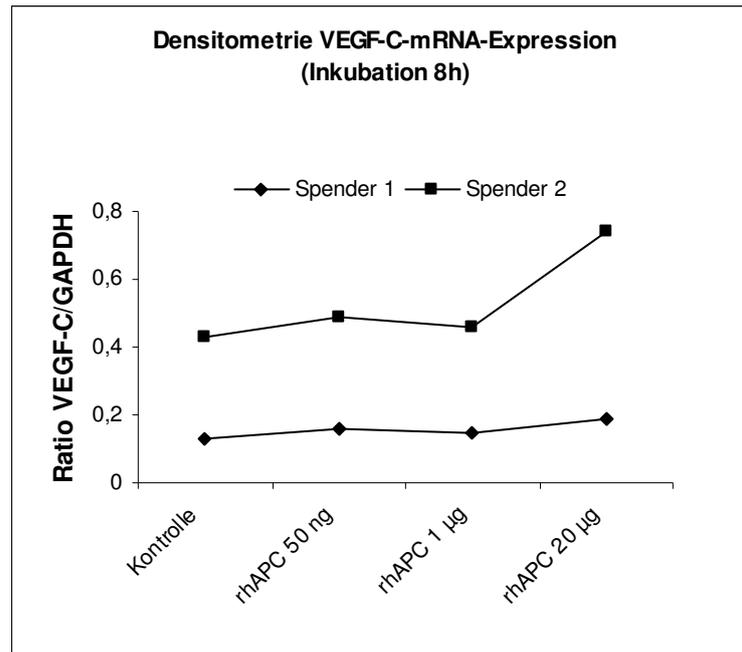
### 3.6 Wirkung von rhAPC auf die VEGF-C-mRNA-Expression bei HUVECs (RT-PCR)

HUVECs der 2. Passage wurden mit rhAPC in den Konzentrationen 50 ng/ml, 1 µg/ml und 20 µg/ml (Inkubation 4, 8 und 24 h) stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte HUVECs. Der RT-PCR-Versuch wurde mit Zellen von  $n = 2$  Spendern durchgeführt.

Die VEGF-C-Banden befanden sich im Elektrophorese-Gel primerspezifisch auf der Höhe von 409 bp. Die Bandenhöhe von GAPDH lag bei 452 Basenpaaren. Nach optischem Vergleich der Bandenstärken wurde eine densitometrische Quantifizierung mit Normalisierung auf das „housekeeping“-Gen GAPDH durchgeführt.

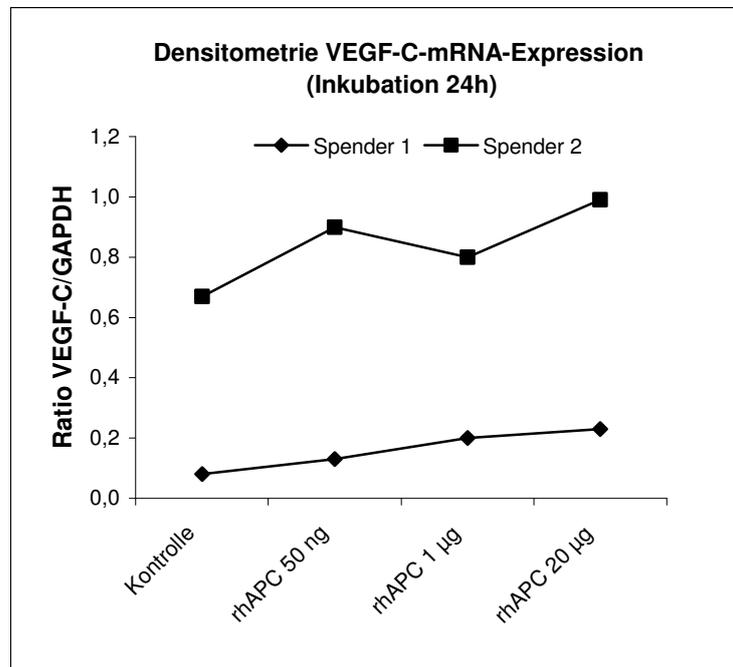
Da die Versuche eine in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (Affymetrix-Array, siehe 2.4.2) festgestellte Steigerung der endothelialen VEGF-C-mRNA-Expression in Abhängigkeit von rhAPC bestätigen, blieb die Versuchszahl auf  $n = 2$  beschränkt.

Die Auswertung erfolgt deskriptiv: Nach 4-stündiger Inkubation konnte noch keine eindeutige Wirkung von rhAPC festgestellt werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Zum Stimulationszeitpunkt 8 Stunden zeigte sich bei beiden Spendern ein Anstieg der VEGF-C-mRNA-Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (rhAPC 50 ng/ml vs. Kontrolle: geringer Anstieg; rhAPC 20 µg/ml vs. Kontrolle: starker Anstieg, Abbildung 3-15). Die 24-Stunden-Stimulation zeigte bei den Konzentrationen rhAPC 50 ng/ml und 5 µg/ml ebenfalls einen steigenden Einfluss auf die Expression von VEGF-C (Abbildung 3-16).



**Abbildung 3-15: Densitometrische Auswertung der RT-PCR für VEGF-C-mRNA (HUVECs, Inkubation 8 h)**

Eine Stimulation mit rhAPC (50 ng/ml, 1 µg/ml und 20 µg/ml; Inkubation 8 h) führt zum dosisabhängigen Anstieg der Expression der VEGF-C-mRNA bei HUVECs.



**Abbildung 3-16: Densitometrische Auswertung der RT-PCR für VEGF-C-mRNA (HUVECs, Inkubation 24 h)**

RhAPC (50 ng/ml, 1 µg/ml und 20 µg/ml; Inkubation 24 h) bewirkt einen dosisabhängigen Anstieg der VEGF-C-mRNA-Expression bei HUVECs. Die Expressionssteigerung zeigt einen vergleichbaren Kurvenverlauf wie zum 8-Stunden Zeitpunkt.

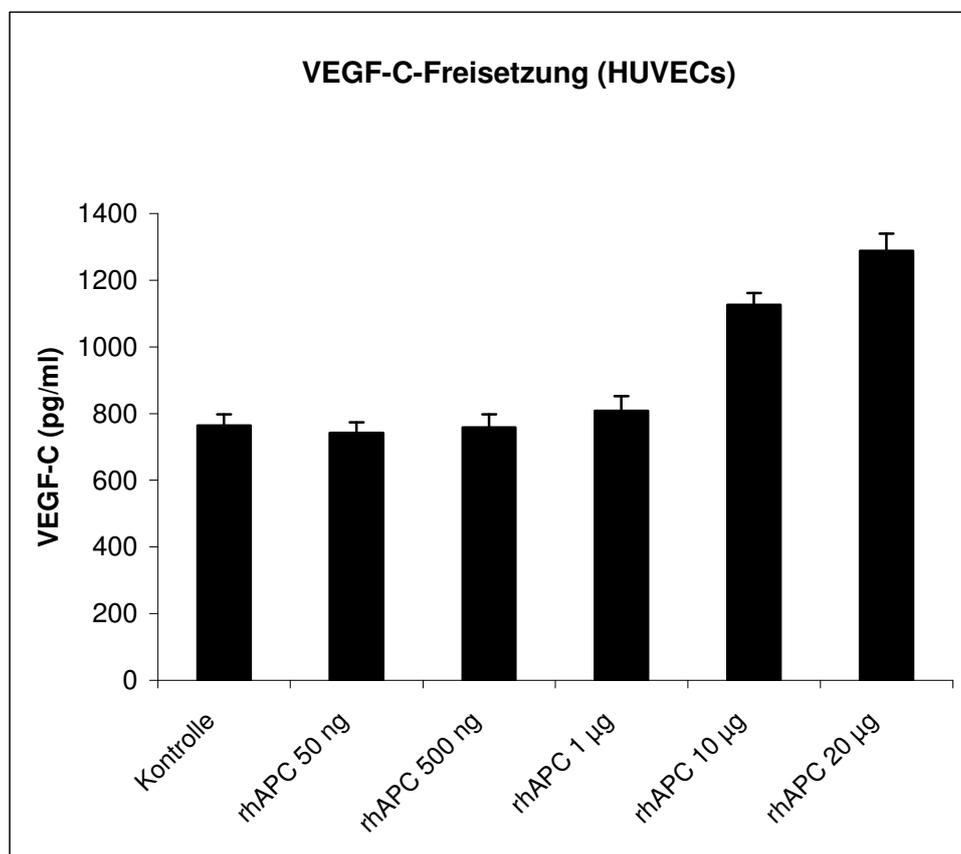
### 3.7 Wirkung von rhAPC auf die endotheliale VEGF-C-Freisetzung (ELISA)

#### 3.7.1 Dosisabhängigkeit

In diesem Versuch wurde der Einfluss verschiedener rhAPC-Dosierungen (50 ng/ml, 500 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 24 h) auf die Freisetzung des Wachstumsfaktors VEGF-C bei HUVECs untersucht. Es sollte überprüft werden, ob sich die rhAPC-abhängige Expressionssteigerung der VEGF-C-mRNA (siehe 3.6) auch in einer vermehrten Synthese auf Proteinebene widerspiegelt. Unstimulierte HUVECs dienen als Kontrolle (n = 2).

Der VEGF-C-Gehalt in den Zellüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit der Genesis Lite Software (Labsystems, Vantaa, Finnland).

Für die Dosierungen rhAPC 10 µg/ml und 20 µg/ml wurde eine Zunahme der VEGF-C-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle festgestellt (deskriptive Auswertung) (Abbildung 3-17).



**Abbildung 3-17: Dosisabhängige Steigerung der VEGF-C-Freisetzung durch rhAPC (HUVECs, ELISA)**

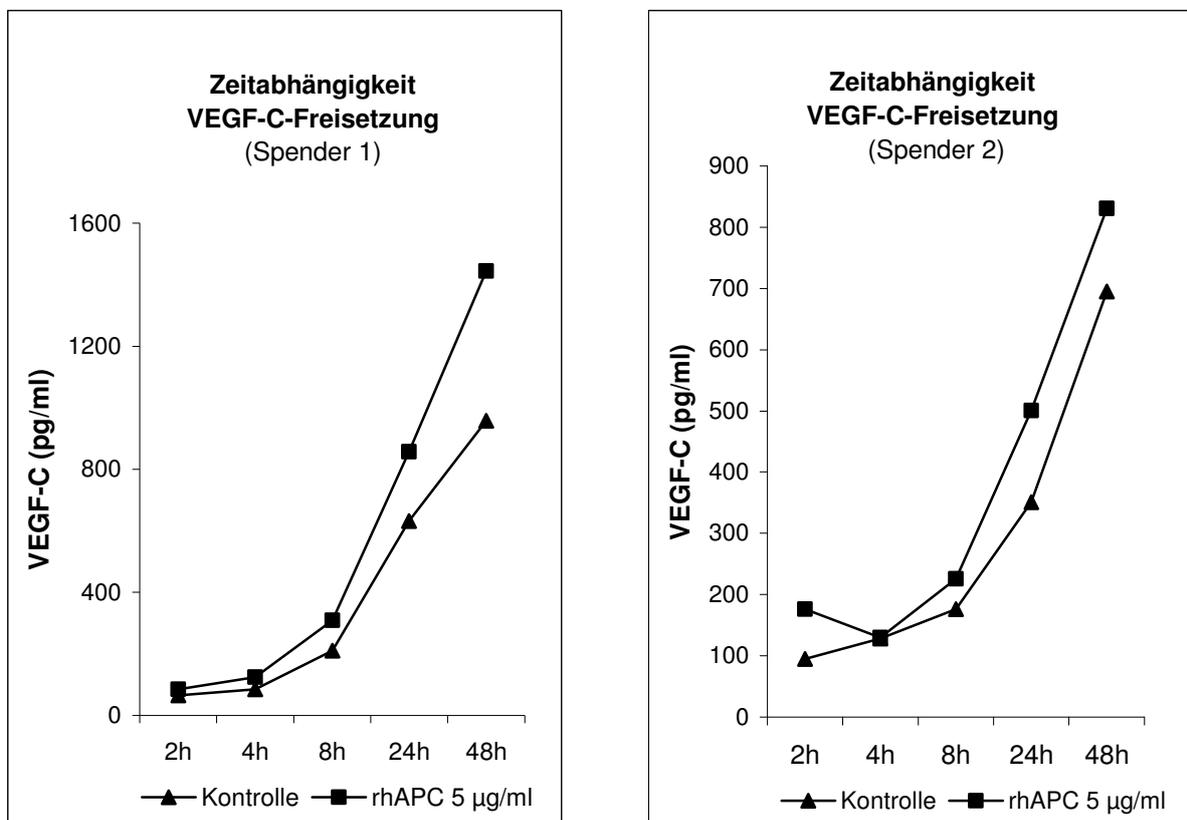
RhAPC (10 µg/ml und 20 µg/ml) steigert die endotheliale Freisetzung von VEGF-C. HUVECs wurden mit rhAPC (50 ng/ml - 20 µg/ml, 24 h) inkubiert und der VEGF-C-Gehalt des Zellüberstandes mittels ELISA quantitativ bestimmt.

Repräsentatives Ergebnis aus n = 2 Untersuchungen mit unterschiedlichen Spendern.

### 3.7.2 Zeitabhängigkeit

In weiteren Stimulationsversuchen wurde der Zeitverlauf der festgestellten rhAPC-induzierten VEGF-C-Freisetzung untersucht. HUVECs wurden mit einer konstanten rhAPC-Konzentration (5 µg/ml) für 2, 4, 8, 24 und 48 Stunden stimuliert und als Kontrollgruppe unstimulierte HUVECs verwendet. Der Versuch wurde zweimal an Zellen von  $n = 2$  verschiedenen Spendern durchgeführt.

Im Zellüberstand wurde ein von der Dauer der Stimulationszeit abhängiger Anstieg des VEGF-C-Gehaltes festgestellt. Auch in den unstimulierten Kontroll-HUVECs wurde ein Anstieg der VEGF-C-Freisetzung mit steigender Inkubationsdauer verzeichnet. Die VEGF-C-Freisetzung unter rhAPC-Stimulation war jedoch zu jedem Untersuchungszeitpunkt höher als in der unbehandelten Kontrolle (deskriptive Auswertung) (Abbildung 3-18).



**Abbildung 3-18: Wirkung von rhAPC auf die VEGF-C-Freisetzung im Zeitverlauf (HUVECs, ELISA)**

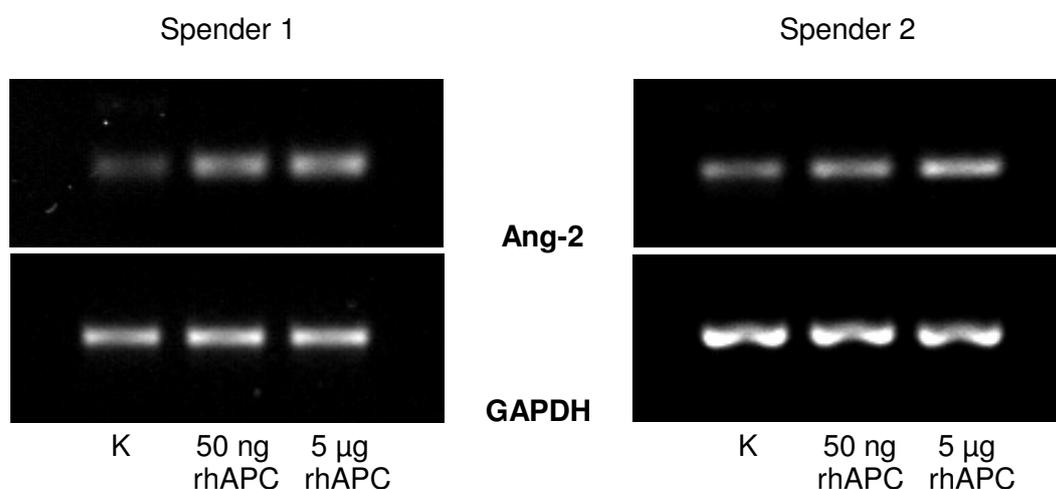
Die Stimulation mit rhAPC (5 µg/ml; Inkubation 2, 4, 8, 24 und 48 Stunden) bewirkt eine zeitabhängige Steigerung der endothelialen VEGF-C-Freisetzung. Unstimulierte HUVECs zeigen im Zeitverlauf ebenfalls eine Erhöhung von VEGF-C im Zellüberstand, jedoch zu jedem Untersuchungszeitpunkt auf einem niedrigeren Niveau als die mit rhAPC behandelten Zellen.

### 3.8 Wirkung von rhAPC auf die Ang-2-mRNA-Expression bei EPCs (RT-PCR)

Zur Überprüfung des angiogenen bzw. vaskulogenen Potentials von rhAPC wurde neben VEGF-C in HUVECs auch der Wachstumsfaktor Ang-2 in EPCs untersucht. Es sollte ermittelt werden, inwiefern rhAPC die Ang-2-Expressionsrate in EPCs beeinflussen kann. Hierzu wurden EPCs am 4. Tag nach der Isolierung mit rhAPC (50 ng/ml und 5 µg/ml, 6 h) stimuliert. Unbehandelte EPCs wurden als Kontrolle eingesetzt. Der Versuch wurde dreimal an Zellen von n = 3 Spendern durchgeführt. Nach der RT-PCR mit folgender Gelelektrophorese wurde eine densitometrische Auswertung der Ang-2-Banden (primerspezifisch im Gel auf der Höhe von 234 bp) durchgeführt (Abbildungen 3-19 und 3-20).

Es wurde eine signifikante Steigerung der quantifizierten Bandenstärke bei rhAPC 5 µg/ml vs. Kontrolle ( $p < 0,05$ ) nachgewiesen (Mittelwerte von n = 3 Versuchen: Kontrolle =  $0,207 \pm \text{SEM } 0,074$ ; rhAPC 50 ng/ml =  $0,451 \pm \text{SEM } 0,103$ ; rhAPC 5 µg/ml =  $0,586 \pm \text{SEM } 0,157$ ; Signifikanzschränke vorher bei 0,05 festgelegt). Das Signal bei der Konzentration rhAPC 50 ng/ml war ebenfalls gegenüber der Kontrolle erhöht (Abbildung 3-21).

Die statistische Auswertung wurde mit dem Friedman-Test (ANOVA, gepaart) in Verbindung mit dem Dunn's Post-Test für multiple Vergleiche durchgeführt.

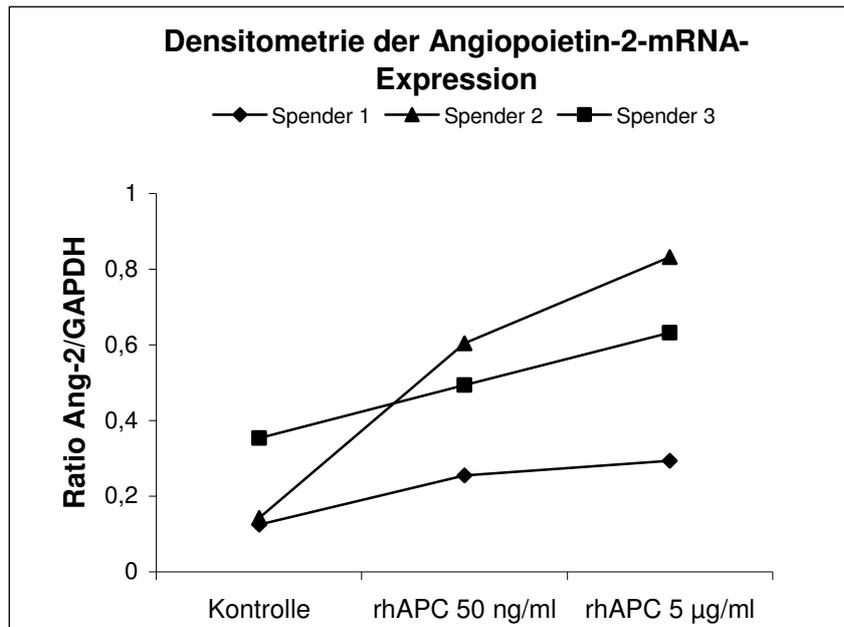


**Abbildung 3-19: RhAPC-abhängige Steigerung der Expression von Ang-2-mRNA in EPCs (RT-PCR)**

RhAPC steigert die mRNA-Expression des Angiogenesefaktors Ang-2 in EPCs:

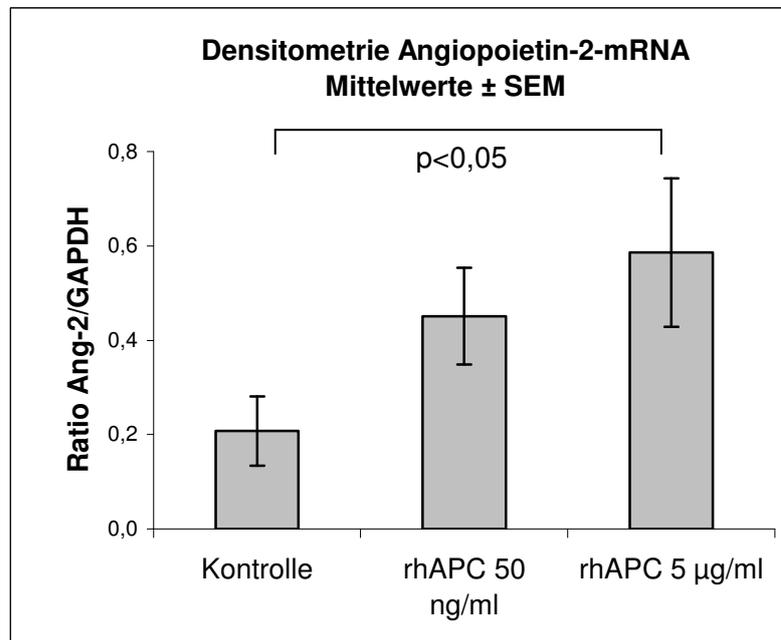
EPCs wurden am 4. Tag nach ihrer Isolierung mit rhAPC (50 ng/ml und 5 µg/ml, 6 h) inkubiert. Als Kontrolle (K) dienten unstimulierte EPCs, die unter den gleichen Kulturbedingungen inkubiert wurden.

Dargestellt sind 2 repräsentative Ergebnisse von n = 3 vergleichbaren RT-PCR-Versuchen mit unterschiedlichen Spendern.



**Abbildung 3-20: Densitometrische Auswertung der Ang-2-mRNA-Expression (EPCs)**

RhAPC (50 ng/ml und 5 µg/ml; Inkubation 6 h) steigert in EPCs die Expression von Ang-2-mRNA im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Densitometrie mit Normalisierung auf GAPDH (n = 3 Versuche mit unterschiedlichen Spendern).



**Abbildung 3-21: Densitometrische Mittelwerte der Ang-2-mRNA-Expression (EPCs)**

Mittelwerte der oben dargestellten RT-PCRs für Ang-2-mRNA; ± Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Signifikante Steigerung von Ang-2-mRNA bei rhAPC 5 µg/ml versus Kontrolle (p < 0,05; Friedman Test).

### 3.9 Wirkung von rhAPC auf die Expressionsraten von Angiogenese- und Arteriosklerose-relevanten Genen bei EPCs (Super Array-Screening)

Im Real-Time RT-PCR-Screening-Assay wurde das Genexpressionsprofil von Angiogenese- und Arteriosklerose-relevanten Genen in EPCs untersucht („human angiogenesis“ und „human atherosclerosis“ Array, siehe 2.6). Die Expressionsraten der geprüften Gene wurden jeweils in einer stimulierten Versuchsgruppe (rhAPC 5µg/ml) und in einer unstimulierten Kontrollgruppe ermittelt. Die Auswertung erfolgte mit der Software des RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array System (Bioscience, Frederick, USA) unter Verwendung der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

Im „human angiogenesis“ Array bewirkte rhAPC in 20 der untersuchten Gene eine signifikante Expressionsveränderung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Unter Berücksichtigung unspezifischer Bindungen wurde die Signifikanzschranke („threshold“) vorab auf 2 festgelegt, d. h. erst eine 2-fache Expressionssteigerung bzw. -verminderung wurde als signifikant gewertet. Bei allen von rhAPC beeinflussten Genen war, mit Ausnahme von Leptin, eine signifikante Verminderung der Expressionsrate feststellbar (Tabelle 3-2).

