

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. M. Rudert

***Ex vivo* Expansion von endothelialen Vorläuferzellen**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
**Anke Katrin Hofmann**  
aus Stuttgart

Würzburg, Mai 2010

Referent: Professor Dr. rer. nat. Norbert Schütze

Korreferentin: Professor Dr. hum. biol. Heike Walles

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juli 2011

Die Promovendin ist Ärztin

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>I.1.</b>	<b>Entstehung von Blutgefäßen (Neovaskularisation)</b>	<b>1</b>
	I.1.1. Allgemeines	1
	I.1.2. Vaskulogenese	1
	I.1.3. Angiogenese	2
<b>I.2.</b>	<b>Zirkulierende Endotheliale Vorläuferzellen (EPCs)</b>	<b>3</b>
	I.2.1. Mobilisierung der EPCs aus dem Knochenmark	4
	I.2.2. Homing und Differenzierung der EPCs	5
	I.2.3. EPCs – ein heterogene Zellpopulation	7
	I.2.4. Biologische Aufgaben der EPCs im Organismus	9
	I.2.5. Gewinnung von EPCs	11
<b>I.3.</b>	<b>Cystein-reiches Protein 61 (CYR61/CCN1)</b>	<b>12</b>
	I.3.1. CYR61 – ein Mitglied der CCN-Proteinfamilie	12
	I.3.2. Regulation der Expression des CYR61-Gens	13
	I.3.3. Biologische Funktionen des CYR61-Proteins	14
	I.3.4. Vermittlung der CYR61-Proteinwirkungen	15
	I.3.5. Der angiogenetische Faktor CYR61	18
<b>I.4.</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>20</b>
<b>II.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
<b>II.1.</b>	<b>Material</b>	<b>21</b>
	II.1.1. Geräte	21
	II.1.2. Verbrauchsmaterialien	21
	II.1.3. Chemikalien	22
	II.1.4. Kommerzielle Laborkits	22
	II.1.5. Puffer und Lösungen	23
	II.1.6. Zellen und Zellkulturmedien	23
	II.1.7. Antikörper	24
	II.1.8. Software zur Datenauswertung	24
<b>II.2.</b>	<b>Methoden</b>	<b>25</b>
	II.2.1. Expression, Aufreinigung und Funktionsprüfung des CYR61-Proteins	25
	II.2.2. Zellisolation aus dem Blut	27
	II.2.3. Zellkultur	29
	II.2.4. Phänotypische Analysen der <i>in vitro</i> kultivierten EPCs	32
<b>III.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>40</b>
<b>III.1.</b>	<b>Synthese von rekombinantem CYR61-Protein</b>	<b>40</b>
	III.1.1. Ausbeute der chromatografischen CYR61-Proteinaufreinigung	40
	III.1.2. Funktionalität des rekombinanten CYR61-Proteins	40

<b>III.2. Charakterisierung der Studienpopulation und Bestimmung der Anzahl mononukleärer Zellen im Blut</b>	<b>41</b>
<b>III.3. Quantifizierung der Zellzahlzunahme nach CYR61-Behandlung</b>	<b>41</b>
<b>III.4. Morphologie und Wachstumsverhalten der EPCs</b>	<b>44</b>
<b>III.5. Analyse der Expression spezifischer Oberflächenantigene</b>	<b>47</b>
III.5.1. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	47
III.5.2. Immunhistologische Färbungen	50
<b>IV. DISKUSSION .....</b>	<b>57</b>
<b>IV.1. CYR61 als potenter Stimulator der <i>ex vivo</i> Expansion von EPCs</b>	<b>57</b>
<b>IV.2. Methodische Überlegungen</b>	<b>58</b>
IV.2.1. Spendervariabilität	61
IV.2.2. Variabilität der CYR61-Präparationen	62
IV.2.3. Spezifität der Antikörpermarkierung	63
IV.2.4. Gleichartigkeit der Kulturbedingungen	63
<b>IV.3. Konzentrationsabhängige Proliferationsstimulation durch CYR61</b>	<b>64</b>
<b>IV.4. Identifizierung der endothelialen Vorläuferzellen</b>	<b>64</b>
IV.4.1. Morphologische Charakterisierung der EPCs	64
IV.4.2. Immunphänotypische Charakterisierung der EPCs	65
<b>IV.5. Interaktion zwischen CYR61 und EPCs</b>	<b>71</b>
IV.5.1. Wachstumsfaktoren beeinflussen EPCs und CYR61	71
IV.5.2. EPCs und CYR61 fördern als angiogenetische Faktoren die Neovaskularisation <i>in vivo</i>	72
IV.5.3. Mögliche Interaktionen zwischen CYR61 und EPCs	76
<b>IV.6. Ausblick</b>	<b>79</b>
IV.6.1. EPCs eröffnen neue Therapiemöglichkeiten	79
IV.6.2. Hürden und Lösungsansätze	82
<b>V. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>84</b>
<b>VI. VERZEICHNISSE .....</b>	<b>87</b>
<b>VI.1. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>87</b>
<b>VI.2. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>88</b>
<b>VI.3. Tabellenverzeichnis</b>	<b>88</b>
<b>VI.4. Literaturverzeichnis</b>	<b>89</b>

## **I. EINLEITUNG**

### **I.1. Entstehung von Blutgefäßen (Neovaskularisation)**

#### **I.1.1. Allgemeines**

Für das Überleben und die Funktionsfähigkeit der Zellen des menschlichen Organismus ist eine adäquate Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, sowie der Abtransport von Stoffwechselprodukten, essentiell. Da die Diffusionsfähigkeit von Sauerstoff limitiert ist (100-200µm), kann eine ausreichende Blutversorgung in multizellulären Organismen nur über intakte Blutgefäße gewährleistet werden. Blutgefäße bestehen aus einem das Lumen auskleidenden Monolayer aus Endothelzellen, die von einer Basalmembran und, je nach Art des Gefäßes, unterschiedlichen periendothelialen Wandzellen umgeben sind. Dazu gehören Perizyten, glatte Muskelzellen und Fibroblasten [1].

Man unterscheidet im Zusammenhang mit der Bildung neuer Blutgefäße zwei grundlegende Mechanismen: Vaskulogenese und Angiogenese. Ein dritter Mechanismus ist bezüglich des postnatalen Wachstums von Blutgefäßen abzugrenzen: Arteriogenese. Dabei entstehen größere, funktionelle (Kollateral-) Arterien aus einem bereits bestehenden Netz kleiner arterieller Verbindungen, die durch Vaskulogenese und Angiogenese gebildet wurden [2]. Da das Gefäßwachstum durch Arteriogenese keine echte Neubildung von Blutgefäßen darstellt, soll in dieser Arbeit nicht weiter darauf eingegangen werden.

#### **I.1.2. Vaskulogenese**

Bei der Vaskulogenese handelt es sich um die *De-novo*-Bildung von Blutgefäßen, ausgehend von endothelialen Vorläuferzellen [3, 4]. Bereits in einem frühen Stadium der menschlichen Embryonalentwicklung beginnt die Bildung des Gefäßsystems mit der sogenannten embryonalen Vaskulogenese. Dabei migrieren Angioblasten, die aus einer gemeinsamen mesodermalen Stammzelle für hämatopoetische und endotheliale Zellen - dem Hämangioblast - hervorgegangen sind [5, 6], an verschiedene Stellen im embryonalen Organismus, wo sie *in situ* zu reifen Endothelzellen differenzieren und so einen primitiven embryonalen Gefäßplexus ausbilden [7, 8].

### I.1.3. Angiogenese

Bei der Angiogenese entstehen neue Gefäßabschnitte (reife Kapillaren) aus präexistenten Blutgefäßen durch Neoendotheliogenese, sprich durch Proliferation, Migration und Fusion ausdifferenzierter Endothelzellen [9].

Dabei unterscheidet man grundsätzlich zwischen sprossender und nicht-sprossender Angiogenese, wobei beide Mechanismen im selben Gewebe parallel stattfinden können. Bei der sprossenden Angiogenese (Endothelzellsprossung, engl. *sprouting angiogenesis*) sprossen neue Gefäße aus der Seite oder den Enden präexistenter Gefäße aus. Bei der nicht-sprossenden Angiogenese (Intussuszeption, unorthodoxe Angiogenese, engl. *non-sprouting angiogenesis, intussusceptive microvascular growth*) kommt es zur longitudinalen Teilung von Gefäßen einschließlich der periendothelialen Zellen.

Die sprossende Angiogenese beginnt mit der Vasodilatation eines bestehenden Gefäßes, gefolgt von der Zunahme der Gefäßpermeabilität und Degradation der umgebenden Matrix. Dies ermöglicht aktivierten proliferierenden Endothelzellen die Migration in Richtung eines angiogenen Stimulus. Anschließend organisieren sich die Endothelzellen zu zunächst soliden Strängen, die nachfolgend ein Lumen ausbilden. Diese, als Endothelzellsprosse bezeichneten, blind endenden Röhren fusionieren mit benachbarten Endothelzellsprossen und Gefäßen, was eine Zunahme des Durchmessers und der Länge der Gefäße und die Ausbildung von Gefäßschleifen und anastomotischen Verbindungen ermöglicht [7, 8, 10].

Bei der nicht-sprossenden Angiogenese [11] entstehen neue Gefäße aus präexistenten Gefäßen durch Gefäßlumensplitting. Dabei bilden sich im Gefäßlumen Matrixbrücken (endotheliale Zellbrücken oder interstitielle Gewebekolumnen), die das Gefäß zerteilen. Die Basalmembran bleibt dabei vollständig erhalten und die endotheliale Proliferation bleibt begrenzt [8].

Parallel und im Anschluss an die Endothelzellproliferation und -organisation kommt es durch Interaktion der Endothelzellen mit der umgebenden Matrix und Anlagerung von metabolisch aktiven periendothelialen Zellen, wie glatten Muskelzellen und Perizyten, zur Stabilisierung und, abhängig von Lage und Funktion, zur Spezialisierung des neu gebildeten Gefäßnetzwerkes [8].

## I.2. Zirkulierende Endotheliale Vorläuferzellen (EPCs)

In der Embryonalzeit laufen Vaskulogenese und Angiogenese parallel ab. Im Rahmen der Vaskulogenese differenzieren zunächst embryonale Angioblasten zu Endothelzellen und bilden einen primitiven Gefäßplexus, der sich durch Angiogenese zu einem funktionsfähigen Gefäßsystem weiterentwickelt.

Lange Zeit nahm man an, dass das Wachstum neuer Blutgefäße (Neovaskularisation) und die Regeneration von geschädigtem Endothel (Reendothelialisierung) postnatal allein auf dem Mechanismus der Angiogenese beruhen. Reife Endothelzellen sind allerdings terminal differenziert und haben somit ein limitiertes proliferatives Potenzial, was auch ihre Fähigkeit geschädigtes Endothel zu ersetzen und neue Gefäße zu bilden begrenzt. Endothelzellregeneration und Angiogenese benötigen also offenbar die Unterstützung angiogenetischer Zellen. Diese Annahme gewann zunehmend an Bedeutung, als Asahara et al. [12] im peripheren Blut von Erwachsenen zirkulierende CD34<sup>+</sup> Zellen entdeckten, die funktionelle und phänotypische Ähnlichkeiten mit embryonalen Angioblasten aufweisen. Sie bezeichneten sie als endotheliale Vorläuferzellen (engl. EPCs, *endothelial progenitor cells*) [12].

Vorläuferzellen sind adulte determinierte Stammzellen, die hinsichtlich ihrer Regenerationsfähigkeit Stammzeleigenschaften aufweisen, jedoch auf die Differenzierung in eine bestimmten Zelllinie festgelegt sind. Die auf die Entwicklung zu endothelialen Zellen festgelegten EPCs stammen aus dem Knochenmark und können von dort im Bedarfsfall in die periphere Blutzirkulation mobilisiert werden. Mit dem Blutstrom werden sie in bestimmte Zielgewebe transportiert, wo sie in den Endothelzellverband eingliedert werden, *in situ* zu reifen Endothelzellen differenzieren (vgl. Abbildung 1) und auf diese Weise zur Neovaskularisation und Reendothelialisierung beitragen. Dieser Vorgang der *De-novo*-Gefäßbildung aus endothelialen Vorläuferzellen entspricht weitgehend dem der embryonalen Vaskulogenese [13]. Die Entdeckung der EPCs gab somit Anlass, die bisher gültige Lehrmeinung, nach der die Vaskulogenese ausschließlich dem embryonalen Organismus vorbehalten blieb, zu revidieren. Heute geht man davon aus, dass EPCs auch postnatal die *De-novo*-Gefäßbildung ermöglichen und somit auch im adulten Organismus Angiogenese und Vaskulogenese simultan ablaufen.

### **I.2.1. Mobilisierung der EPCs aus dem Knochenmark**

Unter physiologischen Bedingungen zirkulieren im Blut von gesunden Erwachsenen nur wenige EPCs, die meisten befinden sich im Hauptreservoir des Körpers für Stammzellen - dem Knochenmark. Verschiedene endogene und exogene Substanzen sind in der Lage die Anzahl von im Blut zirkulierenden EPCs durch verstärkte Mobilisierung aus dem Knochenmark zu steigern [14]. Beispiele für endogene Stimuli sind Zytokine, wie im Rahmen von Entzündungen sezerniertes G-CSF [15, 16] oder GM-CSF [17] oder von ischämischem Gewebe freigesetztes SDF-1 [18, 19]. Aber auch Wachstumsfaktoren, wie VEGF [20] und Angiopoietin [21], oder Hormone, wie Erythropoietin [22, 23] und Östrogene [24, 25], zählen dazu.

Zu den exogenen Stimuli gehören vor allem Medikamente, wie Statine [26-28], oder auch Sport [29]. Der zugrundeliegende Mechanismus der Mobilisierung von EPCs aus dem Knochenmark ist ein komplexer, noch nicht vollständig verstandener Prozess, bei dem verschiedene Wachstumsfaktoren, Enzyme, Zytokine und Oberflächenrezeptoren interagieren.

Die meisten EPCs liegen im Knochenmark in einer Art Stammzellnische (Ruhennische) in engem Kontakt mit Stromazellen und Osteoblasten. Daraus werden einige EPCs zunächst in eine sogenannte vaskuläre Nische (Proliferationsnische) in der Umgebung von sinusoidalen Gefäßen überführt, von wo aus sie anschließend durch das Endothel dieser Gefäße in den Blutstrom transmigrieren können [14, 30].

Ein wichtiger erster Schritt in der Mobilisierung von EPCs aus dem Knochenmark scheint folglich innerhalb des Knochenmarks, der Übertritt von ruhenden, an die Knochenmarksmatrix gebundenen EPCs aus der Stromannische in die vaskuläre Proliferationsnische, zu sein. Für diesen Umgebungswechsel müssen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen gelöst werden [31], um die Motilität der Vorläuferzellen zu erhöhen und dadurch die Translokation zu ermöglichen. Ein Mechanismus, der hierbei zum Tragen kommt, ist die Freisetzung des von den Knochenmarkstromazellen exprimierten Zytokins Kit Ligand, für den EPCs den Rezeptor cKit exprimieren [15]. Der Kit Ligand wird dabei aus seiner membrangebunden, adhäsionsfördernden Form (mKitL) in seine lösliche motogenetische Form (sKitL) überführt. Dieser Vorgang wird durch die ebenfalls von



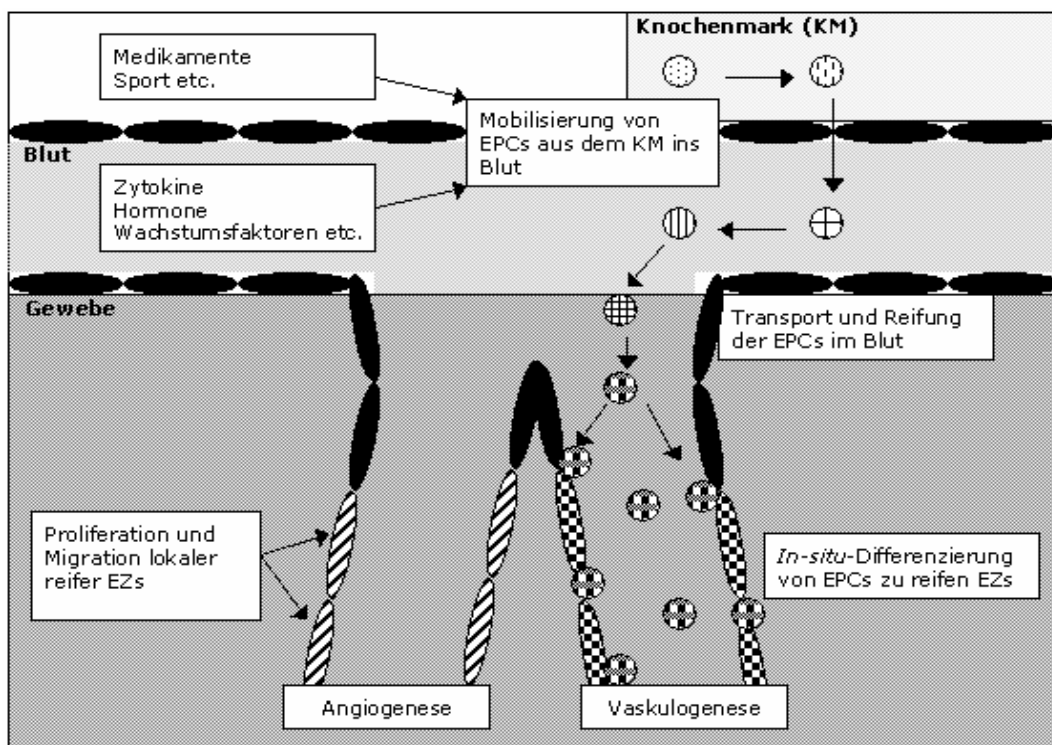
Knochenmarkstromazellen exprimierte Protease MMP-9 katalysiert [32]. MMP-9 wird unter anderem durch Stickstoffmonoxid (NO) aktiviert, welches im Knochenmark durch die eNOS (endotheliale NO-SSynthase) der Endothelzellen der dortigen Blutgefäße synthetisiert wird. Viele der oben beschriebenen mobilisierenden Faktoren wirken über eine Aktivierung der eNOS im Knochenmark. Dazu zählen beispielsweise VEGF, SDF-1, Statine, Sport und Östrogene [14]. Ein weiterer bekannter molekularer Mechanismus, welcher den Nischenwechsel der EPCs ermöglicht, ist die G-CSF-vermittelte Ausschüttung von Elastase und Katepsin G aus Neutrophilen im Knochenmark [33]. Diese beiden Proteasen lösen zum einen Verbindungen zwischen EPCs und Stromazellen. Zum anderen spalten sie von Stromazellen exprimiertes SDF-1, wodurch es zur Umkehr des SDF-1-Gradienten zwischen Knochenmarksstroma und den sinusoidalen Blutgefäßen kommt. Dies wiederum forciert den Übertritt von EPCs ins Blut, da diese den CXCR-4-Rezeptor für SDF-1 auf ihrer Oberfläche exprimieren und somit dem SDF-1-Gradienten chemotaktisch folgen [33].

### **I.2.2. Homing und Differenzierung der EPCs**

Nach ihrer Mobilisierung aus dem Knochenmark müssen die Zellen gezielt zu den Stellen im Organismus gelangen, von welchen ein entsprechender Stimulus zur Gefäßregeneration oder -neubildung ausgegangen ist und wo sie zu reifen Endothelzellen differenzieren werden (vgl. Abbildung 1). Dieser Rekrutierungsvorgang der EPCs wird auch als Homing bezeichnet.

Bisherigen Erkenntnissen zufolge handelt es sich dabei um einen mehrstufigen Prozess. Zunächst adhären im Blutstrom durch das Gefäßsystem des Körpers zirkulierende EPCs an aktivierte Endothelzellen oder offenliegende extrazelluläre Matrix. Anschließend werden die adhärenen EPCs in das geschädigte Endothel eingegliedert oder transmigrieren durch das Endothel ins Interstitium (Extravasation) und dringen auf diese Weise in das minderperfundierte Zielgewebe ein. Dort formieren sie sich zu Zellclustern und bilden Gefäßsprosse und Zellnetzwerke aus, die Anschluss an ein funktionelles Kapillarnetz finden [34, 35].

Die grundlegenden Mechanismen sind auch bei diesem Vorgang noch weitgehend unbekannt. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass sowohl für die Zielführung der EPCs zu ihrem Bestimmungsort, als auch für die Adhäsion und Transmigration der EPCs in das Zielgewebe, SDF-1 und Integrine entscheidend sind [19, 36-38]. Auch beim Differenzierungsprozess von EPCs zu reifen Endothelzellen, der mit dem Verlassen der Stammzellnische im Knochenmark beginnt und im im Zielgewebe abgeschlossen wird, scheint SDF-1 eine Rolle zu spielen [37]. Zudem vermutet man, dass auch VEGF dabei von Bedeutung ist, da es in der Embryonalentwicklung und *in vitro* für die Differenzierung von Endothelzellen entscheidend ist [35]. Des weiteren konnte *in vitro* gezeigt werden, dass bei der Apoptose von Endothelzellen entstehende Mikropartikel die Proliferation und Differenzierung von EPCs fördern [13].



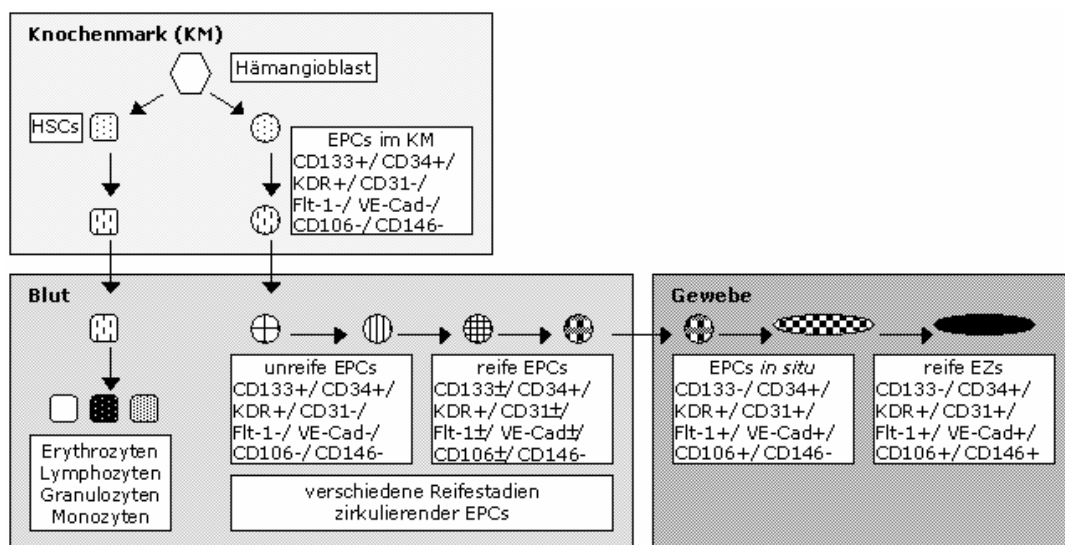
**Abbildung 1** Mechanismen der postnatalen Neovaskularisation. Schematische Darstellung der postnatalen Neovaskularisation durch Angiogenese und EPC-vermittelte Vaskulogenese. (EPCs: engl. *endothelial progenitor cells*; EZs: *Endothelzellen*).

### I.2.3. EPCs – ein heterogene Zellpopulation

Die Identifizierung endothelialer Vorläuferzellen wird dadurch erschwert, dass derzeit kein einheitliches spezifisches Oberflächenexpressionsprofil zur phänotypischen Charakterisierung von EPCs definiert ist. Daher ist auch die Nomenklatur zur Beschreibung dieser Zellen in der Literatur uneinheitlich. Es wird von „*endothelial progenitor cells*“ (EPCs) [12, 15, 39], „*outgrowth endothelial cells*“ (OECs) [39], „*circulating angiogenic cells*“ (CACs) [40], „*circulating endothelial cells*“ (CECs) [15], „*early endothelial progenitor cells*“ (EEPCs) und „*late endothelial progenitor cells*“ (LEPCs) [41] gesprochen. Als Ursache für diese Heterogenität sind zunächst unterschiedliche Isolations- und Kulturbedingungen zu nennen [42-44]. Die Zellen wurden für die verschiedenen Experimente aus Knochenmark, Nabelschnurblut und peripherem Blut gewonnen. Da die Zellen einem ständigen, im Knochenmark beginnenden Reifungsprozess unterworfen sind, ist es denkbar, dass aus verschiedenen Quellen isolierte EPCs unterschiedliche Reifegrade aufweisen. Zudem wurden unterschiedliche Isolationsmethoden zur Gewinnung der EPCs aus den verschiedenen Körpermaterialien angewandt. Aus dem Knochenmark wurden EPCs beispielsweise direkt über CD34<sup>+</sup>-Isolation gewonnen [45] oder aus G-CSF mobilisierten Blutzellen über Isolation mittels des Oberflächenantigens AC133 gewonnen [46]. Aus dem peripheren Blut wurden EPCs mittels CD34-Magnet-Beads [12] isoliert oder es wurden, wie auch in dieser Arbeit, aus dem Blut gewonnene mononukleäre Zellen in Endothelzellmedium kultiviert und die adhären Zellen als EPCs klassifiziert [47]. Darüber hinaus waren auch die Zellkulturbedingungen in den Studien nicht immer identisch, da die für das Wachstum einer spezifischen EPC Population erforderliche Kulturkomponenten nicht eindeutig definiert sind. Da EPCs eine hohe Plastizität und infolgedessen auch eine leichte Beeinflussbarkeit durch äußere Faktoren aufweisen, können abweichende Isolations- und Kulturbedingungen durchaus ausschlaggebend sein.

Wie bereits erwähnt ist es sehr wahrscheinlich, dass sich EPCs aus Knochenmark, Nabelschnurblut und peripheren Blut adulter Spender, hinsichtlich ihres Differenzierungsgrades unterscheiden. Darüber hinaus ist aber auch davon auszugehen, dass es sich auch bei den im Blut zirkulierenden EPCs nicht um eine phänotypisch homogene Gruppe handelt, sondern

ebenfalls um eine Reihe unterschiedlicher Differenzierungsstadien [48]. Als gemeinsamer Vorläufer der endothelialen Zellen und der hämatopoetischen Zellen wird der sogenannte Hämangioblast im Knochenmark angesehen [49]. Dementsprechend gleichen die im Knochenmark vorzufindenden unreifen EPCs noch sehr den hämatopoetischen Stammzellen (engl. HSCs, *hematopoietic stem cells*) und exprimieren beispielsweise die Oberflächenmarker CD133, CD34 und KDR [15]. Nach der Mobilisation der Zellen in die periphere Zirkulation scheint die Expression der für unreife Zellen charakteristischen Oberflächenmarker allmählich verloren zu gehen, statt dessen exprimieren die Zellen zunehmend die Marker reifer Endothelzellen, wie CD31, Flt-1, VE-Cadherin und CD106 [12, 41, 50-53]. Offensichtlich sind EPCs also auf ihrem Weg vom Knochenmark bis in die Gefäßwand auch einem kontinuierlichen Reifungsprozess unterworfen, der von sehr unreifen, dem Hämangioblasten nahe stehenden EPCs ausgeht, sich über zahlreiche im Blut zirkulierende Zwischenstufen mit zunehmend endothelialen Eigenschaften fortsetzt und in der Gefäßwand mit der Differenzierung der EPCs zu reifen Endothelzellen endet [48]. Zirkulierende EPCs sind somit eine heterogene Zellpopulation, die sich aus unterschiedlichen, gleichzeitig nebeneinander im Blut vorliegenden Differenzierungsgraden der endothelialen Vorläuferzellen zusammensetzt.