Im „human atherosclerosis“ Array wurde nur ein Gen (PDGF-A = „platelet derived growth factor-A“) signifikant durch rhAPC beeinflusst. Die hier beobachtete Herabregulierung von PDGF-A korreliert mit den Ergebnissen des „human angiogenesis“ Array, wo das genannte Gen ebenfalls eine (vergleichbare) Expressionsminderung durch rhAPC erfuhr.

In der folgenden Tabelle sind die in EPCs durch rhAPC (5 µg/ml) beeinflussten Gene aufgelistet sowie die Stärke und Art der Expressionsänderung.

**Tab. 3-2: Beeinflussung der Genexpression durch rhAPC (Real-Time RT-PCR, EPCs)**

Abkürzung	Name	Effekt rhAPC vs. Kontrolle
ANGPTL4	Angiopoietin-like 4	---
CXCL1	Chemokin (C-X-C) Ligand 1	--
CXCL3	Chemokin (C-X-C) Ligand 3	--
CXCL5	Chemokin (C-X-C) Ligand 5	-
CXCL9	Chemokin (C-X-C) Ligand 9	-
CXCL10	Chemokin (C-X-C) Ligand 10	--
EDG1 (S1P1)	endothelial differentiation, Shingolipid G-Proteingekoppelter Rezeptor 1 (Sphingosin 1-Phosphat-1-Rezeptor)	--
EFNA1	Ephrin-A1	---
EFNB2	Ephrin-B2	---

Abkürzung	Name	Effekt rhAPC vs. Kontrolle
EGF	epidermal growth factor	--
EPHB4	Ephrin Rezeptor 4	----
EREG	Epiregulin	--
FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3	--
IFNG	Interferon gamma	----
LEP	Leptin (obesity homolog, Maus)	+++
PDGF-A	platelet-derived growth factor alpha Polypeptid	----
PF4	platelet factor 4 (Chemokin (C-X-C) Ligand 4)	-
THBS2	Thrombospondin 2	--
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor (TNF-Familie, Mitglied 2)	-
VEGF-A	vascular endothelial growth factor A	--

EPCs wurden mit rhAPC (5 µg/ml, 4 Tage) stimuliert. Als Kontrolle (K) dienten unstimulierte EPCs. Im Super Array-Screening wurden die Expressionsunterschiede von Angiogenese- und Arteriosklerose-relevanten Genen ermittelt (rhAPC vs. K):

+++ = 100 % Steigerung vs. Kontrolle; --- ≥ 71-85 % Senkung vs. Kontrolle

-- ≥ 56-70 % Senkung vs. Kontrolle; - ≥ 40-55 % Senkung vs. Kontrolle

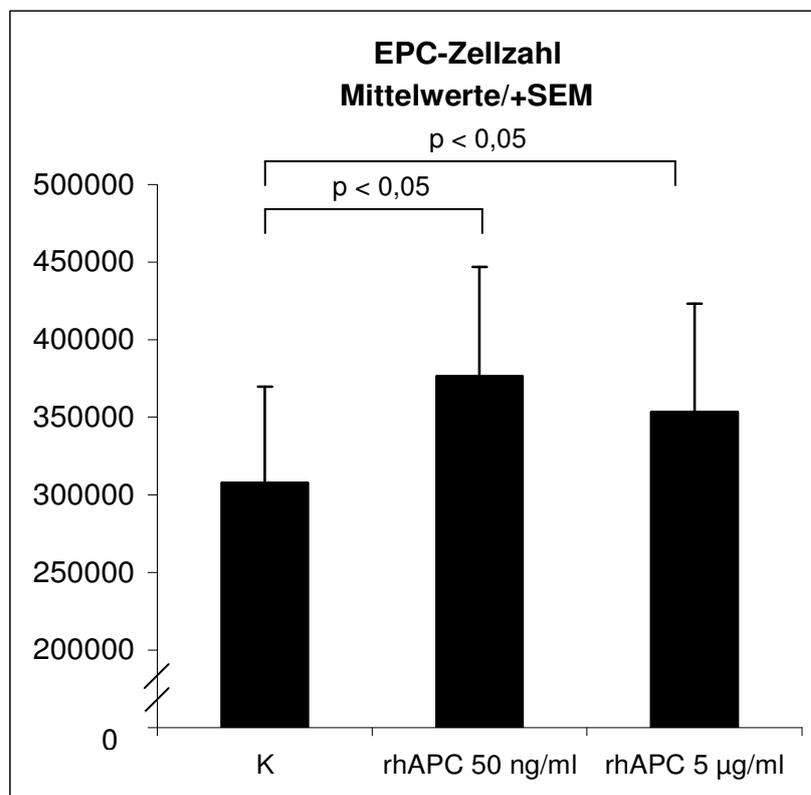
### 3.10 Wirkung von rhAPC auf die Zellproliferation von EPCs

In dieser Versuchsreihe sollte überprüft werden, inwiefern sich eine rhAPC-Stimulierung auf die Proliferationsrate endothelialer Vorläuferzellen auswirkt. Hierzu wurden EPCs in den Endkonzentrationen rhAPC 50 ng/ml und rhAPC 5 µg/ml stimuliert und als Kontrolle unstimulierte EPCs eingesetzt. Als Vergleich fand zudem eine Stimulation mit dem proliferationssteigernden Wachstumsfaktor VEGF (50 ng/ml) statt. Die Versuche wurden an Zellen von 12 verschiedenen Spendern durchgeführt (siehe 2.7).

In diesen Experimenten konnte erstmals eine proliferationssteigernde Wirkung von rhAPC auf EPCs nachgewiesen werden. Die Zellzahlen waren nach rhAPC-Stimulation mit 50 ng/ml signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöht (Kontrolle = 307681 ± SEM 62189; rhAPC 50 ng/ml = 376681 ± SEM 70323;  $p < 0,05$ ). Ebenso wurde eine signifikante Steigerung der EPC-Zahlen nach Stimulation mit rhAPC 5 µg/ml in Relation zur

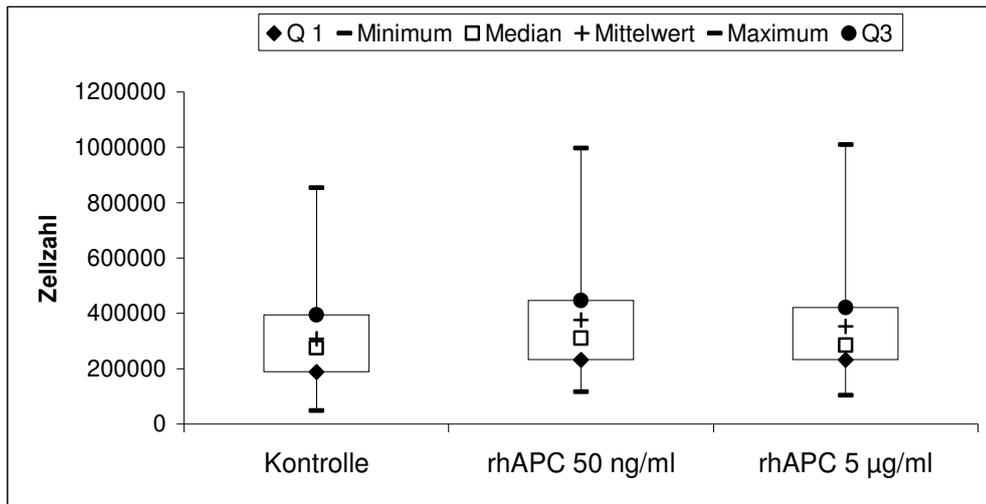
Kontrolle festgestellt (Kontrolle =  $307681 \pm \text{SEM } 62189$ ; rhAPC  $5 \mu\text{g/ml}$   $353479 \pm \text{SEM } 69857$ ;  $p < 0,05$ ) (Abbildung 3-22). RhAPC zeigte in der Konzentration  $50 \text{ ng/ml}$  eine vergleichbar starke Proliferationssteigerung wie der als Positivkontrolle eingesetzte Wachstumsfaktor VEGF (Abbildung 3-24).

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Computer-Programm „In Stat“ (GraphPad Software, San Diego, U.S.A). Im Kolmogorov-Smirnov-Test wurde eine Normalverteilung der Zellzahl-Ergebnisse ermittelt. Aufgrund der variablen Zellzahl-Niveaus innerhalb der EPC-Spender (abhängig vom individuellen EPC-Mobilisierungsgrad) wurden die Zellzahlen der einzelnen Spender als gepaarte Werte im ANOVA-Test eingesetzt (Abbildung 3-23). Die dem ANOVA folgenden multiplen Vergleiche wurden mit dem Student-Newman-Keuls Post Test berechnet und so der p-Wert ermittelt. Für den p-Wert wurde vorab eine Signifikanzschranke von  $0,05$  festgelegt.



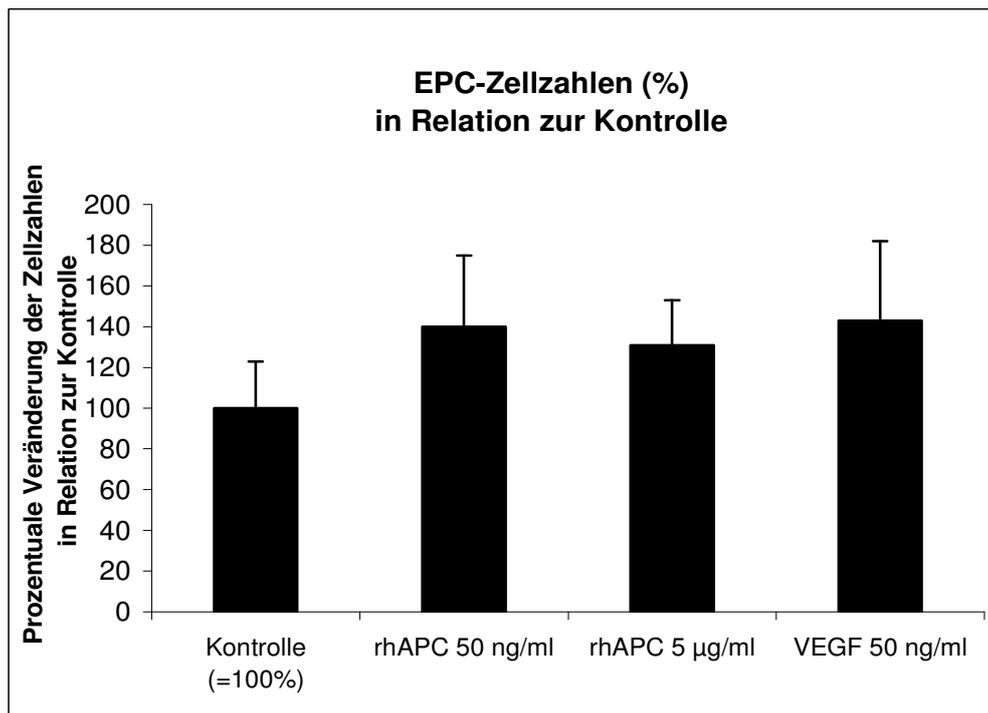
**Abbildung 3-22: Effekt von rhAPC auf die Proliferation von EPCs**

RhAPC ( $50 \text{ ng/ml}$ ;  $5 \mu\text{g/ml}$ , 4 Tage Inkubation) bewirkt eine signifikante Steigerung der Proliferation von EPCs. Dargestellt sind die Mittelwerte der absoluten Zellzahlen und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM) aus  $n = 12$  Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Spender.



**Abbildung 3-23: Darstellung der spenderspezifischen Schwankung der absoluten EPC-Zellzahlen**

In dieser Box-Plot-Darstellung ist die große Schwankungsbreite der EPC-Zellzahlen zwischen den einzelnen Spendern gut erkennbar. Diese unterschiedlichen Spender-niveaus wurden in der Auswertung unter Verwendung eines gepaarten statistischen Tests (ANOVA) berücksichtigt (Q1 = 25%-Quartil, Q3 = 75%-Quartil).



**Abbildung 3-24: Effekt von rhAPC und VEGF auf die Proliferation von EPCs**

RhAPC (50 ng/ml, 4 Tage Inkubation) steigert die Zellproliferation von EPCs in vergleichbar starker Ausprägung wie der Wachstumsfaktor VEGF.

Dargestellt sind die Mittelwerte von n = 12 Experimenten, wobei der Mittelwert der Kontrolle gleich 100 % gesetzt wurde und die Mittelwerte der Stimulationszellzahlen in Relation zur Kontrolle in Prozent umgerechnet wurden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Identifizierung von EPCs (Morphologie, Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse)

Wie bereits unter 1.7. beschrieben, ist die eindeutige Identifizierung einer endothelialen Progenitorzell-Population ein schwieriges Unterfangen. Da nach wie vor in Fachkreisen Uneinigkeit über die Definierung und Abstammung der endothelialen Vorläuferzellen herrscht, ist derzeit eine allgemein akzeptierte Charakterisierung dieser Zellpopulation kaum erreichbar. Die Zuordnung der EPCs erschwert sich insbesondere durch ihre Fähigkeit, aus verschiedenen Ursprungspopulationen (z.B. CD34-positive und CD133-positive hämatopoietische Zellen, CD14-positive Monozyten oder MNCs des Blutes) hervorgehen zu können (Urbich und Dimmeler, 2004). Zudem ist auch die weitere Entwicklungsrichtung der EPCs nicht genau festgelegt; sie können neben dem endothelialen Zelltyp auch in gewebefremde Zellen (z. B. Kardiomyozyten) transdifferenzieren (Badorff et al., 2003).

Eine aus peripherem Blut isolierte EPC-Population scheint demnach ein relativ heterogenes Zellgemisch zu sein. Laut Rehman et al. (2003) handelt es sich hierbei um einen von Monozyten und Makrophagen generierten Zellpool, der eine kleine Population echter Stamm- und Progenitorzellen sowie endotheliale Zellen enthält. Dieser, als „circulating angiogenic cells“ (CAC) bezeichnete Zellpool exprimiert mehrheitlich monozytäre Marker, wie CD14, CD11c und CD163. Das gefäßbildende Potential dieser Zellen beruht auf ihrer Fähigkeit, in ECs zu differenzieren (Schmeisser et al., 2001) und angiogene Wachstumsfaktoren (VEGF, G-CSF, GM-CSF) zu sezernieren (Rehman et al., 2003).

Auch Yamamoto und Kato bestätigten 2007 eine Heterogenität in der EPC-Population. Sie identifizierten zwei Subpopulationen innerhalb des EPC-Pools, von denen eine von CD34-positiven Zellen abstammt und die andere aus CD14-positiven monozytären Zellen hervorgeht. Beide Subpopulationen können in ECs ausdifferenzieren, unterscheiden sich jedoch in ihren Oberflächenantigenen und ihrer proliferativen Kapazität. Im Angiogenese-prozess wird ein synergistisches Zusammenspiel dieser beiden EPC-Populationen vermutet (Yamamoto und Kato, 2007). Es existieren jedoch auch andere Auffassungen über die Natur der EPCs. Die Gruppe um Case et al. ordnet CD34/CD133/VEGFR-2-exprimierende Zellen einem hämatopoietischen Zellpool zu, der nur begrenztes Potential zur Ausbildung neuer Blutgefäße besitzen soll (Case et al., 2007).

Diese Untersuchungen führen vor Augen, wie spekulativ die Definition der EPCs nach wie vor ist. Zweifelsohne konnten in zahlreichen Studien proangiogene Effekte nach Transplantation Ficoll-isolierter EPCs nachgewiesen werden. Den Diskussionen, welche Zellpopulation innerhalb des EPC-Pools für die biologischen Effekte verantwortlich ist, ist allerdings noch lange kein Ende gesetzt. Weitergehende Forschung in dieser Richtung wird

auch in den nächsten Jahren erforderlich sein, um die therapeutische Bedeutung der EPCs gänzlich zu erfassen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zellcharakterisierung in Anlehnung an die EPC-Identifikationskriterien der Forschergruppe Urbich und Dimmeler (Universität Frankfurt, Dtl.; Innere Medizin, Abteilung Molekulare Kardiologie) durchgeführt. Diese Gruppe hat in zahlreichen Veröffentlichungen wichtige Beiträge zum aktuellen Wissensstand über EPCs geliefert (Dimmeler et al., 2001; Vasa et al., 2001; Urbich und Dimmeler, 2004; Urbich et al., 2005). Das Team Urbich/Dimmeler gewährte mir einen persönlichen Einblick in sein Forschungslabor und unterstützte mich mit mündlich gegebenen Fachinformationen in Bezug auf die Isolierung und Charakterisierung von EPCs.

Das morphologische Erscheinungsbild der über Ficoll-Dichtegradient-Zentrifugation isolierten Zellen entsprach der charakteristisch schmalen, spindelförmigen Zellgestalt von EPCs (Hur et al., 2004). Die Ergebnisse funktionaler Untersuchungen (LDL-Aufnahme und Lektin-Bindung) bestätigten zudem, dass die Zellen Eigenschaften besitzen, die auch EPCs zugeschrieben werden (Asahara et al., 1997; Dimmeler et al., 2001; Vasa et al., 2001).

Mittels FACS-Analyse konnten die von der Arbeitsgruppe Urbich/Dimmeler in Frankfurt empfohlenen Oberflächenmoleküle VEGFR-2/KDR, CD34 (schwach), CD133 (schwach), CD31, CD105 und vWF auf diesen Zellpopulationen nachgewiesen werden. Als limitierender Faktor erwies sich hierbei die minimale Zellausbeute bei der EPC-Isolierung. Nur ein geringer Teil der Ficoll-isolierten MNCs adhärierte auf Fibronectin und stand so für die FACS-Färbung zur Verfügung. Die Isolationstechnik mit CD34-Anreicherung minimierte die Zellzahlen nochmals zusätzlich. Aufgrund spenderspezifischer Schwankungen der EPC-Zahlen war es selbst bei herkömmlicher Ficoll-Isolierung nicht immer möglich, alle geforderten Marker gleichzeitig in einer FACS-Messung zu erfassen. Da die EPC-Isolierung jedoch stets nach demselben Prinzip mit konstanten Arbeitsschritten und Materialien durchgeführt wurde, ist davon auszugehen, dass bei jeder Zellisolierung potentiell eine Ausdifferenzierung in EPCs stattfand. Dies bestätigte sich in der FACS-Analyse.

Der extrem starke Expressionsunterschied von CD34 zwischen der Ficoll-isolierten (nahezu negativ) und der über CD34-angereicherten Population (Expression > 90 %) lässt zunächst vermuten, dass es sich nur bei den CD34-angereicherten Zellen um EPCs handelt. Da die CD34-negative Population jedoch die anderen, o.g. charakteristischen Merkmale von EPCs exprimierte, lassen sich diese Zellen entsprechend der Erkenntnisse der Gruppe Reyes et al. (2002) einordnen. Sie entdeckte eine dem Knochenmark entstammende CD34-negative, multipotente Progenitor-Population, die in mature ECs ausdifferenzieren und gefäßbildende Funktionen im Wundheilungsgeschehen und in der Tumorangio-genese ausüben kann (Reyes et al., 2002). Nach Ansicht von Friedrich et al. stellen derartige CD34-

negative EPCs eine Progenitor-Subpopulation dar, die sogar noch potentere vaso-regenerative Kapazitäten besitzen soll, als die bisher bekannte CD34-positive-Population (Friedrich et al., 2006). Die isolierten EPCs repräsentieren folglich, je nach eingesetzter Zell-Isolationsmethode, zwei unterschiedliche EPC-Populationen.

Interessanterweise exprimierten die nach herkömmlicher Ficoll-Separation isolierten EPCs den Marker CD133 nur sehr schwach, die CD34-angereicherte Zellfraktion zeigte sich jedoch CD133-positiv. Eine Begründung hierfür findet sich möglicherweise in der Tatsache, dass EPCs mit zunehmender Zirkulationsdauer den hämatopoietischen Stammzellmarker CD133 verlieren und langsam den endothelialen Phänotyp annehmen (Hristov et al., 2003; Iwami et al., 2004). Expressionsschwankungen von CD133 erklären sich gegebenenfalls in Abhängigkeit davon, wie lange die EPCs, aus denen sich eine Population bildete, in der Blutbahn verweilten.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen anderer Forschergruppen (Bompais et al., 2004; Smadja et al., 2006b), war das Adhäsionsmolekül CD146 (MeICAM oder MUC18) nicht oder nur sehr schwach auf den hier isolierten EPCs vorhanden. Eine Erklärung für dieses abweichende Expressionsmuster findet sich möglicherweise im Zeitpunkt der FACS-Charakterisierung. EPCs lassen sich in Abhängigkeit von Kultivierungsdauer und Differenzierungsgrad in „frühe“ und „späte“ EPCs einteilen. Eine „frühe“ EPC steht noch im Anfangsstadium ihrer Entwicklung in Richtung EC und exprimiert deren Oberflächenmoleküle womöglich noch nicht in vollem Umfang. Mit zunehmender Reife nimmt die Progenitorzelle vermehrt strukturelle und funktionale Eigenschaften einer maturen EC an und wird deshalb ab einer Kultivierungsdauer von 2 bis 3 Wochen als „späte“ EPC bezeichnet (Hur et al., 2004). In der FACS-Analyse stellen sich derartige „späte“ EPCs als CD146-positiv dar (Bompais et al., 2004; Smadja et al., 2006b). Die Oberflächenstrukturen der in der vorliegenden Studie untersuchten EPCs wurden jedoch bereits am 4. Tag nach der Isolierung identifiziert. Demnach ist davon auszugehen, dass es sich bei diesen Zellen um „frühe“ EPCs mit geringerem endothelialen Ausdifferenzierungsgrad handelt, die CD133 bereits verloren haben, CD146 aber erst im Lauf ihrer weiteren Entwicklung exprimieren werden.

Mature ECs tragen das Adhäsionsmolekül CD146 auf ihrer Zelloberfläche, wo es als Bestandteil der endothelialen „adherens junction“ interzelluläre Kontakte vermittelt (Bardin et al., 2001). Auch die in Vergleichsmessungen eingesetzten HUVECs exprimierten dieses Oberflächenmolekül. CD146 erwies sich in der FACS-Analyse als einziges eindeutiges Unterscheidungskriterium zwischen „frühen“ EPCs und HUVECs und ermöglichte erstmalig eine eindeutige Abgrenzung beider Zelltypen.

## **4.2 Expression der APC-relevanten Rezeptoren von EPCs (RT-PCR u. FACS)**

Mittels RT-PCR wurde der Nachweis erbracht, dass EPCs die mit APC interagierenden Rezeptoren PAR-1, PAR-2, EPCR und S1P1 konstitutiv exprimieren. Die EPC-Genprodukte bildeten nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel auf den jeweiligen primerspezifischen Basenpaar-Höhen charakteristische Banden. Die zweite Bande bei dem Rezeptor PAR-2 scheint aufgrund der verwendeten Annealing Temperatur zustande gekommen zu sein. Die obere Bande entspricht jedoch der primerspezifischen Bandenhöhe und demnach dem gesuchten Genprodukt. In Bezug auf den Rezeptor PAR-1 bestätigen sich in den hier durchgeführten Experimenten die Ergebnisse der Forschergruppe um Smadja et al., die bereits 2005 die Expression eines funktionalen PAR-1-Rezeptors in EPCs entdeckte (Smadja et al., 2005).

Die Rezeptoren-Expression auf der Zelloberfläche wurde in der FACS-Analyse überprüft. Mit Ausnahme von PAR-2 konnten die APC-relevanten Rezeptoren eindeutig auf der Oberfläche von EPCs nachgewiesen werden. Die extrem schwache Ausprägung von PAR-2 erklärt sich in der Tatsache, dass PAR-2 ein durch inflammatorische Zytokine induzierbarer Rezeptor ist, der in der Regel erst reaktiv auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Ruf, 2004).

Da die Expression spezifischer Rezeptoren die Voraussetzung für eine potentielle Liganden-Wirkung darstellt, kann davon ausgegangen werden, dass EPCs ebenso wie HUVECs Effektorzellen für APC sind. Demnach kann rhAPC nicht nur auf ECs, sondern auch auf EPCs über direkte Rezeptor-Signaltransduktion einwirken. Die Kostimulation der beiden APC-Rezeptoren EPCR und PAR-1 könnte vermutlich also auch auf EPCs zytoprotektive und stabilisierende Effekte ausüben (Mosnier et al., 2006; Bae et al., 2007). Ebenso kann vermutet werden, dass rhAPC über Interaktion mit den Rezeptoren EPCR/PAR-1 in EPCs vermehrt protektive Gene induziert und so direkte anti-inflammatorische und antiapoptotische Aktivitäten verursacht (Joyce et al., 2001; Riewald et al., 2002; Cheng et al., 2003). Im Crosstalk der Rezeptoren PAR-1 und S1P1 könnte in EPCs die Integrität endothelialer Zell-Kontakte durch antiapoptotische Effekte aufrechterhalten werden (Feistritzer und Ruf, 2005).

## **4.3 Auswirkungen von rhAPC auf die Expressionsrate von APC-relevanten Rezeptoren von EPCs**

Die EPCs reagierten nach Stimulation mit rhAPC mit einer erhöhten mRNA-Expression des PAR-1-Rezeptors. Die Expressionsraten der Rezeptoren PAR-2, EPCR und S1P1 wurden durch rhAPC nicht beeinflusst.

Dem PAR-1 kommt in der APC-Signaltransduktion eine entscheidende Bedeutung zu, da die APC-Effekte in Kooperation mit EPCR hauptsächlich über ihn vermittelt werden. Die

APC-abhängige Aktivierung von PAR-1 bewirkt in der Rezeptorzelle eine zytoprotektive Veränderung der Genexpression und induziert direkt antiapoptotische und anti-inflammatorische Effekte (Joyce et al., 2001; Riewald et al., 2002; Cheng et al., 2003; Mosnier et al., 2006).

Über eine PAR-1-Aktivierung können jedoch auch proangiogene Signale übermittelt werden. Als Initiator angiogener Effekte wird in HUVECs und EPCs bislang eine Thrombin-abhängige Aktivierung des PAR-1 angesehen (Olivot et al., 2001; Smadja et al., 2005), wodurch die wichtigsten Elemente der Gefäßbildung, nämlich Proliferation, Migration und Differenzierung der ECs, induziert werden. So wurde in Experimenten mit EPCs eine Erhöhung der Proliferationsrate nach Stimulation mit dem Thrombin-ähnlichen PAR-1-Agonisten SFLLRN (Smadja et al., 2006a) sowie eine gesteigerte Zellmigration mit Bildung tubulärer Strukturen nachgewiesen (Smadja et al., 2005). Thrombin fördert zusätzlich über PAR-1 die Ausdifferenzierung von EPCs in endotheliale Zellen (Tarzam et al., 2006).

Obwohl der PAR-1-Rezeptor die größte Affinität für Thrombin aufweist, können an ihn diverse andere Proteasen, wie APC, ebenfalls binden. Interessanterweise wird die Rezeptor-Signaltransduktion von der bindenden Protease mitbeeinflusst, wodurch unterschiedliche, teilweise sogar gegenläufige Effekte über ein und denselben Rezeptor vermittelt werden können. Während Thrombin über PAR-1 proinflammatorische und apoptotische Signale auf kultivierte ECs ausübt, bewirkt eine APC/EPCR-abhängige Aktivierung von PAR-1 genau das Gegenteil (Feistritzer und Ruf, 2005; Finigan et al., 2005). Hierbei muss beachtet werden, dass auch die Konzentration der aktivierenden Protease den vermittelten Effekt modulieren kann. Pikomolare Konzentrationen von Thrombin verursachen eine dem APC vergleichbare antiinflammatorische, zytoprotektive Wirkung, wohingegen hohe APC-Konzentrationen Thrombin-ähnliche inflammatorische Effekte hervorrufen können (Feistritzer et al., 2005). Die genauen Mechanismen dieser ambivalenten PAR-1-Wirkungen sind noch nicht vollständig geklärt, wenngleich diese Thematik aktuell intensiv erforscht wird (Bae et al., 2007).

Es scheinen jedoch auch gleich gerichtete Reaktionen durch rhAPC und Thrombin am PAR-1-Rezeptor hervorgerufen werden zu können. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist der MAPK-Pfad, der sowohl durch Thrombin (bzw. durch SFLLRN), als auch durch Bindung von APC aktiviert werden kann (Olivot et al., 2001; Riewald et al., 2002). Der MAPK-Pfad ist als wichtiges Steuerungselement des Zellzyklus für Mitogen-induziertes Zell-Wachstum und Proliferation verantwortlich (Pages et al., 1993). Thrombin vermittelt nach Aktivierung von PAR-1 über diesen Pfad proliferative, angiogene Effekte auf HUVECs (Olivot et al., 2001) und EPCs (Smadja et al., 2005). Untersuchungen der Gruppe um Uchiba et al. (2004) zeigen, dass APC, ebenso wie Thrombin, eine MAPK-abhängige Steigerung der endothelialen Zellproliferation in HUVECs bewirken kann. Da eine Erhöhung der

Proliferationsrate als Grundvoraussetzung angiogener Prozesse gilt, untersuchte diese Gruppe zusätzlich die Fähigkeit von APC zur Neubildung von Gefäßen. Nach Implantation von APC-haltigen Pellets in die murine *Cornea* konnte eine eindeutige Zunahme der Vaskularisierung in diesem Gebiet festgestellt werden. Sowohl die Fläche der Neovaskularisation, als auch die Länge der neugebildeten Gefäße war annähernd analog zu den Effekten einer VEGF-Vergleichsstimulation (Uchiba et al., 2004).

APC scheint demnach über die Aktivierung von PAR-1 Thrombin-ähnliche angiogene Effekte in ECs auslösen zu können. Ob rhAPC derartige Effekte auch in EPCs initiieren kann, wurde bisher von keiner anderen Forschergruppe untersucht. Da in der vorliegenden Studie, ebenso wie in Arbeiten von Smadja et al. (2005), das Vorhandensein von PAR-1 auf EPCs nachgewiesen werden konnte, ist anzunehmen, dass APC auch in EPCs über PAR-1 den MAPK-Weg aktivieren kann. Demnach scheint eine APC-induzierte Proliferationssteigerung von EPCs sowie die Induktion angiogener bzw. vaskulogener Prozesse auf diesem Wege durchaus möglich zu sein (siehe hierzu auch 4.7).

Zudem belegen die Ergebnisse, dass rhAPC seine Effektivität in EPCs selbständig verstärken kann, indem es die Genexpression seines zentralen Rezeptors PAR-1 erhöht.

#### **4.4 Steigerung der VEGF-C-Expression und -Freisetzung in HUVECs durch rhAPC**

Die hier durchgeführten Stimulationsversuche zeigen, dass rhAPC die endotheliale VEGF-C-mRNA-Expression steigert und bestätigen damit das Ergebnis eines Genexpressions-Screenings (Affymetrix Array, unveröffentlichte Daten), das in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Brückmann an HUVECs durchgeführt wurde. Auf Proteinebene konnte in der vorliegenden Doktorarbeit zudem erstmalig eine rhAPC-induzierte zeit- und dosisabhängige Steigerung der VEGF-C-Freisetzung in HUVECs festgestellt werden.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei Keratinozyten und Fibroblasten nach Stimulation mit rhAPC gemacht. Die Forschergruppe um Jackson et al. stellte 2005 bei diesen Zellarten in Abhängigkeit von rhAPC eine erhöhte Expression des dem VEGF-C nah verwandten Wachstumsfaktors VEGF-A fest (Jackson et al., 2005).

VEGF-C ist als proliferations-, migrations- und permeabilitätssteigernder Wachstumsfaktor bekannt, der in erster Linie über den lymphatischen Rezeptor VEGFR-3 die Neubildung von Lymphgefäßen vermittelt. Sowohl in der embryonalen Entwicklung des lymphatischen Systems (Mäkinen et al., 2001a; Karkkainen et al., 2004), als auch in der postnatalen Lymphangiogenese (Paavonen et al., 2000; Yoon et al., 2003) ist VEGF-C als funktionales Element unverzichtbar. Des Weiteren zeigt sich der Wachstumsfaktor auch verantwortlich für die Aufrechterhaltung lymphatischer Funktionalität, indem er zentrale

Aktivitäten wie den Pumpmechanismus der Lymphgefäße steuert (Breslin et al., 2007). Klinische Relevanz kommt dem VEGF-C deshalb im Rahmen der Wundheilung und in der Behandlung von sekundären Lymphödemen zu. Die Neubildung von Lymphgefäßen ist nach Läsionen (Traumata, operative Eingriffe, Infektionen) von großer Bedeutung für die Geweberegeneration. Über Aktivierung von VEGFR-3 bewirkt VEGF-C die Wiederherstellung zerstörter Lymphgefäße und gewährleistet dadurch die Immunantwort im Wundgebiet sowie den Abtransport von posttraumatischen Extravasaten (Paavonen et al., 2000). Zeitgleich wird der Gewebedruck reguliert, wodurch der Entstehung von sekundären, entzündlichen Ödemen entgegengewirkt wird. Bereits bestehende Lymphödeme können durch Applikation von VEGF-C erfolgreich zurückgebildet werden, wie Experimente mit VEGF-C-Gentransfer beweisen (Yoon et al., 2003).

Da rhAPC die VEGF-C-mRNA-Expression sowie die Freisetzung des zugehörigen Proteins in HUVECs steigert, ist anzunehmen, dass es über VEGF-C eine lymphangiogene Wirkung vermitteln kann. Obwohl VEGF-C die Gefäßpermeabilität erhöht und Chemotaxis in Makrophagen induzieren kann (Skobe et al., 2001), werden diese proinflammatorischen Eigenschaften wahrscheinlich nicht durch rhAPC induziert bzw. überwiegen seine antiinflammatorischen Effekte (siehe 1.2.4). Demnach könnte rhAPC möglicherweise aufgrund seines lymphangiogenen und antiinflammatorischen Potentials als adjunktives Therapeutikum zur Verbesserung der Wundheilung eingesetzt werden. Als heilungsfördernd könnte sich auch die indirekt durch rhAPC vermittelte, zytoprotektive VEGF-C-Wirkung erweisen (Wang et al., 2004).

Erste Untersuchungen zur Wirkung von rhAPC während des Wundheilungsgeschehens wurden von der Forschergruppe um Jackson et al. (2005) durchgeführt. In Ratten zeigte rhAPC einen positiven Einfluss auf die Reepithelialisierung und Neovaskularisation in verletzten Hautarealen. RhAPC beschleunigte den Wundverschluss und minimierte inflammatorische Reaktionen im Wundgebiet durch verminderte Infiltration neutrophiler Immunzellen (Jackson et al., 2005).

VEGF-C besitzt neben seiner Affinität zum lymphatischen VEGFR-3 auch noch Bindungskapazität für den VEGFR-2, der auf vaskulärem Endothel lokalisiert ist. Die Aktivierung dieses Rezeptors steigert die endotheliale Proliferation, wodurch die Neubildung von Blutgefäßen initiiert wird. VEGF-C vermittelt demnach nicht nur Lymphangiogenese, sondern auch die Bildung von Blutgefäßen (Joukov et al., 1996; Neufeld et al., 1999). Im Ischämie-Modell steigerte VEGF-C die Kapillardichte sowie den Blutfluss und stellt somit, alternativ zu VEGF-A, ein mögliches Therapeutikum ischämischer Erkrankungen dar (Cao et al., 1998; Witzenbichler et al., 1998).

Ein vergleichbarer Einsatz von rhAPC im Rahmen der therapeutischen Angiogenese ist demnach ebenfalls denkbar, da es das angiogene VEGF-C auf Gen- und Proteinebene hochreguliert. Jackson et al. bewiesen im CAM-Versuch bereits eine angiogene Wirkung von APC über eine gesteigerte Expression von VEGF-A in Keratinozyten und Fibroblasten (Jackson et al., 2005). Die hier erzielten Ergebnisse verweisen auf einen neuen angiogenen Mechanismus von rhAPC, der auf der Erhöhung der endothelialen VEGF-C-Expression beruht.

Neben seiner angiogenen Funktion trägt VEGF-C auch zur Gefäßneubildung im Sinne der Vaskulogenese (embryonal über VEGFR-3, postnatal über VEGFR-2) bei (Dumont et al., 1998; Hamada et al., 2000). Es mobilisiert EPCs über Aktivierung ihres VEGFR-2 aus dem Knochenmark (Asahara et al., 1999b; Kalka et al., 2000b; Shintani et al., 2001), lockt sie chemotaktisch in Gebiete der Gefäßbildung und übt proliferative Signale auf diese Zellen aus. RhAPC könnte demnach über die Hochregulierung von VEGF-C indirekt dazu beitragen, die Zahl der EPCs in Ischämiegebieten zu erhöhen. Da eine gesteigerte EPC-Zahl mit verstärkter vaskulogener Aktivität korreliert, könnte über diesen Mechanismus die Revaskularisierung ischämischer Gebiete verbessert werden. VEGF-C kann zusätzlich über Aktivierung von VEGFR-2 zytoprotektiv auf EPCs wirken und so die neugebildeten Gefäße stabilisieren (Larrivée et al., 2003). Eine Kombination aus lokaler rhAPC-Applikation im Ischämiegebiet mit zeitgleicher systemischer Gabe kann möglicherweise EPCs in die Blutzirkulation mobilisieren, sie lokal im ischämischen Gewebe anreichern und dort über proliferative Signale vaskulogene Gefäßbildung vermitteln.

So können aufgrund der festgestellten endothelialen VEGF-C-Expressionssteigerung zusammenfassend folgende Eigenschaften von rhAPC vorgeschlagen werden: RhAPC fördert möglicherweise indirekt über VEGF-C die Neubildung von Gefäßen des Lymph- und des Blutgefäßsystems durch Angiogenese und Vaskulogenese. Durch zytoprotektive Effekte des VEGF-C werden die neugebildeten Gefäße stabilisiert.

Offen bleibt die Frage, inwieweit die Expressionssteigerung eines angiogenen Wachstumsfaktors die Gefahr Tumor-assoziiertter Angiogenese birgt. Bei diversen Tumorarten wurden gesteigerte VEGF-C-Spiegel sowie eine erhöhte Dichte des Rezeptors VEGFR-3 nachgewiesen (Valtola et al., 1999; Hung et al., 2003). Obwohl sich in Experimenten mit VEGF-C-Gentransfer keine Induktion tumoröser Entartung (Yoon et al., 2003) zeigte, ist eine Therapie mit Steigerung der VEGF-C-Expression bei bereits bestehender Krebserkrankung kontraindiziert, da dadurch das Wachstum und die Vaskularisierung eines Tumors über VEGFR-3 gefördert werden kann (Laakkonen et al., 2007). Zudem besteht die Möglichkeit der Tumormetastasierung durch gesteigerte Lymphangiogenese (Mandriota et al., 2001).

---

#### 4.5 RhAPC-abhängige Expressionssteigerung von Ang-2-mRNA in EPCs

In Stimulationsversuchen wurde in dieser Arbeit eine rhAPC-induzierte signifikante Steigerung der Ang-2-mRNA-Expression in EPCs nachgewiesen. Ob diese Expressionssteigerung auch mit einer vermehrten Produktion des Ang-2-Proteins in EPCs verbunden ist, wurde nicht untersucht. Jedoch liegen andere wissenschaftliche Erhebungen vor, die belegen, dass der Wachstumsfaktor VEGF die Expression von Ang-2 hochreguliert und parallel dazu auch die *de novo*-Synthese auf Proteinebene steigert (Mandriota und Pepper, 1998; Oh et al., 1999). APC erhöht bekanntlich die Expression von VEGF-A in diversen Zellarten (Jackson et al., 2005) und bewirkt, wie hier gezeigt werden konnte, die vermehrte endotheliale Freisetzung des strukturverwandten VEGF-C (siehe 4.4). Demnach ist anzunehmen, dass rhAPC möglicherweise indirekt über VEGF-A bzw. VEGF-C auch die Synthese von Ang-2 in EPCs hochregulieren kann.

Ang-2 stellt als Antagonist des endothelialen Tie-2-Rezeptors ein essentielles Element angiogener Gefäßsprossung dar. Seine destabilisierenden Effekte lockern den engen Zusammenhalt zwischen dem Endothel und dessen umgebenden perivaskulären Zellen, wodurch das Auswachsen neuer Gefäße ins umliegende Gewebe erst ermöglicht wird (Maisonpierre et al., 1997; Asahara et al., 1998). Auch für das Wachstum von Lymphgefäßen zeigt sich Ang-2 mitverantwortlich. Allerdings konnte hierbei eine Tie-2-aktivierende Wirkung festgestellt werden. So scheint Ang-2 in Abhängigkeit von der Tie-2-tragenden Zellart entweder als Rezeptor-Antagonist (vaskulär), oder aber auch als -Agonist (lymphatisch; embryonal auch vaskulär) wirken zu können (Gale et al., 2002; Harfouche und Hussain, 2006). In EPCs bewirkt Ang-2 eine autokrine Aktivierung des Tie-2-Rezeptors (Kim et al., 2006), wodurch ihre Proliferation, Migration und Ausdifferenzierung in ECs veranlasst wird und ihre tubuläre Anordnung erfolgt (Hildbrand et al., 2004; Gill und Brindle, 2005). Zudem fördert die Aktivierung von Tie-2 die Adhäsionsfähigkeit von EPCs ans Gefäßendothel und erleichtert so deren Einbau in neu entstehende Gefäße (Gill und Brindle, 2005). Ang-2 vermag demnach nicht nur das Auswachsen von EC-Sprossen aus bestehenden Gefäßen (Angiogenese) zu vermitteln, sondern auch die Neubildung von Gefäßen aus EPCs (Vaskulogenese). Die Fähigkeit von Ang-2 zur Neovaskularisation wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt (Asahara et al., 1998; Kim et al., 2006).

Die Wirkung von Ang-2 wird jedoch nicht nur vom Effektorzelltyp beeinflusst, sondern im Wesentlichen auch vom Vorhandensein anderer angiogener Stimuli. So bildet der Wachstumsfaktor VEGF einen entscheidenden wirkungsmodulierenden Faktor für Ang-2. Wirkt Ang-2 in Gegenwart von VEGF auf ECs, wird angiogene Kapillarsprossung mit Zunahme der Gefäßdurchmesser ausgelöst. Tritt Ang-2 jedoch ohne Koexpression von VEGF auf, kommt es i. d. R. zur Gefäßregression durch Apoptose der ECs (Asahara et al.,

1998; Holash et al., 1999; Lobov et al., 2002). Dieser Synergismus zwischen Mitgliedern der VEGF-Familie und der Ang-Familie konnte auch für VEGF-C und Ang-2 bei der Entstehung und Remodellierung des Lymphsystems festgestellt werden (Gale et al., 2002).

Über eine dosis- und zeitabhängige Veränderung der Ang-2-Effekte wurde von den Forschergruppen Kim et al. (2002a) sowie Harfouche und Hussain (2006) berichtet. So kann Ang-2 in hoher Konzentration und nach längerer Einwirkzeit, ähnlich wie Ang-1, als Überlebensfaktor für ECs durch Aktivierung des PI 3'-Kinase/Akt-Weges wirken (Kim et al., 2000a; Harfouche und Hussain, 2006). Zytoprotektive Effekte wurden auch in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand der Ang-2-produzierenden Zellen verzeichnet. Bei Vorhandensein von Störfaktoren (z.B. bei Verlust des Kontakts der Zellen zur umliegenden Matrix) können ECs Ang-2 als autokrinen Zellschutz sezernieren (Daly et al., 2006).

Den Ergebnissen der vorliegenden Studie zufolge bewirkt rhAPC die Steigerung beider Wachstumsfaktoren, VEGF-C in HUVECs und Ang-2 in EPCs. Da diese beiden Faktoren durch synergistisches Zusammenwirken Angiogenese (Proliferationsinduktion von HUVECs und Verzweigung von Gefäßen) und Vaskulogenese (Proliferationsinduktion von EPCs und deren Mobilisierung aus dem Knochenmark) initiieren können, kann rhAPC wahrscheinlich indirekt über ihre Steigerung zur Revaskularisierung ischämischer Bezirke beitragen. Nach dem derzeitigen Wissensstand wird hier erstmalig neben der angiogenen Wirkung von rhAPC auch ein Potential zu vaskulogener Aktivität konstatiert.

Auch in der Wundheilung könnte rhAPC durch Erhöhung der Ang-2-Spiegel positive Effekte erzielen. Ang-2 zeigt hierbei schwach proinflammatorische Wirkung, vermag jedoch die leukozytäre Infiltration bei fortschreitender Entzündung zu minimieren (Rovietto et al., 2005). Durch Induktion zytoprotektiver Effekte verhindert hochdosiertes Ang-2 den endothelialen Zelltod (Harfouche und Hussain, 2006). In Experimenten mit adenoviral induzierter Ang-2-Expressionssteigerung wurde in Verbindung mit VEGF verstärkte Lymphangiogenese sowie auch Angiogenese in heilenden Wunden beobachtet (Kim et al., 2007).

Wie bei allen Angiogenese-induzierenden Vorgängen sollten auch in Bezug auf die rhAPC-bedingte Ang-2-Steigerung die Gefahren potentieller Tumorangiogenese nicht außer Acht gelassen werden. Ang-2 wird besonders stark in Gebieten mit vaskulären Umbauvorgängen exprimiert, wie z. B. im weiblichen Reproduktionssystem (Maisonpierre et al., 1997). Allerdings wurde auch Tumor-assoziiert eine verstärkte Ang-2-Expression dokumentiert. Die Kombination von Ang-2 und VEGF-C bietet eine hochwirksame Voraussetzung zur Gefäßneubildung, insbesondere lymphatischer Gefäße, wodurch Metastasierungen möglich werden (Maisonpierre et al., 1997; Holash et al., 1999). Bis dato wurden noch keine kanzerogenen Wirkungen von rhAPC beobachtet, jedoch scheint es angebracht, bei diagnostizierter Tumorerkrankung von einem Einsatz von rhAPC abzusehen.

#### 4.6 Effekt von rhAPC auf das Genexpressionsprofil von EPCs (Super Array)

Mit dem Super Array-Screening wurde ein Genexpressionsprofil von EPCs in Gegenwart und in Abwesenheit von rhAPC erstellt. Die hierbei untersuchten Gene spielen eine Rolle im Bereich der Angiogenese und der Arteriosklerose. Um den Einfluss von rhAPC auf die Genexpression von EPCs zu beurteilen, wurden in der Real-Time RT-PCR die Expressionsraten von stimulierten EPCs (rhAPC 5 µg/ml, 4 d) im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen ermittelt. Da das Super Array-Verfahren eine kostenintensive Untersuchungsmethode ist, wurde dieser Screening-Versuch nur an Zellen eines Spenders durchgeführt. Im Hinblick auf spenderspezifische Expressionsschwankungen zeichnet der Versuch also nur die Reaktion eines einzelnen Individuums nach. Die hier ermittelten Ergebnisse bieten jedoch eine richtungweisende Orientierungshilfe für die Auswahl einzelner, näher zu untersuchender Gene. In weiterführenden PCR-Versuchen können diese rhAPC-abhängigen Expressionsänderungen mit EPCs unterschiedlicher Spender verifiziert werden.

Der Super Array wurde eingesetzt, um die bisher erhobenen Ergebnisse dieser Studie im Gesamtgeschehen von Angiogenese und Inflammation besser einordnen zu können. Die Bedeutung des APC sollte hierbei im Sinne einer Hypothesengenerierung erforscht werden.