**Abbildung 2** EPC-Reifung.

Schematische Darstellung der Differenzierungsstufen aus dem Knochenmark stammender EPCs. (HSCs: engl. *hematopoietic stem cells*; EPCs: engl. *endothelial progenitor cells*; EZ: Endothelzellen).

Die Heterogenität der Zellpopulation zirkulierender EPCs macht weitere Studien zur Definition EPC-spezifischer Expressionsprofile notwendig. Trotz alledem sind sich die meisten der bisherigen Studien bezüglich bestimmter, relativ konstanter Hauptmerkmale von zirkulierenden EPCs einig, sodass diese in der Zwischenzeit zur Charakterisierung herangezogen werden können. Zu diesen Merkmalen zählen zum einen die Oberflächenmarker CD34, CD133 und KDR [52, 54, 55], zum anderen die Aufnahme von acetyliertem LDL (acLDL) und eine Anfärbbarkeit mit Ulex Lectin [56].

Von einem klinisch-therapeutischen Standpunkt aus betrachtet, ist es vor allem wichtig, dass es sich bei den zirkulierenden EPCs um nicht ausdifferenzierte Zellen der endothelialen Zelllinie handelt, die in der Lage sind ins Gewebe zu integrieren und dort zu funktionsfähigen Endothelzellen auszdifferenzieren. Dieses vaskulogenetische Potenzial scheinen alle in der Literatur beschriebenen verschiedenen Phänotypen (Differenzierungsstadien) von zirkulierenden EPCs zu besitzen. Dennoch wäre es künftig interessant die EPC-Arten zu unterscheiden, um ihr vaskulogenetisches Potenzial vergleichen und die für verschiedene Zwecke am besten geeigneten Subpopulation identifizieren zu können.

#### **I.2.4. Biologische Aufgaben der EPCs im Organismus**

Pränatal dient die Neubildung von Blutgefäßen dazu, die Blutzirkulation in zuvor avaskulären Regionen zu etablieren und funktionell anzupassen. Postnatal stellt sie einen adaptiven Vorgang dar, der nur bei bestimmten physiologischen und pathologischen Prozessen auftritt.

Die erwünschte physiologische Gefäßneubildung ist streng kontrolliert und dient der Erhaltung der Homöostase des Organismus. Bei der Wundheilung trägt sie, durch Bildung neuer Kapillarnetze in den Wundrändern, wesentlich zur Etablierung von nutritiver Perfusion und Reoxygenierung bei [57, 58]. Im weiblichen Reproduktionstrakt ist sie entscheidend an der zyklischen Organogenese des Endometriums beteiligt [59]. Eine geregelte Neubildung von Blutgefäßen ist darüber hinaus von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche Knochenbildung im Rahmen der Frakturheilung [60] und als lokaler Kompensationsmechanismus bei Minderdurchblutung von diversen Geweben (Gewebeischämie) [61].

Bei der unerwünschten pathologische Gefäßneubildung kommt es hingegen zur überschießenden Neovaskularisation mit destruktivem Charakter, wobei die neugebildeten Gefäße direkt am Pathomechanismus einer Erkrankung beteiligt sind. Beispiele hierfür sind die diabetischer Retinopathie und chronische Entzündungsprozesse, wie die rheumatoide Arthritis [1, 10, 62]. Darüber hinaus setzt auch das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren, ab einem bestimmten Volumen des neoplastischen Gewebes, die Bildung eines tumoreigenen Gefäßnetzes voraus (*angiogenic switch*), so dass die Tumorangiogenese eine Tumorprogression ermöglicht [63].

Interessanterweise konnten mehrere Untersuchungen zeigen, dass bei den beschriebenen Neovaskularisationsprozessen EPCs aktiviert werden und vermehrt im peripheren Blutkreislauf, sowie in den in den entsprechenden Zielgeweben, zu finden sind. Dementsprechend konnte eine Korrelation zwischen der Mobilisierung und Rekrutierung von EPCs und dem Grad der Neovaskularisation in inflammatorischem, ischämischem [17, 64-66] und neoplastischem [67, 68] Gewebe detektiert werden. Darüber hinaus konnte auch bei der Reendothelialisierung von Gefäßlumina nach Endothelschädigung oder nach Rekanalisierung eines formierten Thrombus eine Beteiligung von EPCs nachgewiesen werden [69]. Tierexperimentelle Studien zeigten eine Integration von transplantierten EPCs in das vorhandene Gefäßsystem [70-73] und wiesen darüber hinaus auch im umliegenden Gewebe EPCs nach, die sich nicht in das bestehende Gefäßsystem integrierten [74-76].

EPCs können also nachweislich *in vivo* in neue und bereits existierende Blutgefäße integriert werden [17, 77, 78]. Alle diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass EPCs an der Neovaskularisation bestimmter Gewebe beteiligt sind und durch die Reparatur von geschädigtem Endothel auch einen Beitrag zur vaskulären Homöostase leisten.

Aus den beschriebenen biologischen Eigenschaften der EPCs lässt sich ein vielversprechendes therapeutisches Potenzial der Vorläuferzellen, im Sinne einer EPC-vermittelten Modulation der Neovaskularisation oder Endothelregeneration, ableiten. Die Möglichkeit mit Hilfe von EPCs die Gefäßbildung voranzutreiben, was vor allem bei der Regeneration von ischämischem Gewebe wünschenswert ist, konnte in tierexperimentellen Studien bereits nachgewiesen werden und wird gegenwärtig in klinischen

Studien erprobt [77-79]. Auch die Inhibition der Tumervaskularisation mit Hilfe von EPCs stellt eine neue Option in der Behandlung von Tumoren dar [80]. Darüber hinaus ist auch der Einsatz von EPCs im Bereich des Tissue Engineering, insbesondere im Bezug auf das muskuloskelettales System, eine interessante Möglichkeit, um eine Durchblutung von neugebildetem Gewebe zu erzielen [81-83]. Methodisch ist beispielsweise eine pharmakologische Stimulation der Mobilisierung von EPCs aus dem Knochenmark denkbar. Besonders vielversprechend erscheint jedoch vielmehr die gezielte Transplantation von EPCs in Gewebe, in denen die Blutgefäßneubildung vorangetrieben werden soll.

#### **I.2.5. Gewinnung von EPCs**

Eine wichtige Voraussetzung für die therapeutische Transplantation von EPCs ist die Gewinnung einer ausreichenden Menge dieser Zellen.

Wie bereits erwähnt, können endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, dem Nabelschnurblut oder dem peripherem Blut gewonnen werden [84]. Nabelschnurblut enthält zwar einen vergleichsweise hohen Anteil an EPCs mit großem Proliferationspotenzial, doch sind diese zur Transplantation weniger geeignet, da sie heterolog zum Empfänger sind und somit die Problematik der Immunsuppression mit sich bringen [71]. Auch im Knochenmark ist der Anteil an Vorläuferzellen relativ hoch, doch sind darunter viele unreife EPCs und auch zahlreiche proinflammatorisch wirksame Leukozyten. Darüber hinaus ist zur Gewinnung von EPCs aus dem Knochenmark im Vergleich zu einer peripheren Blutentnahme ein invasiveres Vorgehen nötig [48]. Peripheres Blut ist bei adulten Spender leicht zu gewinnen, enthält jedoch nur eine sehr geringe Zahl an EPCs, so dass daraus nur wenig EPCs gewonnen werden können [15, 42].

Mit Hilfe der bisherigen Isolierungsmethoden können also aus dem adulten menschlichen Organismus nicht ausreichend autologe EPCs für eine therapeutische Verwendung der Zellen gewonnen werden. Folglich sind hierfür künftig neue Verfahren zur Verbesserung der Isolierung und/ oder *ex vivo* Expansion der EPCs erforderlich.

### I.3. Cystein-reiches Protein 61 (CYR61/CCN1)

#### I.3.1. CYR61 – ein Mitglied der CCN-Proteinfamilie

Das CYR61-Protein wurde vor etwa zwanzig Jahren [85] in murinen Fibroblasten identifiziert [85, 86]. Ende der neunziger Jahre gelang dann auch der Nachweis des humanen Analogons von CYR61 [87, 88].

CYR61 ist das erstbeschriebene Mitglied der Familie der CCN-Proteine und wird daher auch als CCN1-Protein bezeichnet. Das Akronym CCN [89] ergibt sich aus den Anfangsbuchstaben der drei als erstes entdeckten Mitglieder der Proteinfamilie: CYR61 (engl. *Cystein-rich protein 61*, Cystein-reiches Protein 61) [86], CTGF (engl. *Connective tissue growth factor*) [90] und NOV (engl. *Nephroblastoma overexpressed gene*) [91]. Weitere Mitglieder sind die drei *Wnt-1 induced secreted proteins*, WISP1-3.

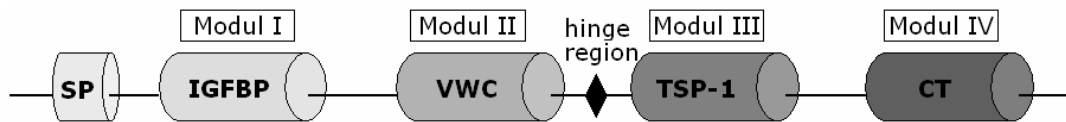
Nachdem die CCN-Proteine anfangs mit verschiedenen, zum Teil irreführenden Namen bezeichnet worden waren, einigte man sich schließlich auf eine einheitliche Nomenklatur, gemäß der Reihenfolge der Beschreibung der einzelnen Mitglieder in der Literatur: CCN1(CYR61), CCN2(CTGF), CCN3(NOV), CCN4(WISP1), CCN5(WISP2), CCN6(WISP3) [92].

Die Ähnlichkeit ihrer molekularen Struktur verbindet die CCN-Proteine zu einer Strukturfamilie multimodularer Mosaikproteine. So zeigen die 35-40kDa großen CCN-Proteine [93] eine 30-50%ige Homologie der Aminosäuresequenz [94] und weisen mit 38 konservierten Cystein-Resten, die etwa 10% der Gesamtmasse ausmachen, einen hohen Cystein-Anteil auf [93]. Besonders charakteristisch für die CCN-Proteine ist darüber hinaus ihre multi-modulare Sekundärstruktur, bestehend aus vier getrennten, konservierten Modulen, die stets in der selben Reihenfolge hintereinander miteinander verbunden sind und jeweils zumindest teilweise einem anderen großen Regulatorprotein gleichen [89, 95] (vgl. Abbildung 3).

Von N-terminal beginnend findet sich zunächst, wie bei sezernierten Proteinen üblich, ein für die Sekretion entscheidendes Signalpeptid (SP, engl. *secretory signal peptide*) [96]. Daran schließt sich Modul I an, eine IGFBP (engl. *insulin-like growth factor binding protein*)-Domäne, gefolgt von Modul II, einer VWC (engl. *von Willebrand type C*)-Domäne, Modul III einer TSP-1 (engl. *thrombospondin-homology type 1*)-Domäne und schließlich Modul IV, einer CT (engl. *carboxyl-terminal*)-Domäne, die nur in WISP2/CCN5 fehlt [89, 95, 97].



Zwischen den Modulen II und III befindet sich zudem eine sogenannte „*hinge region*“, die für die Proteinspaltung durch Proteasen anfällig ist [98, 99].



**Abbildung 3** Modulare Sekundärstruktur der CCN-Proteine.

Schematische Darstellung der modularen Proteinstruktur der CCN-Proteine CCN1-4,6, bei CCN5 fehlt Modul IV. Von N-terminal sind das Signalpeptid (SP), die *IGF-binding-protein*-Domäne (IGFBP, Modul I), die *vonWillebrand-typeC*-Domäne (VWC, Modul II), die *thrombospondin-homology-type1*-Domäne (TSP-1, Modul III) und die *Carboxy-terminal*-Domäne (CT, Modul IV) dargestellt. Zwischen Modul II und III ist die für Proteinspaltung anfällige „*hinge region*“ zu sehen.

Jedes der vier Module wird jeweils von einem separaten Exon auf der mRNA kodiert [100]. Dies deutet darauf hin, dass die Gene der CCN-Familie durch Exon-Mischung vorher vorhandener Gene entstanden sind [101] und hat zur Folge, dass die einzelne Module untereinander strukturell unabhängig sind. Die modulare Konfiguration der CCN-Proteine bestimmt nicht nur deren Wirkungen, sondern scheint auch einen Einfluss auf ihre Bioverfügbarkeit, ihre Halbwertszeit, ihre Bindung anderer Proteinreste und ihre zeitliche und räumliche Regulation zu haben [89, 93, 102].

Hinsichtlich ihrer biologischen Funktion handelt es sich bei den CCN-Proteinen um sezernierte extrazelluläre Proteine. Darunter versteht man an die extrazelluläre Matrix (EZM) assoziierte Proteine, die dynamisch exprimiert werden und keine ersichtliche strukturelle Funktion innerhalb der EZM innehaben, sondern hauptsächlich die zelluläre Antwort auf Einflüsse aus der Umgebung modulieren [103, 104].

### I.3.2. Regulation der Expression des *CYR61*-Gens

Das *CYR61*-Protein wird durch das auf Chromosom 1p22-p31 lokalisierte Gen *CYR61* kodiert [87, 105]. Zunächst wurde dieses *CYR61*-Gen als ein auf Transkriptionsebene reguliertes *Immediate early gene* identifiziert, d.h. ein Gen, dessen Transkription unmittelbar nach der Stimulation einer Zelle beginnt und nur vorübergehend anhält [86, 106].

Als mögliche Induktoren der *CYR61*-Genexpression wurden zunächst Serum, cAMP und verschiedene Wachstumsfaktoren, wie bFGF, PDGF oder TGF- $\beta$ , beschrieben [86, 106, 107]. In zahlreichen neueren Studien konnten diese Beobachtungen bestätigt, präzisiert und erweitert werden [108, 109]. Beispielweise wurden im Promotor des *CYR61*-Gens verschiedene Sequenzen gefunden, die bei der transkriptionellen Aktivierung von *CYR61* eine entscheidende Rolle spielen. Beispiele hierfür sind ein SRE (engl. *serum response element*) [106, 110] und ein durch TGF- $\beta$  über sogenannte SMAD-Proteine induzierbares SMAD-Bindungsmotiv [109]. Darüber hinaus ist heute bekannt, dass auch verschiedene Hormone, wie beispielsweise Angiotensin II [111], Östrogene [112] oder Dihydroxy-Vitamin D3 (1.25-(OH)<sub>2</sub>D3) [88], und Zytokine, wie IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$  [113, 114], in der Lage sind die Expression des *CYR61*-Gens zu induzieren.

Ein besonders eindrucksvoller Aspekt der *CYR61*-Genexpression ist deren Induzierbarkeit durch Sauerstoffmangel (Hypoxie) [115] und physikalische Einflüsse, wie UV-Strahlung [116] oder mechanische Kräfte [117].

### **I.3.3. Biologische Funktionen des CYR61-Proteins**

*CYR61* gehört zu den bisher am besten erforschten Mitglieder der CCN-Proteinfamilie und bleibt weiterhin Gegenstand wissenschaftlicher Forschung, da es an der Steuerung grundlegender zellulärer Vorgänge beteiligt ist und auf diese Weise in der Lage ist, essentielle biologische Prozesse im embryonalen und adulten Organismus maßgeblich zu beeinflussen. So trägt *CYR61* unter anderem zur Regulation der Adhäsion, der Apoptose, der Differenzierung, der Mitose, der Proliferation und der Migration verschiedener Zelltypen bei [97]. Zu den Zielzellen zählen in erster Linie Fibroblasten, Epithelzellen, Muskelzellen, Endothelzellen und Nervenzellen. Die Zielgewebe sind folglich vor allem der Knochen, der Knorpel, die Muskulatur, die Gefäße und das Nervensystem [93, 97, 118]. Über diese Modulation auf zellulärer Ebene übt *CYR61* einen regulierenden Einfluss auf die Embryonalentwicklung und diverse physiologische und pathologische Prozesse im adulten Organismus aus [103]. *CYR61* steuert als Regulator der Angiogenese, Chondrogenese und Fibrogenese die Entstehung verschiedener Gewebe [119]. Aber auch entzündliche, infektiöse, neoplastische, fibrotische und regenerative Prozesse

im adulten Organismus können von einer Hochregulation der *CYR61*-Genexpression begleitet sein und infolgedessen entscheidend durch die *CYR61*-Proteinwirkungen beeinflusst werden [95, 97, 103, 110, 114, 120, 121].

#### **I.3.4. Vermittlung der *CYR61*-Proteinwirkungen**

Es stellt sich nun die Frage, wie *CYR61* als einzelnes Protein so vielen verschiedenen Aufgaben nachkommen kann?

Bis vor einigen Jahren wurde *CYR61* zu den Wachstumsfaktoren [90, 122] oder den EZM-assoziierten Adhäsionsmolekülen [98, 123] gerechnet. Heute weiß man, dass *CYR61* ein sezerniertes, an die EZM assoziiertes Signalmolekül ist [81, 124], welches die Signalübertragung anderer Moleküle modifiziert [99]. Daher zählt man *CYR61* heute zu den matrizellulären Proteinen [81, 99, 125-127]. *CYR61* stellt somit eine Art Bindeglied zwischen extrazellulären Matrixproteinen und zellulären Rezeptoren dar. Es überbrückt die physikalische und funktionelle Lücke zwischen der extrazellulären Matrix und der Zelloberfläche und reguliert auf diese Weise die Kommunikation zwischen diesen beiden Systemen [125].

Die Vermittlung der molekularen Mechanismen, die den *CYR61*-Proteinwirkungen zugrunde liegen, sind derzeit Gegenstand zahlreicher experimenteller Studien. In vielen bisherigen Untersuchungen stand die Suche nach hochaffinen, spezifischen Rezeptoren für *CYR61* im Mittelpunkt, welche jedoch bislang erfolglos blieb. Dennoch konnten molekulare Interaktionspartner des *CYR61*-Proteins identifiziert werden, die zur Vermittlung seiner Wirkungen beitragen. Hierzu zählen insbesondere Zelladhäsionsmoleküle, wie Integrine und Heparan-Sulfat-Proteoglykane (HSPGs), aber auch Wachstumsfaktoren, Zytokine und zelluläre Rezeptoren [99].

Eine besonders bedeutsame Rolle als funktionelle Rezeptoren von *CYR61* kommt offensichtlich den Integrinen und HSPGs zu. So bindet *CYR61* über die Module III und IV direkt an spezifische Integrine auf der Zelloberfläche und induziert auf diese Weise intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse, zu denen Kinaseaktivierung und Gentranskription zählen [128-134]. Dabei scheint *CYR61*, in Abhängigkeit von der jeweiligen Zielzelle und der zu vermittelnden

Wirkung, mit verschiedene Integrinen zu interagieren [103], wovon bislang acht verschiedene (Integrin  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_{2b}\beta_3$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_D\beta_2$ ,  $\alpha_M\beta_2$ ,  $\alpha_V\beta_3$ ,  $\alpha_V\beta_5$ ) identifiziert werden konnten [103, 128, 129, 133, 135-137]. Darüber hinaus ist bekannt, dass CYR61 über eine Heparin-bindende Domäne in Modul IV mit HSPGs der Zelloberfläche, wie Perlecan und bestimmten Syndecanen, interagiert, die wiederum in bestimmten Zusammenhängen als Korezeptoren für Integrine dienen [103, 131, 138-140].

Eine weitere Gruppe von Interaktionspartnern des CYR61-Proteins bilden Zytokine und Wachstumsfaktoren, deren Aktivität CYR61 durch funktionelle und/ oder physikalische Wechselwirkungen entscheidend verändern kann [103]. Ein Beispiel hierfür ist der Einfluss von CYR61 auf das Zytokin TNF- $\alpha$ , ein Zytokin das im Wesentlichen an der Steuerung von immunologischen Prozessen, wie Entzündungsreaktionen, beteiligt ist [141]. CYR61 kann die Wirkung von TNF- $\alpha$  entscheidend verändern, indem es TNF- $\alpha$  in humanen Fibroblasten von einem proliferationssteigernden Faktor in ein potentes apoptotisches Agens verwandelt [142]. Hierfür bindet CYR61 an die Integrine  $\alpha_V\beta_5$  und  $\alpha_6\beta_1$  und Syndecan-4, was über die Bildung von ROS (engl. *reactive oxygen species*) zur biphasischen Aktivierung der für die Apoptose nötigen Proteinkinase JNK führt [142].

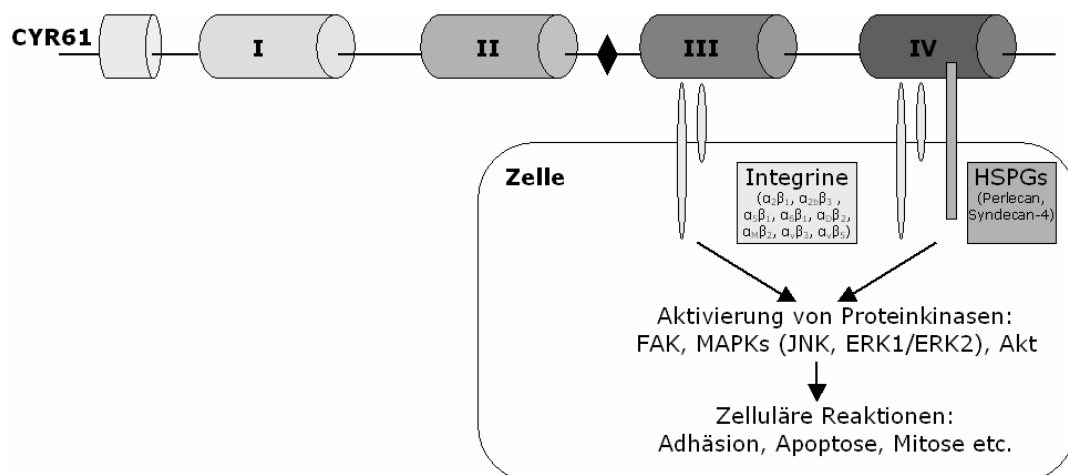
Hinsichtlich der Wachstumsfaktor-Interaktionen ist bisher nur eine direkte Bindung von CTGF/CCN2 über Modul II an TGF- $\beta$  und BMPs (engl. *bone morphogenic proteins*) nachgewiesen, über die CTGF in bestimmten Zellen die Rezeptorbindung, und damit die Funktionen von TGF- $\beta$  und BMPs, zu beeinflussen scheint [143-146]. Für CYR61 konnte diesbezüglich bisher nur ein hemmender Einfluss auf die BMP-Signalübertragung nachgewiesen werden [144]. Dafür konnte gezeigt werden, dass CYR61 die Bioverfügbarkeit von bFGF steuern kann, indem es EZM-gebundenes bFGF löst und so die bFGF-induzierte DNA-Synthese steigert [147].

Diese und weitere Interaktionen von CYR61 mit Molekülen der Zelloberfläche führen zu anschließenden intrazellulären Signalübertragungsvorgängen. Eine entscheidende Rolle scheint hierbei die Aktivierung von Proteinkinasen zu spielen, zu denen vor allem die FAK [148], die MAPKs ERK1/ERK2 [149] und die Serin/Threonin-Kinase Akt (Proteinkinase B) [150] zählen. Daneben sind aber auch andere Signalwege möglich, wie beispielsweise eine

Signalübertragung durch Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration [151, 152].

Vom derzeitigen Kenntnisstand bezüglich der CCN-Proteine und ihrer Interaktionspartner ausgehend, liegt der Schluss nahe, dass eine Antwort auf die Frage der komplexen Vermittlung der CYR61-Proteinwirkungen in der multi-modularen Proteinstruktur gefunden werden kann. Die Fähigkeit über unabhängige funktionelle Domänen mit einer Vielzahl verschiedener Moleküle zu interagieren, ermöglicht dem CYR61-Protein die Einflussnahme auf zahlreiche Signaltransduktionswege. Folglich muss CYR61 nicht unbedingt eine unabhängige Aktivität haben [99], sondern kann die Aktivität anderer Signalmoleküle modifizieren. Dies bedingt eine gewisse Abhängigkeit der biologischen Wirkungen vom jeweiligen Interaktionspartner, mit welchem das CYR61-Protein in bestimmten Situationen interagiert [99].

Alle diese Beobachtungen deuten somit auf einen plausiblen Erklärungsansatz für das breite Spektrum und die Variabilität der biologischen Wirkungen von CYR61 hin, dessen umfassendes Verständnis jedoch weiterer intensiver Forschung bedarf.



**Abbildung 4** Zelluläre Wirkungsvermittlung von CYR61.

Schematische Darstellung bekannter Signalwege zur Vermittlung der zellulären CYR61-Wirkung. (HSPGs: Heparan-Sulfat-Proteoglykane).

### I.3.5. Der angiogenetische Faktor CYR61

CYR61 wurde als erstes CCN-Protein als angiogenetischer Faktor charakterisiert [153]. Dem Nachweis der Fähigkeit von CYR61 zur Steigerung der Proliferation, Migration und Adhäsion von Endothelzellen *in vitro*, folgten tierexperimentelle Modelle, die *in vivo* eine CYR61-vermittelte Induktion von Neovaskularisation zeigten [133, 153-156]. Besonders eindrücklich demonstrierte ein *CYR61-Knockout*-Mausmodell die essentielle Bedeutung von CYR61 bei der Entstehung neuer Blutgefäße [154]. In diesem Experiment verstarben gentechnisch hergestellte *CYR61*-defiziente Mäuse (*CYR61*<sup>-/-</sup>) im embryonalen Entwicklungsstadium infolge vaskulärer Defekte, die in einer Mindervaskularisierung der Plazenta und einem Verlust der Gefäßintegrität im Embryo bestanden. Die großen Gefäße der *CYR61*-Nullmutanten waren stark dilatiert, zeigten abgelöste oder lose mit einer zerfallenden Basallamina verbundene Gefäßzellen, eine lückenhafte Endothelzellschicht, zahlreiche apoptotische Gefäßzellen und einen Mangel an VSMCs (engl. *vascular smooth muscle cells*, glatte Gefäßmuskelzellen) und Perizyten in der umgebenden Gefäßwand [154].