20 der untersuchten Angiogenese-relevanten Gene sowie ein Arteriosklerose-relevantes Gen zeigten eine signifikante Expressionsänderung nach Stimulation mit rhAPC im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Interessanterweise verursachte rhAPC, mit einer Ausnahme, in allen betroffenen Genen eine Reduzierung der Expressionsrate.

Im Folgenden werden die funktionalen Eigenschaften der von rhAPC beeinflussten Gene näher beschrieben und deren Auswirkungen auf das Angiogenese- und Entzündungsgeschehen diskutiert. Funktional lassen sich die Gene den Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren sowie Angiogenese-Stimulatoren und Angiogenese-Inhibitoren zuordnen:

##### Zytokine:

Zytokine sind von vielen Zellarten sezernierte, kleine Proteine bzw. Peptide, die das Verhalten oder die Eigenschaften anderer Zellen, in erster Linie von Immunzellen, ändern (Werner und Grose, 2002). Im Super Array verursachte rhAPC in EPCs eine reduzierte Expression der Zytokine Interferon gamma und Tumor-Nekrose-Faktor.

**Interferon gamma** (IFN $\gamma$ ) wird als Immunantwort auf Mitogene oder Antigene primär von T-Lymphozyten produziert. Dieses proinflammatorische Zytokin vermittelt antivirale Effekte, erhöht die zytotoxische Aktivität von Natürlichen Killerzellen und fördert die Fähigkeit von Makrophagen, im „respiratory burst“ Pathogene zu zerstören (Male, 2005). Über IFN $\gamma$

werden auch angiostatische Signale vermittelt, zum einen über Inhibierung der Endothelzellproliferation, zum anderen über die Expressionsinduktion angiostatischer Mediatoren (Friesel et al., 1987).

Die rhAPC-abhängige Herabregulierung der IFN $\gamma$ -Expression könnte zur Abschwächung der von IFN $\gamma$  vermittelten Signale führen und bewirke demnach auf indirekte Weise antiinflammatorische sowie Angiogenese-fördernde Effekte. Eine zytoprotektive Wirkung kann über diesen Mechanismus ebenfalls vermutet werden.

Das von Immunzellen produzierte proinflammatorische Zytokin **Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$**  (TNF- $\alpha$ ) verdankt seine Bezeichnung der Fähigkeit, den apoptotischen Zelltod u. a. in Tumorzellen induzieren zu können. TNF- $\alpha$  steigert die Leukozytenadhäsion an ECs, indem es die Dichte spezifischer Leukozyten-Rezeptoren auf der Endothelzelloberfläche erhöht. Dadurch wird die Transmigration von Leukozyten ins Gewebe erleichtert. Weitere proinflammatorische Wirkungen zeigt TNF- $\alpha$  durch Induktion von Akute-Phase-Proteinen in der Leber und - im synergistischen Zusammenspiel mit IFN $\gamma$  - durch Steigerung der Antigenpräsentierenden Fähigkeiten von Makrophagen und B-Zellen (Male, 2005). Über Induktion der Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF in ECs übernimmt TNF- $\alpha$  außerdem die Rolle eines indirekten Angiogenese-Stimulators (Yoshida et al., 1997).

Eine APC und rhAPC-induzierte Minimierung der monozytären TNF- $\alpha$ -Produktion wurde bereits von anderen Forschern festgestellt (Grey et al., 1994, White et al., 2000, Yuksel et al., 2002; Nick et al., 2004) und als antiinflammatorische APC-Wirkung interpretiert.

Über die hier festgestellte Herabsetzung der TNF- $\alpha$ -Expression in EPCs könnte rhAPC die Aktivierung von Protein C indirekt erleichtern. TNF- $\alpha$  hemmt nämlich die Aktivierung zu APC, indem es die Expression des Rezeptors EPCR (Fukudome et al., 1994; Faust et al., 2001) und des Thrombomodulin (Conway et al., 1988) herabreguliert.

Des Weiteren potenziert eine Minimierung der TNF- $\alpha$ -Expression vermutlich die antikoagulative und profibrinolytische Wirkung von APC, da TNF- $\alpha$  die vermehrte Freisetzung prokoagulativer (TF) und antifibrinolytischer (PAI-1) Faktoren bewirkt (Sakata et al., 1986).

### Chemokine:

Chemokine sind eine Untergruppe der Zytokine mit vorwiegend chemotaktischen Eigenschaften. Sie werden in Folge einer Infektion oder Verletzung überwiegend von Makrophagen und Lymphozyten, aber auch von Gewebezellen sezerniert. In ECs konnte die mRNA einiger Chemokine ebenfalls nachgewiesen werden (z.B. „gamma interferon inducible protein 10“ (IP-10 = CXCL10) und „monokine induced by gamma interferon“ (Mig = CXCL9)). Die Hauptfunktion von Chemokinen besteht in der Rekrutierung immunkompetenter Zellen

(neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen, T-Zellen) und ihrer Anreicherung in Entzündungsgebieten. Des Weiteren sind Chemokine an der Aktivierung von Leukozyten und ECs beteiligt. Neben diesen proinflammatorischen Effekten übernehmen Chemokine auch wichtige Aufgaben in der Regulation der Angiogenese, z.B. im Rahmen der Wundheilung (Strieter et al., 1995; Werner und Grose, 2003).

Innerhalb der CXC-Chemokine lässt sich eine Unterteilung in Chemokine mit dem ELR-Motiv, einer spezifischen Aminosäuren-Anordnung in der Primärstruktur und solchen ohne dieses Motiv vornehmen. Das ELR-Motiv ist von Bedeutung für die Bindungseigenschaften der Chemokine an spezifische Chemokinrezeptoren und wirkt sich dementsprechend nachhaltig auf die vermittelte Funktion aus. Träger des ELR-Motivs agieren über den CXC-Rezeptor-2 und zeigen stark chemotaktische Wirkung auf Neutrophile. Zudem besitzen sie angiogene Potenz. CXC-Chemokine, denen das ELR-Motiv fehlt, binden an den CXC-Rezeptor-3 und fungieren als äußerst starke Inhibitoren der Angiogenese. Ihre chemotaktische Aktivität bezieht sich in erster Linie auf Lymphozyten (Strieter et al., 1995).

Im Super Array wurde durch rhAPC die Expression folgender CXC-Chemokine (ELR+) in EPCs erniedrigt: CXCL1 („growth-related oncogene  $\alpha$ “ (GRO $\alpha$ )), CXCL3 (GRO $\gamma$ ) und CXCL5 („epithelial neutrophil activating protein 78“ (ENA-78)). Aus der Gruppe der CXC-Chemokine ohne ELR-Motiv wurden folgende Mitglieder durch rhAPC herabreguliert: CXCL4 (Plättchenfaktor 4 = PF4), CXCL9 (Mig) und CXCL10 (IP-10).

Die Expressionsminderung der genannten Chemokine lässt sich als indirekt anti-inflammatorische Wirkung von rhAPC interpretieren. Durch Herabsetzung ihrer Genexpression werden geringere Mengen dieser Chemokine produziert und somit die Aktivierung und chemotaktische Rekrutierung von Immunzellen während eines entzündlichen Geschehens minimiert. Eine überschießende Entzündungsreaktion, wie beim septischen Krankheitsbild, könnte dadurch abgeschwächt oder gar verhindert werden.

Durch Herabregulierung von CXCL4 (PF4) wird zudem ein gerinnungsfördernder Mediator reduziert. PF4 hemmt lokal die Aktivität von Antithrombin-III auf ECs, wodurch das hämostatische Gleichgewicht in Richtung Koagulation verschoben wird. Außerdem besitzt es starke Bindungs-Affinität zu Heparin und Heparan-Sulfaten und setzt deren „Fähigkeit zur Blutverdünnung“ außer Kraft (Lane et al., 1984). APC könnte seine antikoagulative Wirkung folglich zum Teil auch indirekt über Hemmung des prokoagulativen PF4 vermitteln.

Die Chemokine ohne ELR-Motif **CXCL10** (IP-10), **CXCL9** (Mig) und **CXCL4** (PF4) stellen sehr potente Inhibitoren der Angiogenese dar und überlagern bei gleichzeitiger Anwesenheit die angiogenen Effekte der ELR-positiven Chemokine (CXCL1, -3, und -5) (Strieter et al., 1995). CXCL10 (IP-10), CXCL9 (Mig) und CXCL4 (PF 4) üben ihre angiostatische Wirkung

über eine Hemmung der Endothelzellproliferation aus (Luster et al., 1995; Strieter et al., 1995, Lasagni et al., 2003). CXCL10 (IP-10) verhindert zusätzlich die Differenzierung und tubuläre Anordnung von ECs (Angiolillo et al., 1995) und kann den endothelialen Zelltod induzieren (Feldman et al., 2006). Die Expression von IP-10 und Mig ist durch IFN $\gamma$  in diversen Zellarten induzierbar, unter anderem auch in ECs. Es wird vermutet, dass die angiostatischen Effekte von IFN $\gamma$  über die Induktion von IP-10 und Mig vermittelt werden (Strieter et al., 1995).

Möglicherweise bewirkt rhAPC über eine Hemmung der Expression von IFN $\gamma$  auf indirekte Weise die Herabregulierung von IP-10 und Mig. Mit der Minimierung von IP-10, Mig und PF4 schaltet rhAPC bedeutsame angiostatisch wirkende Mediatoren aus und fördert damit vermutlich indirekt die Bildung von Gefäßen.

Durch rhAPC wurden jedoch auch Angiogenese-fördernde Chemokine (CXCL1 (GRO $\alpha$ ), CXCL3 (GRO $\gamma$ ) und CXCL5 (ENA78)) in ihrer Expression supprimiert. **CXCL1** und **CXCL3** sind strukturell nah miteinander verwandt. Ihr mitogenes Potential wurde erstmals im Zusammenhang mit dem Wachstum von Melanomen festgestellt, woraus ihre ursprüngliche Bezeichnung „melanoma growth stimulating activity“ (MGSA) resultierte. Die Fähigkeit dieser beiden Chemokine zur Tumorgenese ist eng mit ihren Angiogenese-steigernden Effekten verbunden (Haghnegahdar et al., 2000).

**CXCL5** (ENA-78) zeigt Strukturverwandtschaft zu IL-8, das als angiogener Faktor bekannt ist. Sowohl IL-8 als auch CXCL 5 werden als Antwort auf Stimulation mit TNF- $\alpha$  produziert, wobei die CXCL5-synthetisierende Zelle die Epithelzelle ist (Chang et al., 1994). Die hier festgestellte rhAPC-abhängige Herabregulierung von TNF- $\alpha$  in EPCs könnte auf indirekte Weise eine Verminderung der CXCL5-Expression bewirken.

Da durch rhAPC sowohl angiostatisch wirkende Chemokine, als auch Angiogenese-fördernde Chemokine erniedrigt werden, scheint die Interpretation der gewonnenen Ergebnisse zunächst schwierig. Vergleicht man aber die Wirkpotenz beider CXC-Chemokin-Gruppen miteinander, so stellt sich heraus, dass die angiostatischen Effekte bei Weitem überwiegen. Demnach kann vermutet werden, dass rhAPC durch gleichzeitige Ausschaltung von starken antiangiogenen Faktoren und schwächeren proangiogenen Faktoren das Gleichgewicht zwischen hemmenden und fördernden Einflüssen in proangiogene Richtung verschiebt. Somit ist eine indirekt gefäßbildende Wirkung von rhAPC über diesen Mechanismus anzunehmen.

Zusammenfassend betrachtet, könnte rhAPC über Beeinflussung der genannten Chemokine indirekt antiinflammatorische, antikoagulative und angiogene Effekte vermitteln.

Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren:

Die Wachstumsfaktoren „epidermal growth factor“ (EGF), Epiregulin (EREG), Ephrin-A1 (EFNA1), Ephrin-B2 (EFNB2) und der Wachstumsfaktor-Rezeptor „Ephrin-Rezeptor B4“ (EPHB4) wurden in EPCs durch rhAPC-Stimulation auf Genebene herabreguliert.

**EGF** ist der Namensgeber für eine Familie von funktions- und strukturverwandten Wachstumsfaktoren, die auf zahlreiche Zellarten über sog. EGF-Rezeptoren (EGFR) proliferativ wirken. Mitglieder der EGF-Familie werden von diversen Zellen ekto- und mesodermalen Ursprungs sezerniert, z.B. von Keratinozyten und Makrophagen (Shirasawa et al., 2004). Neben der Proliferationsinduktion vermittelt EGF über Aktivierung der Phosphatidylinositol-3 Kinase und des „extracellular signal-regulated kinases“ (ERK)-Pfades zytoprotektive Signale, u.a. auf ECs (Vinci et al., 2004).

**Epiregulin** ist ein weiterer Vertreter der EGF-Familie. Es wirkt ebenso wie EGF mitogen auf Keratinozyten und Fibroblasten (Shirakata et al., 2000).

Die rhAPC-abhängige Expressionsverminderung von EGF und EREG in EPCs lässt zunächst antimitogene und proapoptotische Wirkungen von rhAPC vermuten. Allerdings kann APC selbst als EGF-Rezeptor-Ligand fungieren, da es zwei dem EGF struktur-homologe Domänen besitzt. Über Aktivierung des EGFR scheint rhAPC demnach eigenständig die mitogenen und zytoprotektiven Funktionen von EGF und EREG vermitteln zu können. Diese Annahme bestätigt sich in Arbeiten der Forschergruppe um Xue et al., die 2007 bewiesen, dass Protein C als autokriner Wachstumsfaktor die Migration und Proliferation von humanen Keratinozyten fördert und antiapoptotische Effekte ausübt. Hierbei wird der EGFR von Protein C/rhAPC unter Mitwirkung des Rezeptors PAR-1 aktiviert (Xue et al., 2007). Eine Beteiligung des EGFR im antiinflammatorischen Wirkgeschehen von rhAPC wurde von der Gruppe um Feistritzer et al. (2006) konstatiert. Ihren Angaben zufolge bewirkt rhAPC in Lymphozyten über eine EPCR-abhängige PAR-1-Aktivierung die Transaktivierung des EGFR, wodurch die chemotaktische Migration dieser Immunzellen verhindert wird (Feistritzer et al., 2006).

Möglicherweise ist die rhAPC-bedingte Herabregulierung von EGF und EREG ein Kontrollmechanismus, der eine übermäßige EGFR-Aktivierung verhindern soll.

**Ephrine** sind wichtige Mediatoren der Zell-Kommunikation und beeinflussen die Gestalt und Motilität neuronaler und endothelialer Zellen (Aasheim et al., 2005). In Interaktion mit ihren zugehörigen Ephrinrezeptoren (EphR) üben sie chemotaktisch richtungweisende Signale auf auswachsende Kapillarsprossen aus. Über die Abgrenzung arterieller und venöser Gefäße dirigieren Ephrine die Anordnung der Gefäße zu einem funktionalen Netzwerk (Hayashi et al., 2005). Ferner nimmt das Ephrin-/EphR-System auch Einfluss auf die Aktivierung und Chemotaxis von Immunzellen (Pfaff et al., 2006).

Ephrine agieren nicht als lösliche Liganden, sondern in membrangebundener Form. Eine weitere Besonderheit des Ephrin-/EphR-Systems ist seine Fähigkeit, bidirektional Effekte vermitteln zu können. Der membranassoziierte Ligand kann nach Bindung am EphR Signale ins Innere seiner exprimierenden Zelle transferieren und so selbst Rezeptorfunktion übernehmen. Man unterscheidet daher zwischen einem „Vorwärtssignal“, das in die rezeptortragende Zelle geleitet wird und einem „Rückwärtssignal“, das in der liganden-tragenden Zelle entsteht. Interessanterweise werden in ECs, die sowohl Ephrin-Liganden, als auch EphR exprimieren können, je nach Signalrichtung gegenläufige Effekte übermittelt. So bewirkt ein Ephrin-B2-Vorwärtssignal in ECs eine Proliferations- und Migrationshemmung, die entgegengesetzte Signalrichtung fördert jedoch diese Vorgänge (Hamada et al., 2003).

Die Familie der Ephrine besteht aus 8 Liganden und 14 Rezeptoren, deren Auswirkungen auf das Angiogenesegeschehen noch weitgehend unbekannt sind. Aufgrund der Komplexität der Ephrinwirkungen während der Gefäßbildung gestaltet sich eine angiogenesebezogene Interpretation der rhAPC bedingten Expressionsverminderung von EFNA1 und -B2 sowie des EphB4-Rezeptors in EPCs als schwierig. Davon abgesehen lässt sich nicht beurteilen, inwieweit andere Mitglieder der Ephrin-/EphR-Familie die Wirkungen der expressionsverminderten Gene kompensieren können.

Im Entzündungsgeschehen vermitteln Ephrine jedoch eindeutige Effekte; sie wirken über chemotaktische Rekrutierung von Immunzellen proinflammatorisch. Das von ECs exprimierte **Ephrin-A1** stimuliert die Migration von CD4<sup>+</sup>T-Lymphozyten in entzündliches Gewebe (Aasheim et al., 2005) und **Ephrin-B2** trägt über seinen spezifischen **EphB4-Rezeptor** zur Kostimulation von T-Zellen bei, wodurch deren Proliferationsrate sowie die Sekretion des Zytokins IFN- $\gamma$  gesteigert wird (Yu et al., 2003).

Im Super Array zeigte rhAPC durch Expressionsminderung der genannten Ephrine und des EphB4-Rezeptors in EPCs folglich antiinflammatorische Wirkung. Eine Bestätigung dieser Ergebnisse findet sich in den Arbeiten zweier Forschergruppen, die Genexpressionsprofile von HUVECs nach Stimulation mit rhAPC erstellten. So ermittelte die Forschergruppe um Joyce et al. (2001) eine rhAPC-bedingte Herabregulierung des Gens für Ephrin-A1. In Versuchen von Riewald et al. wurde eine verminderte Expression von Ephrin-B2 festgestellt (Joyce et al., 2001; Riewald et al., 2005). Da EPCs als endotheliale Vorläufer ein mit HUVECs weitgehend übereinstimmendes Genspektrum besitzen, ist es nicht überraschend, dass rhAPC bei beiden Zelltypen ähnliche Veränderungen bewirkt.

Die Expression des „platelet-derived growth factor  $\alpha$  polypeptide“ (**PDGF-A**) wurde sowohl im Angiogenese- als auch im Arteriosklerose-Super Array in EPCs untersucht. In beiden Experimenten zeigte sich eine vergleichbar starke Herabregulierung der mRNA nach

Stimulation mit rhAPC. Das dem VEGF strukturverwandte PDGF wird von einer Vielzahl von Zellen, unter anderem auch von vaskulären ECs synthetisiert. Es tritt in drei Formen (PDGF-A, PDGF-B und PDGF-AB) mit divergierenden Polypeptid-Aminosäuresequenzen auf. Weiterhin existieren zwei verschiedene PDGF-Rezeptoren (PDGF- $\alpha$ - bzw. - $\beta$ -Rezeptor), wobei das im Array untersuchte PDGF-A exklusiv an den PDGF- $\alpha$ -Rezeptor bindet (Ross et al., 1986). Dieser Rezeptor wird u. a. von Fibroblasten, vaskulären glatten Muskelzellen und Thrombozyten exprimiert, nicht jedoch von kapillären ECs und Perizyten. Durch Aktivierung des PDGF- $\alpha$ -Rezeptors wird das Zellwachstum der Effektorzelle über mitogene Signale stimuliert (Heldin und Bengt, 1999), weshalb PDGF auch als Angiogenese-fördernder Faktor fungieren kann. Die angiogene Wirkung des PDGF ist jedoch schwächer als die anderer Wachstumsfaktoren und wird hauptsächlich durch PDGF-B über den auf kapillären ECs und perivaskulären Zellen lokalisierten PDGF- $\beta$ -Rezeptor vermittelt (Smits et al., 1989; Sundberg et al., 1993). Da im Super Array nur PDGF-A durch rhAPC herabreguliert wurde, sich die Expression von PDGF-B jedoch nicht signifikant veränderte, ist keine inhibierende Beeinflussung der Gefäßbildung über diesen Zusammenhang zu erwarten.

Eine Aktivierung des  $\alpha$ -Rezeptors durch PDGF-A bewirkt weiterhin inflammatorische Effekte durch Chemotaxis von Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten (Shure et al., 1992). Demnach wirkt rhAPC möglicherweise über Minimierung der PDGF-A-Expression in EPCs indirekt antiinflammatorisch.

In Bezug auf arteriosklerotische Erkrankungen könnte sich eine verminderte PDGF-A-Expression in endothelialen Zellen als positiv erweisen. In arteriosklerotischen Plaques wurden erhöhte PDGF-A und PDGF-B-Spiegel nachgewiesen und in Verbindung mit der inflammatorisch-fibroproliferativen Überaktivierung dieses Krankheitsbildes gebracht (Wilcox et al., 1988). Als mögliche Ursache einer derartigen Überaktivierung wird die Eigenschaft endothelialer Zellen gesehen, bei erniedrigter Blutströmung vermehrt PDGF-A zu produzieren (Kraiss et al., 1996). Durch Herabregulierung von PDGF-A in EPCs könnte rhAPC der Entstehung von arteriosklerotischen Ablagerungen entgegenwirken. Diese Mechanismen sind auch im Rahmen der Sepsistherapie interessant, da während des septischen Geschehens ebenfalls Verlangsamungen des Blutflusses auftreten können.

RhAPC reduzierte in den EPCs weiterhin die Expression der Rezeptoren „fibroblast growth factor receptor-3“ (FGFR3) und „endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor 1“ (S1P1, früher EDG1).

Der **FGFR3** ist einer von vier spezifischen Rezeptoren (FGFR1 - FGFR4), die die Effekte der großen Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren übermitteln. Mit über 20 Mitgliedern übernimmt die FGF-Familie eine wichtige Rolle bei zellulären Wachstums- und Differenzierungsvorgängen in der embryonalen Entwicklung. Im adulten Organismus fördern

FGFs durch ihre angiogene und antiapoptotische Kapazität die Regeneration und Heilung traumatisierter Gewebe. Sie können jedoch auch Entzündungsvorgänge verursachen und zur Entstehung und Progression tumoröser Prozesse beitragen. Die bedeutendsten FGFs sind der „acidic fibroblast growth factor“ (aFGF = FGF1) und der „basic fibroblast growth factor“ (bFGF = FGF2), die vergleichbare mitogene, chemotaktische und angiogene Effekte in neuroekt- und mesodermalen Zellen (z.B. Fibroblasten, glatte Muskelzellen, ECs) induzieren (Basilico und Moscatelli, 1992; Powers et al., 2000).

Da die einzelnen FGFs mit den vier FGF-Rezeptoren in einem komplexen Zusammenspiel interagieren, wobei die vermittelten Aktivitäten u.a. von der aktivierten Zellart sowie den Umständen der Aktivierung abhängig sind, ist eine Interpretation der rhAPC-induzierten Expressionsminderung des Rezeptors FGFR3 nicht möglich, auch aufgrund der Tatsache, dass die über FGFR3 vermittelten Effekte potentiell von den anderen FGF-Rezeptoren übernommen werden können.

**EDG1 (S1P1)** ist ein APC-relevanter Rezeptor, der nicht direkt von APC aktiviert wird, sondern über Crosstalk der beiden Rezeptoren EPCR und PAR-1. In erster Linie übermittelt EDG1 zytoprotektive Signale durch Apoptose-Prävention (Mosnier et al., 2006). Diese zellschützenden Effekte wirken zugleich antiinflammatorisch, da sie die endotheliale Barrierefunktion stabilisieren und so eine übermäßige entzündungsfördernde Permeabilitäts-erhöhung verhindern (Feistritzer und Riewald, 2005; Finigan et al., 2005).

Im Super Array wurde, im Gegensatz zu den RT-PCR Versuchen (hier keine erkennbare Expressionsänderung), eine rhAPC-abhängige Herabregulierung von EDG1 in EPCs festgestellt. Dies könnte man als selbstregulierende Hemmung der über EDG1 vermittelten APC-Effekte deuten. Allerdings vermag rhAPC auch über andere Mechanismen zytoprotektiv zu wirken, beispielsweise über die hier festgestellte Steigerung der VEGF-C-Expression und -Freisetzung sowie die vermehrte Expression von Ang-2.

Die rhAPC-bedingte Herabregulierung des angiogenen Wachstumsfaktors **VEGF-A** in den EPCs zeigt eine gegenläufige Tendenz zu den APC-Effekten in HUVECs. Hier stellten Jackson et al. eine Steigerung der VEGF-A-Expression durch rhAPC fest (Jackson et al., 2005). Zur Interpretation dieses Ergebnisses scheinen weitere Untersuchungen mit Zellen verschiedener Spender erforderlich.

#### Angiogenese-Inhibitoren:

**Thrombospondin-2** (THBS2) ist ein von Fibroblasten sezernierter, potenter Angiogenese-Inhibitor, der sowohl das Wachstum als auch die Proliferationsrate von ECs hemmt. Auch entzündungshemmende Eigenschaften (Verminderung der Produktion von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ ) werden dem THBS2 zugesprochen (Park et al., 2004).

Eine rhAPC-bedingte Herabregulierung dieses Inhibitors hätte demnach einen indirekt angiogenen und proinflammatorischen Effekt zur Folge. In ECs wird THBS2 jedoch nur sehr schwach exprimiert, so dass ein Einfluss auf die Angiogenese und das Entzündungsgeschehen über diese Zellen eher unwahrscheinlich ist (Armstrong et al., 2002).

Das der Angiopietin-Familie verwandte Protein „Angiopietin-like 4“ (**ANGPTL4**) wurde ebenfalls durch rhAPC in EPCs herabreguliert. ANGPTL4 ist ein starker Inhibitor der Endothelzellproliferation und -migration. Zusätzlich verhindert es die tubuläre Anordnung von ECs und vermag die proangiogenen Signale von VEGF zu unterdrücken (Ito et al., 2003).

Da rhAPC die Expression von ANGPTL4 in EPCs vermindert, hemmt es dessen stark angiostatische Wirkung. Somit dürfte rhAPC über Beeinflussung von ANGPTL4 indirekt proliferationssteigernde und proangiogene Effekte ausüben.

#### Angiogenese-Stimulatoren:

**Leptin**, ein primär von Adipozyten synthetisiertes, im Blut zirkulierendes Hormon, war der einzige Mediator, der durch rhAPC in EPCs eine Expressionssteigerung erfuhr.

Über hypothalamische Effekte beeinflusst Leptin das Sättigungsgefühl und den Energieverbrauch, wodurch das Körpergewicht reguliert wird. Neben seiner endokrinen Wirkung kann Leptin auch parakrin als Wachstumsfaktor fungieren. Dementsprechend wurde die Produktion von Leptin nicht nur im Fettgewebe, sondern auch in aktiven angiogenen Organen (Plazenta, fetales Herz etc.) nachgewiesen. Leptin fördert die Endothelzellproliferation und -migration und regt das Endothel zur Ausbildung röhrenförmiger Strukturen an (Sierra-Honigmann et al., 1998).

Durch Steigerung der Leptin-Expression wirkt rhAPC vermutlich indirekt proangiogen.

### **4.7 Proliferationssteigerung von EPCs durch Stimulation mit rhAPC**

Es konnte eine signifikante Steigerung der Proliferationsrate von EPCs nach Stimulation mit rhAPC nachgewiesen werden. RhAPC zeigte hierbei eine dem Wachstumsfaktor VEGF vergleichbare Steigerung der Zellzahl.

Proliferationssteigernde Effekte von rhAPC auf HUVECs wurden bereits 2004 festgestellt (Uchiba et al., 2004). Vergleichbare Versuche an EPCs sind bis jetzt jedoch noch nicht

bekannt. Laut Uchiba et al. (2004) lässt sich die Proliferationssteigerung der HUVECs über eine APC-bedingte Aktivierung des MAPK-Pfades mit Phosphorylierung der Kinasen MEK1/2 und ERK1/2 erklären (Uchiba et al., 2004). Der MAPK-Pfad stellt in vielen Zelllinien die Grundlage der durch Wachstumsfaktoren vermittelten Mitogenese dar. Er ist während der Mitose wie auch der Meiose aktiviert und übernimmt wichtige Funktionen in der Regulation von Zellzyklus, Zellwachstum und -proliferation (Pages et al., 1993). Der genaue Mechanismus der zur Proliferation führenden APC-Signaltransduktion in HUVECs liegt jedoch noch im Unklaren. Am wahrscheinlichsten erscheint die These, dass APC nach Bindung an den EPCR eine Transaktivierung des Rezeptors PAR-1 verursacht, die wiederum zur Phosphorylierung der MAP-Kinasen führt (Riewald et al., 2002).

In den FACS-Analysen konnte nachgewiesen werden, dass EPCs, ebenso wie HUVECs, die Rezeptoren PAR-1 und EPCR auf ihrer Oberfläche exprimieren (siehe 4.2). Demnach könnte auch in EPCs eine APC/EPCR-bedingte Transaktivierung des PAR-1-Rezeptors stattfinden. Die rhAPC-induzierte Steigerung der EPC-Zahl könnte also über einen vergleichbaren Mechanismus ablaufen wie bei HUVECs. Ein indirekt proliferativer Mechanismus lässt sich weiterhin in der hier festgestellten Steigerung der VEGF-C- und Ang-2-Expression (siehe 4.4 und 4.5) vermuten.

Die Hypothese, dass über das proliferative Potential von rhAPC womöglich auch Angiogenese vermittelt werden kann, wurde in ersten Tierexperimenten näher untersucht. Im angiogenen Stimulationsversuch induzierte rhAPC in der murinen *Cornea* ein vergleichbar starkes Gefäßwachstum wie der hochpotente Wachstumsfaktor VEGF (Uchiba et al., 2004). In verletzten Hautarealen von Ratten verbesserte rhAPC aufgrund seines proliferativen Potentials den Heilungsprozess. Da neben ECs auch Fibroblasten und Keratinozyten proliferative Effekte über rhAPC erfahren und zudem angiogene Promotoren wie die Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2) und VEGF in diesen Zelllinien hochreguliert werden, erfolgte ein schnellerer Wundverschluss mit verbesserter Durchblutung (Jackson et al., 2005).

Die hier nachgewiesene rhAPC-induzierte Proliferationssteigerung von EPCs könnte in vielfacher Hinsicht von therapeutischem Nutzen sein. Die Fähigkeit dieser Zellen zur Vaskulogenese, das heißt ein komplett neues Gefäßsystem *de novo* bilden zu können, ist bekannt. Durch vaskulogene Gefäßbildung wird embryonal ein primäres Gefäßnetz angelegt, das mit laufender Entwicklung über angiogene Gefäßreifung und -sprossung weiter ausgebaut wird. Dass Vaskulogenese auch postnatal im Rahmen der Geweberegeneration und als Reparaturmaßnahme nach traumatischen Prozessen stattfinden kann, wurde erst mit der Entdeckung der EPCs im adulten Organismus erkannt. Seither bietet sich ein weites Feld, die Einsatzmöglichkeiten von EPCs zur therapeutischen Vaskulogenese zu erkunden. In diversen Ischämie-Modellen bei Mensch und Tier bewirkte eine Transplantation von EPCs

eine Revaskularisierung der ischämischen Gebiete mit deutlich gesenkter Nekrotisierungsrate (Kalka et al., 2000a; Schattemann et al., 2001; Zhang et al., 2002; Huang et al., 2004; 2005). Auch in der Behandlung myokardialer Ischämien bei Herzinfarkt-Patienten erwies sich die Transplantation *ex vivo* vermehrter EPCs als erfolgreich (Kawamoto et al., 2001; Kocher et al., 2001; Schachinger et al., 2004; Wollert et al., 2004). EPCs können zudem zur Reendothelialisierung nach Gefäßverletzungen beitragen (Werner et al., 2002 und 2003) und unterstützen die Endothelialisierung von Gefäßprothesen (Kaushal et al., 2001). Aufgrund der genannten Eigenschaften sind EPCs im Sinne therapeutischer Vaskulogenese bei diversen Ischämie-assoziierten Erkrankungen einsetzbar, z.B. bei Diabetes, Herzinfarkt, Schlaganfall und möglicherweise auch in der schweren Sepsis. Bisher wurden hierbei *ex vivo* vermehrte Zellen transplantiert, um mit Hilfe gesteigerter EPC-Zellzahlen eine Gefäßneubildung in ischämischen Geweben zu erreichen.

Da rhAPC in der vorliegenden Studie die Zellzahl von EPCs *in vitro* steigerte und in Studien anderer Forscher (Uchiba et al., 2004; Jackson et al., 2005) bei diversen Zelllinien auch *in vivo* proliferative Effekte zeigte, könnte es die gefäßbildenden Effekte nach einer Transplantation von EPCs verstärken. Eventuell könnte sogar eine EPC-Transplantation vermieden werden, wenn rhAPC lokal im Ischämiegebiet appliziert wird. Hierbei könnte rhAPC die Anzahl der EPCs im ischämischen Bereich indirekt über VEGF-C und Ang-2 (Steigerung der EPC-Proliferation und chemotaktische Rekrutierung zirkulierender EPCs, siehe 4.4 und 4.5) erhöhen. Eine zeitgleiche GM-CSF-Mobilisierung von EPCs aus dem Knochenmark könnte die genannten Effekte zusätzlich intensivieren.

### 4.8 Fazit

- Bei den über Ficoll-Dichtegradient-Zentrifugation isolierten Zellen handelte es sich um EPCs, die spezifische Oberflächenmoleküle exprimieren (VEGFR-2/KDR-positiv, CD34-positiv (schwach), CD133-positiv (schwach), CD31-positiv, CD105-positiv, vWF-positiv, CD146-negativ).
- „Frühe“ EPCs und HUVECs lassen sich anhand des Oberflächenmoleküls CD146 eindeutig voneinander unterscheiden (frühe EPCs: CD146-negativ, HUVECs: CD146-positiv).
- EPCs sind Effektorzellen von APC, da sie die spezifischen Rezeptoren PAR-1, PAR-2, EPCR und S1P1 exprimieren und mit Ausnahme von PAR-2 konstitutiv auf ihrer Zelloberfläche tragen.
- RhAPC bewirkt in EPCs eine Expressionssteigerung seines zentralen Rezeptors PAR-1.

- RhAPC wirkt möglicherweise indirekt angiogen und lymphangiogen über Steigerung der Expression und Freisetzung des Wachstumsfaktors VEGF-C in HUVECs.
- RhAPC fördert vermutlich die Vaskulogenese über Steigerung der Expression des Wachstumsfaktors Ang-2 in EPCs und VEGF-C in HUVECs.
- RhAPC könnte über VEGF-C und Ang-2 zytoprotektiv wirken.
- RhAPC beeinflusst das Genexpressionsprofil von EPCs, wodurch folgende indirekt vermittelte Effekte resultieren könnten:
  - Antiinflammatorische Wirkung durch Herabregulierung inflammatorischer Mediatoren (IFN $\gamma$ ; TNF; CXCL1, - 3, - 4, - 5, -9, -10, Ephrin A1, - B2, PDGF-A)
  - Zytoprotektive Wirkung durch Herabregulierung von zytotoxisch und apoptotisch wirkenden Mediatoren (TNF; IFN $\gamma$ ; CXCL10)
  - Angiogene Wirkung durch Expressionsminderung angiostatischer Faktoren (CXCL-4, - 9, und - 10; IFN $\gamma$ ; Thrombospondin-2: Angiopoietin-like 4) und Expressionssteigerung des Angiogenesefaktors Leptin
  - Antikoagulative Wirkung durch Expressionsminderung gerinnungsfördernder Mediatoren (CXCL4; PDGF-A; TNF)
- RhAPC induziert die Proliferation von EPCs (vermutlich indirekt über Steigerung der Ang-2-Expression in EPCs und Steigerung der VEGF-C-Expression in HUVECs).

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Untersuchungen, dass rhAPC potentiell die Bildung von vaskulären und lymphatischen Gefäßen im Sinne einer gesteigerten Angiogenese und Vaskulogenese vermitteln kann. Dies könnte auf indirekte Weise geschehen und zwar einerseits durch Induktion angiogener Mediatoren auf Gen- und Proteinebene sowie andererseits durch Hemmung der Expression angiostatischer Mediatoren. Des Weiteren könnte rhAPC über Regulation der Genexpression indirekt antiinflammatorisch und zytoprotektiv wirken.

Diese Ergebnisse liefern interessante neue Einblicke in die molekularen Wirkmechanismen von rhAPC und können dazu beitragen, das Indikationsgebiet dieses multifunktionalen körpereigenen Antikoagulanz zu erweitern, z. B. als Therapeutikum ischämischer Erkrankungen und zur Verbesserung der Wundheilung.

## 5 Zusammenfassung

### **Wirkung von rekombinantem humanem aktiviertem Protein C auf humane Endothelzellen und endotheliale Progenitorzellen**

Das körpereigene „Aktivierte Protein C“ (APC) nimmt aufgrund seiner antikoagulativen und profibrinolytischen Wirkung eine Schlüsselfunktion in der Regulation der Blutgerinnung und der Aufrechterhaltung des hämostatischen Gleichgewichts ein. Darüber hinaus vermittelt APC antiinflammatorische und zytoprotektive Effekte, wodurch es auch als Entzündungsmodulator fungieren kann. Da das Krankheitsbild der Sepsis mit einer überschießenden Gerinnungsaktivierung sowie einer systemischen Entzündungsreaktion verbunden ist, gewann rekombinantes humanes APC (rhAPC) im Rahmen der Sepsistherapie an Bedeutung. Zahlreiche Studien an Patienten mit schwerer Sepsis belegen, dass eine Behandlung mit rhAPC die Mortalitätsrate senkt und den weiteren Verlauf der Erkrankung positiv beeinflusst. Bis heute stellt die Sepsis das einzige Indikationsgebiet für rhAPC dar, jedoch scheint dieses multifunktionale Antikoagulanz ein weitaus größeres Einsatzspektrum zu besitzen.

In diversen Tier-Modellen konnten *in vivo* angiogene Effekte von rhAPC nachgewiesen werden; die molekularen Grundlagen dieser Effekte sind jedoch weitgehend unbekannt. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von rhAPC auf die Vaskulogenese (*de novo*-Bildung von Gefäßen) und die Angiogenese (Ausprossung von Kapillaren aus bestehenden Gefäßen) *in vitro* zu untersuchen sowie die molekularen und zellulären Wirkmechanismen gefäßbildender Effekte zu erforschen. Hierzu wurden im Zellkultur-experiment Stimulationsversuche mit rhAPC an endothelialen Progenitorzellen (EPCs) und humanen Endothelzellen (HUVECs) durchgeführt.

Die Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung der EPCs erfolgte gemäß persönlicher Mitteilung der Gruppe Urbich/Dimmeler und in Anlehnung an ihre Veröffentlichungen (Dimmeler et al., 2001; Urbich und Dimmeler, 2004). Über Ficoll-Isolierung wurden mononukleäre Zellen aus „buffy coats“ isoliert und unter speziellen Bedingungen angezüchtet, die eine Ausdifferenzierung von EPCs begünstigen. Die Detektion der EPCs erfolgte durch Prüfung morphologischer und funktioneller Zelleigenschaften (LDL-Aufnahme, Lektin-Bindung) und durch den Nachweis spezifischer Oberflächenmoleküle in der FACS-Analyse. Die Zellen exprimierten die charakteristischen Marker VEGFR-2, CD34 (schwach), CD133 (schwach), CD31, vWF und CD105. Abweichend von Literaturvorgaben (Bompais et al., 2004; Smadja et al., 2006b) wurde das Adhäsionsmolekül CD146 nicht exprimiert. Da die FACS-Analyse im Vergleich zu anderen Gruppen zu einem früheren Zeitpunkt durchgeführt wurde, ist anzunehmen, dass die hier isolierten EPCs eine unreifere EPC-Population darstellen, die diesen Endothelzellmarker noch nicht exprimiert. Anhand von CD146 konnte hier erstmals eine Unterscheidung zwischen „frühen“ EPCs und HUVECs vorgenommen werden.

Da die Wirkung von rhAPC bisher noch nicht an EPCs getestet wurde, sollte zunächst ermittelt werden, ob EPCs Effektorzellen von APC sind. Hierzu wurde untersucht, ob EPCs die für die APC-Wirkung verantwortlichen Rezeptoren (PAR-1, PAR-2, EPCR und S1P1) exprimieren. Mittels RT-PCR konnten alle genannten APC-Rezeptoren in den EPCs auf Genebene detektiert werden. Der Nachweis auf der Zelloberfläche erfolgte in der FACS-Analyse, wobei die APC-relevanten Rezeptoren, mit Ausnahme von PAR-2, darstellbar waren. In darauf folgenden Stimulationsversuchen (RT-PCR) steigerte rhAPC die Genexpression des Rezeptors PAR-1 in EPCs. Die Expression der Rezeptoren PAR-2, EPCR und S1P1 wurde durch rhAPC nicht verändert.

In weiteren Experimenten (RT-PCR, ELISA) wurde untersucht, ob rhAPC die Genexpression bzw. die Synthese wichtiger Mediatoren der Vaskularisation beeinflusst. Hierbei bewirkte rhAPC eine Expressionssteigerung des Wachstumsfaktors „vascular endothelial growth factor-C“ (VEGF-C) in HUVECs sowie eine zeit- und dosisabhängige Erhöhung der endothelialen VEGF-C-Freisetzung. In EPCs wurde der angiogen und vaskulogen wirkende Mediator Angiopoietin-2 (Ang-2) vermehrt nach Stimulation mit rhAPC exprimiert.

In einem Screening-Verfahren (Real-Time RT-PCR) wurde ein Genexpressionsprofil von EPCs nach Stimulation mit rhAPC erstellt. RhAPC zeigte hier ein indirekt proangiogenes Potential, indem es die Expression angiostatischer Gene (Interferon- $\gamma$ , CXCL-Chemokin-4; -9; -10; Angiopoietin-like-4; Thrombospondin-2) verminderte und das stark angiogene Leptin hochregulierte. Daneben könnte rhAPC auch indirekt entzündungshemmend durch Herabsetzung der Expression proinflammatorischer Gene (Interferon- $\gamma$ ; TNF; PDGF-A, CXCL-Chemokin-1; -3; -4; -5; -9 und -10, Ephrin A1- und B2) wirken.

Weiterhin wurde untersucht, ob rhAPC einen Einfluss auf die Proliferation von EPCs ausübt. In Stimulationsversuchen konnte gezeigt werden, dass rhAPC die Zellzahlen von EPCs signifikant *in vitro* steigert. Dieser proliferative Effekt fördert die *de novo*-Bildung von Gefäßen, da die vaskulogene Aktivität mit der Zahl zirkulierender EPCs korreliert.

Die Ergebnisse dieser Studie belegen, dass rhAPC potentiell die Entstehung neuer Gefäße vermitteln kann. Der Mechanismus der Angiogenese könnte von rhAPC indirekt aktiviert werden, indem es die Expression und Freisetzung proangiogener Wachstumsfaktoren in HUVECs und EPCs steigert, während es angiostatisch wirkende Gene herabreguliert. Erstmals konnte hier auch eine indirekt vaskulogene Wirkung von rhAPC konstatiert werden, die auf einer Erhöhung der Anzahl von EPCs (Proliferationssteigerung und Mobilisierung aus dem Knochenmark durch VEGF-C und Ang-2) beruht. Zudem wurde eine indirekt antiinflammatorische Beeinflussung der Genexpression durch rhAPC festgestellt.

Die vorliegende Doktorarbeit kann dazu beitragen, neue therapeutische Indikationen von rhAPC im Rahmen der Revaskularisierung ischämischer Gewebe zu erschließen (z.B. bei Traumata, kardiovaskulären Verschlusskrankungen oder Diabetes).

## 6 Summary

### **Effect of recombinant human activated protein C on human endothelial cells and endothelial progenitor cells**

The endogenous serine protease “activated protein C” (APC) is a key regulator of blood coagulation and fibrinolysis to maintain hemostasis. In addition to its anticoagulant and profibrinolytic properties APC can also modulate inflammatory responses, because it exerts antiinflammatory and antiapoptotic activity.

Therefore APC is a therapeutical option for the treatment of septic diseases, which are characterized by widespread coagulopathy and systemic inflammation. As various studies have shown, “recombinant human activated protein C” (rhAPC) can reduce the mortality in septic patients. To date severe sepsis is the only indication for rhAPC, although its multifunctional effects might have a greater therapeutic potential.

Previous studies in animals already confirmed that rhAPC can promote revascularization after tissue-ischemia *in vivo*. However, the molecular mechanisms of these angiogenic activities are still unknown. Therefore this study was aimed to discover the influence of rhAPC on vasculogenesis (*de-novo*-synthesis of blood vessels) and angiogenesis (sprouting of capillaries from pre-existing vessels) *in vitro* and to detect new molecular and cellular mechanisms for vascularization. “Endothelial progenitor cells” (EPCs) were used to examine whether rhAPC can induce vasculogenesis and “human umbilical vein endothelial cells” (HUVECs) served as a model to examine the ability of rhAPC to promote angiogenesis. Both cell-types were isolated and cultivated by the author.

The isolation and characterization of EPCs was based on protocols and private information from the group around Urbich/Dimmeler (Dimmeler et al., 2001; Urbich and Dimmeler, 2004). Mononuclear cells were isolated from buffy coats by Ficoll-density-separation and cultivated under special conditions to facilitate their differentiation into EPCs. The characterization of EPCs was performed by FACS-analysis, where EPC-typical cell surface markers were detectable (VEGFR-2, CD34 (weak), CD133 (weak), CD31, vWF and CD105). In addition, morphological and functional (LDL-uptake and lectin-binding) cell-properties of EPCs were verified. In contrast to the results of other investigator groups (Bompais et al., 2004; Smadja et al., 2006b) the isolated EPCs in this study did not express the adhesion molecule CD146. One possible explanation for this could lie in the FACS-analysis being performed comparatively sooner after isolation. One can assume that these younger EPCs would represent a more pre-mature EPC-population, which would express the endothelial surface molecule CD146 in future. Using the adhesion molecule CD146 as a means to distinguish between “early” EPCs and HUVECs was performed in this study for the first time.

As rhAPC has never been tested on EPCs before, it was examined, whether EPCs express the receptors which transfer the effects of APC (PAR-1, PAR-2, EPCR and S1P1). In RT-PCR-experiments the mRNA-expression of all APC-relevant receptors could be confirmed in the isolated EPCs. By using FACS-analysis these receptors were detectable on the cell surface with exception of PAR-2. In stimulation experiments (RT-PCR) rhAPC up-regulated the expression of PAR-1-mRNA in EPCs. There was no effect of rhAPC on the receptor expression of PAR-2, EPCR and S1P1.

The effect of rhAPC on the expression and release of important mediators of angiogenesis and vasculogenesis was examined in HUVECs and EPCs (RT-PCR, ELISA) during subsequent experiments. Following treatment with rhAPC, HUVECs showed an increased expression of the angiogenic cytokine “vascular endothelial growth factor-C” (VEGF-C). In addition a time- and dose-dependent release of VEGF-C-protein was discovered in these cells. In EPCs rhAPC augmented the mRNA levels of the angiogenic and vasculogenic mediator angiopoietin-2 (Ang-2).

The geneexpression profile of EPCs was examined following stimulation with rhAPC in a real-time RT-PCR-screening-array. The results showed a potential angiogenic effect of rhAPC by down-regulating angiostatic genes (Interferon- $\gamma$ , Angiopoietin-like-4; CXCL-chemokine-4; -9; -10; Thrombospondin-2) and up-regulating the proangiogenic gene of leptin. Moreover a probable antiinflammatory effect of rhAPC could be documented by its ability to down-regulate the expression of proinflammatory genes (Interferon- $\gamma$ ; TNF; PDGF-A, CXCL-chemokine-1; -3; -4; -5; -9; -10, Ephrin A1 and -B2).

It was also examined whether rhAPC can influence the proliferation of EPCs, because vasculogenic activity highly correlates to the number of circulating EPCs. This is the first study to show that rhAPC significantly increases the number of EPCs *in vitro*.