Einen weiteren Hinweis auf die angiogenetische Wirkung von CYR61 liefert die bereits erwähnte *CYR61*-Überexpression als direkte Antwort auf Sauerstoffmangel im Gewebe [115]. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die bei der Transkription von Hypoxie-induzierbaren Genen bedeutsamen Transkriptionsfaktoren AP-1 und HIF-1 $\alpha$  auch an der Induktion der *CYR61*-Genexpression beteiligt sind. Für AP-1 konnte sogar ein Bindungsmotiv im Promotor des *CYR61*-Gens nachgewiesen werden [115].

Die beschriebenen Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass CYR61 ein durch Sauerstoffmangel induzierbarer angiogenetischer Faktor ist.

#### I.3.5.1. Von der *CYR61*-Expression zur Neovaskularisation

Der Nachweis der Angiogeneseinduktion durch CYR61 wirft die Frage auf, wie es von der *CYR61*-Überexpression zur gesteigerten Neubildung von Blutgefäßen im Gewebe kommt.

Bei der Vermittlung des stimulierenden Effekts von CYR61 auf Endothelzellen scheint auf molekularer Ebene insbesondere die Interaktion von CYR61 mit den Integrinen  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_6\beta_1$  bedeutsam zu sein [128, 133, 153, 155]. Über

welches dieser beiden Integrine CYR61 mit Endothelzellen interagiert, hängt vom Aktivierungszustand der jeweiligen Zelle ab: die Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte angiogenetische Aktivität von CYR61 bedarf einer Aktivierung, im Gegensatz zur konstitutiven angiogenetischen Interaktion von CYR61 und Integrin  $\alpha_6\beta_1$  [133]. Integrine scheinen zudem eine Rolle beim CYR61-vermittelten Rekrutment von CD34<sup>+</sup> endothelialen Vorläuferzellen eine Rolle zu spielen, welches wiederum zur Steigerung der endotheliale Proliferation und Neovaskularisation beiträgt [157].

Neben diesen direkten Integrin-vermittelten Interaktionen von CYR61 mit endothelialen Zellen kann CYR61 die Angiogenese auch vorantreiben, indem es die Aktivität anderer angiogenetischer Signalmoleküle, wie VEGF oder bFGF, beeinflusst [114, 147, 154].

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von CYR61, Integrin  $\alpha_6\beta_1$  und HSPGs die Adhäsion und Chemotaxis von VSMCs vorantreiben kann [132]. Dies macht deutlich, dass der angiogenetische Effekt von CYR61 nicht auf die Beeinflussung endothelialer Zellen beschränkt zu sein scheint, sondern verschiedene Gefäßzellen mit einbezieht.

Die Vermittlung der angiogenetischen Wirkung des CYR61-Proteins ist also nicht auf die Interaktion mit einem bestimmten Molekül oder die Stimulation eines definierten Zelltyps zurückzuführen. Statt dessen beeinflusst CYR61 diverse Moleküle und Zellen, die in unterschiedlicher Art und Weise an der Neubildung von Blutgefäßen beteiligt sind.

### **I.3.5.2. CYR61-vermittelte Neovaskularisation in Krankheit und Therapie**

In Übereinstimmung mit der dargestellten angiogenetischen Wirkung des CYR61-Proteins kann in zahlreichen, mit Neovaskularisation einhergehenden, physiologischen und pathologischen Prozessen im Organismus eine CYR61-Überexpression und infolgedessen eine CYR61-vermittelte Neovaskularisation gefunden werden [119]. So unterstützt CYR61 durch seine angiogenetische Wirkung die Regeneration verschiedener geschädigter Gewebverbände, wie beispielsweise die Heilung von Wunden, frakturiertem Knochen oder infarziertem Gewebe [81, 156, 158, 159]. Unerwünschterweise kann CYR61 auch in neoplastischem Gewebe die Neubildung von Blutgefäßen vorantreiben

und damit einen entscheidenden Beitrag zur Tumorvaskularisation und damit zur Tumorprogression leisten [160].

Aus diesen Erkenntnissen erwächst die Idee einer gezielten pharmakologischen Modulation der CYR61-Aktivität in der Therapie entsprechender Erkrankungen, die jedoch durch das Fehlen spezifischer Rezeptoren für CYR61 erschwert wird.

#### **I.4. Fragestellung**

Sowohl EPCs als auch CYR61 sind, auf noch nicht vollständig verstandene Art und Weise, an der Blutgefäßbildung beteiligt. Diese Feststellung gab im Vorfeld dieser Arbeit Anlass dazu, zum Kulturmedium, von aus dem peripheren Blut gewonnenen und *in vitro* kultivierten EPCs, versuchsweise rekombinantes CYR61-Protein zu geben. Infolgedessen konnte eine deutliche Zellzahlzunahme der mit CYR61 behandelten Zellen, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen, beobachtet werden. Daraus ergaben sich die dieser Arbeit zugrundeliegende Fragestellungen:

Kann durch die Behandlung von *in vitro* kultivierten EPCs mit CYR61 regelmäßig eine deutliche Zellzahlvermehrung erzielt werden?

Führt die CYR61-Behandlung zur weiteren Differenzierung der EPCs und infolgedessen zur Veränderung des Phänotyps der Vorläuferzellen oder hat die CYR61-Behandlung *in vitro* keinen Einfluss auf die Zelldifferenzierung?

Ist CYR61 folglich ein potenter Stimulator der *ex vivo* Expansion von aus dem Blut isolierten EPCs?



## II. MATERIAL UND METHODEN

### II.1. Material

#### II.1.1. Geräte

Geräte	Firmen
Brutschrank, Inkubator	H+P, Oberschleissheim
Digitalkamera, CanonPowerShot A620	Canon, Krefeld
Digitalkamera-Mikroskop-Adaptertubus	Soligor, Leinfelden-Echterdingen
ELISA Reader	SLT-Labinstruments, Achterwehr
FACS-Scan	Becton Dickinson, Heidelberg
Gefrierschrank	Bosch, Stuttgart
Heißluftsterilisator	Haraeus, Hanau
Kühlschrank	Bosch, Stuttgart
Inversionsmikroskop, ZeissAxiovert 25	Zeiss, Oberkochen
PH-Meter, inoLAB	WTW, Weilheim
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Vortexmischer, Minishaker	IKA Works, Wilmington, USA
Waage	Saltec, Heiligenstadt
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Werkbank, LAF	Haraeus, Hanau
Zentrifuge, Megafuge 1.0	Haraeus, Hanau

**Tabelle 1** Geräte.

#### II.1.2. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firmen
Chambered-Permanox-Slides, 8-Well	Nalge Nunc, Wiesbaden
Deckgläser	Karl Hecht „Assistent“, Sondheim
Einmalhandschuhe	Ansell, München
Eppendorfhütchen	Greiner, Frickenhausen
FACS-Reagenzröhrchen	Beckton Dickinson, Heidelberg
Falcon-Tubes	Greiner, Frickenhausen
Glaswaren	Schott, Mainz
Halbmikroküvetten	Greiner, Frickenhausen
Hämocytometer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Monovetten 9ml	Sarstedt, Nümbrecht
Multifly	Sarstedt, Nümbrecht
PH-Papier	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Plastikpipetten	Greiner, Frickenhausen
Plastikspritzen	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflaschen	TPP, Trasadingen (CH)
Zellschaber	TPP, Trasadingen (CH)
Zellkulturschalen	Greiner, Frickenhausen

**Tabelle 2** Verbrauchsmaterialien.

### II.1.3. Chemikalien

Chemikalien	Firmen
Accutase	PAA, Pasching
Aceton	AppliChem, Darmstadt
Ascorbat-2-Phosphat (50mg/ml)	Sigma-Aldrich, Seelze
Bradford-Reagenz	Roth, Karlsruhe
BSA (Albumin Fraktion V, pH7,0)	AppliChem, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
EDTA	Sarstedt, Nümbrecht
EGF	Strathmann Biotech, Hamburg
Ethanol (20%, 70%)	AppliChem, Darmstadt
FBS	Invitrogen, Karlsruhe
FCS (fötales Kälberserum)	PAA, Pasching
Fc-tag	Dr. P. Schneider, Univ. of Lausanne
b-FGF	Strathmann Biotech, Hamburg
Ficoll Hypaque	GE Healthcare, München
Glycerol-Gelatine	Sigma-Aldrich, Seelze
Glycin (0,1M pH2,2)	AppliChem, Darmstadt
Glutamin	PAA, Pasching
Hämatoxylin	Fluka Chemie, Buchs (CH)
HCl	Roth, Karlsruhe
IGF-1	R&D Systems, Wiesbaden
Levamisol	DakoCytomation, Hamburg
Maus Serum	DakoCytomation, Hamburg
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Normal-Pferdeserum	PAA, Pasching
PBS	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Pasching
TBS	AppliChem, Darmstadt
Tris-HCl (3M pH8,0)	AppliChem, Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Seelze
VEGF-165	Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg

**Tabelle 3** Chemikalien.

### II.1.4. Kommerzielle Laborkits

Laborkits	Firmen
BacPAK™ Baculovirus Expression System	Clontech, Heidelberg
Dako REAL™ Steptavidin AP	DAKO Cytomation, Hamburg
HiTrap Protein G Hp Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
DakoREAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse	DakoCytomation, Hamburg
Roti-Quant® Bradford-Reagenz	Roth, Karlsruhe
WST-1 Reagenz	Roche, Mannheim

**Tabelle 4** Kommerzielle Laborkits.

### II.1.5. Puffer und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung	Versuch
Elutionspuffer	0.1M Glycin-HCl pH2.2	CYR61-Proteingewinnung
Probenpuffer	3M Tris-HCl pH8.0	
Waschpuffer	Aqua dest. / 0.9%NaCl / 1%FCS	Zellisolation
FACS-Puffer	PBS / 0.5% BSA	FACS-Analysen
Waschpuffer	0.05M TBS pH7.6	Immunhistochemie
Blockierungslösung	TBS/2%BSA/2.5%Normal-Pferdeserum	

**Tabelle 5** Puffer und Lösungen.

### II.1.6. Zellen und Zellkulturmedien

Zellen	Bezugsquelle	Grundmedium		Zusätze
Sf21	Clontech, Heidelberg	TNM-FH	Invitrogen, Karlsruhe	10% FCS, 10% DMSO
EA.hy926	Cora-Jean S. Edgell, Univ. of North Carolina, USA	DMEM/F12	PAA, Pasching	10% FCS
EPC	Spender vgl. Abschnitt II.2.2	EBM-2	Cambrex, Verviers(F)	5% FCS, 50mM Asc-2-P 1 X Pen/Strep
Caco-2	DSMZ, Braunschweig	RPMI	PAA, Pasching	10% FCS, 1%L-Glutamin 1 X Pen/Strep

**Tabelle 6** Zellen und Zellkulturmedien.

**Sf21-Insektenzelllinie:** Die Sf21-Zelllinie (IPLB-Sf21) stammt aus dem ovariellen Gewebe der Larve des Nachtfalters *Spodoptera frugiperda* [161], die vor allem zur Vermehrung von AcMNPV-basierten Viren (Baculoviren) und folglich zur Produktion von rekombinanten Proteinen eingesetzt werden.

**EA.hy926 Endothelzelllinie:** Die humane Endothelzelllinie EA.hy926 wurde durch die Fusion von HUVECs mit der humanen Lungenkarzinom-Zelllinie A549 [162] generiert. Diese gut charakterisierte makrovaskuläre Endothelzelllinie dient als Modell für humanes Endothel [163].

**Caco-2 Zellen:** Die CD133 exprimierenden humanen Kolonkarzinomzellen Caco-2 wurden von Dr. B. Schmaußer aus dem Labor des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt, um die Funktionalität des verwendeten Antikörpers gegen CD133 in der FACS-Analyse zu testen.

## II.1.7. Antikörper

### II.1.7.1. Antikörper für die FACS-Analysen

Epitop	Klon	Isotyp	Verd.	Markierung	Firma
monoklonale fluoreszenzmarkierte Primärantikörper					
CD31	WM59	Maus IgG <sub>1</sub>	1:50	FITC	Serotec, Düsseldorf
CD34 Class II	QBEnd-10	Maus IgG <sub>1</sub>	1:50	FITC	Serotec, Düsseldorf
CD133	AC133	Maus IgG <sub>1</sub>	1:50	PE	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
CD106	1.G11B1	Maus IgG <sub>1</sub>	1:50	FITC	Serotec, Düsseldorf
CD146	F4-35H7 (Sendo-1)	Maus IgG <sub>1</sub>	1:25	PE	Biocytex, Marseille (F)
Isotypenkontrolle: Maus IgG <sub>1</sub>				FITC, PE	Dianova, Hamburg

**Tabelle 7** Antikörper für die FACS-Analysen.

### II.1.7.2. Antikörper für die Immunhistochemischen Analysen

Epitop	Klon	Isotyp	Verd.	Markierung	Firma
monoklonale unmarkierte Primärantikörper					
CD31	JC70A	Maus IgG <sub>1</sub>	1:400	Unmarkiert	DAKOCytomation, Hamburg
CD34 Class II	QBEnd 10	Maus IgG <sub>1</sub>	1:5	Unmarkiert	DAKOCytomation, Hamburg
CD133/1	AC133	Maus IgG <sub>1</sub>	1:10	Unmarkiert	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Flt-1 (VEGFR1)	49560	Maus IgG <sub>1</sub>	1:50	Unmarkiert	R&D Systems, Wiesbaden
KDR (VEGFR2)	KDR-1	Maus IgG <sub>1</sub>	1:150	Unmarkiert	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
VE-Cad (CD144)	BV6	Maus IgG <sub>2</sub>	1:10	Unmarkiert	Chemicon, Hampshire (UK)
Isotypenkontrolle: Maus IgG <sub>1,2</sub>				Unmarkiert	DAKOCytomation, Hamburg
Polyklonaler Sekundärantikörper: Kaninchen IgG anti Maus				biotiniliert	DAKOCytomation, Hamburg

**Tabelle 8** Antikörper für die Immunhistochemischen Analysen.

### II.1.8. Software zur Datenauswertung

Software	Firma	Versuch
CellQuestPro	Becton Dickinson, Heidelberg	FACS-Analyse
WinMDI	Microsoft	FACS-Analyse
AxioVision	Zeiss, Oberkochen	Immunhistochemie, Mikroskopie

**Tabelle 9** Software zur Datenauswertung.

## **II.2. Methoden**

### **II.2.1. Expression, Aufreinigung und Funktionsprüfung des CYR61-Proteins**

Das rekombinante CYR61-Protein wurde nach Schütze et al. [94] als Fusionsprotein mit der Fc-Domäne von humanem IgG (Fc-tag) in Insektenzellen der kontinuierlich wachsenden Zelllinie IPLB-Sf21 (kurz Sf21), unter Verwendung eines Baculovirus-Expressionssystems, exprimiert und anschließend mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt.

#### **II.2.1.1. Synthese von rekombinantem CYR61-Protein**

Die Sf21-Insektenzellen wurden in Medium (vgl. Abschnitt II.1.6) bei 25°C kultiviert. Parallel wurden Baculoviren gentechnisch so verändert, dass ihr Genom für das CYR61-Protein kodierte. Danach wurden Monolayerkulturen von Sf21-Zellen mit diesen Baculoviren transfiziert und dazu angeregt das rekombinante CYR61-Protein als Fusionsprotein mit einem Fc-tag zu synthetisieren und in den Zellkulturüberstand abzugeben [94]. Aus dem Überstand konnte das rekombinante Fusionsprotein aufgereinigt werden.

#### **II.2.1.2. CYR61-Proteinaufreinigung**

Für die CYR61-Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie wurde der HiTrap Protein G Hp Kit von Amersham Biosciences verwendet. Das in den Chromatographiesäulen des Kits enthaltene, Matrix-gebundene Protein G ist ein Typ III Fc-Rezeptor, der an die Fc-Region von IgG bindet. Der Fc-tag, des im vorherigen Schritt synthetisierten Fusionsproteins, fungierte somit bei der Proteinaufreinigung als Affinitäts-tag, über welchen das CYR61-Protein an der Säulenmatrix haftete. Alle Befüllungen der Säule erfolgten mit sterilen Plastikspritzen und einer Flussgeschwindigkeit von etwa 2ml/min. Zunächst wurde die Säule mit 10ml PBS gewaschen, um das zum Schutz vor Austrocknung enthaltene 20%ige Ethanol zu entfernen und die Säule zu äquilibrieren. Anschließend wurde das proteinhaltige Probenmaterial (vgl. Abschnitt II.2.1.1) über die Säule geleitet. Nach einem erneuten Waschschriff mit 10ml PBS erfolgte die Elution des CYR61-Protein durch pH-Änderung mit 5ml Elutionspuffer (0,1M Glycin-HCl pH2,2). Als Sammelbehälter für die Eluatfraktion dienten Eppendorfhütchen, die in der Vorbereitung mit je 40µl 3M Tris-HCl pH 8.0 befüllt und auf Eis gelagert

worden waren. Das Eluat wurde in fünf Fraktionen zu je 1ml in die vorbereiteten Eppendorfhütchen geleitet und der Rest verworfen. Zum Schluss wurde der pH-Wert der gewonnenen Proteinfractionen mit Hilfe von pH-Papier, 0,1M Glycin pH2,2 und 3M Tris pH8,0 neutralisiert (pH7,0). Die verwendete Chromatographiesäule wurde mit 10ml PBS gewaschen, mit 6ml 20%igem Ethanol befüllt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

### **II.2.1.3. Proteinbestimmung nach Bradford**

Der Proteingehalt in den gewonnenen Eluatfraktionen wurde photometrisch nach Bradford ermittelt. Diese Methode beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue-G250 an Protein bindet, wodurch sich sein Absorptionsmaximum von 470nm auf 595nm verschiebt. Diese zur Proteinkonzentration proportionale Absorptionsänderung kann bei 595nm im Photometer gemessen werden. In der Vorbereitung wurde das vorgefertigte Bradford-Reagenz (Roti-Quant®) 1:4 mit Aqua bidest. verdünnt und davon je 500µl in Halbmikroküvetten vorgelegt. Anschließend wurden je 10µl Probenpuffer (0,1M Glycin), BSA-Proteinstandard (25-250µg BSA/ml 0,1M Glycin) oder Probe zugegeben und durch kurzes Vortexen gemischt. Nach kurzer Inkubation der Ansätze bei Raumtemperatur wurde die Absorption der BSA-Standards und der Proben im Photometer bei 595nm gegen den Nullwert (Probenpuffer in verdünntem Bradford-Reagenz) gemessen. Die Messungen der BSA-Standards wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt und aus den Ergebnissen der Mittelwert gebildet. Mit Hilfe der seriellen BSA-Verdünnungsreihe wurde zunächst eine Eichkurve erstellt. Anhand dieser BSA-Standardkurve wurden anschließend die CYR61-Proteinkonzentrationen in den einzelnen Proben berechnet.

### **II.2.1.4. Prüfung von Reinheit und Funktionalität des CYR61-Proteins**

Die Reinheit des Proteins wurde in der Arbeitsgruppe mittels Silbergefärbung und Western Blotting überprüft. Zudem wurde, vor dem Einsatz des rekombinanten CYR61-Proteins in der EPC-Kultur, die Funktionalität, d.h. die proliferative Aktivität, des Proteins in der Arbeitsgruppe nach Schütze et al. [94] mit Hilfe des Zellproliferationstests WST-1-Reagenz und der Endothelzelllinie EA.hy926 bestimmt.

## **II.2.2. Zellisolation aus dem Blut**

### **II.2.2.1. Gewinnung von frischem Vollblut**

Die für die Analysen der vorliegenden Arbeit verwendeten endothelialen Vorläuferzellen (EPCs) wurden aus dem peripher-venösen Blut von 24 freiwilligen gesunden Spendern isoliert. Die Isolation der EPCs erfolgte im Einverständnis mit den Spendern und unter Bewilligung der lokalen Ethik-Kommission der Universität Würzburg. Das Blut wurde durch Venenpunktion der Vena brachialis gewonnen und in den Abnehmeröhrchen unmittelbar nach der Abnahme mit 1,6mg/ml EDTA antikoaguliert.

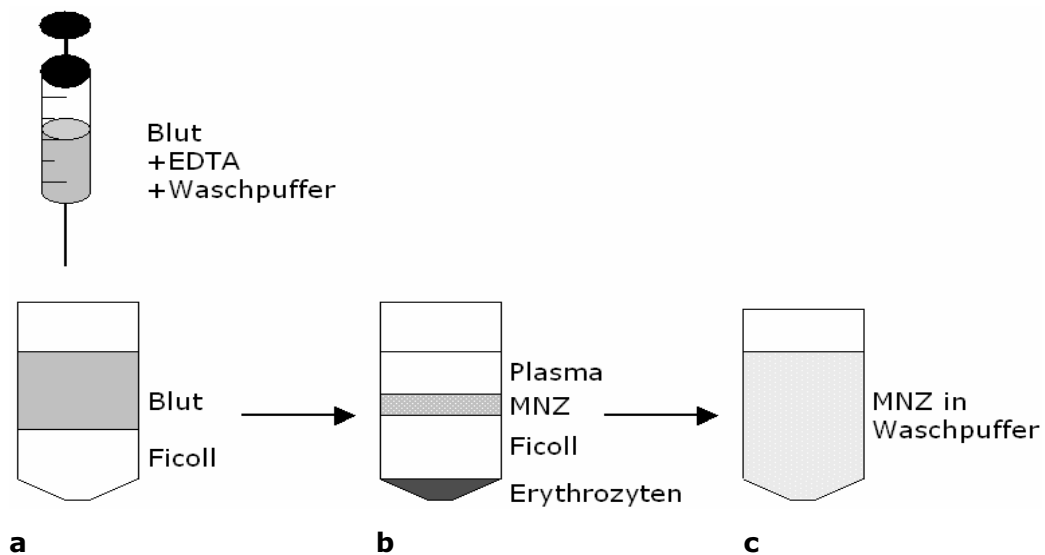
### **II.2.2.2. Isolation der mononukleären Zellen aus dem Vollblut**

Zur Gewinnung der EPCs wurden zunächst die mononukleären Zellen (MNZ) mittels Dichtgradientenzentrifugation aus dem Vollblut isoliert. Durch *in vitro* Kultur der MNZ mit einem speziellen Nährmedium wurde daraus die Subpopulation der EPCs selektiert [41, 164, 165]. Dabei wurde streng darauf geachtet, dass für jede Versuchsreihe ausschließlich das Blut eines einzelnen Spenders verwendet wurde. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen einer Sterilbank (*Laminar Air Flow*, LAF).

### **II.2.2.3. Ficoll-Dichtgradientenzentrifugation**

Die Zentrifugation über Ficoll ist eine schnelle, einfache und verlässliche Methode zur Isolation von mononukleäre Zellen (MNZ) aus dem Vollblut. Dabei wird frisch antikoaguliertes Vollblut sorgfältig über Ficoll geschichtet (vgl. Abbildung 5a). Durch die niedrige Viskosität, die entsprechende Dichte und die osmotischen Eigenschaften der Ficoll-Lösung werden durch die Zentrifugation Schichten ausgebildet, die verschiedene Zelltypen enthalten (vgl. Abbildung 5b). Die unterste Schicht enthält Erythrozyten, die durch Ficoll aggregieren und deshalb komplett sedimentieren. Die Schicht unmittelbar über den Erythrozyten bilden vorwiegend Granulozyten, welche durch den osmotischen Druck der Ficoll-Lösung eine Dichte erhalten, die groß genug ist, um durch die Ficoll-Schicht zu migrieren. Wegen ihrer geringen Dichte werden Lymphozyten und Monozyten mit den anderen langsam sedimentierenden Teilchen, wie beispielsweise Thrombozyten, an der Grenze zwischen Plasma und der Ficoll-Schicht gefunden.

Das frisch gewonnene EDTA-antikoagulierte Vollblut eines Spenders wurde in einer sterilen Zellkulturflasche im Verhältnis 1:2 mit Waschpuffer (Aqua dest./ 0,9%NaCl/ 1%FCS) verdünnt. In 50ml Falcon-Tubes wurden je 15ml Ficoll Hypaque (Dichte 1,077+0,001g/ml) sorgfältig mit je 30ml des verdünnten, antikoagulierten Vollbluts überschichtet und sofort mit 1800rpm für 30min bei 20°C ohne Bremse zentrifugiert. Das Plasma wurde bis auf einen kleinen Rest vorsichtig von oben her abgezogen und verworfen. Anschließend wurde die milchige Grenzschicht mononukleärer Zellen sorgfältig abpipettiert und in ein neues 50ml Falcon-Tube überführt. Es wurde jeweils die monozytäre Zellfraktion aus zwei Röhrrchen in einem vereinigt. Nachfolgend wurden die Zellen mit Waschpuffer 5min bei 1200rpm und 20°C von Thrombozyten, Ficoll-Resten und Plasma gereinigt (vgl. Abbildung 5c). Die Zellpellets aller Röhrrchen wurden danach in Waschpuffer resuspendiert und in einem 50ml Röhrrchen zusammengeführt. Es folgte ein weiterer Waschschrift, der ein kleines rötliches Zellpellet am Boden des Falcon-Tubes hinterließ. Anschließend wurden die Zellen in EPC-Zellkulturmedium resuspendiert und lichtmikroskopisch die Zellzahl bestimmt.



**Abbildung 5** Isolierung mononukleärer Zellen (MNZ) aus Vollblut. Schematische Darstellung der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung von MNZ aus dem Blut. **(a)** Überschichtung von Ficoll mit verdünntem antikoaguliertem Vollblut. **(b)** Schichtenbildung nach Zentrifugation. **(c)** Reinigung der MNZ.



#### II.2.2.4. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Hämozytometer (Zählkammer nach Neubauer) bestimmt. Zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen diente dabei die Trypanblau-Methode. Im Gegensatz zu intakten Zellen, nehmen geschädigte Zellen den Farbstoff Trypanblau auf, der Zellkern und Zytoplasma blau anfärbt. Auf diese Weise lassen sich avitale Zellen (blau) von vitalen Zellen (farblos) unterscheiden. Zu einem Aliquot von 30µl der Zellsuspension wurden 30µl Trypanblau gegeben und dieser Ansatz bei Raumtemperatur wenige Minuten inkubiert. Anschließend wurden etwa 10µl dieses Gemischs auf eine Zählkammer nach Neubauer gegeben. Bei 100facher Vergrößerung wurde die Zellzahl in vier Großquadraten ausgezählt und aus den Zählergebnissen der Mittelwert (m) gebildet. Mit Hilfe einer Formel, welche die Verdünnung der Zellsuspension ( $V = 2$ ) und den Kammerfaktor ( $K = 10\ 000$ ) berücksichtigt, wurde die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension (z) wie folgt berechnet [166]:

$$z = m \times V \times K = m \times 2 \times 10\ 000.$$

#### II.2.3. Zellkultur

Grundlage der folgenden Versuche war die *in vitro* Kultur der aus dem Blut isolierten Zellen mit einem für die Selektion von EPCs geeigneten Grundmedium (EPC-Medium: EBM-2 Medium/ 5%FCS/ 1XPenicillin/Streptomycin/ 50mM Ascorbat-2-Phosphat). Die mittels Dichtegradientenzentrifugation aus dem Vollblut gewonnenen mononukleären Zellen wurden unmittelbar nach der Isolation mit einer Dichte von  $0,75 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Für die Konzentrationsreihen, die FACS-Analysen und immunhistochemischen Färbungen wurden Zellkulturflaschen und gekammerte Objektträger (*chambered-permanox-slides*) aus Plastik verwendet. Die Zellen für die Haematoxylin/Eosin(HE)-Färbung wurden auf Glasplatten ausgesät. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Am zweiten Kulturtag wurde das Medium mit den nicht adhären Zellen entfernt und die adhären Zellen mit frischem EPC-Medium überschichtet. Fortan wurden die Zellkulturansätze jedes einzelnen Blutspenders für die folgenden Versuche in Gruppen unterteilt. Jeder Gruppe wurden bei jedem Mediumwechsel

definierte Zusätze zum Grundmedium (EPC-Medium) zugefügt. So wurde ein Teil der Zellen mit angiogenetischen Faktoren, wie CYR61-Protein und/oder Wachstumsfaktoren (2ng/µl IGF-1, 10ng/µl EGF, 1ng/µl β-FGF, 100ng/µl VEGF-165), stimuliert. Die Kontrollzellen blieben unbehandelt oder erhielten 0,19µg/ml Fc-tag (äquimolar zu 0,5µg/ml CYR61). Diese zweite Negativkontrolle mit Fc-tag wurde eingesetzt, um auszuschließen, dass die Effekte des verwendeten CYR61-Proteins auf EPCs von diesem Affinitäts-tag ausgingen, der für die chromatographische Proteinaufreinigung an das rekombinante CYR61-Protein gekoppelt worden war. In Tabelle 10 ist eine Übersicht der Kulturansätze für die verschiedenen Versuchsreihen dargestellt, die in den angegebenen Kapiteln näher beschrieben werden. Abgesehen von den unterschiedlichen Zusätzen wurde die Zellkultur unter identischen und konstanten Kulturbedingungen (im Brutschrank bei 37° und 5%CO<sub>2</sub>) für eine bis drei Wochen fortgesetzt. Das Medium wurde dreimal wöchentlich gewechselt.

Versuch	Kulturgefäße	Kulturzusätze	Kulturdauer
Konzentrationsreihe	25cm <sup>2</sup> Flaschen	Kein Zusatz	1 Woche
		0,05 µg/ml CYR61	
		0,1 µg/ml CYR61	
		0,25 µg/ml CYR61	
		0,5 µg/ml CYR61	
		1,5 µg/ml CYR61	
		0,19 µg/ml Fc-tag	
HE-Färbung	Glasplatten	Kein Zusatz	1 Woche
		0,5 µg/ml CYR61	
FACS-Analyse	25cm <sup>2</sup> Flaschen	kein Zusatz	3 Wochen
	75cm <sup>2</sup> Flaschen	0,5 µg/ml CYR61	
	175cm <sup>2</sup> Flaschen		
Immunhistochemie	8-kammerige Objektträger	Kein Zusatz	1-3 Wochen
		0,5 µg/ml CYR61	
		0,5 µg/ml CYR61	
		Wachstumsfaktoren*	
		Wachstumsfaktoren*	

\*Wachstumsfaktoren:

2ng/µl IGF-1 (engl. *Insulin-like growth factor-1*)

10ng/µl EGF (engl. *Endothelial growth factor*)

1ng/µl β-FGF (engl. *Basic fibroblastic growth factor*)

10ng/µl VEGF-165 (engl. *Vascular endothelial growth factor-165*)

**Tabelle 10** Versuchsreihen und zugehörige Zellkulturansätze.

### **II.2.3.1. Dokumentation und Quantifizierung des proliferationsfördernden Effekts von CYR61 auf EPCs**

Zur Dokumentation der Zellproliferation wurden die verschiedenen Zellkulturansätze kontinuierlich lichtmikroskopisch beobachtet und in regelmäßigen Zeitabständen fotografiert.

Um den proliferationsfördernden Effekt von CYR61 auf EPCs genauer quantifizieren zu können wurde darüber hinaus die Zellzahl in den verschiedenen Kulturansätzen bestimmt. Hierfür wurden EPCs auf Glasplatten ausgesät und eine Woche kultiviert. Dabei wurde ein Teil der Ansätze mit CYR61 supplementiert. Die restlichen Ansätze dienten als Negativkontrollen, welche mit reinem EPC-Medium oder mit 0,19µg/ml Fc-tag (äquimolar zu 0,5µg/ml CYR61) versorgt wurden. Im Anschluss an die Zellkultur wurden die Zellen mittels HE-Färbung angefärbt. Die infolgedessen blau angefärbten Zellen wurden, in drei zufällig ausgewählten Bereichen jeder Glasplatte unter dem Inversionsmikroskop bei 100facher Vergrößerung, ausgezählt.

### **II.2.3.2. Zellkultur für die FACS-Analyse**

In der Expansionskultur der EPCs zur Zellgewinnung für die durchflusszytometrischen Analysen, wurde die Hälfte der Zellkulturansätze jeder Versuchsreihe (mit Zellen eines Spenders) mit 0,5µg/ml CYR61 stimuliert, die andere Hälfte blieb unbehandelt. Die Zellen wurden über einen Kulturzeitraum von drei Wochen kultiviert, um in den unstimulierten Kontrollansätzen eine für die FACS-Analyse ausreichende Zellzahl zu erzielen.

### **II.2.3.3. Anfertigung von EPC-Monolayern auf gekammerten Objektträgern für die immunhistochemischen Analysen**

Um eine phänotypische Charakterisierung der Zellen mittels Immunhistochemie zu ermöglichen, wurden die frisch aus dem Vollblut isolierten mononukleären Zellen in 8-kammerige Objektträger ausgesät und für ein oder zwei Wochen kultiviert.

Die Objektträger jeder Versuchsreihe (mit Zellen eines Spenders) wurden in vier Gruppen eingeteilt, die verschiedene Kulturzusätze erhielten. Die erste

Gruppe wurde mit 0,5µg/ml CYR61, die zweite mit 0,5µg/ml CYR61 und einem Gemisch aus Wachstumsfaktoren (vgl. Tabelle 10) und die dritte ausschließlich mit dem Wachstumsfaktorengemisch stimuliert. Die vierte Gruppe diente als Negativkontrolle und wurde ausschließlich mit EPC-Medium ohne sonstige Zusätze kultiviert.

Bei der mit 0,5µg/ml CYR61 behandelten Gruppe und der unbehandelten Kontrollgruppe wurde die Kultur bei jeweils einem Drittel der Objektträger nach ein, zwei oder drei Wochen beendet. Die mit Wachstumsfaktoren stimulierten Ansätze wurden zwei Wochen kultiviert.

Nach Ablauf der jeweiligen Kulturdauer wurden die Zellen unter unsterilen Bedingungen auf den Objektträgern fixiert. Hierfür wurden die Zellen, nach Entfernen des Mediums und einmaligem Spülen mit PBS für 8min, mit einem Fixativ aus Aceton und Methanol im Verhältnis 1:1 überschichtet und anschließend zwei Mal für 5min mit PBS gewaschen. Die Objektträger wurden in Alufolie gewickelt und bei -18°C bis zur immunhistochemischen Färbung gelagert.

#### **II.2.4. Phänotypische Analysen der *in vitro* kultivierten EPCs**

##### **II.2.4.1. Fotografische Dokumentation der Zellkultur**

Die in Zellkulturflaschen kultivierten Zellen der Konzentrationsreihe und der Expansionskultur für die FACS-Analyse wurden lichtmikroskopisch mit Hilfe eines Inversionsmikroskops ausgewertet. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe einer Digitalkamera, die über einen Adapter am Mikroskop angeschlossen war, fotografisch dokumentiert. Die digitalen Fotos konnten direkt von der Kamera auf den Computer übertragen und dort gespeichert werden.

##### **II.2.4.2. Phänotypisierung mittels FACS-Analysen**

Zur Untersuchung der Oberflächenexpression charakteristischer Markerproteine wurden zunächst durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Die Durchflusszytometrie oder auch Zytofluorometrie wird häufig mit dem Akronym FACS (engl. *Fluorescence Activated Cell Sorting*, fluoreszenzaktivierte Zellanalyse) bezeichnet.

### Methodische Grundlagen (Prinzip)

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse der Größe, der inneren Struktur und der Oberflächenexpression von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage optischer Eigenschaften (Streulicht und Immunfluoreszenz) [167]. Dabei können bis zu 1.000 Zellen pro Sekunde gezählt und mittels multiparametrischer Korrelation empfindlich und präzise analysiert werden.

Grundvoraussetzung zur Messung am Durchflusszytometer ist, dass die Probe als Einzelzellsuspension vorliegt, denn das Prinzip der Durchflusszytometrie besteht in der hydrodynamischen Fokussierung. Die Einzelzellen werden aus dem Probenröhrchen mittels Überdruck einer Messküvette (Messzelle) zugeführt, in der sie nacheinander in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl (Probenstrom) einzeln durch den Strahlengang eines monochromen Lasers mit spezifischer Wellenlänge (Argon-Ionen-Laser,  $\lambda=488\text{nm}$ ) (Anregungslicht) geführt werden. Die dabei emittierten optischen Signale (Emissionslicht: Streu- und Fluoreszenzlicht) werden von verschiedenen Photodetektoren, sogenannte Photovervielfältigerröhrchen (*Photomultiplier tubes*, PMTs), empfangen und in elektronische Signale verwandelt. Hierzu werden jeweils die Impulshöhen der einzelnen Parameter bestimmt, digitalisiert und die Werte einem Computer zur Speicherung, Korrelation, quantitativen Auswertung und graphischen Darstellung übertragen.

Gemessen werden zwei verschiedene Datenarten: Streulichtparameter (Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht) und Fluoreszenzparameter. Die Lichtstreuung ist ein physikalischer Prozess, bei dem die Zelle die Richtung des anregenden Lichts verändert. Das in Richtung des einfallenden Laserstrahls gestreute Licht wird als Vorwärtsstreulicht (engl. *Forward Scatter*, FSC) bezeichnet und steht in Relation zur Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (engl. *Sideward Scatter*, SSC) genannte, in rechtem Winkel zum einfallenden Laserstrahl gestreute Licht, korreliert mit der Binnenstruktur der Zelle (Zellgranularität und Zellkomplexität). Sowohl im FSC als auch im SSC wird jede Zelle von Detektoren mit mehr als 1.000 Kanälen erfasst. Die Fluoreszenz ist das durch Strahlung angeregte

Leuchten eines Stoffes. Jeder Fluoreszenzfarbstoff absorbiert Licht in einem charakteristischen Wellenlängenbereich (Absorptionsspektrum), wodurch Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben werden. Beim Zurückfallen zum Grundniveau emittiert das Elektron ein Photon. Diese als Fluoreszenz bezeichnete Lichtemission ist stets langwelliger als das Anregungslicht und bildet das Emissionsspektrum. In der Durchflusszytometrie kann mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle nachgewiesen werden. Hierfür binden die mit einem Fluorochrom konjugierten Antikörper zunächst nach dem Antigen-Antikörper-Prinzip an die zu untersuchenden Oberflächenantigene. Bei der Passage dieser Zellen durch das Durchflusszytometer wird der Farbstoff durch den Laserstrahl angeregt und auf ein höheres Energieniveau angehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Photonenenergie auf ihr Ursprungsenergieniveau zurück. Die dabei emittierten Lichtquanten besitzen eine für das jeweilige Fluorochrom spezifische Wellenlänge, die von Photodetektoren mit hoher Sensitivität für bestimmte Wellenlängen registriert werden. Die Zahl der emittierten Photonen ist zur Anzahl der pro Zelle gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörper proportional, was Rückschlüsse auf die Expression des zugehörigen Oberflächenantigens zulässt. Damit ist die Fluoreszenzintensität ein relatives Maß für die Expression des untersuchten Oberflächenmarkers.

Die Mehrfachfluoreszenzanalyse, bei der verschiedene Oberflächenantigene mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert werden, ermöglicht die Korrelation mehrerer Zelleigenschaften. Sie ist besonders bei der Untersuchung der Zelldifferenzierung und der Identifizierung kleiner Subpopulationen von Bedeutung. Dabei ist darauf zu achten, dass die verwendeten Fluorochrome, neben einem gemeinsamen Absorptionsmaximum, deutlich voneinander getrennte Emissionsmaxima aufweisen, damit sie mit einem Laser angeregt, aber von verschiedenen Detektoren (PMTs) getrennt erfasst werden können.

Die Auswertung erfolgt anschließend mittels einer zugehörigen Software. Die gemessenen Parameter (Streuung und Fluoreszenz) können linear oder

logarithmisch dargestellt werden (bzw. wird beispielsweise die Fluoreszenzintensität logarithmisch verstärkt und dann auf einer linearen Skala dargestellt, die vier Log-Dekaden (0 – 10.000) entspricht). Dabei unterscheidet man zwischen Ein- und korrelierten Zweiparameterdarstellungen. Bei der Einparameterdarstellung, dem Histogramm, handelt es sich um eine Häufigkeitsverteilung der Messsignale eines gemessenen Parameters. Die Abszisse (x-Achse) gibt dabei die Intensität der Einzelmessungen wieder, die Ordinate (y-Achse) stellt die Anzahl der Zellen mit der gleichen Intensität dar. Auf diese Weise entsteht eine Gaußverteilung eines Parameters, die als Population bezeichnet wird. Die Korrelation zweier Parameter kann als Dotplot (Punktgraf) dargestellt werden, indem sie gegeneinander aufgetragen werden und bei jeder Schnittstelle der beiden Werte ein Punkt angezeigt wird. Beispielsweise wird auf der Abszisse das FSC aufgetragen und auf der Ordinate das SSC, auf diese Weise lassen sich aus einer Zellpopulation Subpopulationen mit identischer Zellgröße und Binnenstruktur identifizieren. Mit Hilfe dieser beiden Darstellungsarten lassen sich die gemessenen Zellen empfindlich charakterisieren und gezielt untersuchen. Durch sogenanntes Gating ist es möglich mit Hilfe der Parameterkombination FSC für die Zellgröße und SSC für die Binnenstruktur nur Messwerte aus definierten Teilbereichen („Gates“) zu erfassen und damit Zellen bestimmter Subpopulationen gezielt abzubilden.

### Zellfärbung

Für die FACS-Analyse wurden die *in vitro* expandierten Zellen nach einer Kulturzeit von drei Wochen mit Hilfe von Accutase und einem Zellschaber vorsichtig vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst und in ein 50ml Falcon-Tube überführt. Nach 5min Zentrifugation bei 1400rpm wurde das Medium verworfen, die Zellen zum Waschen und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen in FACS-Puffer (PBS/ 0.5%BSA) resuspendiert und erneut für 5min bei 1400rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das gewonnene Zellpellet wieder in FACS-Puffer resuspendiert und mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer die Zellzahl bestimmt. Danach wurden die Zellen auf FACS-Reagenzröhrchen verteilt, so dass sich je  $1 \times 10^5$

Zellen in jedem Röhrchen befanden. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in jedem Reagenzröhrchen in 100µl FACS-Puffer aufgenommen und mit spezifischen monoklonalen fluoreszenzmarkierten Primärantikörpern für 30min auf Eis inkubiert. Es wurden industriell mit den Fluorochromen FITC (Absorptionsmaximum=494nm, Emissionsmaximum=518nm) und PE (Absorptionsmaximum=496nm, Emissionsmaximum=546nm) gekoppelte Primärantikörper gegen die Oberflächenantigene CD34, CD133, CD31, CD106 und CD146 verwendet. Die eingesetzten Antikörper waren monoklonale Maus anti-Mensch IgG<sub>1</sub> Antikörper. Als Negativkontrollen kamen demzufolge mit FITC- und PE-konjugierte Mausantikörper vom Isotyp IgG<sub>1</sub> zum Einsatz.

#### Messung am Durchflusszytometer

Zur Gewinnung der für die FACS-Messung erforderlichen Einzelzellsuspension wurden die fluoreszenzmarkierten EPCs in den FACS-Probenröhrchen ein letztes Mal mit FACS-Puffer für 5min bei 1200rpm gewaschen und danach in je 200µl FACS-Puffer aufgenommen. Für die Messung wurde das Durchflusszytometer FACScan der Firma Becton Dickinson eingesetzt, welches einen Argonlaser der Wellenlänge 488nm verwendet und die Erfassung von Grün- (FL1, Wellenlänge 515-545nm), Orange- (FL2, Wellenlänge 564-606nm) und Rotfluoreszenzen (FL3, Wellenlänge >659nm) erlaubt. Da zwei Fluorochrome (FITC und PE) verwendet wurden erfolgte die Antikörpermessung in zwei Fluoreszenzkanälen des Zytometers. Die Daten der Streulicht- und Fluoreszenzemission wurden gespeichert und mit Hilfe der CellQuestPro Software der Firma Becton Dickinson auf einem Macintosh Computer ausgewertet. Zur Darstellung der Daten in Microsoft Programmen wurde die WinMDI Software von Microsoft verwendet. Zunächst wurden Dotplots der Streulichtemission erstellt und die gewünschte Population vitaler EPCs gated, d.h. mit Hilfe der Parameterkombination FSC für die Zellgröße und SSC für die Binnenstruktur eingegrenzt. Die Zellen des durch Gating eingegrenzten Fensters der EPCs (EPC-Gate) wurden dann auf die Bindung fluoreszenzmarkierter Antikörper untersucht und die Ergebnisse als Histogramme dargestellt.



### II.2.4.3. Phänotypisierung mittels immunhistochemischer Analysen

#### Immundetektion (Antikörperfärbung)

Als zweites Verfahren zum spezifischen Nachweis der Expression von Antigenen auf der Oberfläche der *in vitro* kultivierten EPCs wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Hierbei wurde die indirekte Färbung nach der LSAB (Labels Streptavidin-Biotin)-Methode gewählt, um die Spezifität des Nachweises zu erhöhen. Der Primärantikörper bindet hierbei an bestimmte Antigene der Zellen, anschließend bindet der an Biotin gekoppelte Sekundärantikörper an ein Epitop des Primärantikörpers. Durch die Biotinylierung kann sich im Folgenden ein mit Peroxidase markiertes Avidin-Molekül anlagern, welches an drei weitere Biotin-Moleküle gebunden ist. Durch die insgesamt vier Bindungsstellen für Biotin findet eine Signalverstärkung des schwachen Signals statt. Nach Zugabe des Substrats, welches durch Peroxidase umgesetzt wird, erscheint schließlich eine Rotfärbung. Die Zellen, die das Substrat nicht umsetzen können werden durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin blau markiert.

Vor der immunhistochemischen Anfärbung wurden die auf gekammerten Objektträgern fixierten, bei  $-18^{\circ}\text{C}$  gelagerten EPCs (vgl. Abschnitt II.2.3.3) bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend erfolgte eine Rehydrierung in Waschpuffer (0,05M TBS pH7,6) für 20min. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch 20min Inkubation mit 100 $\mu\text{l}$  Blockierungslösung (TBS/ 0.1%BSA/ 2%Normal-Pferdeserum) pro Kammer. Nach entfernen der Blockierungslösung erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, indem in jede Kammer 100 $\mu\text{l}$  des mit Blockierungslösung verdünnten Primärantikörpers pipettiert wurden. Für jeden Antikörper wurde jeweils eine Negativkontrolle mitgeführt, wobei die EPCs anstelle des Primärantikörpers mit Mausserum (Maus IgG1) in der entsprechenden Proteinkonzentration inkubiert wurden. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 100% Luftfeuchtigkeit in einer Feuchtkammer im Kühlschrank bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Am nächsten Tag wurden die Plastikkammern von den Objektträgern entfernt und die Objektträger dreimal in Waschpuffer gewaschen. Es folgten drei weitere Inkubationen in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur. Im ersten Schritt wurde mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten

biotinylierten polyklonalen anti-Maus Kaninchen-Sekundärantikörper (Dako REAL™ Link, Biotynilated Secondary Antibodies (AB2)) für 15min inkubiert und anschließend dreimal in Waschpuffer gewaschen. Im zweiten Schritt wurde für weitere 15min an alkalische Phosphatase konjugiertes Streptavidin (Dako REAL™ Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP)) auf die Objektträger aufgetragen und anschließend erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen, um den Komplex wieder zu entfernen. Im dritten Arbeitsschritt wurde die Reaktion sichtbar gemacht, indem die Zellen für 5min mit Fast Red-Chromogen und Levamisol überschichtet wurden. Die Zugabe von Levamisol zu Fast Red-Chromogen gewährleistete die Hemmung der zelleigenen Phosphatase-Aktivität. Im Anschluss an die Färbung mit Fast Red-Chromogen wurde dreimal mit Aqua dest. gewaschen.

Nach der immunhistochemischen Färbung erfolgte eine Gegenfärbung in Hämatoxylin (Haerris-Hämalaun 1:3 mit Aqua dest. verdünnt) für 8min. Anschließend wurden die Präparate dreimal in Aqua dest. gewaschen und 1min in Leitungswasser gebläut. Um zu verhindern, dass die Objektträger austrocknen, wurden sie vorübergehend in Aqua dest. gestellt und dann der Reihe nach mit verflüssigter Glycerol-Gelatine eingedeckt.

#### Fotographische Dokumentation immunhistochemisch markierter EPCs auf Objektträgern

Die auf Objektträgern kultivierten EPCs wurden nach der immunhistochemischen Färbung in 100facher Vergrößerung unter dem Inversionsmikroskop beurteilt. Die Auswertung erfolgte für jeden der verwendeten Antikörper einzeln und zudem getrennt nach der jeweiligen Zusammensetzung des Kulturmediums, in welchem die untersuchten EPCs zuvor kultiviert worden waren (vgl. Abschnitt II.2.3.3). Auf die Expression der Oberflächenmarker CD34, CD133, CD31 und VE-Cadherin wurden EPCs untersucht, die in purem oder mit 0,5µg/ml CYR61 supplementiertem EPC-Medium kultiviert worden waren. Die Analyse der Expression der VEGF-Rezeptoren Flt-1 und KDR erfolgte zusätzlich bei EPCs, die mit einem Gemisch aus Wachstumsfaktoren (vgl. Tabelle 10) oder diesem Wachstumsfaktorengemisch und 0,5µg/ml CYR61 behandelt worden waren. Das Ergebnis wurde mit einer im Mikroskop integrierten Digitalkamera

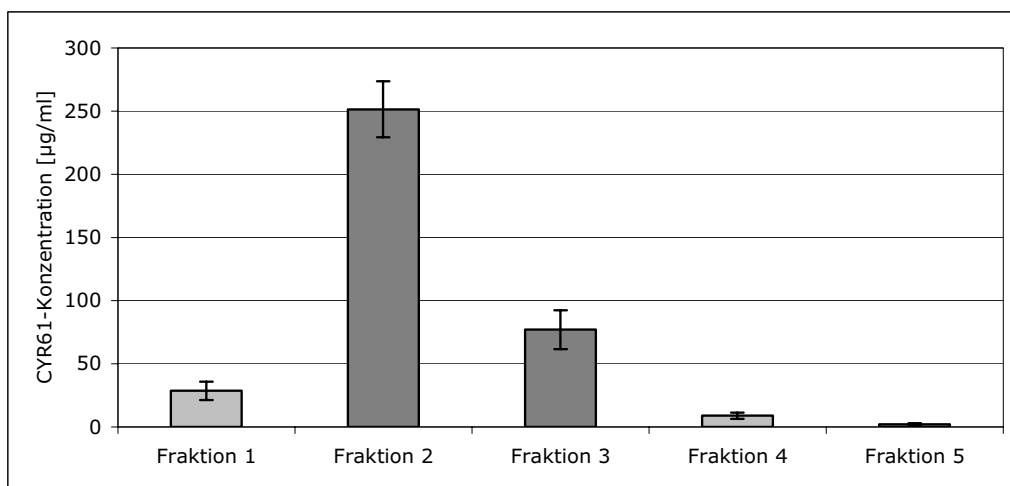
dokumentiert, direkt auf einen angeschlossenen Computer übertragen und mit der zugehörigen AxioVision Software der Firma Zeiss ausgewertet. Dabei wurde insbesondere der Einfluss der Zusammensetzung des Kulturmediums auf die Oberflächenmarkerexpression der EPCs untersucht, indem mit CYR61 und/ oder Wachstumsfaktoren behandelte EPCs mit den unbehandelten Kontrollzellen verglichen wurden.

### III. ERGEBNISSE

#### III.1. Synthese von rekombinantem CYR61-Protein

##### III.1.1. Ausbeute der chromatografischen CYR61-Proteinaufreinigung

Zur Bestimmung der Ausbeute der Proteinaufreinigung wurden die Proteinkonzentrationen in den einzelnen Eluatfraktionen photometrisch bestimmt. In Abbildung 6 sind die mittleren Endkonzentrationen an CYR61-Protein in jeder der fünf Eluatfraktionen aus 16 verschiedenen Proteinaufreinigungen dargestellt. Die Fraktionen 2 und 3 zeigten die höchsten Proteinkonzentrationen und wurden zur Stimulation der EPCs eingesetzt.



**Abbildung 6** CYR61-Proteinkonzentrationen in den Eluatfraktionen.

Dargestellt sind die mittleren CYR61-Proteinkonzentrationen in den fünf Eluatfraktionen nach der rekombinanten Proteinexpression und chromatografischen Proteinaufreinigung von CYR61 aus 16 verschiedenen Experimenten: Fraktion1: 28,65µg/ml (SEM: 7,23), Fraktion2: 251,46µg/ml (SEM: 22,22), Fraktion3: 77,06µg/ml (SEM: 15,39), Fraktion4: 8,95µg/ml (SEM: 2,42) und Fraktion5: 2,14 (SEM: 0,87). Die beiden dunkler gefärbten Balken markieren die beiden zur Stimulation der EPCs eingesetzten Eluatfraktionen mit den höchsten Proteinkonzentrationen.

##### III.1.2. Funktionalität des rekombinanten CYR61-Proteins

Die Funktionalitätsprüfung des synthetisierten rekombinanten CYR61-Proteins unter Verwendung des Zellproliferationstest WST-1-Reagenz und der Endothelzelllinie EA.hy926 ergab eine mindestens 30% gesteigerte Proliferationsrate der Endothelzellen.