Summarized these *in vitro* results show that rhAPC may have the ability to induce blood vessel formation. RhAPC may probably promote angiogenesis because it increases the expression and the release of proangiogenic factors in HUVECs and EPCs. On the other hand it down-regulates angiostatic factors in these cells. RhAPC also might be able to induce vasculogenesis by stimulating the proliferation of EPCs and mobilizing them from the bone-marrow through VEGF-C and Ang-2. In addition a potential new antiinflammatory mechanism of rhAPC was discovered in the down-regulation of proinflammatory genes in EPCs.

These results indicate various possible new indications for rhAPC as a transmitter of revascularization after ischemic tissue disease (e.g. traumata, cardiovascular diseases or diabetes).

---

## 7 Literatur

- Aasheim H.C., Delabie J., Finne E. F.** Ephrin-A1 binding to CD4<sup>+</sup> T lymphocytes stimulates migration and induces tyrosine phosphorylation of PYK2. *Blood* **105** (7), 2869-76 (2005).
- Achen M.G., Jeltsch M., Kukk E., Makinen T., Vitali A., Wilks A.F., Alitalo K., Stacker S.A.** Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor-2 (Flk1) and VEGF receptor-3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 548-53 (1998).
- Aicher A., Zeiher A.M., Dimmeler S.** Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension* **45**; 321-5 (2005).
- Alitalo K., Tammela T., Petrova T.V.** Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* **438**, 946-53 (2005).
- Angiolillo A.L., Sgadari C., Taub D.D., Liao F., Vitali A., Wilks A.F., Alitalo K., Stacker H.K., Reaman G.H., Tosato G.** Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* **182**, 155-62 (1995).
- Armstrong L.C., Björkblom B., Hankenson K.D., Siadak A.W., Stiles C.E., Bornstein P.** Thrombospondin 2 inhibits microvascular endothelial cell proliferation by a caspase-independent mechanism. *Mol Biol Cell* **13**, 1893-1905 (2002).
- Asahara T., Chen D.H., Takahashi T., Fujikawa K., Kearney M., Magner M., Yancopoulos G.D., Isner J.M.** Tie-2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res* **83**, 233-40 (1998).
- Asahara T., Kawamoto A.** Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C572-9 (2004).
- Asahara T., Masuda H., Takahashi T., Kalka C., Pastore C., Silver M., Kearne M., Magner M., Isner J.M.** Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* **85**, 221-8 (1999a).
- Asahara T., Takahashi T., Masuda H.** VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* **18**, 3964-72 (1999b).
- Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schatteman G., Isner J.M.** Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964-7 (1997).
- Badorff C., Brandes R.P., Popp R., Rupp S., Urbich C., Aicher A., Fleming I., Busse R., Zeiher A.M., Dimmeler S.** Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* **107**, 1024-32 (2003).
- Bae J-S., Yang L., Manithody C., Rezaie A.R.** The ligand occupancy of endothelial protein C switches the protease-activated receptor1-dependent signaling specificity of thrombin from a permeability-enhancing to a barrier-protective response in endothelial cells. *Blood* **110** (12), 3909-16 (2007).
- Bagley R.G., Walter-Yohrling J., Cao X., Weber W., Simons B., Cook B.P., Chartrand S.D., Wang C., Madden S.L., Teicher B.A.** Endothelial precursor cells as a model of tumor endothelium: characterization and comparison with mature endothelial cells. *Cancer Res* **63**, 5866-73 (2003).

- Bahlmann F.H., De Groot K., Spandau J.M. et al.** Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood* **103**, 921-6 (2004).
- Bajzar L., Jain N., Wang P., Walker J.B.** Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor: not just an inhibitor of fibrinolysis. *Crit Care Med* **32**, (Supplement 5), 320-4 (2004).
- Bajzar L., Manuel R., Nesheim M.E.** Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* **270**, 14477-84 (1995).
- Bajzar L., Nesheim M., Tracy P.B.** The profibrinolytic effect of activated protein C in clots formed from plasma is TAFI-dependent. *Blood* **88**, 2093-2100 (1996).
- Bardin N., Anfosso F., Massé J-M., Cramer E., Sabatier F., Le Bivic A., Sampol J., Dignat-George F.** Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion. *Blood* **98**, 3677-84 (2001).
- Basilico C., Moscatelli D.** The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res (United States)* **59**, 115-65 (1992).
- Bender J.G., Unverzagt K.L., Walker D.E., Lee W., Van Epps D.E., Smith D.H., Stewart C.C To L.B.** Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. *Blood* **77**, 2591-6 (1991).
- Bernard G.R., Vincent J.L., Laterre P.F., La Rosa S.P., Dhainaut J.F., Lopez-Rodriguez A., Steingrub J.S., Garber G.E., Helterbrand L.D., Ely E.W., Fisher C.J. Jr.** The recombinant human activated protein C worldwide evaluation in severe sepsis (PROWESS) study group (2001). Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* **344**, 699-709 (2001).
- Bhattacharya V., McSweeney P.A., Shi Q., Bruno B., Ishida A., Nash R., Storb R.F., Sauvage L.R., Hammond W.P., Wu M.H.D.** Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester graft seeded with CD34+ bone marrow cells. *Blood* **95**, 581-5 (2000).
- Bishop A.E., Buttery L.D., Polak J.M.** Embryonic stem cells. *J Pathol* **197**, 424-9 (2002).
- Bizios R., Lai L., Fenton J.W 2nd, Malik A.B.** Thrombin-induced chemotaxis and aggregation of neutrophils. *J Cell Physiol* **128**, 485-90 (1986).
- Blau H.M., Brazelton T.R., Weimann J.M.** The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* **105**, 829-41 (2001).
- Bompais H., Chagraoui J., Canron X., Crisan M., Hui Liu X., Anjo A., Tolla-Le Port C., Leboeuf M., Charbord P., Bikfalvi A., Uzan G.** Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood* **103** (7), 2577-84 (2004).
- Breslin J.W., Gaudreault N., Watson K.D., Reynoso R., Yuan S.Y., Wu M.H.** Vascular endothelial growth factor-C stimulates the lymphatic pump by a VEGF receptor-3-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H709-18 (2007).
- Brock T, Dvorak H.F., Senger D.R.** Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca<sup>2+</sup> and von Willebrand factor release in human endothelial cells. *Am J Pathol* **138**, 213-21 (1991).
- Brueckmann M., Glasl C., Schmidt J., Lang S., Hoffmann U., Borggreffe M.** Recombinant human activated protein C increases the number of endothelial progenitor cells in vitro. *Infection* **35** (Suppl. II), 35 (2007).

- 
- Brueckmann M., Hoffmann U., De Rossi L., Weiler H.M., Liebe V., Lang S; Kaden J.J., Borggreffe M., Haase K.K., Huhle G.** Activated protein C inhibits the release of macrophage inflammatory protein-1-alpha from THP-1 cells and from human monocytes. *Cytokine* **26**, 106-13 (2004).
- Brueckmann M., Huhle G., Max M.** Wirkungsweise von rekombinantem humanem aktiviertem Protein C. *Der Anaesthetist* **55** (Supplement 1), 5-15 (2006), Springer Medizin Verlag.
- Busch C., Cancilla P., DeBault L., Goldsmith J., Owen W.** Use of endothelium cultured on microcarriers as a model for the microcirculation. *Lab Invest* **47**; 498-504 (1982).
- Bussolati B., Dunk C., Grohman M., Kontos C.D., Mason J., Ahmed A.** Vascular endothelial growth factor receptor-1 modulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis via nitric oxide. *Am J Pathol* **159** (3), 993-1008 (2001).
- Cao Y., Linden P., Farnebo J., Cao R., Eriksson A., Kumar V., Qi J-H., Claesson-Welsh L., Alitalo K.** Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 14389-94 (1998).
- Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeyt S., Kieckens L., Gertsenstein M., Fahrig M., Vandenhoek A., Harpal K., Eberhardt C., Declercq C., Pawling J., Moons L., Collen D., Risau W., Nagy A.** Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**, 435-9 (1996).
- Carmeliet P.** Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Med* **6**, 389-95 (2000).
- Carmeliet P.** Angiogenesis in health and disease. *Nature Med* **6**, 653-60 (2003).
- Carmeliet P.** Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**, 932-6 (2005).
- Case J., Mead L.E., Bessler W.K., Prater D., White H.A., Reza Saadatzadeh M., Bhavsar J.R., Yoder M.C., Haneline L.S., Ingram D.A.** Human CD34<sup>+</sup> AC133<sup>+</sup> VEGFR-2<sup>+</sup> cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp Hematol* **35**, 1109-18 (2007).
- Chang M., McNinch J., Basu R., Simonet S.** Cloning and characterization of the human neutrophil-activating peptide (ENA-78) gene. *J Biol Chem* **269** (41), 25277-82 (1994).
- Chen C.M., Hou C.C., Cheng K.C., Tian R.L., Chang C.P., Lin M.T.** Activated protein C therapy in a rat heat stroke model. *Crit Care Med* **34**, 1960-6 (2006).
- Cheng T., Liu D., Griffin J.H., Fernandez J.A., Castellino F., Rosen E.D., Fukudome K., Zlokovic B.V.** Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Neuro Med* **9**, 338-42 (2003).
- Cheung A.H., Steward R.T., Marsden P.A.** Endothelial Tie2/Tek ligands angiopoietin-1 (ANGPT1) and angiopoietin-2 (ANGPT2): regional localization of the human genes to 8q22.3-q23 and 8p23. *Genomics* **48**, 389-91 (1998).
- Choi K., Kennedy M., Kazarov A., Papadimitriou J.C., Keller G.** A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* **125**, 725-32 (1998).
- Choi K.** The hemangioblast: a common progenitor of hematopoietic and endothelial cells. *J Hematother Stem Cell Res* **11**, 91-101 (2002).
- Conway E.M., Rosenberg R.D.** Tumor necrosis factor suppresses transcription of the thrombomodulin gene in endothelial cells. *Mol Cell Biol* **8**, 5588-92 (1988).
-

- Cross M.J., Dixelius J., Matsumoto T., Claesson-Welsh L.** VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci* **28**, 488-94 (2003).
- Crowther M., Brown N.J., Bishop E.T., Lewis C.E.** Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol* **70**, 478-90 (1996).
- Dahlbäck B., Hillarp A., Rosen S., Zoeller B.** Resistance to activated protein C, the FV:Q506 allele, and venous thrombosis. *Ann Hematol* **72**, 166-76 (1996).
- Daly C., Pasnikowski E., Burova E., Wong V., Aldrich T.H., Griffiths J., Ioffe E., Daly T.J., Fandl J.P., Papadopoulos N., McDonald D.M., Thurston G., Yancopoulos G., Rudge J.S.** Angiopoietin-2 functions as an autocrine protective factor in stressed endothelial cells. *PNAS* **103** (42) 15491-6 (2006).
- Davis S., Aldrich T.H., Jones P.F., Acheson A., Compton D.L., Jain V., Ryan T.E., Bruno J., Radziejewski C., Maisonpierre P.C., Yancopoulos G.D.** Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* **87**(7), 1161-9 (1996).
- Dhainaut J.F., Yan S.B., Margolis B.D., Lorente J.A., Russell J.A., Freebairn R.C., Spapen H.D., Riess H., Basson B., Johnson G. 3<sup>rd</sup>, Kinasewitz G.T.** PROWESS sepsis study group (2003). Drotrecogin alfa (activated) (recombinant human protein C) reduces host coagulopathy response in patients with severe sepsis. *Thromb Haemost* **90**, 642-53 (2003).
- Dhainaut J.F., Marin N., Mignon A., Vinsonneau C.** Hepatic response to sepsis: Interaction between coagulation and inflammatory processes. *Crit Care Med* **29** (Suppl 1), 42-7 (2001).
- Dimmeler S., Aicher A., Vasa M., Mildner-Rihm C., Adler K., Tiemann M., Rütten H., Fichtlscherer S., Martin H., Zeiher A.M.** HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* **108**, 391- 7 (2001).
- Drake C.J.** Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth Def Res (Part C)* **69**, 73-82 (2003).
- Dreyfus M., Magny J.F., Bridey F., Schwarz H.P., Planche C., Dehan M., Tchernia G.** Treatment of homozygous protein C deficiency and neonatal purpura fulminans with purified protein C concentrate. *N Engl J Med* **325**, 1565-8 (1991).
- Dumont D.J., Yamaguchi T.P., Conlon R.A., Rossant J., Breitman M.L.** Tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene* **7**, 1471-80 (1992).
- Dumont D.J., et al.** Dominant-negative targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, *tek*, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev* **8**, 1897-1909 (1994).
- Dumont D.J., Jussila L., Taipale J., Lymboussaki A., Mustonen T., Pajusola K., Breitman M., Alitalo K.** Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* **282**, 946-9 (1998).
- Eichmann A., Pardanaud L., Yuan L., Moyon D.** Vasculogenesis and the search for the hemangioblast. *J Hematother Stem Cell Res* **11**, 207-14 (2002).
- Enholm B., Paavonen K., Ristimäki A., Kumar V., Gunji Y., Klefstrom J., Kivinen L., Laiho M., Olofsson B., Joukov V., Eriksson U., Alitalo K.** Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene* **14**, 2475-83 (1997).
- Erber W.N.** Human leucocyte differentiation antigens: review of the CD nomenclature. *Pathology* **22**, 61-9 (1990).

- Esmon C.T.** The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* **264**, 4743-6 (1989).
- Esmon C.T.** The anticoagulant and antiinflammatory roles of the protein C anticoagulant pathway. *J Autoimmun* **15**, 113-6 (2000a).
- Esmon C.T.** The protein C pathway. *Crit Care Med* **28**, 44-8 (2000b).
- Esmon C.T.** Protein C anticoagulant pathway and its role in controlling microvascular thrombosis and inflammation. *Crit Care Med* **29** (Suppl 1), 48-52 (2001).
- Esmon C.T.** Protein C pathway in sepsis. *Ann Med* **34**, 598-605 (2002).
- Faust S.N., Levin M., Harrison O.B., Goldin R.D., Lockhart M.S., Kondaveeti S., Laszik Z., Esmon C.T., Heydermann R.S.** Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. *N Engl J Med* **345**, 408-16 (2001).
- Feistritzer C., Mosheimer B.A., Sturn D.H., Riewald M., Patsch J.R., Wiedermann C. J.** Endothelial protein C receptor-dependent inhibition of migration of human lymphocytes by protein C involves epidermal growth factor receptor. *J Immunol* **176**, 1019-25 (2006).
- Feistritzer C., Riewald M.** Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR-1-dependent shingosine 1-phosphat receptor-1 crossactivation. *Blood* **105**, 3178-84 (2005).
- Feldman E.D., Weinreich D.M., Carroll N.M., Burness M.L., Feldman A.L., Turner E., Xu H., Alexander H.R., Jr.** Interferon gamma-inducible protein 10 selectively inhibits proliferation and induces apoptosis in endothelial cells. *Ann Surg Oncol* **13** (1), 125-33 (2006).
- Fernandez J.A., Xu X., Liu D., Zlokovic B.V., Griffin J.H.** Recombinant murine activated protein C is neuroprotective in a murine ischemic stroke model. *Blood Cells Mol Dis* **30**, 271-6 (2003).
- Ferrara N., Davis-Smyth T.** The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* **18**, 4-25 (1997).
- Ferrara N., Henzel W.J., Gospodarowicz D.** Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **161**, 851-8 (1989).
- Ferrara N.** Role of vacular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kid Int* **56**, 794-814 (1999)
- Fiedler U., Scharpfenecker M., Koidl S., Hegen A., Grunow V., Schmidt J.M., Kritz W., Thurston G., Augustin H.G.** The Tie-2 ligand Angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood* **103**, 4150-6 (2004).
- Fijnvandraat K., Derkx B., Peters M., Bijlmer R., Sturk A., Prins M.H., van Deventer S.J., Cate J.W.** Coagulation activation and tissue necrosis in meningococcal septic shock: severely reduced Protein C levels predict a high mortality. *Thromb Haemost* **73**, 15-20 (1995).
- Fina J., Molgard H.V., Robertson D., et al.** Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* **75**, 2417-26 (1990).

- 
- Finigan J.H., Dudek S.M., Singleton P.A., Chiang E.T., Jacobson J.R., Camp S.M., Ye S.Q., Garcia J.G.N.** Activated protein C mediates novel lung endothelial barrier enhancement: role of sphingosine 1-phosphat receptor transactivation. *J Biol Chem* **280**, 17286-93 (2005).
- Fisher C.J. Jr., Yan S.B.** Protein C levels as a prognostic indicator of outcome in sepsis and related diseases. *Crit Care Med* **28**, 49-56 (2000).
- Flamme I., Risau W.** Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development* **116**, 435-9 (1992).
- Folkman J., Shing Y.** Angiogenesis. *J Biol Chem* **267**, 10931-4 (1992).
- Friedmann G., Silva E., Vincent J.L.** Has the mortality of septic shock changed with time? *Crit Care Med* **26**, 2078-86 (1998).
- Friedrich E.B., Walenta K., Scharlau J., Nickenig G., Werner N.** CD34-/CD133+/VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. *Circ Res* **98**, e20-e25 (2006).
- Friesel R., Komoriya A., Maciag T.** Inhibition of endothelial cell proliferation by gamma-interferon. *J Cell Biol* **104**, 689-96 (1987).
- Fukudome K., Esmon C.T.** Identification, cloning and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem* **269**, 26486-91 (1994).
- Gale N.W., Thurston G., Hackett S.F., Renard R., Wang Q., McClain J., Martin C., Witte C., Witte M.H., Jackson D., Suri C., Campochiaro P.A., Wiegand S.J., Yancopoulos G.D.** Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by angiopoietin-1. *Dev Cell* **3**, 411-23 (2002).
- Gehling U.M., Ergun S., Schumacher U., Wagener C., Pantel K., Otte M., Schuch G., Schafhausen P., Mende T., Kilic N., Kluge K., Schafer B., Hossfeld D.K., Fiedler W.** In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* **95**, 3106-12 (2000).
- Gerber H.P., Malik A.K., Solar G.P., Sherman D., Liang X.H., Meng G., Hong K., Marsters J.C., Ferrara N.** VEGF regulates hematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* **417**, 954-8 (2002).
- Gerber H.P., Mc Murtrey A., Kowalski J., Yan M., Keyt B.A., Dixit V., Ferrara N.** Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/akt signal transduction pathway. *J Biol Chem* **46** (13), 30336-43 (1998).
- Gill K.A., Brindle N.P.J.** Angiopoietin-2 stimulates migration of endothelial progenitors and their interaction with endothelium. *Biochem Biophys Res Com* **336** (2), 392-6 (2005).
- Gill M., Dias S., Hattori K.** Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR(+)/AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res* **88**, 167-74 (2001).
- Gille H., Kowalski J., Li B., LeCouter J., Moffat B., Zioncheck T.F., Pelletier N., Ferrara N.** Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem* **276**, 3222-30 (2001).
- Giulietti A., Overbergh L., Valckx D., Decallonne B., Bouillon R., Mathieu C.** An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* **25**, 386-401 (2001).
-

- 
- Grey S.T., Tsuchida A., Hau H., Orthner C.L., Salem H.H., Hancock W.W.** Selective inhibitory effects of the anticoagulant activated protein C on the response of human mononuclear phagocytes to LPS, IFN-gamma, or phorbol ester. *J Immunol* **153**, 3664-72 (1994).
- Grinnel B.W., Hermann R.B., Yan S.B.** Human Protein C inhibits selectin-mediated cell adhesion: role of unique fucosylated oligosaccharide. *Glycobiology* **4**, 221-6 (1994).
- Grove J., Bruscia E., Krause D.** Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* **22**, 487-500 (2004).
- Gruber A., Griffin J.H.** Direct detection of activated protein C in blood from human subjects. *Blood* **79**, 2340-8 (1992).
- Gulati R., Jevremovic D., Peterson T.E., Chatterjee S., Shah V., Vile R.G., Simari R.D.** Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res* **93**, 1023-5 (2003).
- Guo H., Liu D., Gelbard H., Cheng T., Insalaco R., Fernández J.A., Griffin J.H., Zlokovic B.V.** Activated protein C prevents neuronal apoptosis via protease activated receptors 1 and 3. *Neuron* **41**, 563-72 (2004).
- Hack C.E., De Groot E.R., Felt-Bersma R.J.F., Nuijens J.H., Strack Van Schijndel R.J.M., Eerenberg-Belmer A.J.M., Thijs L.G., Aarden L.A.** Increased plasma levels of Interleukin-6 in sepsis. *Blood* **74**, 1704-10 (1989).
- Hackett S.F., Ozaki H., Strauss R.W., Wahlin K., Suri C., Maisonpierre P.C., Yancopoulos G.D., Campochiaro P.A.** Angiopoietin-2 expression in the retina: upregulation during physiologic and pathologic neovascularization. *J Cell Physiol* **184**, 275-84 (2000).
- Haghnegahdar H., Du J., Wang D., Strieter R.M., Burdick M D., Nanney L.B., Cardwell N., Luan J., Shattuck-Brandt R., Richmond A.** The tumorigenic and angiogenic effects of MGSA/GRO proteins in melanoma. *J Leukoc Biol* **67**, 53-62 (2000).
- Hamada K., Oike Y., Ito Y., Maekawa H., Miyata K., Shimomura T., Suda T.** Distinct roles of Ephrin-B2 forward and EphB4 reverse signaling in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 190-7 (2003).
- Hamada K., Oike Y., Takakura N., Ito Y., Jussila L., Dumont D.J., Alitalo K., Suda T.** VEGF-C signaling pathways through VEGFR-2 and VEGFR-3 in vasculogenesis and hematopoiesis. *Blood* **96**, 3793-800 (2000).
- Hanahan D.** Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* **277**, 48-50 (1997).
- Harfouche R., Hussain N.A.** Signaling and regulation of endothelial cell survival by angiopoietin-2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H1635-45 (2006).
- Harry L.E., Paleolog E.M.** From the cradle to the clinic: VEGF in development, physiological, and pathological angiogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today* **69** (4), 363-74 (2003).
- Hartman D.L., Bernard G.R., Helterbrand J.D., Yan S.B., Fisher C.J.** Recombinant human activated protein C (rhAPC) improves coagulation abnormalities associated with severe sepsis. *Intensive Care Med* **24** (Supplement 1), S77 (1998).
-

- 
- Hattori K., Dias S., Heissig B., et al.** Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med* **193**, 1005-1014 (2001).
- Hayashi S., Asahara T., Masuda H., Isner J.M., Losordo D.W.** Functional ephrin-B2 expression for promotive interaction between arterial and venous vessels in postnatal neovascularization. *Circulation* **111**, 2210-8 (2005).
- Hazzard T.M., Christenson L.K., Stouffer R.L.** Changes in expression of vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 and -2 in the macaque corpus luteum during the menstrual cyclus. *Mol Hum Reprod* **6**, 993-8 (2000).
- He X.F., Wen Z.B., Liu M.J., Zhang H., Li G., He S.L.** Levels of plasma des-gamma-carboxy protein C and prothrombin in patients with liver disease. *World J Gastroenterol* **10**, 3073-5 (2004).
- Heeb M.J., Espana F., Griffin J.H.** Inhibition and complexation of activated protein C by two major inhibitors in plasma. *Blood* **73**, 446-54 (1989).
- Heeschen C., Aicher A., Lehmann R., et al.** Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* **102**, 1340-6 (2003).
- Heldin C.-H., Westermark B.** Mechanisms of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* **79**, 1283-1316 (1999).
- Hesselvik F., Malm J., Dahlbäck B., Blomback M.** Protein C, protein S and C4b-binding protein in severe infection and septic shock. *Thromb Haemost* **65**, 126-9 (1991).
- Hildebrand P., Cirulli V., Prinsen R.C., Smith K.A., Torbett B.E., Salomon D.R., Crisa L.** The role of angiopoietins in the development of endothelial cells from cord blood CD34+ progenitors. *Blood* **104**, 2010-9 (2004).
- Hoffmann J.N., Vollmar B., Laschke M.W., Inthorn D., et al.** Microhemodynamic and cellular mechanisms of activated protein C action during endotoxemia. *Crit Care Med* **32**, 1011-7 (2004).
- Holash J., Wiegand S.J., Yancopoulos G.D.** New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* **18**, 5356-62 (1999).
- Hooper W.C., Phillips D.J., Renshaw M.A., Evatt B.L., Benson J.M.** The up-regulation of IL-6 and IL-8 in human endothelial cells by activated protein C. *J Immunol* **161**, 2567-73 (1998).
- Houck K.A., Ferrara J., Winer J., Cachianes G., Li B., Leung D.W.** The vascular endothelial growth factor family. Identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* **5**, 1806-1814 (1991).
- Hristov M., Erl W., Weber P.C.** Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 1185-9 (2003).
- Huang P.P., Li S.Z., Han M.Z., Xiao Z.J., Yang R.C., Qiu L.G., Han Z.C.** Autologous transplantation of peripheral blood stem cells as an effective therapeutic approach for severe arteriosclerosis obliterans of lower extremities. *Thromb Haemost* **91**, 606-9 (2004).
- Huang P., Li S., Han M., Xiao Z., Yang R., Han Z.C.** Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia in diabetes. *Diabetes Care* **28**, 2155-60 (2005).
-