### III.2. Charakterisierung der Studienpopulation und Bestimmung der Anzahl mononukleärer Zellen im Blut

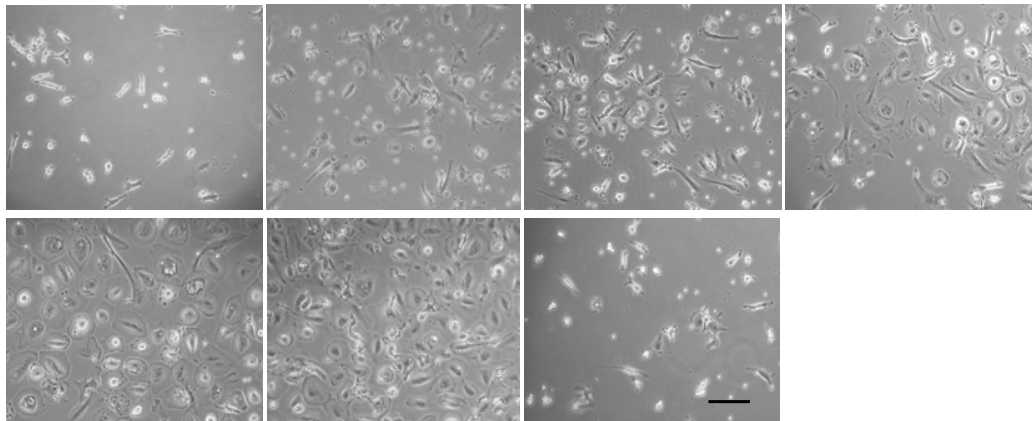
Die Spenderpopulation des frischen peripher-venösen Vollbluts, welches zur Zellisolation verwendet wurde, setzte sich aus 16 weiblichen und 8 männlichen freiwilligen gesunden Personen im Alter von 14 bis 58 Jahren ( $27 \pm 11$  Jahre) zusammen. Jede Blutabnahme umfasste  $100 \pm 30$  ml Blut.

Die Anzahl der mononukleären Zellen (MNZ) im Blut des Spenderkollektivs betrug im Mittel  $1,44 \pm 0,59 \times 10^6$  Zellen/ml Blut ( $0,43 - 2,78 \times 10^6$  Zellen/ml;  $n=32$ ), dies entsprach einem Anteil von  $0,03 \pm 0,01\%$  ( $0,01\% - 0,06\%$ ) an der Gesamtzahl der Zellen im Blut ( $5 \times 10^9$  Zellen/ml Blut). Die Zahl der isolierten mononukleären Zellen schwankte bei den verschiedenen Spendern zwischen  $0,45 \times 10^6$  Zellen/ml und  $2,78 \times 10^6$  Zellen/ml. Bei wiederholten Blutspenden einzelner Spender ergaben sich zum Teil Schwankungen der Zellzahl von bis zu  $1,99 \times 10^6$  Zellen/ml zwischen den Einzelspenden. Ein deutlicher Unterschied zwischen weiblichen ( $1,44 \pm 0,63 \times 10^6$  Zellen/ml Blut;  $0,43 - 2,78 \times 10^6$  Zellen/ml;  $n=23$ ) und männlichen ( $1,28 \pm 0,46 \times 10^6$  Zellen/ml Blut;  $0,45 - 2,07 \times 10^6$  Zellen/ml;  $n=9$ ) Spendern war nicht feststellbar.

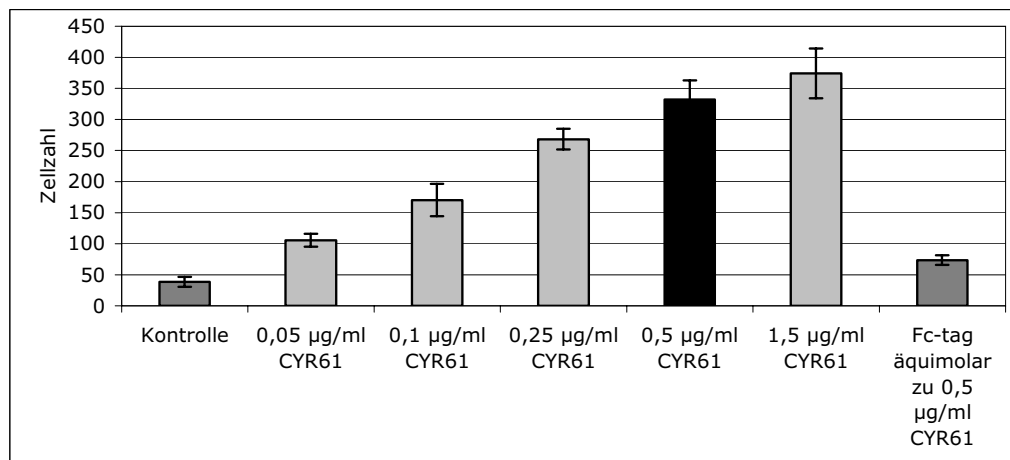
### III.3. Quantifizierung der Zellzahlzunahme nach CYR61-Behandlung

Bereits nach einer Kulturwoche führte der Zusatz von CYR61, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, zu einer signifikant gesteigerten Zellzahlzunahme. Dieser proliferationsfördernde Effekt von CYR61 auf EPCs *in vitro* war, innerhalb des Konzentrationsbereichs von 0,05 bis 1,5  $\mu\text{g/ml}$  CYR61, konzentrationsabhängig. Zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit des proliferationsfördernden Effekts von CYR61 auf EPCs und darüber hinaus zur Bestimmung der optimalen Stimulationskonzentration für die Expansionskultur, wurde eine Konzentrationsreihe durchgeführt. Hierbei wurde zu EPC-Monolayerkulturen CYR61, in fünf aufsteigenden Konzentrationsstufen zwischen 0,05 und 1,5  $\mu\text{g/ml}$  (0,05/ 0,1/ 0,25/ 0,5/ 1,5  $\mu\text{g/ml}$  CYR61), zum Grundmedium zugesetzt. Für die Negativkontrollen wurden Zellen in purem EPC-Medium und mit dem Zusatz von 0,19  $\mu\text{g/ml}$  Fc-tag (äquimolar zu 0,5  $\mu\text{g/ml}$  CYR61 Protein) kultiviert. Die Zellproliferation in diesen verschiedenen Kulturansätzen wurde eine Woche lichtmikroskopisch beobachtet, fotografisch dokumentiert und nach

HE-Färbung die Zellzahl bestimmt. Die Kulturdauer von einer Woche wurde gewählt, da nach dieser Zeit die mit 1,5µg/ml CYR61 behandelten Zellen konfluent waren und sich bei längerer Kulturdauer, vermutlich aufgrund von Platzmangel, vom Boden der Kulturflaschen ablösen. Die repräsentativen Ergebnisse nach einer Kulturwoche aus sechs unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 7 dargestellt.



**a**



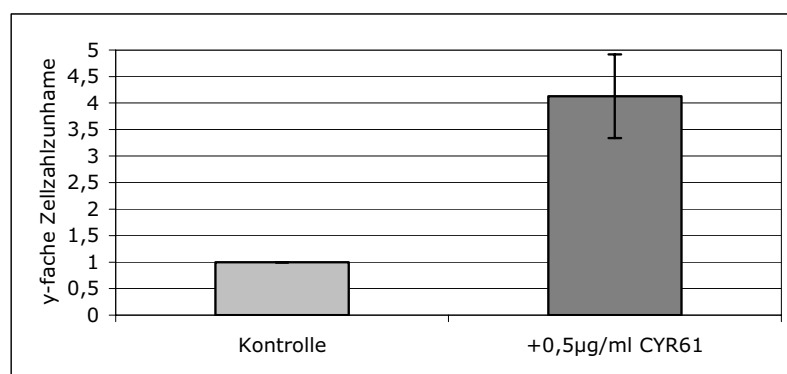
**b**

**Abbildung 7** Konzentrationsreihe.

Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel der Konzentrationsabhängigkeit des proliferationsfördernden Effekts von CYR61 auf EPCs *in vitro* aus sechs unabhängigen Experimenten. Die Zellen wurden für eine Woche mit 0,05/ 0,1/ 0,25/ 0,5/ 1,5µg/ml CYR61 behandelt. Die Negativkontrollen blieben unbehandelt oder erhielten 0,19µg/ml Fc-tag (äquimolar zu 0,5µg/ml CYR61). **(a)** Inversionsmikroskopie. Der Balken zeigt 100µm an. **(b)** Zellzählung der in (a) gezeigten Zellen. Der schwarze Balken markiert die Stimulationskonzentration von 0,5µg/ml CYR61, die für die nachfolgenden Experimente gewählt wurde. Die beiden etwas dunkler grauen Balken zeigen die Negativkontrollen.

Die Versuche zeigten eine Konzentrationsabhängigkeit des proliferationsfördernden Effekts von CYR61 auf EPCs im Konzentrationsbereich von 0,05 bis 1,5µg/ml CY61.

Abbildung 7 zeigt eindeutig, dass die EPC-Zahl mit steigender CYR61-Stimulationskonzentration deutlich zunimmt. Bereits 0,05µg/ml CYR61 führten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zur doppelten Zellzahl. Bei der Behandlung mit 1,5µg/ml wurden sogar bis zu achtfache EPC-Zahlen erreicht. 0,5µg/ml CYR61 wurde als optimale Stimulationskonzentration für die nachfolgenden Experimente gewählt. Bei dieser Konzentration war zum einen nach wenigen Tagen bereits ein deutlicher proliferativer Effekt im Vergleich zur Kontrolle festzustellen. Zum anderen war aber auch eine, für die FACS-Analysen notwendige Kulturdauer, von bis zu drei Wochen möglich, ohne dass sich die Zellen, vermutlich aufgrund von Platzmangel, vor Ende der Kulturzeit vom Boden der Kulturgefäße ablösten. Für die nun also weiterhin verwendete CYR61-Konzentration von 0,5µg/ml wurde in einem weiteren Experiment die Proliferationssteigerung durch Zellzählung in sieben unabhängigen Experimenten, im Vergleich zu unbehandelten Kontrolle, erneut quantifiziert. Unter Behandlung mit 0,5µg/ml CYR61 ergab sich im Durchschnitt eine 4,1fache Zellzahlzunahme (vgl. Abbildung 8).



**Abbildung 8** Zunahme der EPC-Zahl nach CYR61-Behandlung.

Zellzählung nach der Behandlung von EPCs mit 0,5µg/ml CYR61 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Abbildung zeigt die absolute Zunahme der EPC-Zahl in von sieben verschiedenen Spendern über eine Kulturperiode von einer Woche. Es ergab sich eine 4,1fache Zellzahlzunahme in den mit 0,5µg/ml CYR61 behandelten Kulturansätzen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollansätzen (SEM 0,79) ( $p < 0,001$ ).

### III.4. Morphologie und Wachstumsverhalten der EPCs

Die *in vitro* Kultur der mit 0,5µg/ml CYR61 behandelten EPCs und der unbehandelten Kontrollzellen wurde kontinuierlich, unter Verwendung eines Inversionsmikroskops, beobachtet. Dabei wurde insbesondere auf die Morphologie und das Wachstumsverhalten der Zellen geachtet. Das Ergebnis sechs unabhängiger Kulturansätzen wurde fotografisch festgehalten (vgl. Abbildung 10).

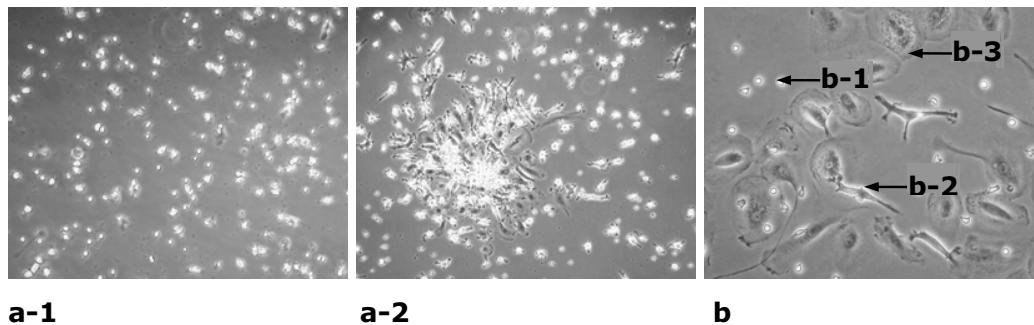
Das beschriebene Zellkulturverfahren hinterließ am zweiten Kulturtag zahlreiche kleine runde und einzelne spindel- und tropfenförmige adhärente Zellen und andere nicht adhärente Zellen, die beim ersten Medienwechsel entfernt wurden. Die adhärennten Zellen waren zu Beginn gleichmäßig und nicht zusammenhängend über den Boden der Zellkulturgefäße verteilt (vgl. Abbildung 9a-1).

Anfänglich waren zwischen den kleinen runden Zellen nur vereinzelt kleine spindel- und tropfenförmige Zellen zu sehen. Ende der ersten Kulturwoche konnten jedoch in den mit CYR61 stimulierten Kulturansätzen erste Kolonien von sich teilenden Zellen mit zunächst spindel- und tropfenförmiger und später pflastersteinartiger Morphologie beobachtet werden. Die Anzahl der Kolonien war dabei geringer als die zuvor sichtbaren adhärennten Individuen mit spindel- und tropfenförmiger Morphologie. Daher ist davon auszugehen, dass einzelne Individuen so dicht beieinander zu liegen kamen, dass sie nur eine einzige gemeinsame Kolonie bildeten oder einige Individuen so fest aneinander hafteten, dass sie nicht getrennt wurden und sich ebenfalls nur eine Kolonie daraus entwickelte. Man spricht in beiden Fällen von sogenannten CFUs (engl. *colony forming units*, koloniebildene Einheiten). Auch in den Kontrollkulturen konnte die Bildung solcher CFUs beobachtet werden, allerdings erst in der Mitte der zweiten Kulturwoche und in deutlich geringerem Ausmaß (weniger Kolonien und weniger Zellen pro Kolonie). Abbildung 9a-2 zeigt derartige Zusammenballungen sich teilender Zellen nach einer Kulturwoche unter CYR61-Stimulation.

Die Zellproliferation hielt über die gesamte Kulturdauer an. Der Anstieg der Zellzahl in den mit CYR61 behandelten Kulturen war rasch und stark, so dass die Zellen in der dritten Kulturwoche in der Regel einen konfluenten



Monolayer bildeten. Die Kontrollzellen vermehrten sich hingegen langsamer und in geringerem Ausmaß, so dass sie auch nach drei Kulturwochen keine Konfluenz erreichten (vgl. Abbildung 10).



**Abbildung 9** Morphologie und Wachstumsverhalten der EPCs.

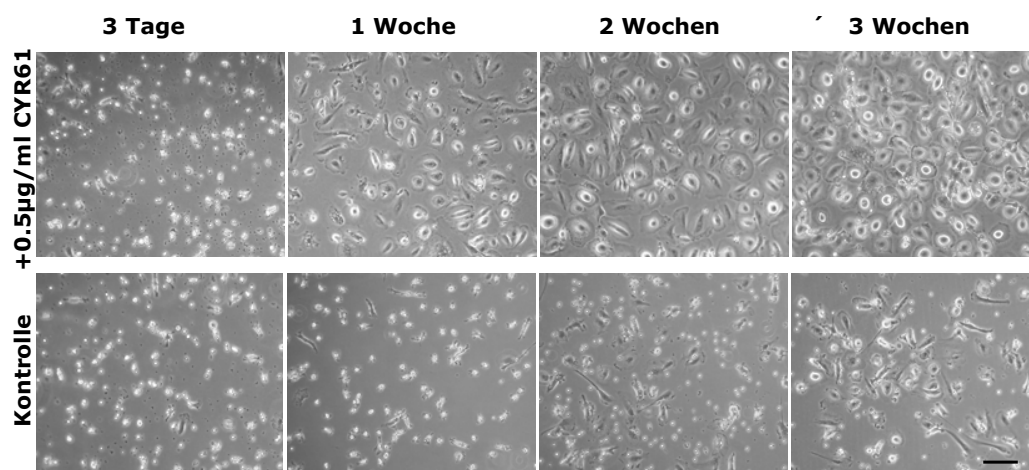
Dargestellt sind die während der *in vitro* Kultur beobachteten Zellen. (a) Wachstumsverhalten: (a-1) adhärenz Zellen nach dem ersten Mediumwechsel, (a-2) CFU; (b) Zellmorphologien: (b-1) kleine runde Zellen, (b-2) spindel- und tropfenförmige Zellen, (b-3) pflastersteinartige Zellen.

Im Laufe der Expansionskultur konnten Zellen mit unterschiedlicher Morphologie beobachtet werden. Zwischen den anfänglich zu beobachtenden kleinen runden Zellen (vgl. Abbildung 9b-1) traten bald Zellen mit spindel- und tropfenförmiger Morphologie in Erscheinung (vgl. Abbildung 9b-2), später kamen polygonale pflastersteinartige Zellen mit glatter Berandung und deutlichem Nukleus hinzu (vgl. Abbildung 9b-3). Zellen dieser drei Morphologien waren im Zeitverlauf der *in vitro* Kultur in allen Versuchsansätzen regelmäßig zu beobachten. Allerdings zu verschiedenen Zeitpunkten bei den mit CYR61 behandelten EPCs und den unbehandelten Kontrollzellen (vgl. Abbildung 10).

Während am dritten Kulturtag in allen Kulturansätzen überwiegend kleine runde Zellen mit vereinzelt dazwischenliegenden spindel- und tropfenförmigen Zellen zu sehen waren, zeigte sich nach einer Kulturwoche ein deutlicher Unterschied. In den mit 0,5µg/ml CYR61 supplementierten Kulturansätzen waren am Ende der ersten Kulturwoche überwiegend spindel- und tropfenförmige oder pflastersteinartige Zellen zu sehen. In den mit einem EPC-Medium kultivierten Kontrollkulturen hatte sich im Vergleich

zum dritten Kulturtag nicht viel verändert, es konnte lediglich eine geringfügige Zunahme der spindel- und tropfenförmigen Zellen zwischen den kleinen runden Zellen gefunden werden.

Nach der zweiten Kulturwoche waren in den mit CYR61 behandelten Kulturen mehrheitlich pflastersteinartige und einige spindel- und tropfenförmige Zellen zu sehen. In den unbehandelten Kulturansätzen waren am Ende der zweiten Kulturwoche noch zahlreiche kleine runde Zellen zu sehen. Es zeigten sich zwischen diesen jedoch auch zahlreiche spindel- und tropfenförmige und pflastersteinartige Zellen. Am Ende der dritten Kulturwoche waren in den mit CYR61 behandelten Ansätzen praktisch nur noch Zellen mit pflastersteinartiger Morphologie zu sehen, wohingegen in den Kontrollansätzen Zellen aller drei Morphologien vorlagen (vgl. Abbildung 10).



**Abbildung 10** Morphologie und Wachstumsverhalten im Zeitverlauf.

Dargestellt ist ein für sechs Experimente repräsentatives Beispiel der fotografischen Dokumentation der *in vitro* Kultur der EPCs im Zeitverlauf: nach 3 Tagen (linke Spalte), 1 Woche (2. Spalte von links), 2 Wochen (3. Spalte von links) und 3 Wochen (rechte Spalte). Die obere Zeile zeigt die mit 0,5µg/ml CYR61 supplementierten Kulturansätze, die untere Zeile die unbehandelten Kontrollzellen. Der Balken zeigt 100µm an.

### **III.5. Analyse der Expression spezifischer Oberflächenantigene**

Mit dem Ziel, die aus dem Blut isolierten und *in vitro* kultivierten Zellen als EPCs zu identifizieren und festzustellen, ob die Stimulation dieser Zellen mit CYR61 deren Phänotyp verändert, wurden mit 0,5µg/ml CYR61 behandelte Zellen und unbehandelte Kontrollzellen auf die Expression charakteristischer Oberflächenmarkerproteine untersucht. Hierfür wurden die *in vitro* expandierten EPCs in unabhängigen Experimenten mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) und immunhistochemischer Färbung analysiert.

#### **III.5.1. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)**

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden über drei Wochen kultivierte, mit 0,5µg/ml CYR61 behandelte EPCs und unbehandelte Kontroll-EPCs verwendet. Diese wurden mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten monoklonalen Antikörpern gegen die Stammzellantigene CD34 und CD133 und die Endothelzellmarker CD31, CD106 und CD146 markiert und die Fluoreszenz im Durchflusszytometer gemessen.

Je Antikörper wurden mindestens drei verschiedene Proben von mit CYR61 behandelten EPCs und sechs Kontrollproben mit unbehandelten EPCs durchflusszytometrisch analysiert. Die Daten wurden mit Hilfe der BD CellQuest Software ausgewertet und sind in Abbildung 11 in Form von Histogrammen dargestellt. Dabei wurden avitale Zellen durch entsprechendes Gating von der Analyse ausgeschlossen (vgl. Abbildung 11a), so dass nur die Fluoreszenzdaten vitaler EPCs dargestellt wurden.

##### **III.5.1.1. Titrierung der Antikörper zur Entwicklung der optimalen Arbeitsbereiche**

Um ein bestmögliches Ergebnis zu erhalten und das Verhältnis von spezifischem Signal zum Hintergrund („noise to signal“-Quotient) für die folgenden Versuche zu optimieren, wurden zunächst für alle verwendeten Antikörper Titrierungsversuche durchgeführt.

Hierfür wurden die einzelnen fluoreszenzmarkierten Antikörper in den vier aufsteigenden Titrationsstufen (Verdünnungen) 1:25, 1:50, 1:100 und

1:200 eingesetzt. Verdünnt wurde mit FACS-Puffer. Bei der Wahl der einzelnen Verdünnungsstufen wurde auf Herstellerangaben und Erfahrungen aus Vorversuchen zurückgegriffen.

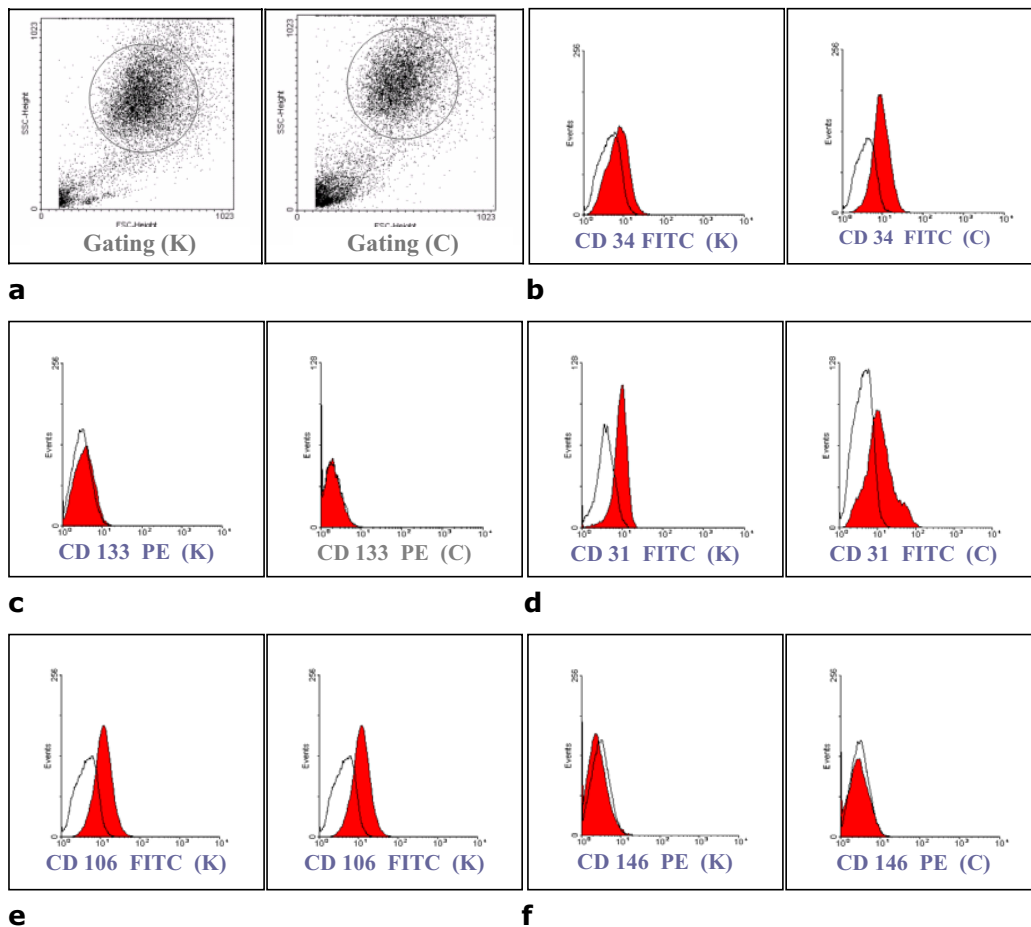
Auf der Grundlage dieser Titrierungsversuche wurden, bei den folgenden FACS-Analysen zur Phänotypisierung von EPCs, die Antikörper anti-CD34-FITC, anti-CD133-PE, anti-CD31-FITC und anti-CD106-FITC in der Verdünnung 1:50 und der Antikörper anti-CD146-PE in der Verdünnung 1:25 eingesetzt (vgl. Tabelle 7).

### **III.5.1.2. Durchflusszytometrische Detektion der Oberflächenmarker CD34, CD133, CD31, CD106 und CD146**

Durchflusszytometrisch lies sich die Expression des hämatopoetischen Stammzellmarkers CD34 auf den mit CYR61 stimulierten EPCs in fünf von sechs Experimenten nachweisen. Die Kontrollzellen zeigten in allen durchflusszytometrischen CD34-Expressionsanalysen ein positives Signal (vgl. Abbildung 11b).

Betrachtet man die Expression des Stammzellmarkers CD133, so war sowohl bei den mit CYR61 stimulierten als auch bei den Kontrollzellen, in allen durchflusszytometrischen Analysen keine Expression von CD133 nachweisbar (vgl. Abbildung 11c). Um einen Defekt im verwendeten Antikörper der FACS-Analyse auszuschließen, wurde dieser mit einer sicher CD133<sup>+</sup> Zelllinie (Colon-Carcinom Zelllinie Caco-2) nachgetestet. Dieses Experiment viel deutlich positiv aus und bestätigte damit die Funktionalität des verwendeten anti-CD133-Antikörpers.

Fluoreszenzmarkierungen mit den endothelspezifischen Antikörpern anti-CD31 (PECAM) und CD106 (VCAM-1) erbrachten bei den vitalen EPCs ein positives Signal (mit geringen Streubreiten in der Intensität) (vgl. Abbildung 11d-e). Für das von reifen Endothelzellen exprimierte Oberflächenmolekül CD146 (MCAM) konnte in keiner Probe eine Expression nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 11f).



**Abbildung 11** FACS-Analysen der Oberflächenmarkerexpression. Dargestellt ist ein für jeweils mindestens drei unabhängige Experimente repräsentatives Beispiel der durchflusszytometrischen Analysen der Expression von Oberflächenmarkern auf endothelialen Vorläuferzellen (EPCs) aus dem peripheren venösen Blut adulter Spender nach drei wöchiger *in vitro* Kultur mit CYR61 Stimulation; links jeweils die unbehandelte Kontrolle (K), rechts jeweils nach Behandlung mit 0,5µg/ml CYR61 (C).