- 
- Hung C.J., Ginzinger D.G., Zarnegar R., Kanauchi H., Wong M. G., Kebebew E., Clark O.H., Duh Q-Y.** Expression of vascular endothelial growth factor-C in benign and malignant thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **88** (8), 3694-9 (2003).
- Hur J., Yoon C.H., Kim H.S., Choi J.H., Kang H.J., Hwang K.K., Oh B.H., Lee M.M., Park Y.B.** Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 288-93 (2004).
- Ingram D.A., Caplice N.M., Yoder M.C.** Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* **106**, 1525-31 (2005).
- Isner J.M., Asahara T.** Angiogenesis und vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* **103** (9), 1231-6 (1999).
- Isobe H., Okajima K., Harada N., Liu W., Okabe H.** Activated protein C reduces stress-induced gastric mucosal injury in rats by inhibiting endothelial cell injury. *J Thromb Haemost* **2**, 313-20 (2004).
- Ito Y., Oike Y., Yasunaga K., Hamada K., Miyata K., Matsumoto S., Sugano S., Tanihara H., Masuho Y., Suda T.** Inhibition of angiogenesis and vascular leakiness by angiopoietin-related protein 4. *Cancer Res* **63**, 6651-7 (2003).
- Iwakura A., Luedemann C., Shastry S., Hanley A., Kearney M., Aikawa R., Isner J.M., Asahara T., Losordo D.W.** Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation* **108**, 3115-21 (2003).
- Iwama A., Hamaguchi I., Hashiyama M., Murayama Y., Yasunaga K., Suda T.** Molecular cloning and characterization of mouse TIE and TEK receptor tyrosine kinase genes and their expression in hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **195**, 301-9 (1993).
- Iwami Y., Masuda H., Asahara T.** Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future. *J Cell Mol Med* **8** (4), 488-97 (2004).
- Jackson C.J., Xue M., Thompson P., Davey R.A., Whitmont K., Smith S., Buisson-Legendre N., Sztynka T., Furphy L.J., Cooper A., Sambrook P., March L.** Activated protein C prevents inflammation yet stimulates angiogenesis to promote cutaneous wound healing. *Wound Rep Reg* **13**, 284-94 (2005).
- Jackson K.A., Majka S.M., Wang H., Pocius J., Hartley C. J., Majesky M.W., Entman M.L., Michael L.H., Hirschi K.K., Goodell M.A.** Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* **107**, 1395-402 (2001).
- Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G., Minick C.R.** Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins; identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* **52**, 2745-56 (1973).
- Jain R.K.** Antiangiogenetic therapy for cancer: current and emerging concepts. *Oncology* **19**, 7-16 (2005).
- Jamdar S., Siriwardena A.K.** Drotrecogin alfa (recombinant human activated protein C) in severe acute pancreatitis. *Crit Care* **9**, 321-2 (2005).
- Janssens S., Dubois C., Bogaert J., Theunissen K., Deroose C., Desmet W., Kalantzi M., Herbots L., Sinnaeve P., Dens J., Maertens J., Rademakers F., Dymarkowski S., Gheysens O., Van Cleemput J., Bormans G., Nuyts J., Mortelmans L., et al.** Autologous bone marrow-derived stem cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double blind, randomised controlled trial. *Lancet* **367**, 113-21 (2006).
-

- Jeltsch M., Kaipainen A., Joukov V., Meng X, Lakso M., Rauvala H., Awartz M., Fukumura D., Jain R.K., Alitalo K.** Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* **276**, 1423-5 (1997).
- Johnson K., Choi Y., DeGroot E., Samuels I., Creasey A., Aarden L.** Potential mechanisms for a proinflammatory vascular cytokine response to coagulation activation. *J Immunol* **160**, 5130-5 (1998).
- Jones N., Iljin K., Dumont D.J., Alitalo K.** Tie receptors : New modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 257-67 (2001).
- Joukov V., Pajusola K., Kaipainen A., Chilov D., Lahtinen I., Kukk E., Saksela O., Kalkkinen N., Alitalo K.** A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* **15**, 290-8 (1996).
- Joukov V., Sorsa T., Kumar V., Jeltsch M., Claesson-Welsh L., Cao Y., Saksela O., Kalkkinen N., Alitalo K.** Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J* **16** (13), 3898-3911 (1997).
- Joyce D.E., Gelbert L., Ciaccia A., DeHoff B., Grinnel B.W.** Gene expression profile of antithrombotic protein C defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* **276**, 11199-203 (2001).
- Kabrun N., Buhring H.J., Choi K., Ullrich A., Risau W. Keller G.** Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development* **124**, 2039-48 (1997).
- Kaipainen A., Korhonen J., Mustonen T., et al.** Expression of the fms-like tyrosine kinase FLT4 gene becomes restricted to endothelium of lymphatic vessels during development. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 3566-70 (1995).
- Kalka C., Masuda H., Takahashi T., Kalka Moll W.M, Silver M., Kearney M., Li T., Isner J.M., Asahara T.** Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 3422-7 (2000a).
- Kalka C., Tehrani H., Laudenberg B., et al.** VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *Ann Thorac Surg* **70**, 829-34 (2000b).
- Karkkainen M., Haiko P., Sainio K., Partanen J., Taipale J., Petrova T.V., Jeltsch M., Jackson D.G., Talikka M., Rauvala H., Betsholtz C., Alitalo K.** Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nature Immunol* **5** (1), 74-9 (2004).
- Kaushal S., Amiel G.E., Guleserian K.J., Shapira O.M., Perry T., Sutherland F.W., Rabkin E., Moran A.M., Schoen F.J., Atala A., Soker S., Bischoff J., Mayer J.E., Jr.** Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nature Med* **7**, 1035-40 (2001).
- Kawamoto A., Gwon H.C., Iwaguro H., Yamaguchi J.I., Uchida S., Masuda H., Silver M., Ma H., Kearney M., Isner J.M., Asahara T.** Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* **103**, 634-7 (2001).
- Kärpänen T., Heckman C.A., Keskitalo S., Jeltsch M., Ollila H., Neufeld G., Tamagnone L., Alitalo K.** Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors. *FASEB J* **20**, 1462-72 (2006).

- 
- Khan S.S., Solomon M.A., McCoy J.P., Jr.** Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* **64B**:1-8 (2005).
- Keck P.J., Hauser S.D., Krivi G., Sanzo K., Warren T., Feder J., Conolly D.T.** Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to platelet derived growth factor. *Science* **246**, 1309-12 (1989).
- Kerschen E.J., Fernandez J.A., Cooley B.C., Yang X.V., Sood R., Mosnier L.O., Castellino F.J., Mackman N., Griffin J.H., Weiler H.** Endotoxemia and sepsis mortality reduction by non-anticoagulant-activated protein C. *J Exp Med* **204** (10), 2439-48 (2007).
- Kim I., Kim H.G., So J.N., Kim J.H., Kwak H.J., Koh G.Y.** Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway. *Circ Res* **86**, 24-9 (2000a).
- Kim I., Kim J-H., Moon S-O., Kwak H.J., Kim N-G., Koh G.Y.** Angiopoietin-2 at high concentrations can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *Oncogene* **19**, 4549-52 (2000b).
- Kim I., Kim J-H., Ryu Y.S., Liu M., Koh G.Y.** Tumor necrosis factor- $\alpha$  upregulates angiopoietin-2 in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **269**, 361-5 (2000c).
- Kim K.E., Cho C-H., Kim H-Z., Baluk P., McDonald D.M., Koh G.Y.** In vivo actions of angiopoietins on quiescent and remodeling blood and lymphatic vessels in mouse airways and skin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 564-70 (2007).
- Kim K.I., Shin I-S., Kim J-M., Choi J-H., J., Jeon E-S., Suh W., Kim D-K.** Interaction between Tie receptors modulates angiogenic activity of angiopoietin-2 in endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res* **72**, 394-402 (2006).
- Kisiel W.** Human plasma protein C. Isolation, characterization and mechanism of activation by  $\alpha$ -thrombin. *J Clin Invest* **64**, 761-9 (1979).
- Koblizek T.I., Weiss C., Yancopoulos G.D., Deutsch U., Risau W.** Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis *in vitro*. *Current Biology* **8**, 529-32 (1998),
- Kocher A.A., Schuster M.D., Szabolcs M.J., Takuma S., Burkhoff D., Wang J., Homma S., Edwards N.M., Itescu S.** Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* **7**, 430-6 (2001).
- Kraiss I.W., Geary R.L., Mattson E.J.R., Vergel S., et al.** Acute reductions in blood flow and shear stress induce platelet-derived growth factor-A expression in baboon prothetic grafts. *Circ Res* **79**, 45-53 (1996).
- Krause D.S., Fackler M.J., Civin C.I., May W.S.** CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* **87**, 1-13 (1996).
- Krikun G., Schatz F., Finlay T., Kadener S., Mesia A., Gerrets R., Lockwood C.J.** Expression of angiopoietin-2 by human endometrial endothelial cells: regulation by hypoxia and inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* **275**, 159-63 (2000).
- Krzystek-Korpacka M., Matusiewicz M., Diakowska D., Grabowski K., Blachut K., Banas T.** Up-regulation of VEGF-C secreted by cancer cells and not VEGF-A correlates with clinical evaluation of lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). *Cancer Lett* **249**, 171-7 (2007).
-

- 
- Kukk E., et al.** VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* **122**, 3829-37 (1996).
- Kwak H.J., So J.N., Lee S.J., Kim I., Koh G.Y.** Angiopoietin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells. *FEBS Lett* **448**, 249-53 (1999).
- Laakkonen P., Waltari M., Holopainen T., Takahashi T., Pytowski B., Steiner P., Hicklin D., Persaud K., Tonra J.R., Witte L., Alitalo K.** Vascular endothelial growth factor receptor 3 is involved in tumor angiogenesis and growth. *Cancer Res* **67** (2), 593-9 (2007).
- Lane D.A., Denton J., Flynn A.M., Thunberg L., Lindahl U.** Anticoagulant activities of heparin oligosaccharides and their neutralization by platelet factor 4. *Biochem J* **218**, 725-32 (1984).
- Larrivée B., Lane D.R., Pollet I., Olive P.L., Humphries R.K., Karsan A.** Vascular endothelial growth factor receptor-2 induces survival of hematopoietic progenitor cells. *J Biol Chem* **278**, 22006-13 (2003).
- Lasagni L., Francalanci M., Annunziato F., Lazzeri E., Giannini S., Cosmi L., Sagrinati C., Mazinghi B., Orlando C., Maggi I., Marra F., Romagnani S., Serio M., Romagnani P.** A alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as a functional receptor for platelet factor 4. *J Exp Med* **197**, 1537-49 (2003).
- Laszik Z., Mitro A., Taylor F.B. Jr., Ferrell G., Esmon C.T.** Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway. *Circulation* **96**, 3633-40 (1997).
- Laufs U., Werner N., Link A., Endres M., Wassmann S., Jürgens K., Miche E., Böhm M., Nickenig G.** Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* **109**, 220-6 (2004).
- Lee S.H., Wolf P.L., Escudero R., Deutsch R., Jamieson S.W., Thistlethwaite P.A.** Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med* **342**, 626-33 (2000).
- Leyden D., Hattori K., Dias S., Costa C., Blaikie P., Butros L., Chadburn A., Heissig B., Marks W., Witte L., Wu Y., Hicklin D., Zhu Z., Hackett N.R., Crystal R.G., Moore M.A., Hajjar K.A., Manova K., Benezra R., Rafii S.** Impaired recruitment of bone marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nature Med* **7**, 1194-1201 (2001).
- Lin P., Buxton J.A., Acheson A., Radziejewski C., Maisonpierre P.C., Yancopoulos G.D., Channon K.M., Hale L.P., Dewhirst M.W., George S.E., Peters K.G.** Antiangiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **95** (15), 8829-34 (1998).
- Lin T.N., Wang C.K., Cheung W.M., Hsu C.Y.** Induction of angiopoietin and Tie receptor mRNA expression after cerebral ischemia-reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**, 387-95 (2000).
- Llavadot J., Murasawa S., Kureishi Y., Uchida S., Masuda H., Kawamoto A., Walsh K., Isner J.M., Asahara T.** HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* **108** (3), 399-405 (2001).
- Lobov I.B., Brooks P.C., Lang R.A.** Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival *in vivo*. *PNAS* **99** (17), 11205-10 (2002).
-

- Lunde K., Solheim S., Aakhus S., Arnesen H., Abdelnoor M., Egeland T., Endresen K., Ilebekk A., Mangschau A., Fjeld J.G., Smith H.J., Taraldsrud E., Groggaard H.K., Bjornerheim R., Brekke M., Muller C., Hopp E., Ragnarsson A., Brinchmann J.E., Forfang K.** Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* **355**, 1199-209 (2006).
- Luster A.D., Greenberg S.M., Leder P.** The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. *J Exp Med* **182**, 219-31 (1995).
- Macias W.L., Dhainaut J.F., Yan S.C., Helterbrand J.D., Seger M., Johnson G. 3<sup>rd</sup>, Small D.S.** Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of Drotrecogin alfa (activated) in patients with severe sepsis. *Clin Pharmacol Ther* **72**, 391-402 (2002).
- Mäkinen T., Jussila L., Veikkola T., Karpanen T., Kettunen M.I., Pulkkanen K.J., Kauppinen R., Jackson D.G., Kubo H., Nishikawa S.I., Ylä-Herttuala S., Alitalo K.** Inhibition of lymph-angiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nature Med* **7** (2), 199-205 (2001a).
- Mäkinen T., Vaikkola T., Mustjoki S., Karpanen T., Catimel B., Nice E.C., Wise L., Mercer A., Kowalski H., Kerjaschki D., Stacker S.A., Achen M.G., Alitalo K.** Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/-D receptor VEGFR-3. *EMBO J* **20**, 4762-73 (2001b).
- Maglione D., Guerriero V., Viglietto G., Ferraro M.G., Aprelikova O., Alitalo K., Del Vecchio S., Lei K.J., Chou J.Y., Persico M.G.** Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PLGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene* **8**, 925-31 (1993).
- Maisonpierre P.C., Suri C., Jones P.F., Bartunkova S., Wiegand S.J., Radziejewski C., Compton D., McClain J., Aldrich T.H., Papadopoulos N., Daly T.J., Davis S., Sato T.N., Yancopoulos G.D.** Angiopoietin-2, a natural antagonist for TIE2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* **277**, 55-60 (1997).
- Male D.** Immunologie auf einen Blick. 1.Auflage, München: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag (2005).
- Mammen E.F.** The haematological manifestation of sepsis. *J Antimicrob Chemother* **41** (Supplement A), 17-24 (1998).
- Mandriota S.J., Jussila L., Jeltsch M., Compagni A., Baetens D., Prevo R., Banerji S., Huarte J., Montesano R., Jackson D.G., Orci L., Alitalo K., Christofori G., Pepper M.S.** Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumor metastasis. *EMBO J* **20** (4), 672-82 (2001).
- Mandriota S.J., Pepper M.S.** Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circ Res* **83**, 852-9 (1998).
- Mantovani A., Bussoloni F., Dejana E.** Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB J* **6** (8), 2591-9 (1992).
- Matsumoto T., Claesson-Welsh L.** VEGF receptor signal transduction. *Science STKE* **112** (RE21), 1-17 (2001).
- Mavrommatis A.C., Theodoridis T., Economou M., Kotanidou A., El Ali M., Christophoulou-Kokkinou V., Zakyntinos S.G.** Activation of the fibrinolytic system and utilization of the coagulation inhibitors in sepsis: comparison with severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* **27**, 1853-9 (2001).

**Meyer J.G.** Blutgerinnung und Fibrinolyse: Diagnostik, Therapie, Prophylaxe. 7. völlig neu bearbeitete Auflage, Köln: *Deutscher Ärzte-Verlag GmbH* (1993).

**Meyer G.P., Wollert K.C., Lotz J., Steffens J., Lippolt P., Fichtner S., Hecker H., Schaefer A., Arseniev L., Hertenstein B., Ganser A., Drexler H.** Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction; eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* **113**, 1287-94 (2006).

**Meyer M., Clauss M., Lepple-Wienhues A., et al.** A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* **18**, 363-74 (1999).

**Miraglia S., Godfrey W., Yin A.H., Atkins K., Warnke R., Holden J.T., Bray R.A., Waller E.K., Buck D.W.** A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* **90**, 5013-21 (1997).

**Mitsubishi R., Suzuka K., Yamazawa K., Matsui H., Seki K., Sekiya S.** Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C levels as tumor markers in patients with cervical carcinoma. *Cancer* **103**, 724-30 (2005).

**Mizutani A., Okajima K., Uchiba M., Noguchi T.** Activated protein C reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation. *Blood* **95**, 3781-7 (2000).

**Mosnier L O., Zlokovic B.V., Griffin J.H.** The cytoprotective Protein C pathway. *Blood* **109** (8), 3161-72 (2006).

**Murin S., Marelich G.P., Arroliga A.C., Matthay R.A.** Hereditary thrombophilia and venous thromboembolism. *Am J Resp Crit Care Med* **158**, 1369-73 (1998).

**Murohara T., Ikeda H., Duan J., Shintani S., Sasaki K., Eguchi H., Onitsuka I., Matsui K., Imaizumi T.** Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* **105**, 1527-36 (2000).

**Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., Poltorak Z.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* **13**, 9-22 (1999).

**Nick J.A., Coldren C.D., Geraci M.W. Poch K.R., Fouty B.W., O'Brien J., Gruber M., Zarini S., Murphy R.C., Kuhn K., Richter D., Kast K.R., Abraham E.** Recombinant human activated protein C reduces human endotoxin-induced pulmonary inflammation via inhibition of neutrophil chemotaxis. *Blood* **104**, 3878-85 (2004).

**Nieda M., Nicol A., Denning Kendall P., Sweetenham J., Bradley B., Hows J.** Endothelial cell precursors are normal components of human umbilical cord blood. *Br J Haematol* **98**, 775-7 (1997).

**Oh H., Takagi H., Suzuma K., Otani A., Matsumura M., Honda Y.** Hypoxia and vascular endothelial growth factor up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* **274**, 15732-9 (1999).

**Okajima K., Koga S., Kaji M., Inoue M., Nakagaki T., Funatsu A., Okabe H., Takatsuki K., Aoki N.** Effect of protein C and activated protein C on coagulation and fibrinolysis in normal human subjects. *Thromb Haemost* **63**, 48-53 (1990).

**Olivot J.M., Estebanell E., Lafay M., Brohard B., et al.** Thrombomodulin prolongs thrombin-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylation and nuclear retention in endothelial cells. *Circ Res* **88**, 681-7 (2001).

- Olofsson B., Korpelainen E., Pepper M.S., et al.** Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 111709-14 (1998).
- Orbe J., Chorda C., Montes R., Paramo J.A.** Changes in the fibrinolytic components of cultured human umbilical vein endothelial cells induced by endotoxin, tumor necrosis factor-alpha and IL-1 alpha. *Haematologica* **84**, 306-11 (1999).
- Pages G., Lenormand P., L'Allemain G., Chambard J.C., Meloche S., Pouyssegur J.** Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 8319-23 (1993).
- Papapetropoulos A., Garcia-Cardena G., Dengler T.J., Maisonpierre P.C., Yancopoulos G.D., Sessa W.C.** Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other growth factors. *Lab Invest* **79**, 213-3 (1999).
- Park J.E., Chen H.H., Winer J., Houck K.A., Ferrara N.** Placenta growth factor, potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, *in vitro* and *in vivo*, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* **269**, 25646-25654 (1994).
- Park S., Tepper O.M., Galiano R.D., et al.** Selective recruitment of endothelial progenitor cells to ischemic tissues with increased neovascularization. *Plast Reconstr Surg* **113**, 284-93 (2004).
- Park Y.W., Kang Y.M., Butterfield J., Detmar M., et al.** Thrombospondin-2 functions as an endogenous regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* **165**, 2087-98 (2004).
- Paavonen K., Puolakkainen P., Jussila L., Jahkola T., Alitalo K.** Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am J Pathol* **156** (5), 1499-1504 (2000).
- Partanen T.A., Arola J., Saaristo A., Jussila L., Ora A., Miettinen M., Stacker S.A., Achen M.G., Alitalo K.** VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *FASEB J* **14**, 2087-96 (2000).
- Peichev M., Naiyer A.J., Pereira D., Zhu Z., Lane W.J., Williams M., Oz M.C., Hicklin D.J., Witte L., Moore M.A., Rafii S.** Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* **95**, 952-8 (2000).
- Pelosi E., Valtieri M., Coppola S., et al.** Identification of the hemangioblast in postnatal life. *Blood* **100**, 3203-8 (2002).
- Pfaff D., Fiedler U., Augustin H.G.** Emerging roles of the angiopoietin-Tie and the ephrin-Eph systems as regulators of cell trafficking. *J Leukoc Biol* **80**, 719-26 (2006).
- Pfaffl M.W.** Real-Time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum* **10**, 92-94 (2004).
- Pittenger M., Mackay A., Beck S., et al.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-7 (1999).

**Planat-Benard V., Silvestre J.S., Cousin B., Andre M., Nibbelink M., Tamarat R., Clergue M., Manneville C., Saillan-Barreau C., Duriez M., Tedgui A., Levy B., Penicaud L., Casteilla L.** Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* **109**, 656-63 (2004).

**Plate K.H., Warnke P.C.** Vascular endothelial growth factor. *J Neurooncol* **35** (3), 365-72 (1997).

**Powell T.M., Paul J.D., Hill J.M., et al.** Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 296-301 (2005).

**Powers C.J., Leskey S.W., Wellenstein A.** Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endoc Rel Cancer* **7**, 165-97 (2000).

**Preissner K.T., Nawroth P.P., Kanse S.M.** Vascular protease receptors: integrating haemostasis and endothelial cell functions. *J Pathol* **190**, 360-72 (2000).

**Quirici N., Soligo D., Caneva L., Servida F., Bossolasco P., Delilieri G.L.** Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol* **115**, 186-94 (2001).

**Rafii S.** Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest* **105**, 17-9 (2000).

**Rafii S., Heissig B., Hattori K.** Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors. *Gene Ther* **9**, 631-41 (2002).

**Rehman J., Li J., Orschell C.M., March K.L.** Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* **107**, 1164-9 (2003).

**Reyes M., Dudek A., Jahagirdar B., Koodie L., Marker P.H., Verfaillie C.M.** Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* **109**, 337-46 (2002).

**Riewald M., Petrovan R.J., Donner A., Mueller B.M., Ruf W.** Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* **296**, 1880-2 (2002).

**Riewald M., Ruf W.** Protease-activated receptor-1 signaling by activated protein C in cytokine-perturbed endothelial cells is distinct from thrombin signaling. *J Biol Chem* **280** (20), 19808-14 (2005).

**Rigby A.C., Grant M.A.** Protein S: a conduit between anticoagulation and inflammation. *Crit Care Med* **32** (Supplement 3), 336-41 (2004).