(a) Gating der vitalen EPCs. Dotplot-Darstellungen der EPCs nach ihren Streulichteigenschaften (im Streulichtbild (Scatter)). Abszisse = Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*, FSC) = Zellgranularität; Ordinate = Seitwärtsstreulicht (*Sideward Scatter*, SSC) = Zellgröße. Die Population der vitalen EPCs ist durch einen Kreis eingerahmt (EPC-Gate) und wird den in (b-f) dargestellten Fluoreszenzdarstellungen zugrundegelegt.

(b-f) Histogramm-Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung der EPCs mit FITC/PE-gekoppelten Antikörpern (rote Fläche) und Isotyp-Kontroll-Antikörpern (schwarze Linie). Abszisse = Intensität der FITC/PE-Fluoreszenz, Ordinate = Häufigkeit (Anzahl der Zellen mit dem gleichen x-Wert). Die schwarze Linie (weiße Fläche) stellt die Isoprobe bzw. die Eigenfluoreszenz der Zellen dar, die rote Fläche die Fluoreszenz der

markierten Antikörper. Eine Überlagerung der beiden Kurven bedeutet, dass der Marker nicht exprimiert wird. Eine Rechtsverschiebung der roten Kurve bedeutet, dass der Marker exprimiert wird. **(b)** Nachweis der CD34 Expression auf EPCs anti-CD34-FITC Antikörpern; **(c)** fehlender Nachweis der CD133 Expression auf EPCs mit anti-CD133-PE Antikörpern; **(d)** Nachweis der CD31 Expression mit anti-CD31-FITC Antikörpern; **(e)** Nachweis der CD106 Expression mit anti-CD106-FITC Antikörpern; **(f)** fehlender Nachweis der CD146 Expression mit anti-CD146-PE Antikörpern.

### III.5.2. Immunhistologische Färbungen

Für die immunhistologischen Färbungen wurden zwei Wochen mit 0,5µg/ml CYR61 stimulierte EPCs und unbehandelte Kontroll-EPCs auf 8-kammerigen Objektträgern mit monoklonalen Antikörpern gegen die Zelloberflächenantigene CD34, CD133, CD31, KDR, Flt-1 und VE-Cadherin gefärbt. Als Negativkontrolle wurde Mausserum in der selben Proteinkonzentration wie der jeweilige spezifische Antikörper eingesetzt. Je Versuchsansatz, mit definierten vorangegangenen Kulturbedingungen (vgl. Abschnitt II.2.3.3) und immunhistochemischer Färbung mit einem spezifischen Antikörper, wurden jeweils mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Oberflächenmarkerexpression wurde mit Hilfe der LSAB-Methode in Kombination mit Fast Red-Chromogen Färbung sichtbar gemacht. Die Zellkerne wurden mit Haematoxylin gegengefärbt. Die Färbungen wurden mit Hilfe eines Inversionsmikroskops begutachtet, auf einen Computer übertragen, mit der AxioVision Software von Zeiss ausgewertet und sind in Abbildung 12 dargestellt.

Bei positiver immunhistochemischer Reaktion auf einen Antikörper, als Zeichen der Expression des entsprechenden spezifischen Oberflächenmarkers, zeigte sich eine homogene, feingranuläre Rotfärbung der Zellkörper aller Zellen des Monolayers. Die Farbskala reichte von einem blassen Rot, bei schwach positiver Markerexpression, bis zu einem intensiven Rot, bei stark positiver Expression des entsprechenden Markers. Die Zellkerne stellten sich blau dar. Die Präparate waren in der Regel frei von unspezifischer Hintergrundfärbung. Die Negativkontrollen waren erwartungsgemäß negativ.

### III.5.2.1. Titrierung der Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen

Auch für die immunhistochemischen Analysen wurden zunächst für alle verwendeten Antikörper Titrierungsversuche durchgeführt, um die jeweils optimalen Arbeitsbereiche zu ermitteln. Bei der Wahl der einzelnen Verdünnungsstufen wurde auf Herstellerangaben und Erfahrungen aus Vorversuchen zurückgegriffen. Auf der Grundlage dieser Titrierungsversuche wurden, bei den darauffolgenden immunhistochemischen Färbungen zur Phänotypisierung von EPCs, die Antikörper anti-CD34, anti-CD133, anti-CD31, anti-CD106, anti-VE-Cadherin, anti-KDR und anti-Flt-1 in den in Tabelle 8 aufgeführten Verdünnung eingesetzt.

### III.5.2.2. Immunhistochemische Detektion der charakteristischen Oberflächenmarker von EPCs

Eine schwach positive immunhistochemische Reaktion des Antikörpers anti-CD34 als Nachweis von CD34 stellte sich als homogene blasse Rotfärbung des Zellkörpers dar (vgl. Abbildung 12a). Der für die immunhistochemische Detektion des Markers CD133 spezifische Primärantikörper vermittelte in allen Versuchsansätzen eine deutliche Rotfärbung der Zellen (vgl. Abbildung 12b). Im Gegensatz zur FACS-Analyse gelang somit der immunhistochemische Nachweis der CD133 Expression auf EPCs.

Die immunhistochemische Färbung für den Endothelzellmarker CD31 führte zu einer äußerst intensiven Rotfärbung, also dem Nachweis einer deutlichen Expression von CD31 (vgl. Abbildung 12c).

Auch die Expression des endothelspezifischen Zelloberflächenmoleküls VE-Cadherin/CD144 konnte immunhistochemisch durch eine deutliche Rotfärbung der Zellen nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 12d).

Sowohl die immunhistochemische Analyse des, von Endothelzellen, multipotenten Stammzellen und Hämangioblasten exprimierten, VEGF-Rezeptors-2/KDR, als auch des, von Endothelzellen und Zellen des peripheren Blutes exprimierten VEGF-Rezeptors-1/Flt-1 zeigte eine deutliche Rotfärbung der Zellen und erbrachte somit den positiven Nachweis der Expression dieser beiden Marker (vgl. Abbildung 12e-f).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Positivkontrollen eine besonders intensive Anfärbbarkeit für CD31 und eine deutliche

Anfärbarkeit für CD133, VE-Cadherin, Flt-1 und KDR zeigten, während die Anfärbarkeit für CD34 weniger ausgeprägt war.

Der Vergleich der Markereexpression, auf der Oberfläche von mit 0,5µg/ml CYR61 stimulierten EPCs und unstimulierten Kontrollzellen, zeigte bezüglich aller untersuchten Oberflächenantigene keine signifikanten Unterschiede im Sinne einer verminderten oder erhöhten Expression.

### **III.5.2.3. Immunhistochemische Detektion der Stammzellmarker CD34 und CD133 im Zeitverlauf**

Es sollte ausgeschlossen werden, dass die Behandlung der EPCs mit 0,5µg/ml CYR61 zur zunehmenden Ausreifung der Vorläuferzellen führt. Hierzu wurde die Expression der Stammzellmarker CD34 und CD133 im Zeitverlauf untersucht, indem auf gekammerten Objektträgern kultivierte EPCs nach ein, zwei und drei Kulturwochen immunhistochemisch bezüglich dieser beiden Marker analysiert wurden. Die immunhistochemischen Färbungen ergaben sowohl für CD34 (vgl. Abbildung 12a) als auch für CD133 (vgl. Abbildung 12b) nach ein, zwei und drei Wochen eine vergleichbare Rotfärbung.

### **III.5.2.4. Immunhistochemische Detektion der VEGF-Rezeptoren Flt-1 und KDR bei Wachstumsfaktorenstimulation**

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Behandlung von EPCs mit einem Gemisch aus den Wachstumsfaktoren IGF, EGF, bFGF und VEGF Einfluss auf die Zellproliferation und Oberflächenexpression der VEGF-Rezeptoren KDR und Flt-1 auf EPCs hat. Dabei war auch von Interesse, ob sich Wechselwirkungen zwischen CYR61 und den Wachstumsfaktoren bei simultaner Behandlung der EPCs ergeben, beispielsweise im Sinne einer veränderten (gesteigerten oder verminderten) Expression der VEGF-Rezeptoren auf der Oberfläche von EPCs.

Hierfür wurden EPCs über zwei Wochen auf gekammerten Objektträgern kultiviert und dabei mit einem Gemisch aus den genannten Wachstumsfaktoren in konstanten definierten Konzentrationen (vgl. Tabelle 10) oder diesem Wachstumsfaktorengemisch und 0,5µg/ml CYR61 behandelt und immunhistochemisch bezüglich der Oberflächenmarker KDR und Flt-1 analysiert. Die Ergebnisse wurden untereinander und mit den

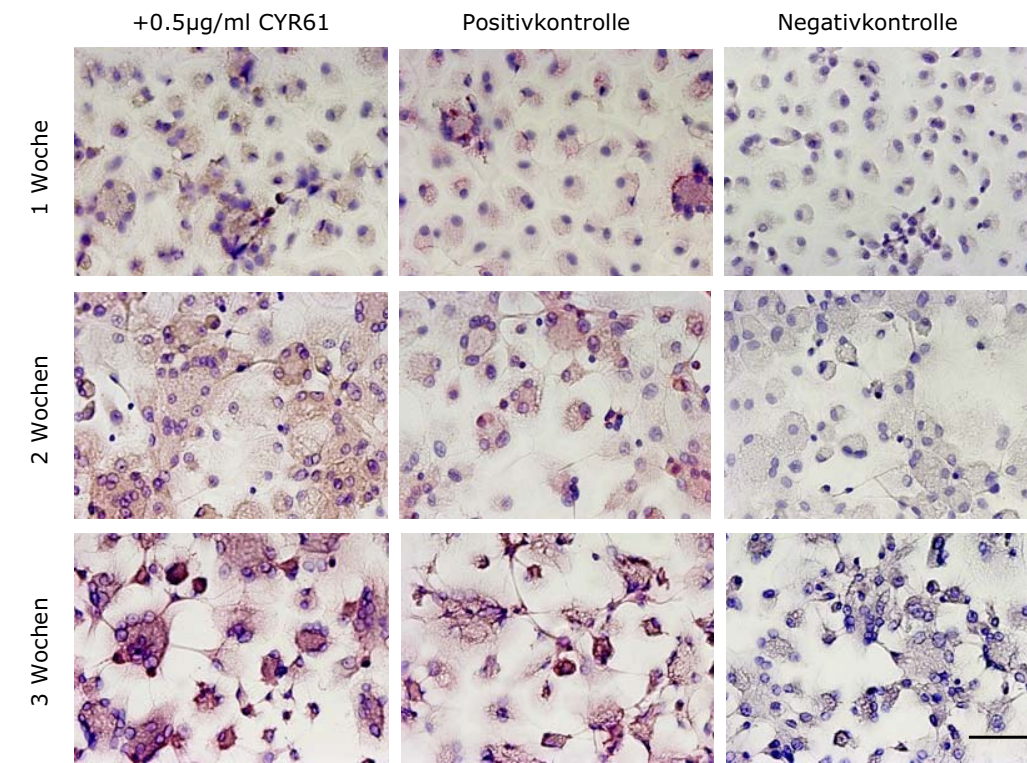


immunhistochemischen Färbungen der mit 0,5µg/ml oder reinem EPC-Medium über zwei Wochen kultivierten EPCs (vgl. Abschnitt III.5.2.2) verglichen (vgl. Abbildung 12e-f).

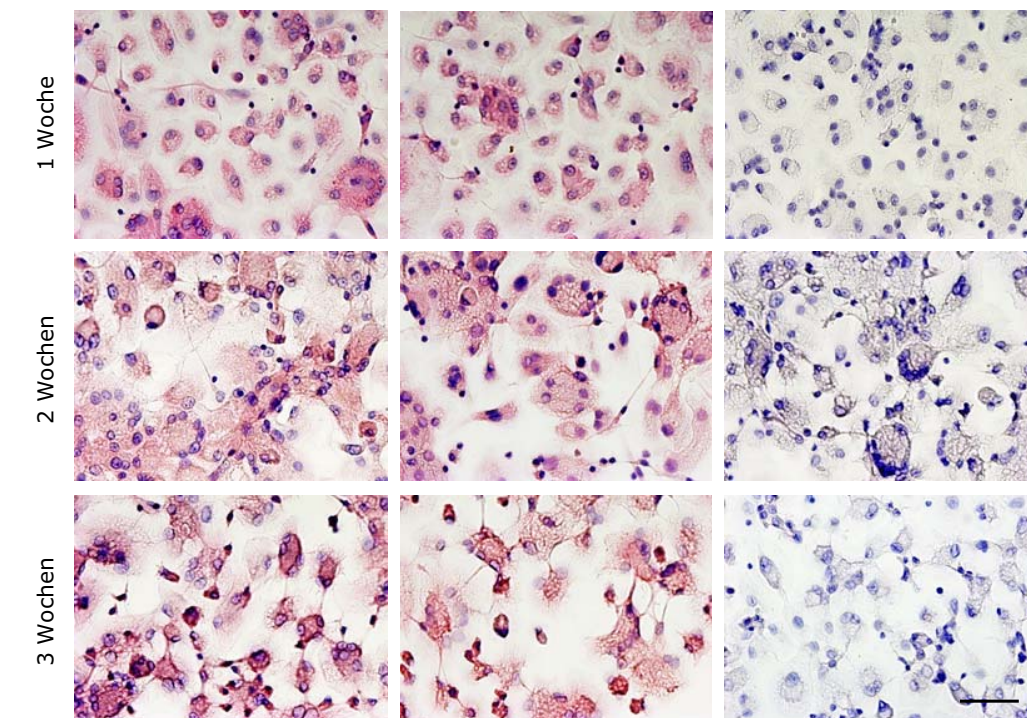
Die alleinige Behandlung mit Wachstumsfaktoren ohne CYR61 erbrachte keine Steigerung der Proliferation, die Zellen vermehrten sich in gleichem Maße, wie die unstimulierten Kontrollzellen. Auch die zusätzliche Wachstumsfaktorenbehandlung der mit 0,5µg/ml CYR61 stimulierten EPCs erbrachte keine weitere Proliferationssteigerung im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 0,5µg/ml CYR61. Es konnte also weder eine proliferationsfördernde Wirkung der Wachstumsfaktoren IGF-1, EGF, bFGF und VEGF auf EPCs nachgewiesen werden, noch eine Interaktion der Wachstumsfaktoren mit CYR61 im Sinne einer Wirkungsverstärkung.

Auch die Oberflächenexpression der VEGF-Rezeptoren KDR und Flt-1 blieb infolge der Wachstumsfaktorenstimulation unverändert (vgl. Abbildung 12e-f). Die immunhistochemischen Analysen der Oberflächenexpression der Marker Flt-1 und KDR erbrachte sowohl bei alleiniger Behandlung der EPCs mit den genannten Wachstumsfaktoren, als auch bei der Kombination aus 0,5µg/ml CYR61 und dem Wachstumsfaktorengemisch keine signifikanten Unterschiede zur Flt-1- bzw. KDR-Expression der unstimulierten Kontrollzellen bzw. der mit 0,5µg/ml stimulierten EPCs.

Auf den Seiten 54 und 55 folgen in Abbildung 12a-f die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen gegen die einzelnen spezifischen Antikörper. Die zu Abbildung 12a-f gehörige Beschriftung befindet sich auf Seite 56.

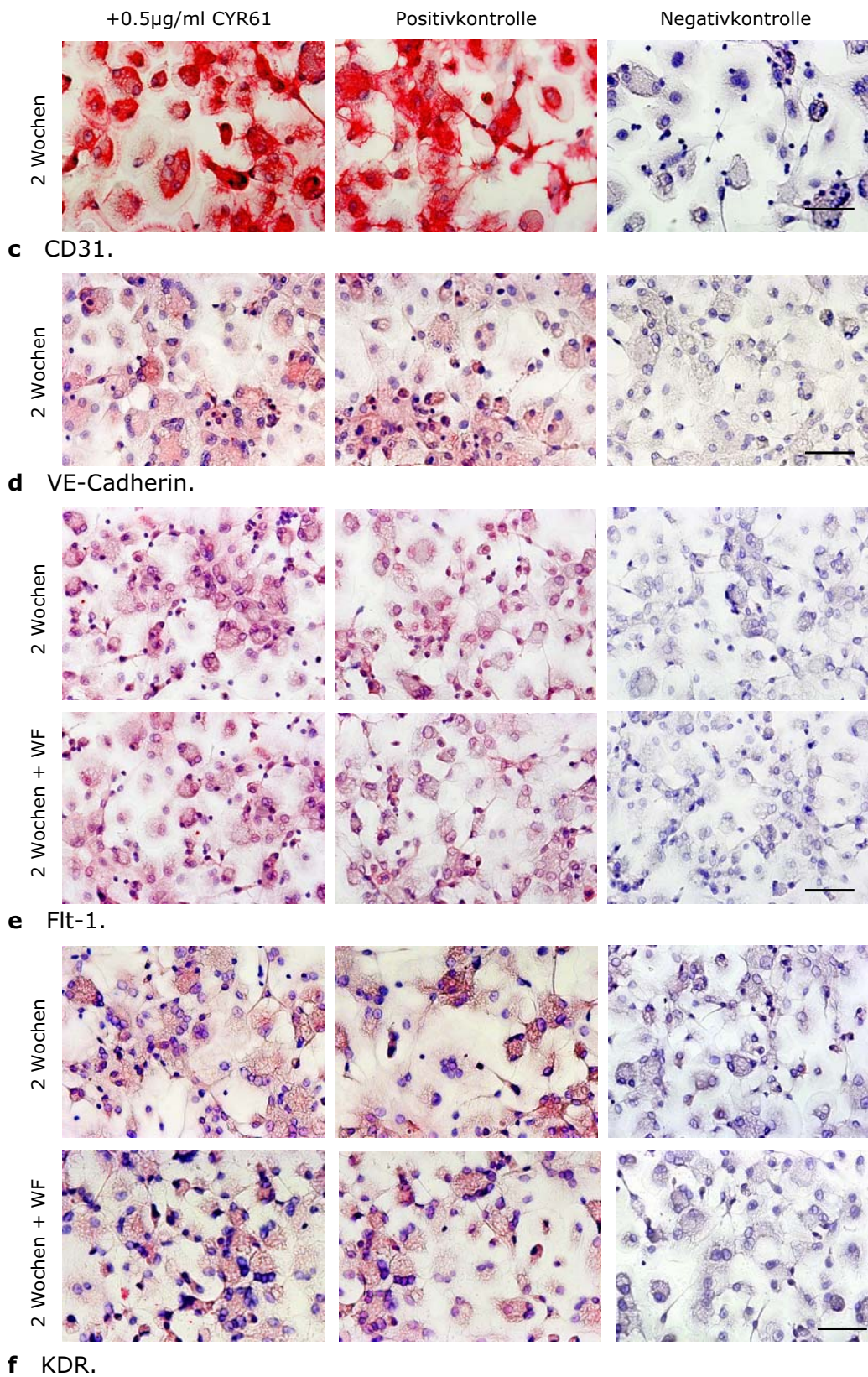


**a** CD34.



**b** CD133.





**Abbildung 12** Immunhistochemische Charakterisierung von EPCs.

Dargestellt sind die immunhistochemischen Färbungen von EPCs für die Oberflächenmarker CD34, CD133, CD31, VE-Cadherin, Flt-1 und KDR. Das abgebildete Ergebnis ist dabei repräsentativ für mindestens drei Experimente je Versuchsansatz (Kulturbedingungen und Antikörper). Positive Zellen zeigen eine rote Färbung. Negative Zellen sind entsprechend der Gegenfärbung blau. In der linken Spalte ist jeweils die Färbung der mit 0,5µg/ml CYR61 behandelten EPCs dargestellt, in der mittleren Spalte die unbehandelten Kontrollzellen (Positivkontrolle) und in der rechten Spalte die Negativkontrolle (mit der gleichen Proteinkonzentration an Mausserum wie der entsprechende Antikörper). Die Balken bilden 100µm ab.

(a) Färbung für den Oberflächenmarker CD34 nach einwöchiger (obere Zeile), zweiwöchiger (mittlere Zeile) und dreiwöchiger (untere Zeile) Kultur. (b) Färbung für den Oberflächenmarker CD133 nach einwöchiger (obere Zeile), zweiwöchiger (mittlere Zeile) und dreiwöchiger (untere Zeile) Kultur. (c) Färbung für den Oberflächenmarker CD31 nach zweiwöchiger Kultur. (d) Färbung für den Oberflächenmarker VE-Cadherin nach zweiwöchiger Kultur. (e) Färbung für den Oberflächenmarker Flt-1 nach zweiwöchiger Kultur ohne (obere Zeile) und mit (untere Zeile) zusätzlicher Behandlung mit Wachstumsfaktoren. (f) Färbung für den Oberflächenmarker KDR nach zweiwöchiger Kultur ohne (obere Zeile) und mit (untere Zeile) zusätzlicher Behandlung mit Wachstumsfaktoren.

## IV. DISKUSSION

### IV.1. CYR61 als potenter Stimulator der *ex vivo* Expansion von EPCs

Die Neubildung von Blutgefäßen und die Regeneration von geschädigtem Endothel im adulten Organismus beruht nicht ausschließlich auf der Migration und Proliferation lokaler reifer Endothelzellen (Angiogenese), sondern auch auf der Rekrutierung und *in situ* Differenzierung von aus dem Knochenmark stammenden zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen (EPCs) (Vaskulogenese). Im Rahmen diverser physiologischer und pathologischer Vorgänge sind EPCs ein bedeutsamer Bestandteil der postnatalen Neovaskularisation und Reendothelialisierung. Die Fähigkeit EPCs aus dem peripheren Blut zu gewinnen, eröffnet die Möglichkeit, mit Hilfe von EPCs, gezielt die Regeneration von geschädigtem Endothel zu fördern oder in insuffizient vaskularisierten Geweben die Neubildung von Blutgefäßen zu induzieren. Dies stellt eine vielversprechende neue Therapieoption für zahlreiche Erkrankungen dar, die mit Gefäßschädigung und/ oder Minderperfusion einhergehen. Eine wesentliche Hürde auf dem Weg zur therapeutischen Verwendung der EPCs, im Sinne einer autologen Zelltransplantation, besteht in der niedrigen Anzahl dieser Zellen, die im peripheren Blut zirkulieren und aus einem Patienten isoliert werden können. Das menschliche Blut enthält etwa  $5 \times 10^6$  Zellen pro 100ml Blut. Peichev et al. schätzen den Anteil der EPCs auf 0,002%, Ingram nur auf 0,0001% der Blutzellen [15, 42]. Auf Tierexperimenten beruhende Schätzungen gehen davon aus, dass bis zu 12 Liter autologen Blutes nötig wären, um ausreichend EPCs zur Induktion von Angiogenese im Patienten durch intravenöse Zellinfusion zu gewinnen [168]. Folglich müssen künftig Methoden gefunden werden, mit denen entweder die therapeutisch benötigte Menge an EPCs reduziert oder die *ex vivo* Vermehrung der Vorläuferzellen gesteigert werden kann. Denkbare Ansätze hierzu sind die lokale Applikation von EPCs in ischämisches Gewebe, die Anwendung gentechnologischer Verfahren zur Steigerung der angiogenetischen Potenz dieser Zellen [168, 169] oder die Suche nach einem Stimulator zur *ex vivo* Vermehrung der EPCs. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das

sezernierte Matrixprotein CYR61 in der Lage ist, die EPC-Zahl *in vitro* deutlich zu steigern, ohne dabei die phänotypischen Eigenschaften der Zellen zu verändern. Folglich scheint CYR61 ein interessantes Hilfsmittel zu sein, um die *ex vivo* Multiplikation von endothelialen Vorläuferzellen aus dem peripherem Blut voranzutreiben.

In den nachfolgenden Abschnitten sollen zunächst methodische Gesichtspunkte diskutiert werden und im Zusammenhang damit die wissenschaftliche Aussagefähigkeit der Versuchsergebnisse (vgl. Abschnitt IV.2 und IV.3). Die anschließende Einordnung der Ergebnisse dieser Arbeit in den aktuellen Stand der Forschung (vgl. Abschnitt IV.4 und IV.5) eröffnet den Ausblick auf potentielle therapeutische Einsatzmöglichkeiten der CYR61-vermittelten *ex vivo* Vervielfältigung von EPCs (vgl. Abschnitt IV.6).

#### **IV.2. Methodische Überlegungen**

Empirische wissenschaftliche Untersuchungen müssen den drei Qualitätskriterien Objektivität, Reliabilität und Validität genügen, um als aussagefähig zu gelten. Objektivität setzt voraus, dass die Durchführung der Untersuchung und die Auswertung der Ergebnisse vom Untersucher und den Untersuchungsbedingungen unabhängig sind. Reliabilität steht für die Zuverlässigkeit und Genauigkeit des Messinstruments, die sich in der verlässlichen Reproduzierbarkeit der Messergebnisse, bei wiederholten Messungen unter gleichen Bedingungen, widerspiegelt. Wissenschaftliche Ergebnisse gelten also als reliabel, wenn sie möglichst frei von zufälligen Messfehlern sind. Die Validität beschreibt die Gültigkeit der Messmethode hinsichtlich der Messung des gewünschten Merkmals. Eine Untersuchung ist dann valide, wenn tatsächlich das gemessen wird, was gemessen werden soll.

Um eine möglichst hohe Objektivität und Reliabilität zu erzielen, ist eine maximale Standardisierung der Durchführung der Experimente und ihrer Auswertung anzustreben. Es eignen sich also insbesondere einfache, schnelle, sichere und standardisierte Routineverfahren. In dieser Arbeit wurde die *in vitro* Zellkultur mit anschließender FACS-Analyse und/ oder immunhistochemischer Färbung gewählt. Diese Methoden finden auch in der Literatur häufig Verwendung in der Expressionsanalyse von

Oberflächenmarkern und gelten dabei als Testverfahren mit hoher Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Sowohl bei der Zellkultur, als auch bei der FACS-Analyse und den immunhistochemischen Färbungen sind die Ergebnisse rasch verfügbar. Die Verwendung kommerzieller Kits garantiert dabei eine einfache und standardisierte Handhabung. Ein Vorteil der FACS-Analyse ist darüber hinaus die große Anzahl von Zellen, die in einem Versuchsansatz gemessen werden kann. Dies schränkt nicht nur den Arbeitsaufwand ein, sondern erhöht auch die Genauigkeit der Ergebnisse, da alle in der Probe enthaltenen Zellen untersucht werden und nicht nur repräsentative Subpopulationen aus der Gesamtanzahl der Zellen. Um eine möglichst hohe Reliabilität der Ergebnisse nachzuweisen wurden verschiedene Testmethoden angewandt, die jeweils die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bestätigen sollten. Zum einen wurde mit Hilfe des Test-Retest-Verfahrens überprüft, ob wiederholte Messungen unter konstanten Rahmenbedingungen gleiche Messergebnisse erbrachten. Hierfür wurden alle dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimente mehrfach gleichartig durchgeführt und ergaben jeweils übereinstimmende Ergebnisse. Zum anderen wurde das sogenannten Paralleltest-Verfahren angewandt, welches systematische, versuchsbedingte Fehler aufgedeckt, indem mehrere vergleichbare Messverfahren eingesetzt werden, die identische Ergebnisse liefern sollen. In diesem Sinne wurde in dieser Arbeit die Expression der Oberflächenmarker CD34, CD133 und CD31 sowohl durchflusszytometrisch als auch immunhistochemisch analysiert. Für die beiden Marker CD34 und CD31 konnte mit beiden Nachweismethoden ein identisches Ergebnis erzielt werden. Die Expression des Stammzellmarkers CD133 war in den FACS-Analysen nicht nachzuweisen. In der immunhistochemischen Färbung zeigte sich hingegen eine deutliche Expression. Als mögliche Ursache wurde zunächst ein Defekt des für die FACS-Analyse verwendeten antiCD133-Antikörpers in Betracht gezogen. Die Funktionalität dieses Antikörpers wurde daraufhin mit Hilfe der sicher CD133<sup>+</sup> Zelllinie Caco-2 ausgetestet und nachgewiesen. Als weitere methodische Erklärung muss die unterschiedliche Sensitivität der beiden Verfahren in Betracht gezogen werden. Bezüglich der qualitativen Detektion von spezifischen Antigenen auf

der Oberfläche einzelner Zellen ist die immunhistochemische Färbung der FACS-Analyse etwas überlegen, deren Schwerpunkt mehr in der quantitativen Detektion von Oberflächenmarkern auf einer großen Anzahl von Zellen liegt. Es ist also möglich, dass die CD133 Expression so gering war, dass die durchflusszytometrische Nachweisgrenze nicht überschritten werden konnte, jedoch die der immunhistochemischen Färbung. Darüber hinaus könnten die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der CD133 Expression in der FACS-Analyse und der immunhistochemischen Färbung in der Differenz der vorausgehenden Kulturdauer liegen. Um auch in den nicht mit CYR61 stimulierten Kontrollkulturansätzen eine für die FACS-Analyse ausreichende Zellzahl zu erzielen, wurden die Zellen der FACS-Analyse über drei Wochen kultiviert. Die Zellen für die immunhistochemischen Analysen wurden hingegen in der Regel nur zwei Wochen kultiviert, um die Färbung der Zellen in Form eines Monolayers auf Objektträgern auch in den mit CYR61 kultivierten Kulturen noch gut beurteilen zu können - ohne durch hohe Zellzahlen bedingte Überlagerungen oder durch Platzmangel bedingte Zellablösung oder -verformung. Während der dritten Kulturwoche, der für die FACS-Analysen kultivierten EPCs, könnte es zu einer Weiterentwicklung der Zellen, einhergehend mit einem Verlust der Fähigkeit zur Expression von CD133, gekommen sein (vgl. Abschnitt IV.4.2.1). Um dies zu prüfen, wurde die CD133-Expression immunhistochemisch im Zeitverlauf nach ein-, zwei- und dreiwöchiger Zellkultur, analysiert. Dabei zeigte sich eine vergleichbare Expression von CD133 nach ein, zwei und drei Kulturwochen (vgl. Abschnitt III.5.2.3). Somit ist am ehesten davon auszugehen, dass die unterschiedlichen Ergebnisse der durchflusszytometrischen und immunhistochemischen Analysen bezüglich der Expression von CD133, auf die unterschiedliche Sensitivität der beiden Verfahren zurückzuführen ist. Für die Validität der Expressionsanalysen war die Spezifität der verwendeten Antikörper für die untersuchten Oberflächenmarker von Bedeutung, worauf später eingegangen wird (vgl. Abschnitt IV.2.3). Mögliche, jedoch unvermeidbare Variabilitäten zwischen den einzelnen Versuchen sollen nun dargestellt und diskutiert werden.



#### IV.2.1. Spendervariabilität

Trotz identischer Isolationsbedingungen- und methoden zeigte sich bei der Gewinnung der monozytären Zellen aus dem peripheren venösen Vollblut der Spender eine deutliche Variation der Zellzahl zwischen den einzelnen Spendern. Auch bei wiederholten Blutspenden gleicher Spender konnten deutliche Zellzahlschwankungen beobachtet werden (vgl. Abschnitt III.2). Als mögliche methodische Fehlerquelle für diese Zellzahlschwankungen muss die Abnahme der Zellfraktion monozytärer Zellen im Anschluss an die Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation in Betracht gezogen werden. Allerdings wurde beim vorsichtigen Abpipetieren der Zellfraktion stets sorgfältig darauf geachtet, dass die weißliche Zellschicht möglichst komplett abgehoben wurde. Des Weiteren ist bekannt, dass die Zahl der monozytären Zellen im Blut physiologisch nicht konstant ist. Ein wichtiger Grund hierfür ist, dass zu den monozytären Zellen vor allem auch Zellen des Immunsystems zählen, deren Anzahl im Rahmen immunologischer Abwehrreaktionen ständigen Schwankungen unterlegen ist.

Um den Einfluss der beschriebenen Zellzahlschwankungen auf die Experimente dieser Arbeit zu minimieren, wurden die isolierten monozytären Zellen stets in der selben Dichte von  $0,75 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Dennoch ergaben sich auch nach der Aussaat der mononukleären Zellen und der Inkubation im endothelzellspezifischem Medium, Schwankungen der Anzahl adhärenter EPCs. Diese Schwankungen konnten, sowohl beim Vergleich von Kulturansätzen mit Zellen verschiedener Spender, als auch mit Zellen aus verschiedenen Blutspenden eines Spenders, beobachtet werden. Da die Schwankungen regelmäßig in vergleichbarem Ausmaß auftraten, ist eine rein methodische Erklärung der Zellzahlschwankungen unwahrscheinlich. Vielmehr scheint die EPC-Zahl inter- und intraindividuell zu variieren. In der Literatur sind verschiedene Faktoren beschrieben, die auch bei gesunden Personen die Anzahl an zirkulierenden EPCs im peripheren Blut beeinflussen [13, 51]. Ein positiver Effekt auf die EPC-Zahl, im Sinne einer signifikant erhöhten Zahl zirkulierender EPCs, konnte beispielsweise nach Sport [29, 170, 171], bei Frauen mit hohen Östrogen-Plasmakonzentrationen [25] und in der

Schwangerschaft [172] gefunden werden. Mit einer Reduktion der EPC-Zahl konnten hingegen zunehmendes Alter [173] und Zigarettenrauchen [173, 174] in Zusammenhang gebracht werden. Die in dieser Arbeit beobachteten inter- und intraindividuellen Schwankungen der EPC-Zahl im peripheren Blut können also als physiologisch angesehen werden. Von entscheidender Bedeutung war folglich, dass die Experimente trotz der Variabilität der absoluten EPC-Zahl je Versuchsansatz, gleiche Ergebnisse erbrachten.

#### **IV.2.2. Variabilität der CYR61-Präparationen**

Für die einzelnen Experimente wurden verschiedene CYR61-Präparationen verwendet, die prinzipiell unterschiedliche Wirksamkeiten hätten aufweisen können. Dies konnte in den Experimenten jedoch nicht bestätigt werden. Vor der Verwendung der rekombinant synthetisierten CYR61-Proteine für die EPC-Kultur wurde die Funktionalität jeder CYR61-Präparation in der Arbeitsgruppe mit Hilfe eines Proliferationstest (WST-1-Reagenz von Roche) unter Verwendung der endothelialen Zelllinie EA.hy926 getestet, was in einer gesteigerten Proliferationsrate von mindestens 30% resultierte (vgl. Abschnitt III.1.2) [94]. Zudem wurde während der Stimulationskultur der EPCs mit CYR61 zeitnah vor jedem Medienwechsel die aktuelle Proteinkonzentration der verwendeten CYR61-Präparationen photometrisch bestimmt.

Gegen einen bedeutsamen Unterschied in der Funktionalität verschiedener CYR61-Präparationen spricht auch, dass der proliferationssteigernde Effekt der verschiedenen CYR61-Präparationen in den mehrfach durchgeführten Expansionskulturexperimenten in vergleichbarem Ausmaß reproduzierbar war.

Darüber hinaus untersuchten weitere Arbeitsgruppen den Einfluss von CYR61 auf unterschiedliche zelluläre Vorgänge, wie beispielsweise die Differenzierung von Osteoklasten [175], die Migration von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) [176] und die Adhäsion und Anoikis von retinalen Perizyten [177]. Auch sie konnten dabei die Wirksamkeit des CYR61-Proteins in verschiedenen Präparationen bestätigen.

### **IV.2.3. Spezifität der Antikörpermarkierung**

Um möglichst valide Ergebnisse bei der Expressionsanalyse eines Oberflächenmarkers mit Hilfe eines markierten Antikörpers zu erhalten, ist es wichtig für das zu detektierende Antigen den spezifischen Antikörper in der geeigneten Konzentration einzusetzen. Bei hoher Antikörperspezifität bindet der Antikörper selektiv an den zugehörigen Oberflächenmarker, so dass tatsächlich nur Zellen markiert werden, die diesen exprimieren. Bei zu geringer Antikörperkonzentration werden nur wenige Bindungsstellen besetzt, woraus eine schwache, kaum oder nicht auswertbare Markierung der Zellen folgt, die zu falsch negativen Ergebnissen führt. Wird der Antikörper hingegen in zu hoher Konzentration eingesetzt, kommt es zu unspezifischen Bindungen und damit zu falsch positiven Ergebnissen.

Zur Etablierung der in dieser Arbeit eingesetzten Antikörperkonzentrationen wurden im Vorfeld aller durchflusszytometrischen und immunhistochemischen Messungen Titrierungsexperimente durchgeführt (vgl. Abschnitt III.5.1.1 und III.5.2.1) und auf diese Weise die jeweils optimale Antikörperkonzentration ermittelt.

Zur kontinuierlichen Kontrolle der Validität der Versuchsergebnisse wurde bei den Expressionsanalysen stets eine Negativkontrolle mitgeführt. Bei dem in der FACS-Analyse fraglich negativen Antikörper CD133 wurde eine zusätzliche Positivkontrolle mit Zellen der sicher CD133<sup>+</sup> Zelllinie Caco-2 durchgeführt.

### **IV.2.4. Gleichartigkeit der Kulturbedingungen**

Störende Einflüsse von Kulturbedingungen finden sich in der Literatur beschrieben. Kulturbedingungen, wie Kulturzusätze (FCS, Zytokine) oder Plastik, können den Phänotyp von Zellen verändern [178]. Auch Interaktionen von Zellen in der heterogenen Zellmischung der mononukleären Zellen können die Ausbeute und die funktionelle Aktivität der kultivierten Zellen beeinflussen [179].

Wie bereits erwähnt, wiesen zahlreiche, in der Literatur beschriebene Studien mit endothelialen Vorläuferzellen Unterschiede in den Isolations- und Kulturbedingungen auf, was zu einer Vielzahl verschiedener Zellcharakterisierungen und Zelldefinitionen führte. In dieser Arbeit konnte

sichergestellt werden, dass alle Zellen auf die selbe Art und Weise isoliert wurden und für alle Zellkulturansätze die selben Bedingungen herrschten. Es kamen stets die selben Instrumente, Geräte und Medien zum Einsatz.

#### **IV.3. Konzentrationsabhängige Proliferationsstimulation durch CYR61**

Die Konzentrationsreihe zeigte eindeutig, dass die gesteigerte Proliferation von EPCs, als Reaktion auf die Stimulation mit CYR61, konzentrationsabhängig war (vgl. Abschnitt III.3, Abbildung 7). Bei der Zugabe geringer Mengen an CYR61 (0,05µg/ml) war kaum eine Reaktion der EPCs zu detektieren. Bei sehr hohen Konzentration an CYR61 (1,5µg/ml) trat hingegen eine sehr rasche Proliferation auf, welche die *in vitro* Kultur der Zellen erschwerte, da sich diese, vermutlich aufgrund von Platzmangel, vom Boden der Kulturgefäße lösten oder aufgrund von Nährstoffmangel abstarben. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass beim Einsatz von CYR61, zur Stimulation der EPC-Proliferation, die Wahl der geeigneten Stimulationskonzentration von Bedeutung ist. Mit der optimalen Stimulationskonzentration an CYR61 sollte ein proliferativer Effekt erzielt werden, dessen Ausmaß ausreicht, um *ex vivo* genügend EPCs zu gewinnen und der gleichzeitig eine kritische Grenze nicht überschreitet, welche die kulturelle Handhabung der Zellen erschwert.

#### **IV.4. Identifizierung der endothelialen Vorläuferzellen**

Ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit war es, die aus dem Blut isolierten und *in vitro* kultivierten Zellen phänotypisch zu charakterisieren und als endotheliale Vorläuferzellen (EPCs) zu identifizieren. Des Weiteren wurden die phänotypischen Eigenschaften der mit CYR61 behandelten Zellen und der unbehandelten Kontrollzellen miteinander verglichen, um herauszufinden, ob die CYR61-Behandlung den Phänotyp der Zellen verändert.

##### **IV.4.1. Morphologische Charakterisierung der EPCs**

Die spindel- und tropfenförmige Zellmorphologie, welche sich regelmäßig bei den mit CYR61 behandelten und den Kontrollzellen zeigte, ist ein typisches endothelzellspezifisches Charakteristikum. Auch die etwas später

erkennbare pflastersteinartige Morphologie ist kennzeichnend für die Endothelzelllinie. Folglich lieferte bereits die mikroskopische Untersuchung der Zellkultur deutliche Hinweise darauf, dass mit der Kultivierung unselektierter mononukleärer Zellen in endothelzellspezifischem Medium eine *in vitro* Anreicherung von endothelialen Zellen gelungen war.

Die insbesondere zu Beginn der Kultur beobachteten kleinen runden Zellen proliferierten nicht, bildeten keine CFUs und ihre Anzahl nahm im Verlauf der *in vitro* Kultur ab. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei diesen Zellen nicht um endotheliale Vorläuferzellen handelt, sondern um andere monozytäre Zellen, die am Boden der Kulturgefäße adhärten und deshalb bei den Medienwechseln nicht vollständig entfernt werden konnten.

#### **IV.4.2. Immunphänotypische Charakterisierung der EPCs**

Die Analyse des Oberflächenexpressionsprofils erlaubte eine präzise Charakterisierung der Zellen und damit die Abgrenzung von anderen Zellarten und die Zuordnung zur Gruppe der endothelialen Vorläuferzellen. Neben der Analyse der, aus der Literatur bekannten, klassischen EPC-Marker, wurde ein besonderes Augenmerk auf die Identifizierung der Zellen als Vorläuferzellen geworfen, indem sie klar von ausdifferenzierten Endothelzellen abgegrenzt wurden. Dies war von Bedeutung, weil sich aus dem Gefüge der Gefäßwände Endothelzellen lösen können, die dann im Blut zirkulieren und mit EPCs verwechselt werden könnten. Bei gesunden Personen ist die Anzahl solcher zirkulierender adulter Endothelzellen vernachlässigbar gering. Allerdings kommt es unter bestimmten pathologischen Umständen, wie beispielsweise beim akutem Myokardinfarkt [180] oder nach PTCA [181], möglicherweise zu vermehrter Endothelzellablösung. In diesen Fällen kann die Zahl zirkulierender reifer Endothelzellen bedeutsam werden, so dass Überschneidungen der zwei prinzipiell unterschiedlichen Zelltypen (EPCs und reife Endothelzellen) möglich sind.

Desweiteren sollte durch die Abgrenzung der untersuchten Zellen von reifen Endothelzellen unbedingt sichergestellt werden, dass die Behandlung der EPCs mit CYR61 nicht zu einer Ausdifferenzierung der EPCs führt, sondern die Zellen in einem unreifen Differenzierungsstadium bleiben.

#### IV.4.2.1. Expression der klassischen EPC-Marker: CD34, CD133 und KDR

Als klassisches Markerprofil zur Identifizierung von EPCs findet sich in der Literatur die Koexpression der Antigene CD34, CD133 und KDR [15]. Der Nachweis der Expression dieser drei klassischen EPC-Marker konnte mittels FACS-Analyse und/ oder immunhistochemischer Färbung, auf den mit CYR61 behandelten Zellen und den Kontrollzellen, erbracht werden. Fraglich war dabei der bereits erwähnte fehlende durchflusszytometrische Nachweis der CD133 Expression, bei positivem Ergebnis der immunhistochemischen Expressionsanalyse von CD133.

CD34 ist ein klassischer Stammzellmarker der hämatopoetischen Stammzelllinie, dessen Expression sich während der Differenzierung von frühen zu reiferen hämatopoetischen Stammzellen vermindert. Nach dem heutigen Stand der Forschung haben hämatopoetische Stammzellen (HSCs) und EPCs eine gemeinsame Ursprungszelle, den sogenannten Hämangioblasten [182]. Auch für EPCs ist die Expression von CD34 kennzeichnend [12]. Allerdings wird CD34 nicht ausschließlich auf unreifen Zellen der Endothelzelllinie, sondern in geringem Ausmaß auch auf reifen Endothelzellen exprimiert [183, 184].

Ähnliches gilt für das humane Homolog KDR des VEGF-Rezeptor-2, welches eine essentielle Rolle bei der Vaskulogenese, Angiogenese und Hämatopoese spielt [185]. Auch KDR wird von frühen hämatopoetischen Stammzellen, EPCs und reifen Endothelzellen exprimiert [185-187].

Die Koexpression von CD34 und KDR alleine ermöglicht folglich keine exakte Differenzierung zwischen EPCs und reifen Endothelzellen. Demzufolge sind weitere Oberflächenmoleküle zur genaueren Charakterisierung und weiteren Eingrenzung der Population zirkulierender EPCs nötig.

Als wichtiger Marker zur Identifizierung von pluripotenten frühen Stammzellen wurde Ende der 90er Jahre das Oberflächenmolekül CD133 (anfangs AC133 genannt) gefunden [188]. CD133 wird von frühen hämatopoetischen Stammzellen aus dem adulten Knochenmark, der fetalen Leber und dem zirkulierenden Blut exprimiert und verliert seine Expression bei reifen Stammzellen [15]. Darüber hinaus konnte eine frühe CD133<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> EPC-Population nachgewiesen werden, die sich *in vitro* zu

einer reiferen CD133<sup>-</sup>/ CD34<sup>+</sup>/ KDR<sup>+</sup> EPC-Population weiterdifferenzieren ließ [15, 46]. Das Vorhandensein von CD133 auf EPCs scheint folglich ein Hinweis auf eine frühe Form der zirkulierenden Vorläuferzellen zu sein, welche dann in der Weiterentwicklung die Fähigkeit zur CD133 Expression verlieren. Reife EPCs exprimieren, wie reife Endothelzellen, vermutlich kein CD133 mehr. Weshalb und zu welchem Zeitpunkt der Differenzierung die CD133 Expression verloren geht, ist derzeit noch nicht bekannt.

Dieser allmähliche CD133 Verlust mit zunehmender Ausreifung der EPCs hätte eine mögliche Erklärung, für den fehlenden Nachweis der CD133 Expression in den durchflusszytometrischen Analysen nach drei Kulturwochen im Vergleich zum positiven immunhistochemischen Nachweis von CD133 nach zwei Kulturwochen, darstellen können. Es wäre denkbar gewesen, dass die EPCs innerhalb der dritten Kulturwoche bezüglich der CD133 Expression den kritischen Punkt ihrer endothelialen Differenzierung erreicht hätten, wodurch es zum Verlust der Expression des Stammzellmarkers gekommen wäre. Dieser Annahme zufolge hätten sich die EPCs zum Zeitpunkt der immunhistochemischen Färbung noch im Differenzierungsstadium der frühen CD133<sup>+</sup>/ CD34<sup>+</sup>/ KDR<sup>+</sup> EPCs befunden und hätten eine Woche später, zum Zeitpunkt der FACS-Analysen, bereits das Stadium der reifen CD133<sup>-</sup>/ CD34<sup>+</sup>/ KDR<sup>+</sup> EPCs erreicht.

Dies konnte jedoch durch die positive immunhistochemische Färbung der Zellen gegen CD133 nach dreiwöchiger Kultur ausgeschlossen werden. Selbst wenn jedoch der Nachweis der CD133 Expression in der durchflusszytometrischen und auch in der immunhistochemischen Färbung nach dreiwöchiger *in vitro* Kultur in gleicher Weise bei den mit CYR61 behandelten und den Kontrollzellen negativ gewesen wäre, hätte davon ausgegangen werden können, dass die mögliche zunehmende endotheliale Differenzierung der EPCs im Verlauf der Kultur ein physiologischer Prozess ist und nicht auf die Stimulation durch CYR61 zurückzuführen ist.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die durchflusszytometrisch und/ oder immunhistochemisch nachgewiesene, reproduzierbare Koexpression von CD34 und KDR, die selektiv kultivierte

Subpopulation, der aus dem Blut isolierten und ausgesäten mononukleären Zellen, als EPCs im klassischen Sinne identifizierte.

Die Antigene CD34 und KDR werden entlang der Differenzierung von der endothelialen Vorläuferzelle bis hin zur adulten Endothelzelle exprimiert, die Expression des frühen Stammzellmarkers CD133 geht hingegen während der weiteren endothelialen Zelldifferenzierung der EPCs verloren. Daher deutet die immunhistochemisch nachgewiesene Dreifachexpression von CD34, KDR und CD133 darauf hin, dass die EPCs in einem frühen unreifen, stammzellartigen Vorläuferzellstadium verblieben. Die Expression von CD133, CD34 und KDR war in den durchflusszytometrischen und den immunhistochemischen Analysen zu jedem Kulturzeitpunkt identisch für die mit CYR61 behandelten EPCs und die Kontrollzellen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Behandlung der EPCs mit CYR61 zu keiner Veränderung des Expressionsmusters der klassischen EPC-Marker führte.

#### **IV.4.2.2. Abgrenzung von reifen Endothelzellen mittels CD146**

Um auszuschliessen, dass trotz des fehlenden durchflusszytometrischen Expressionsnachweises von CD133, die über drei Wochen kultivierten Zellen, während der dritten Kulturwoche das Stadium der reifen Endothelzelle erreichten, wurden die Zellen zusätzlich durchflusszytometrisch auf die Expression von CD146 analysiert.

CD146 (P1H12) wird nur auf differenzierten Endothelzellen exprimiert und ist auf keiner anderen im Blut zirkulierenden Zelle vorhanden, auch nicht auf endothelialen Vorläuferzellen [189]. Folglich lassen sich mit monoklonalen Antikörpern gegen CD146 spezifisch reife Endothelzellen markieren und damit von EPCs unterscheiden.

Die negativen Ergebnisse aller FACS-Analysen bezüglich der Expression von CD146, können dahingehend gedeutet werden, dass es sich unabhängig von der Stimulation mit CYR61, auch bei den über drei Wochen kultivierten Zellen um EPCs handelte und nicht um reife Endothelzellen.



#### **IV.4.2.3. Expression weiterer für EPCs kennzeichnender endothelialer Oberflächenmarker: CD31, Flt-1, VE-Cadherin, CD106**

Es wurde bereits beschrieben, dass sich die frühen funktionellen Formen der EPCs, die bald nach der Trennung der endothelialen und der hämatopoetischen Zelllinie entstehen, durch die Expression der drei Oberflächenmarker CD133, CD34 und KDR auszeichnen. Mit zunehmender Reifung der zirkulierenden EPCs kommt es zu einem Wechsel des Expressionsmusters auf deren Zelloberfläche [84]. Während die CD133 Expression nachlässt, nimmt im Gegenzug die Expression einer Vielzahl von Oberflächenantigenen zu, die für die endotheliale Differenzierung charakteristisch sind. Dazu zählen CD31, VE-Cadherin (CD144), Flt-1 (VEGFR-1) und CD106 [12, 41, 50-53].

Das endothelzellspezifische Adhäsionsmolekül CD31 (PECAM-1) ist ein Mitglied der Immunglobulin(Ig)-Superfamilie [190]. Eine ausgeprägte CD31 Expression findet sich im adulten Organismus im Bereich der interzellulären Verbindungen der Endothelzellen des gesamten Gefäßsystems [191]. Eine schwächere Expression kann auch auf zahlreichen Blutzellen nachgewiesen werden, wozu Monozyten, Neutrophile, Thrombozyten, B- und T-Zellsubpopulationen [192] und EPCs zählen. CD31 kommt nicht auf Fibroblasten, Epithelien, Muskelzellen oder anderen Nicht-Gefäßzellen vor [193]. Auch das endothelzellspezifische Mitglied der Cadherine VE-Cadherin (CD144) ist im Adhäsionsmechanismus beteiligt, der für die Stabilität von Endothelzellkontakten sorgt. Es wird von reifen Endothelzellen exprimiert, konnte aber auch auf EPCs im Verlauf ihrer Differenzierung nachgewiesen werden [51]. Der VEGF-Rezeptor-1 Flt-1 findet sich, wie KDR, auf Endothelzellen, frühen embryonalen hämatopoetischen Zellpopulationen und aus dem adulten Knochenmark abgeleiteten Makrophagen und Monozyten [194, 195].

Ein positiver Expressionsnachweis für diese vier Antigene (CD31, VE-Cadherin, Flt-1, CD106) konnte in dieser Arbeit in gleichem Maße auf den mit CYR61 behandelten und den unbehandelten Zellen der *in vitro* Kultur erbracht werden. Dieses Ergebnis unterstreicht die Identifikation der Zellen als zirkulierende EPCs und bestätigt, dass die Behandlung mit CYR61 den Phänotyp der EPCs erhält.

#### IV.4.2.4. Die Zellen dieser Arbeit sind EPCs

Der heutige Stand der Forschung bezüglich der phänotypischen Charakterisierung von EPCs anhand der Expression von spezifischen Oberflächenmolekülen kann wie folgt zusammengefasst werden.

Aus dem Knochenmark in die periphere Blutzirkulation mobilisierte EPCs unterliegen einem Reifungsprozess, bei dem sich ihr Oberflächenmarker-Expressionsprofil verändert (vgl. Abbildung 2). Sehr frühe Formen der EPCs haben den Phänotyp CD133<sup>+</sup>/ CD34<sup>+</sup>/ KDR<sup>+</sup>/ CD31<sup>-</sup>/ Flt-1<sup>-</sup>/ VE-Cadherin<sup>-</sup>/ CD106<sup>-</sup>/CD146<sup>-</sup>. Im Verlauf des Reifungsprozesses kommt es zum allmählichen Verlust der Expression von CD133 und zur zunehmenden Expression der Oberflächenantigene CD31, VE-Cadherin und CD106, so dass über diverse Zwischenstufen (CD133<sup>±</sup>/ CD34<sup>+</sup>/ KDR<sup>+</sup>/ CD31<sup>±</sup>/ Flt-1<sup>±</sup>/ VE-Cadherin<sup>±</sup>/ CD106<sup>±</sup>/ CD146<sup>-</sup>) Spätformen der EPCs mit dem Expressionsprofil CD133<sup>-</sup>/ CD34<sup>+</sup>/ KDR<sup>+</sup>/ CD31<sup>+</sup>/ Flt-1<sup>+</sup>/ VE-Cadherin<sup>+</sup>/ CD106<sup>+</sup>/ CD146<sup>-</sup> entstehen.