**Ristimäki A., Narko K., Enholm B., Joukov V., Alitalo K.** Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *J Biol Chem* **273**, 8413-8 (1998).

**Risau W.** Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-4 (1997).

**Risau W., Flamme I.** Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**, 73-91 (1995).

**Robetorye R.S., Rodgers G.M.** Update on selected inherited venous thrombotic disorders. *Am J Hematol* **68**, 256-68 (2001).

**Ross R., Reines E.W., Bowen-Pope D.F.** The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* **46**, 155-69 (1986).

- 
- Roviezzo F., Tsigkos S., Kotanidou A., Bucci M., Brancialeone V., Cirino G., Papapetropoulos A.** Angiopoietin-2 causes inflammation in vivo by promoting vascular leakage. *J Pharmacol Exp Therap* **314**, 738-44 (2005).
- Ruf W.** Protease-activated receptor signaling in the regulation of inflammation. *Crit Care Med* **32** (Supplement 5), 287-92 (2004).
- Ruf W., Dorfleutner A., Riewald M.** Specificity of coagulation factor signaling. *J Thromb Haemost* **1**, 1495-1503 (2003).
- Rutkowski J.M., Moya M., Johannes J., Goldman J., Swartz M.A.** Secondary lymphedema in the mouse tail: lymphatic hyperplasia, VEGF-C upregulation, and the protective role of MMP-9. *Microvasc Res* **72**, 161-71 (2006).
- Sakata Y., Loskutoff D.J., Gladson C.L., Hekman C.M., Griffin J.H.** Mechanism of protein C-dependent clot lysis: role of plasminogen activator inhibitor. *Blood* **68**, 1218-23 (1986).
- Sato T.N., Tozawa Y., Deutsch U., Wolburg-Buchholz K., Fujiwara Y., Gendron-Maguire M., Gridley T., Wolburg H., Risau W., Qin Y.** Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* **376**, 70-4 (1995).
- Sawano A., Iwai S., Sakurai Y., Ito M., Shitara K., Nakahata T., Shibuya M.** Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* **97**, 785-91 (2001).
- Schächinger V., Assmus B., Britten M.B., Honold J., Lehmann R., Teupe C., Abolmaali N.D., Vogl T.J., Hofmann W.K., Martin H., Dimmeler S., Zeiher A.M.** Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol* **44**, 1690-9 (2004).
- Schatteman G.C., Awad O.** Hemangioblasts, angioblasts, and adult endothelial cell progenitors. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **276**, 13-21 (2004).
- Schatteman G.C., Hanlon H.D., Jiao C., Dodds S.G., Christy B.A.** Blood-derived angioblasts accelerate bloodflow restoration in diabetic mice. *J Clin Invest* **106**, 571-8 (2000).
- Schmeisser A., Garlichs C.D., Zhang H.** Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res* **49**, 671-80 (2001).
- Schmidt-Supprian M., Murphy C., While B., Lawler M., Kapurniotu A., Voelter W., Smith O., Bernhagen J.** Activated protein C inhibits tumor necrosis factor and macrophage migration inhibitory factor production in monocytes. *Eur Cytokine Netw* **11**, 407-13 (2000).
- Schmittgen T.D., Zakrajsek B.A., Mills A.G., Gorn V., Singar M.J., Reed M.W.** Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem* **285**, 194-204 (2000).
- Schoots I.G., Levi M., van Vliet A.K., Maas A.M., Roossink E.H.P., van Gulik T.M.** Inhibition of coagulation and inflammation by activated protein C or antithrombin reduces intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Crit Care Med* **32**, 1375-83 (2004).
- Scully M.F., Toh C.H., Hoogendoorn H., Manuel R.P., Nesheim M.E., Solymoss S., Giles A.R.** Activation of protein C and its distribution between its inhibitors, protein C inhibitor,  $\alpha$ 1-antitrypsin,  $\alpha$ 2-macroglobulin, in patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* **69**, 448-53 (1993).
-

- Seligsohn U., Berger A., Abend M., Rubin L., Attias D., Zivelin A., Rapaport S.I.** Homozygous protein C deficiency manifested by massive venous thrombosis in the newborn. *N Engl J Med* **310**, 559-62 (1984).
- Senger D.R., Galli S.J., Dvorak A.M., Perruzzi C.A., Harvey V.S., Dvorak H.F.** Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* **219**, 983-5 (1983).
- Shaked Y., Bertolini F., Man S., Rogers M.S., Cervi D., Foutz T., Rawn K., Voskas D., Dumont D.J., Ben-David Y., Lawler J., Henkin J., Huber J., Hichlin D.J., D'Amato R.J., Kerbel R.S.** Genetic heterogeneity of the vasculogenic phenotype parallels angiogenesis; Implications for cellular surrogate marker analysis of antiangiogenesis. *Cancer Cell* **7**, 101-11 (2005).
- Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T.P., Gertsenstein M., Wu X.F., Breitmann M.L., Schuh A.C.** Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-deficient mice. *Nature* **376**, 62-6 (1995).
- Shibuya M., et al.** Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* **8**, 519-27 (1990).
- Shi Q., Rafii S., Wu M.H., Wijelath E.S., Yu C., Ishida A., Fujita Y., Kothari S., Mohle R., Sauvage L.R., Moore M.A., Storb R.F., Hammond W.P.** Evidence for circulating bone marrow- derived endothelial cells. *Blood* **92**, 362-7 (1998).
- Shimizu S., Gabazza E.C., Taguchi O., et al.** Activated protein C inhibits the expression of platelet-derived growth factor in the lung. *Am J Respir Crit Care Med* **167**, 1416-26 (2003).
- Shintani S., Murohara T., Ikeda H., Ueno T., Honma T., Katoh A., Sasaki K., Shimada T., Oike Y., Imaizumi T.** Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* **103**, 2776-9 (2001).
- Shirakata Y., Komurasaki T., Toyoda H., Hanakawa Y., Yamasaki K., Tokumaru S., Sayama K., Hashimoto K.** Epiregulin, a novel member of the epidermal growth factor family, is an autocrine growth factor in normal human keratinocytes. *J Biol Chem* **275** (8), 5748-53 (2000).
- Shirasawa S., Sugiyama S., Baba I., Inokuchi J., et al.** Dermatitis due to epiregulin deficiency and a critical role of epiregulin in immune-related responses of keratinocyte and macrophage. *PNAS* **101** (38), 13921-6 (2004).
- Shure D., Senior R.M., Griffin G.L., Deuel T.F.** PDGFAA homodimers are potent chemoattractants for fibroblasts and neutrophils, and for monocytes activated by lymphocytes or cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* **186**, 1510-4 (1992).
- Sierra-Honigmann M.R., Nath A.K., Murakami C., Garcia-Cardena G., Papapetropoulos A., Sessa W.C., Madge L.A., Schechner J.S., Schwabb M.B., Polverini P.J., Flores-Riveris J.R.** Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* **281**, 1583-6 (1998).
- Skobe M., Hamberg L.M., Hawighorst T., Schirner M., Wolf G.L., Alitalo K., Detmar M.** Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *Am J Pathol* **159** (3), 893-903 (2001).

- 
- Smadja D.M., Bièche I., Uzan G., Bompais H., Muller L., Boisson-Vidal C., Vidaud M., Aiach M., Gaussem P.** PAR-1 activation on human late endothelial progenitor cells enhances angiogenesis in vitro with upregulation of the SDF-1/CXCR4 system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 2321-7 (2005).
- Smadja D.M., Bieche I., Emmerich J., Aiach M., Gaussem P.** PAR-1 activation has different effects on the angiogenetic activity of endothelial progenitor cells derived from human adult and cord blood. *J Thromb Haemost* **4**, 2729-31 (2006a).
- Smadja D.M., Laurendeau I., Avignon C., Vidaud M., Aiach M., Gaussem P.** The angiopoietin pathway is modulated by PAR-1-activation on human endothelial progenitor cells. *J Thromb Haemost* **4**, 2051-8 (2006b).
- Smadja D.M., Cornet A., Emmerich J., Aiach M., Gaussem P.** Endothelial progenitor cells; characterization, *in vitro* expansion, and prospects for autologous cell therapy. *Cell Biol Toxicol* **23**, 223-239 (2007).
- Smits A., Hermanson M., Nister M., Karnushina I.** Rat brain capillary endothelial cells express functional PDGF B-type receptors. *Growth factors* **2**, 1-8 (1989).
- Stearns-Kurosawa D.J., Kurosawa S., Mollica J.S., Ferrel G.L., Esmon C.T.** The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 10212-6 (1996).
- Strehlow K., Werner N., Berweiler J., Link A., Dirnagl U., Priller J., Laufs K., Ghaeni L., Milosevic M., Bohm M., Nickening G.** Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation* **107**, 3059-65 (2003).
- Strieter R.M., Polverini P.J., Arenberg D.A., Kunkel S.L.** The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis. *Shock* **4** (3), 155-60 (1995).
- Sugama Y., Tirupathi C., Janakidevi K., Andersen T., Fenton J.W., Malik A.B.** Thrombin-induced expression of endothelial P-Selectin and intercellular adhesion molecule-1: a mechanism for stabilizing neutrophil adhesion. *J Cell Biol* **119**, 935-44 (1992).
- Sundberg C., Ljungstrom M., Lindmark G., Gerdin B., Rubin K.** Microvascular pericytes express platelet-derived growth factor- $\beta$  receptors in human healing wounds and colorectal adenocarcinoma. *Am J Pathol* **143**, 1377-88 (1993).
- Suri C., Jones P.F., Patan S., Bartunkova S., Maisonpierre P.C., Davis S., Sato T.N., Yancopoulos G.D.** Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* **87**, 1171-80 (1996).
- Sutherland D.R., Watt S.M., Dowden G., Karhi K., Baker M.A., Greaves M.F., Smart J.E.** Structural and partial amino acid sequence analysis of the human hemopoietic progenitor cell antigen CD34. *Leukemia* **2**, 793-803 (1988).
- Suzuki H., Watabe T., Kato M., Miyazawa K., Miyazono K.** Roles of vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling in differentiation of mouse embryonic stem cell-derived vascular progenitor cells into endothelial cells. *Blood* **105**, 2372-9 (2005).
- Takahashi T., Kalka C., Masuda H., Chen D., Silver M., Kearney M., Magner M., Isner J.M., Asahara T.** Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* **5**, 434-8 (1999).
-

---

**Taoka Y., Okajima K., Uchiba M., Murakami K., Harada N., Johno M., Naruo M.** Activated protein C reduces the severity of compression-induced spinal cord injury in rats by inhibiting leukocyte activation. *J Neurosci* **18**, 1393-8 (1998).

**Tarzam S.T., Wang G., Li W., Green L., Singh J.P.** Thrombin and PAR-1 stimulate differentiation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Thromb Haemost* **4**, 656-63 (2006).

**Tateishi-Yuyama E., Matsubara H., Murohara T., Ikeda U., Shintani S., Masaki H., Amano K., Kishimoto Y., Yoshimoto K., Akashi H., Shimada K., Iwasaka T., Imaizumi T.** Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* **360**, 427-35 (2002).

**Taylor F.B.Jr., Chang A., Esmon C.T., D'Angelo A., Vigano-D'Angelo S., Blick K.E.** Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of escherichia coli infusion in the baboon. *J Clin Invest* **79**, 918-25 (1987).

**Teichert-Kuliszewska K., Maisonpierre P.C., Jones N., Campbell A.I.M., Master Z., Bendeck M.P., Alitalo K., Dumont D.J., Yancopoulos G.D., Stewart D.J.** Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie-2. *Cardiovasc Res* **49**, 659-70 (2000).

**Till J.E., McCulloch E.A.** A direct measurement of the radiation sensitivity of a normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* **14**, 1419-1430 (1961).

**Tille J.C., Wang X., Lipson K.E., McMahon G., Ferrara N., Zhu Z., Hicklin D.J., Sleeman J.P., Eriksson U., Alitalo K., Pepper M.S.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 signaling mediates VEGF-C(deltaNdeltaC)- and VEGF-A-induced angiogenesis in vitro. *Exp Cell Res* **285**, 286-98 (2003).

**Tuan R.S., Boland G., Tuli R.** Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* **5** (1), 32-45 (2003).

**Trejo J.** Protease-activated receptors: new concepts in regulation of G protein-coupled receptor signaling and trafficking. *J Pharmacol Exp Ther* **307**, 437-42 (2003).

**Uchiba M., Okajima K., Oike Y., Ito Y., Fukudome K., Isobe H., Suda T.** APC induces endothelial cell proliferation by mitogen-activated protein kinase activation in vitro and angiogenesis in vivo. *Circ Res* **95**, 34-41 (2004).

**Urbich C., Dimmeler S.** Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* **95**, 343-353 (2004).

**Urbich C., Aicher A., Heeschen C., Dernbach E., Hofmann W.K., Zeiher A.M., Dimmeler S.:** Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol* **39**, 733-42 (2005).

**Valenzuela D.M., Griffiths J.A., Rojas J., Aldrich T.H., Jones P.F., Zhou H., McClain J., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Huang T., Papadopoulos N., Maisonpierre P.C., Davis S., Yancopoulos G.D.** Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA* **96** (5), 1904-9 (1999).

**Valtola R., Salven P., Heikkilä P., Taipale J., Joensuu H., Rehn M., Pihlajaniemi T., Weich H., deWaal R., Alitalo K.** VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am J Pathol* **154** (5), 1381-90 (1999).

- 
- Van Hinsberg V.W., Bertina R.M., van Wijngaarden A., van Tilburg N.H., Emeis J.J., Haverkate F.** Activated protein C decreases plasminogen activator-inhibitor activity in endothelial cell-conditioned medium. *Blood* **65**, 444-51 (1985).
- Vasa M., Fichtlscherer S., Aicher A., Adler K., Urbich C., Martin H., Zeiher A.M., Dimmeler S.** Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* **89**, e1-e7 (2001).
- Veikkola T., Alitalo K.** Dual role of angiopoietin-2 in postnatal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Development Cell* **3** (3), 302-4 (2002).
- Veikkola T., Alitalo K.** VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* **9** (3), 211-20 (1999).
- Veikkola T., Karkkainen M., Claesson-Welsh L., Alitalo K.** Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* **60**, 203-12 (2000).
- Veikkola T., Jussila L., Makinen T., Karpanen M., Jeltsch M., Petrova T.V., Kubo H., Thurston G., McDonald D.M., Achen M.G., Stacker S.A., Alitalo K.** Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J* **6**, 1223-31 (2001).
- Vincent J.L., Bernard G., Beale R., Doig C., Putensen C., Dhainaut J.F., Artigas A., Fumagalli R., Macias W., Wright T., Wong K., Sundin K., Turlo M.A., Janes J.** for the ENHANCE study group (2005). Drotrecogin alfa (activated) treatment in severe sepsis from the global open-label trial ENHANCE: further evidence for survival and safety and implications for early treatment. *Crit Care Med* **33**, 2266-77 (2005).
- Vinci M. C., Visentin B., Cusinato F., Nardelli G. B., Trevisi L., Luciani S.** Effect of vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor on iatrogenic apoptosis in human endothelial cells. *Biochem Pharmacol* **67**, 277-84 (2004).
- Wang J.F., Zhang X., Groopman J.E.** Activation of vascular endothelial growth factor receptor-3 and its downstream signaling promote cell survival under oxidative stress. *J Biol Chem* **279** (26), 27088-97 (2004).
- Weissman I.L.** Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* **100**, 157-168 (2000).
- Werner N., Junk S., Laufs U., et al.** Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res* **93**, e17-24 (2003).
- Werner N., Priller J., Laufs U., et al.** Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 1567-72 (2002).
- Werner S., Grose R.** Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* **83**, 835-70 (2003).
- White B., Schmidt M., Murphy C., Livingstone W., O'Toole D., Lawler M., O'Neill L., Kelleher D., Schwarz H.P., Smith O.P.** Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced nuclear factor kappa B (NF-kappaB) and tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) production in the THP-1 monocytic cell line. *Br J Haematol* **110**, 130-4 (2000).
- Wilcox J.N., Smith K.M., Williams L.T., Schwartz S.M., Gordon D.** Platelet-derived growth factor mRNA detection in human atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *J Clin Invest* **82**, 1134-43 (1998).
-

- Witzenbichler B., Asahara T., Murohara T., Silver M., Spyridopoulos I., Magner M., Principe N., Kearney M., Hu J-S., Isner J.M.** Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *Am J Pathol* **153** (2), 381-94 (1998).
- Wobus A.M.** Potential of embryonic stem cells. *Mol Aspects Med* **22**, 149-64 (2001).
- Wollert K.C., Meyer G.P., Lotz J., Ringes-Lichtenberg S., Lippolt P., Breidenbach C., Fichtner S., Korte T., Hornig T., Messinger D., Arseniev L., Hertenstein B., Ganser A., Drexler H.** Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* **364**, 141-8 (2004).
- [www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp](http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp) (aufgerufen am 8.03.2009).
- [www.sepsis-gesellschaft.de/DSG/Deutsch/Was+ist+Sepsis%3F/Geschichte+der+Sepsis?sid=uJ5XlWKfcu5iOjOAeXz8M&iid=1](http://www.sepsis-gesellschaft.de/DSG/Deutsch/Was+ist+Sepsis%3F/Geschichte+der+Sepsis?sid=uJ5XlWKfcu5iOjOAeXz8M&iid=1) (aufgerufen am 8.03.2009).
- Xue M., Campbell D., Jackson C.J.** Protein C is an autocrine growth factor for human skin keratinocytes. *J Biol Chem* **282** (18), 13610-6 (2007).
- Xue M., Thompson P., Kelso I., Jackson C.** Activated protein C stimulates proliferation, migration and wound closure, inhibits apoptosis and upregulates MMP-2 activity in cultured human keratinocytes. *Exp Cell Res* **299**, 119-27 (2004).
- Yin A.H., Miraglia S., Zanjani E.D., Almeida-Porada G., Ogawa M., Leary A.G., Olweus J., Kearney J., Buck D.W.** AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **90**, 5002-12 (1997).
- Yamamoto H., Kato H, Uruma M., Nitta M., Takamoto S.** Identification of two distinct populations of endothelial progenitor cells differing in size and antigen expression from human umbilical cord blood. *Ann Hematol*, **87** (2), 87-95 (2008).
- Yan S.B., Grinnel B.W.** Antithrombotic and anti-inflammatory agents for the protein C coagulant pathway. *Ann Rep Med Chem* **11**, 103-12 (1994).
- Yano M., Iwama A., Nishio H., Suda J., Takada G., Suda T.** Expression and function of murine receptor tyrosine kinases, TIE and TEK, in hematopoietic stem cells. *Blood* **89**, 4317-26 (1997).
- Yoon C.H., Hur J., Park K.W., Kim J.H., Lee C.S., Oh I.Y., Kim T.Y., Cho H.J., Kang H.J., Chae I.H., Yang H.K., Oh B.H., Park Y.B., Kim H.S.** Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation* **112**, 1618-27 (2005).
- Yoon Y., Murayama T., Gravereaux E., Silver T., Curry C., Wecker A., Kirchmair R., Kearney C., Ashare A., Jackson D.G., Kubo H., Losordo W.** VEGF-C gene therapy augments postnatal lymphangiogenesis and ameliorates secondary lymphedema. *J Clin Invest* **111** (5), 717-25 (2003).
- Yoshida S., Ono M., Shono T., Izumi H., et al.** Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Moll Cell Biol* **17**, 4015-23 (1997).
- Young H.E., Duplaa C., Romero-Ramos M., Chesselet M.F., Vourch P., Yost M.J., Ericson K., Terracio L., Asahara T., Masuda H., Tamura-Ninomiya S., Detmer K., Bray R.A., Steele T.A., Hixson D., el-Kalay M., Tobin B.W., Russ R.D., et al.** Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering. *Cell Biochem Biophys* **40**, 1-80 (2004).

- Yu G., Luo H., Wu Y., Wu J.** Ephrin B2 induces T cell costimulation. *J Immunol* **171**, 106-14 (2003).
- Yuksel M., Okajima K., Uchiba M., Horiuchi S., Okabe H.** Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced tumor-necrosis factor- $\alpha$  production by inhibiting activation of both nuclear factor- $\kappa$ -B and activator protein-1 in human monocytes. *Thromb Haemost* **88**, 267-73 (2002).
- Zeng W., Matter W.F., Yan S.B., Um S.L., Vlahos C.J., Liu L.** Effect of drotrecogin alfa (activated) on human endothelial cell permeability and Rho-kinase signaling. *Crit Care Med* **32** (Suppl), 302-8 (2004).
- Zhang Z.G., Zhang L., Jiang Q., et al.** Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circ Res* **90**, 284-8 (2002).
- Zhao B., Smith G., Cai J., Ma A., Boulton M.** Vascular endothelial growth factor C promotes survival of retinal vascular endothelial cells via vascular endothelial growth factor receptor-2. *Br J Ophthalmol* **91**, 538-45 (2007).
- Ziegler B.L., Valtieri M., Porada G.A., De Maria R., Muller R., Masella B., Gabbianelli M., Casella I., Pelosi E., Bock T., Zanjani E.D., Peschle C.** KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* **285**, 1553-8 (1999).
- Zon L.I.** Developmental biology of hematopoiesis. *Blood* **86**, 2876-91 (1995).

## **8 Anhang**

### **8.1 Eigene Veröffentlichung**

3rd International Congress on Sepsis and Multiorgan Dysfunction, Weimar 5.- 8.9.2007:

Brueckmann M., Glasl C., Schmidt J., Lang S., Hoffmann U., Borggrefe M.: Recombinant human activated protein C increases the number of endothelial progenitor cells *in vitro*. *Infection* **35** (Suppl. II), 35 (2007).

### **8.2 Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Borggrefe, der mir ermöglicht hat, an der von ihm geleiteten I. Medizinischen Klinik der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg, meine Promotionsarbeit anzufertigen.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. med. vet. Johanna Plendl bedanken, die sich bereit erklärt hat, mich als externe Doktorandin aufzunehmen. Ihre Herzlichkeit und ihr Humor haben mich während des Studiums begleitet und ich hoffe, auch in weiterer Zukunft.

Besonderer Dank gilt auch meiner Betreuerin in Mannheim Frau Prof. Dr. Martina Brückmann, die mit mir in geduldiger Überlegung das Thema meiner Promotionsarbeit erarbeitet hat und mir stets freundlich und hilfsbereit zur Seite gestanden hat.

Vielen Dank auch an Herrn Dr. Siegfried Lang für die Einarbeitung im Labor und dafür, dass er stets ein offenes Ohr für Fragen hatte und nie müde wurde, Lösungen zu finden.

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen unersetzlichen, äußerst hilfsbereiten biologisch-technischen Assistenten Herrn Joachim Schmidt, der sowohl fachlich und praktisch, als auch menschlich unbezahlbare Hilfe geleistet hat.

Ich möchte mich bei der Arbeitsgruppe Urbich/Dimmeler (Universität Frankfurt, Innere Medizin, Molekulare Kardiologie) herzlich bedanken für die persönlich gegebenen hilfreichen Tips zur Isolierung und Charakterisierung von endothelialen Progenitorzellen.

Ich danke dem Springer Verlag für die Genehmigung zur Verwendung der APC-Abbildungen.

Vielen Dank auch an Frau Sylvia Büttner (Medizinische Statistik und Biomathematik, Universität Heidelberg) für die hilfreiche Beratung bei der statistischen Auswertung.

Ein unendlicher Dank geht an diese wunderbaren Menschen, die mein Leben bereichern: Finja, Lara, Sabine, Helmut, Ninski, Eva, Linda, Ida, Hartmut, Olaf, Anita, Larissa, Klaudia, Ksenija, Julia, Johannes, Anne, Gini, Susannen, Lucie, Svenja, Antonia, Anuschka, Florian.

Der größte Dank geht an meine Familie: meinen Papa, der Beste von allen; meine Mama, die in meinen Gedanken lebt und meine Schwester Frau Dr. Bettina Glasl.

### **8.3 Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen habe.

Stuttgart, den 24. 04. 2009

Carola Glasl