Es ist davon auszugehen, dass im peripheren Blut gleichzeitig EPCs der beschriebenen Differenzierungsstadien und zahlreiche Zwischenstufen zirkulieren [51]. Werden die EPCs in den Zellverband des Endothels integriert, differenzieren sie *in situ* zu reifen Endothelzellen aus, die dann durch das Expressionsmuster CD133<sup>-</sup>/ CD34<sup>+</sup>/ KDR<sup>+</sup>/ CD31<sup>+</sup>/ Flt-1<sup>+</sup>/ VE-Cadherin<sup>+</sup>/ CD106<sup>+</sup>/ CD146<sup>+</sup> gekennzeichnet sind (vgl. Abbildung 2).

Die in dieser Arbeit immunhistochemisch charakterisierten EPCs zeigten das Markerprofil CD133<sup>+</sup>/ CD34<sup>+</sup>/ KDR<sup>+</sup>/ CD31<sup>+</sup>/ Flt-1<sup>+</sup>/ VE-Cadherin<sup>+</sup>. Es handelte sich also sehr wahrscheinlich um Zwischenstufen zwischen unreifen und reifen EPCs, bei denen die CD133 noch nicht vollständig verloren gegangen war und bereits die Expression von CD31, Flt-1 und VE-Cadherin begonnen hatte.

Die nach dreiwöchiger Kultur durchflusszytometrisch untersuchten Zellen zeigten das Expressionsprofil CD133<sup>-</sup>/ CD34<sup>+</sup>/ KDR<sup>+</sup>/ CD31<sup>+</sup>/ Flt-1<sup>+</sup>/ VE-Cadherin<sup>+</sup>/ CD106<sup>+</sup>/ CD146<sup>-</sup> von reifen EPCs. Damit war es gelungen die Zellen dieser Arbeit mittels Oberflächenexpressionsanalyse als EPCs zu identifizieren.

Darüber hinaus konnte in der Arbeitsgruppe für die Zellen dieser Arbeit auch die für EPCs charakteristische Aufnahme von acetyliertem LDL (acLDL) und Anfärbbarkeit mit Ulex Lectin (vgl. Abschnitt I.2.3) nachgewiesen werden.

#### **IV.5. Interaktion zwischen CYR61 und EPCs**

Nachdem die Zellen nun als EPCs identifiziert wurden, sollen mögliche Interaktionen zwischen den endothelialen Vorläuferzellen und dem angiogenetischen Faktor CYR61 diskutiert werden.

In allen Experimenten dieser Arbeit konnte, in Folge der CYR61-Behandlung, der aus dem Blut isolierten und *in vitro* kultivierten EPCs, keine signifikante Veränderung des Phänotyps festgestellt werden. Die mit CYR61 behandelten EPCs und die unbehandelten Kontrollzellen wiesen zu jedem Zeitpunkt dieselbe Oberflächenmarkerexpression auf und blieben bis zum Ende der Expansionskultur in einem unreifen endothelialen Vorläuferzellstadium. Der bedeutsame Unterschied zwischen den mit CYR61 behandelten und den unbehandelten EPC-Kulturansätzen war eine deutlich gesteigerte EPC-Proliferation als Reaktion auf die Stimulation mit CYR61. Demzufolge interagierten CYR61 und EPCs *in vitro*.

Vergleicht man auf dieser Grundlage, die bisher in der Literatur beschriebenen Erkenntnisse über die Gewebeexpression und die angiogenetischen Wirkungen von CYR61 im menschlichen Organismus, mit denjenigen über die Rekrutierung und die angiogenetischen Eigenschaften von EPCs *in vivo*, so lassen sich interessante Parallelen feststellen, die eine Interaktion von CYR61 und EPCs auch *in vivo* wahrscheinlich machen.

##### **IV.5.1. Wachstumsfaktoren beeinflussen EPCs und CYR61**

Eine Gemeinsamkeit zwischen EPCs und CYR61 ist deren Ansprechen auf die Stimulation durch Wachstumsfaktoren. VEGF, FGF, IGF, PDGF und Angiopoietin sind Beispiele für Wachstumsfaktoren, die bei der Bildung neuer Blutgefäße eine wichtige Rolle spielen [196]. Eine durch endotheliale Vorläuferzellen vermittelte gesteigerte Angiogenese wird durch die Freisetzung solcher Wachstumsfaktoren beeinflusst [197]. Darüber hinaus

ist bekannt, dass die Expression von CYR61 ebenfalls durch Wachstumsfaktoren, wie VEGF, induzierbar ist [86, 198].

Es liegt also nahe, derartige Wachstumsfaktoren künftig auch klinisch zur Förderung der Angiogenese einzusetzen. Allerdings konnten großflächig dazu angelegte Studien noch keinen übereinstimmenden Nutzen des klinischen Einsatzes von VEGF nachweisen [157, 199, 200]. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass VEGF in diesen Untersuchungen alleine eingesetzt wurde. Neuere Beobachtungen weisen jedoch darauf hin, dass VEGF gemeinsam mit verschiedenen anderen angiogenetischen Faktoren die Gefäßbildung beeinflusst, wozu beispielsweise CYR61 zählt [154, 156, 201]. Sehr wahrscheinlich wird die Gefäßbildung also nicht durch einen angiogenetischen Faktor alleine, sondern durch ein Zusammenspiel von EPCs mit verschiedenen angiogenetischen Faktoren vorangetrieben, wovon einer CYR61 ist. Die Interaktionen der angiogenetischen Faktoren untereinander und mit den endothelialen Vorläuferzellen, sowie die zugrundeliegenden Mechanismen der Vermittlung ihrer angiogenetischen Wirkung, sind dabei noch weitgehend unbekannt.

#### **IV.5.2. EPCs und CYR61 fördern als angiogenetische Faktoren die Neovaskularisation *in vivo***

Parallelen zwischen EPCs und CYR61 sind jedoch nicht nur hinsichtlich ihrer Beeinflussbarkeit durch Wachstumsfaktoren zu beobachten. Diverse physiologische und pathologische Vorgänge im adulten menschlichen Organismus, die mit Gefäßneubildung oder Endothelregeneration einhergehen, konnten sowohl mit einer vermehrten Rekrutierung von EPCs, als auch mit einer Hochregulation der *CYR61*-Expression in Zusammenhang gebracht werden. Dazu zählen im Besonderen die Neovaskularisation von ischämischem Gewebe, die Reendothelialisierung von geschädigten Gefäßen, die Wund- und Frakturheilung und die Tumorangiogenese.

EPCs werden bei Gefäßschädigung oder Minderperfusion verstärkt aus dem Knochenmark in die periphere Blutzirkulation mobilisiert und gezielt ins Gewebe rekrutiert. Dort werden sie in die Gefäßwand integriert und differenzieren zu reifen Endothelzellen. Auf diese Weise tragen sie maßgeblich zur Regeneration des geschädigten Endothels und zur

Neubildung von Blutgefäßen in zuvor insuffizient vaskularisiertem Gewebe bei [13].

In Übereinstimmung damit findet sich bei Sauerstoffmangel eine Hochregulation der *CYR61*-Expression [115]. Als angiogenetischer Faktor ist das *CYR61*-Protein dann in der Lage die Proliferation, Migration und Röhrenbildung von Endothelzellen voranzutreiben und die Neubildung von Blutgefäßen zu stimulieren [133, 153, 154, 156].

Im Folgenden sollen einige wichtige Beispiele der Neovaskularisationsprozesse dargestellt werden, die sowohl von EPCs als auch von *CYR61* gefördert werden.

#### **IV.5.2.1. Kardiovaskuläre Regeneration**

Von großem medizinischen Interesse ist die Gefäßregeneration im Bereich der Koronarien und die Revaskularisierung von ischämischem Myokard, da die koronare Herzkrankheit (KHK) und ihre Folgeerkrankungen eine hohe Prävalenz und Inzidenz in der Bevölkerung aufweisen. Umso interessanter sind die Ergebnisse voneinander unabhängiger Studien, die in vergleichbaren pathologischen Zuständen des kardiovaskulären Systems eine verstärkte Mobilisierung von EPCs aus dem Knochenmark und eine Hochregulation der *CYR61*-Expression zeigten [111, 134, 158]. Dazu zählen die Myokardischämie nach akutem Myokardinfarkt und der Endothelschaden nach PTCA [158, 169, 202, 203]. Aber auch bereits eine Gefäßschädigung begünstigende kardiovaskuläre Risikofaktoren und die daraus resultierende Arteriosklerose, welche die pathophysiologische Grundlage der KHK bildet und dem Myokardinfarkt häufig weit voraus geht, lassen sich mit Veränderungen der EPC-Zahl und -Funktion [61] und der *CYR61*-Expression [111, 134] in Verbindung bringen.

Kommt es infolge der fortschreitenden Gefäßschädigung zur Koronarinsuffizienz und damit zur Myokardischämie, induzieren ischämische Stimuli eine verstärkte Mobilisierung von EPCs aus dem Knochenmark. Der Anstieg der Anzahl zirkulierender EPC und die durch diese Zellen vermittelte Endothelregeneration und Neovaskularisation führt zur kardiovaskulären Regeneration und trägt auf diese Weise zur Reduktion des ischämischen Schadens bei [61, 204, 205]. So konnten EPCs in Transplantationsmodellen

erfolgreich zur myokardialen Regeneration eingesetzt werden [206]. Eine Abnahme der EPC-Zahl ist hingegen als ein negativer Vorhersagewert für die Morbidität und Mortalität von kardiovaskulären Erkrankungen zu werten [61, 207].

Dass CYR61 ebenfalls an der Anpassung des Herzens an kardiovaskuläre Belastung beteiligt ist, zeigt unter anderem die Induktion der myokardialen CYR61-Expression durch Überdruckbelastung, Ischämie und neurohumorale Faktoren, wie Angiotensin II oder  $\alpha_1$ -adrenerge Stimuli [158].

#### **IV.5.2.2. Extremitätenischämie**

Die durch EPC und CYR61 geförderte Regeneration von ischämischem Gewebe beschränkt sich allerdings nicht auf den Herzmuskel, sondern spielt auch in minderperfundierten Extremitäten eine entscheidende Rolle.

So konnten tierexperimentelle Studien zeigen, dass nach Extremitätenischämie eine Transplantation von EPCs [56] oder ein CYR61-Genstransfer [156], die Revaskularisierung des ischämisch geschädigten Gewebes fördern.

#### **IV.5.2.3. Tumorangiogenese**

Das Wachstum und die Metastasierung von soliden Tumoren ist von der Bildung neuer Blutgefäße zur Versorgung des neoplastischen Gewebes abhängig [63]. Dieser Vorgang der Tumorangiogenese wird von EPCs [80] und CYR61 [160] gefördert.

Die Beteiligung von EPCs an der Neubildung von tumoreigenen Gefäßen wurde insbesondere in Transplantationsstudien deutlich. Dabei fanden sich, nach der Übertragung von genetisch markierten EPCs in tumorkranke Mäuse, im neugebildeten Gefäßnetz des Tumors genetisch markierte Endothelzellen [208, 209]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Anteil des Tumorgefäßvolumens, der auf EPCs zurückgeführt werden konnte, mit zunehmender Tumorprogression steigt [72, 210]. All diese Beobachtungen stützen die Annahme, dass EPCs die Neovaskularisation von malignem Gewebe vorantreiben und infolgedessen einen entscheidenden Faktor für die Tumorprogression darstellen.

Parallel dazu konnte in Tumoren zahlreicher Organe und Gewebe auch eine veränderte *CYR61-Expression* beobachtet werden [103]. Die Wirkungen von *CYR61* in Tumoren scheinen dabei sehr komplex zu sein, denn paradoxerweise kann *CYR61* die Progression und das Wachstum von Tumoren in Abhängigkeit vom Tumortyp vorantreiben [153, 211] oder hemmen [212]. In Übereinstimmung mit der antiapoptotischen und angiogenetischen Aktivität von *CYR61* [103] sind zwei Mechanismen zur Förderung der Tumorprogression durch *CYR61* bekannt: die Erhöhung der Widerstandsfähigkeit gegenüber Apoptose [211] und die Verbesserung der Tumorangio-genese [153]. Im Rahmen von Tiermodellen resultierte eine *CYR61*-Überexpression in Tumorzellen in einer gesteigerten Tumorigenität dieser Zellen. Aus diesen *CYR61*-überexprimierenden Zellen entwickelten sich Tumore, die im Vergleich zu den aus Kontrollzellen hervorgegangenen Tumoren, besser vaskularisiert waren [103, 153]. Seit kurzem sind auch erste Mechanismen der Hochregulation von *CYR61* in hypoxischem Tumorgewebe bekannt [160].

#### **IV.5.2.4. Heilung von Knochen und Wunden**

Zu den Vorgängen, deren Erfolg entscheidend von der Neubildung von Blutgefäßen abhängig sind, zählen insbesondere auch Heilungsprozesse des muskuloskelettalen Systems, wie die Heilung von frakturiertem Knochen oder Weichteilwunden.

So werden bei der Knochen- und Wundheilung verstärkt EPCs aus dem Knochenmark in die periphere Zirkulation mobilisiert, die dann höchstwahrscheinlich zur Neubildung von Blutgefäßen beitragen und auf diese Weise die Geweberegeneration ermöglichen [57, 58, 60, 213].

In Übereinstimmung damit wird während der Knochen- und Wundheilung auch die *CYR61*-Expression im Frakturkallus bzw. im Granulationsgewebe von Hautwunden zeitweise hochreguliert [114, 159]. Dabei konnte das *CYR61*-Protein in Endothelzellen, Fibroblasten, Osteoblasten, proliferierenden Chondrozyten, unreifen Osteozyten [88, 114, 159, 214, 215] und auch in der osteoiden Knochenmatrix [215] gefunden werden. Insbesondere hinsichtlich der Frakturheilung konnte gezeigt werden, dass *CYR61* dabei vor allem die Vaskularisation und Chondrogenese entscheidend

beeinflusst [81]. So ist beispielsweise eine verspätete und reduzierte Hochregulation der *CYR61*-Expression mit einer reduzierten Vaskularisation und einer schlechteren Chondrogenese im Frakturkallus assoziiert, was wiederum eine langsamere Heilung des Knochens zur Folge hat [159].

### **IV.5.3. Mögliche Interaktionen zwischen *CYR61* und EPCs**

Die meisten Studien beschäftigten sich bisher jeweils nur mit den angiogenetischen Eigenschaften von EPCs oder *CYR61*. Die beobachteten Parallelen im Wirkungsbereich von EPCs und *CYR61* werfen jedoch die Frage nach dem Zusammenspiel der beiden angiogenetischen Faktoren auf: Interagieren EPCs und *CYR61* bei der Stimulation der Neubildung von Blutgefäßen und wie könnten diese Wechselwirkungen gestaltet sein?

#### **IV.5.3.1. *CYR61*-Expression in Vorläuferzellen**

Im Hinblick auf die Fragestellung der Interaktion von *CYR61* und endothelialen Vorläuferzellen ist interessant, dass bereits im Zusammenhang mit Vorläuferzellen anderer Zelllinien eine Veränderung der *CYR61*-Expression beobachtet werden konnte. Schütze et al. zeigten, dass die *CYR61*-Expression, mit zunehmender osteogener, adipogener und chondrogener Differenzierung von aus dem Knochenmark stammenden mesenchymalen Stammzellen (MSCs), deutlich abfällt [81]. Dies könnte auf eine spezifische Funktion von *CYR61* in Vorläuferzellen vor dem Beginn der Differenzierungswege hinweisen [81]. Darüber hinaus zeigten Schütze et al. [176], dass exogenes, also nicht von den Zellen selbst sezerniertes, *CYR61* in der Lage ist, die Adhäsion und Migration von humanen CD34<sup>+</sup> Vorläuferzellen und MSCs zu fördern.

#### **IV.5.3.2. EPCs und *CYR61* interagieren bei der Blutgefäßbildung**

Über die Wechselwirkungen von *CYR61* und MSCs hinaus verdichten sich in aktuellen Studien auch die Hinweise auf Interaktionen von *CYR61* und EPCs. Grote et al. [157] gehen von einer angiogenetischen Wirkung von *CYR61* aus, die über zwei koexistente Wege vermittelt wird: einen direkten, lokal begrenzten Effekt von *CYR61* auf die endotheliale Proliferation und einen indirekten stimulierenden Effekt von *CYR61* auf endotheliale Vorläuferzellen.



Letzterer bietet eine flexiblere Antwort auf Gewebeschädigung. Yu et al. [216] stützen diese These mit dem Nachweis eines signifikanten Beitrags von CYR61 an der parakrinen Wirkung von reifen Endothelzellen auf EPCs. Demzufolge sind Endothelzellen über CYR61 in der Lage die Proliferation, Migration und Röhrenbildung von EPCs zu regulieren und damit die EPC-vermittelte Angiogenese voranzutreiben.

Auch die in dieser Arbeit nachgewiesene CYR61-vermittelte Proliferationssteigerung von EPCs *in vitro* bestätigt die Interaktion der beiden angiogenetischen Faktoren im Sinne einer Stimulation der EPCs durch CYR61.

Wie sich diese Interaktionen zwischen EPCs und CYR61 im Einzelnen gestalten ist noch weitgehend unklar und bedarf weiterer Untersuchungen. Mögliche Interaktionsmechanismen und erste Erkenntnisse darüber sollen im Folgenden kurz dargestellt werden.

#### **IV.5.3.3. Mögliche Interaktionsmechanismen von EPCs und CYR61**

Entscheidende Schritte bei der Rekrutierung und Differenzierung von EPCs sind die transendotheliale Migration der Zellen aus dem Knochenmark in die Blutzirkulation, der anschließende Transport der Zellen zum Zielort und letztlich wiederum die transendotheliale Migration aus den Blutgefäßen in das Zielgewebe. Dort kommt es zur Integration der EPCs in die Gefäßwand, gefolgt von der *in situ* Differenzierung zu reifen Endothelzellen. Auch wenn, die diesem Vorgang zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht abschließend geklärt sind, gibt es Hinweise, dass das Mikromilieu der Gefäße einen entscheidenden Einfluss auf die Rekrutierung und die biologischen Eigenschaften der EPCs hat [217-219]. Ein angiogenetisch wirksamer Bestandteil dieses Mikromilieus ist CYR61, welches unter anderem von Gefäßzellen exprimiert und sezerniert wird. Es sind verschiedene Möglichkeiten der Einflussnahme von CYR61 auf die EPC-vermittelte Neovaskularisation denkbar.

Sehr wahrscheinlich ist CYR61 in der Lage die transendotheliale Migration von EPCs zu fördern. Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass CYR61 die transendotheliale Migration und die Gewebemigration von CD34<sup>+</sup> Zellen, die eine entscheidende Rolle in der Angiogenese spielen, induzieren kann

[157, 220]. Es wurde eine CYR61-induzierte Zunahme der Sekretion von MMP-9 durch CD34<sup>+</sup> Zellen festgestellt [157]. MMP-9 ist in erster Linie an der Mobilisierung von EPCs aus dem Knochenmark beteiligt [221], aber auch nachweislich mit Angiogenese assoziiert [222]. Ein möglicher Mechanismus der Interaktion von CYR61 und anderen angiogenetischen Faktoren mit EPCs scheint also, die Induktion der Freisetzung von MMP-9 aus den Vorläuferzellen zu sein, wodurch die transendotheliale Migration der Vorläuferzellen vorangetrieben wird [157, 221-223].

Auch bei der „Zielfindung“, dem Homing, der EPCs sind Einflüsse von angiogenetischen Faktoren, wie CYR61, denkbar. CYR61 wurde zunächst in humanem Plasma gefunden [12]. Dies könnte auf einen parakrinen Effekt von CYR61 auf EPCs, vergleichbar mit sezernierten Chemokinen, hinweisen. So könnte CYR61 über die Ausbildung eines Konzentrationsgradienten für die Anlockung zirkulierender EPCs an Stellen mit Endothelschädigung sorgen [157]. Die Plasmaspiegel von CYR61 liegen mit 10-100ng/ml etwa in der selben Spanne, wie CYR61-Spiegel, die Signaleffekte in Zellkulturen und *in vivo* Studien haben [157].

Ein weiterer denkbarer Mechanismus zur Interaktion von CYR61 mit EPCs ist eine spezifische Bindung von CYR61 an Integrine auf der Oberfläche von EPCs. Eine Grundlage der Vermittlung der CYR61-Wirkungen (Zelladhäsion, Zellmigration und Zellproliferation) auf Gefäßzellen stellt die spezifische Bindung an Integrine, wie  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_M\beta_2$  und  $\alpha_V\beta_3$ , dar [125, 128, 130, 134]. Auch auf zirkulierenden peripheren CD34<sup>+</sup> Blutzellen konnte die Expression der CYR61-spezifischen Integrine  $\alpha_M\beta_2$  und  $\alpha_V\beta_3$  nachgewiesen werden, die dort eine strukturelle Grundlage für die generelle Empfindlichkeit der Vorläuferzellen für CYR61 bieten [157, 224, 225]. Dementsprechend konnte die Bindung von CYR61 an CD34<sup>+</sup> Zellen durch Integrin-antagonisierende RGD-Peptide blockiert werden und gezeigt werden, dass die CYR61-induzierte Adhäsion von CD34<sup>+</sup> Zellen an endotheliale Monolayer durch Integrine vermittelt wird. Dies ist von biologischer Bedeutung, da das Zellrekrutement von Integrin-vermittelter fester Adhäsionen und Diapedese abhängt [157].

Darüber hinaus zeigten Yu et al. [216], dass gesteigert exprimiertes exogenes CYR61 zur Induktion von VEGF und MCP-1 und zur gesteigerten Proliferation, Migration und Röhrenbildung von EPCs beiträgt. Wohingegen eine Inhibition der *CYR61*-Expression zu verminderter Migration und Röhrenbildung von EPCs führt.

EPCs und CYR61 scheinen also zu verschiedenen Zeitpunkten, an zahlreichen Orten und durch diverse molekulare Mechanismen miteinander zu interagieren. Um die Vorgänge besser zu verstehen und gegebenenfalls beeinflussen zu können bedarf es weiterer Studien.

## **IV.6. Ausblick**

### **IV.6.1. EPCs eröffnen neue Therapiemöglichkeiten**

Aus dem wachsenden Verständnis der Mechanismen, die der EPC-vermittelten Neovaskularisation zugrunde liegen, ergeben sich Möglichkeiten zur Einflussnahme auf diesen Prozess. Dadurch eröffnet sich ein weites Feld neuer therapeutischer Optionen. Besonders vielversprechend erscheint die Transplantation und Stimulation von EPCs zur Gewährleistung einer adäquaten Blutversorgung durch die Neubildung von Blutgefäßen in ischämisch geschädigtem Gewebe oder auch in mittels Tissue Engineering neugebildetem, noch nicht vaskularisiertem Gewebe. Im Gegenteil dazu ist aber auch eine spezifische Inhibition von EPCs im Rahmen einer antiangiogenetischen Tumorthherapie denkbar [80].

#### **IV.6.1.1. Regeneration von ischämischem Gewebe**

Auf der Grundlage des erfolgreichen Einsatzes von EPCs zur Verbesserung der Regeneration von geschädigten Gefäßen und ischämischem Gewebe in Tiermodellen [77, 78], wurden in den letzten Jahren bereits erste klinische Studien zur Untersuchung der therapeutischen Verwendung von EPCs beim Menschen entworfen und durchgeführt [79].

Beispielsweise untersuchte die bedeutsame Pilotstudie TOPCARE-AMI den therapeutischen Einsatz von EPCs nach akutem Myokardinfarkt (AMI) [169, 226, 227]. Im Rahmen dieser Studie erhielten Patienten mit reperfundiertem AMI wenige Tage nach dem kardialen Ereignis eine Infusion von autologen EPCs in die Infarktarterie. Vier Monate später wurde die

Herzfunktion der Patienten angiografisch und echokardiografisch untersucht, wobei sich eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Funktion, der Wandbewegung im Infarktareal und der Durchblutung der Infarktarterie zeigte [169]. Die nach einem Jahr durchgeführte kontrastverstärkte Magnetresonanztomografie ergab eine verbesserte linksventrikuläre Funktion, eine Verkleinerung des Infarktareals und keinen Nachweis einer reaktiven Hypertrophie [226, 227]. Die Ergebnisse konnten auch in der BOOST-Studie mit ähnlichem Studiendesign bestätigt werden [228]. Stamm et al. injizierten im Rahmen einer weiteren Studie bei Patienten, deren AMI mittels koronarer Bypassoperation therapiert wurde, unmittelbar nach der Operation autologe CD133<sup>+</sup> Knochenmarkszellen in das minderperfundierte Myokard der Infarkttrandzone [229]. Auch diese intramyokardiale Transplantation von Vorläuferzellen führte zu einer deutlich verbesserten linksventrikulären Funktion und Perfusion des Infarktareals [229]. Mit diesen klinischen Studien gelang folglich der Nachweis eines positiven Einflusses, der intrakoronaren oder intramyokardialen Transplantation von autologen EPC nach AMI, auf die funktionelle Regeneration des geschädigten Ventrikels und das Remodeling des Infarktareals.

#### **IV.6.1.2. Der Einsatz von EPCs in der regenerativen Medizin**

Vielversprechend erscheint auch der Einsatz von EPCs in der regenerativen Medizin, zu dessen zentralen Technologien das Tissue Engineering zählt. Beim Tissue Engineering werden einem Organismus lebende Zellen entnommen und diese als dreidimensionales Konstrukt kultiviert. Anschließend kann dieses bioartifizielle Gewebekonstrukt in den Organismus implantiert werden. Auf diese Weise kann beispielsweise zerstörtes, nicht regenerationsfähiges Körpergewebe ersetzt werden. Der autologe Zellanteil dieser Implantate verringert im Empfängerorganismus das Risiko für Komplikationen, wie Abstoßungs- oder Unverträglichkeitsreaktionen. Zudem können Tissue Engineering Implantate nicht nur strukturelle, sondern auch funktionelle Defekte beheben, da sie dem zu ersetzenden Körpergewebe entsprechen.

Insbesondere im muskuloskelettalen Bereich sind für zahlreiche Zelltypen bereits Isolations- und Kulturprotokolle etabliert und extrazelluläre Trägermatrices stehen zur Verfügung. So werden heute bereits mittels Tissue Engineering hergestellte Gewebekonstrukte, von beispielsweise Haut und Knorpel, erfolgreich transplantiert [230, 231]. Dabei nehmen Haut- und Knorpeltransplantate jedoch gegenüber anderen Geweben eine Sonderrolle ein: dünne Hautkonstrukte und bradytrophes Knorpelgewebe stellen keine hohen Anforderungen an ihre Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen. Konstrukte mit größerem Volumen sind hingegen auf das Einwachsen von Blutgefäßen angewiesen. Allerdings benötigt das Einwachsen von Wirtsgefäßen nach der Implantation eines Gewebekonstruktes in den Organismus mehrere Tage, so dass in dieser frühen Postimplantationsphase zahlreiche der transplantierten Zellen aufgrund mangelnder Blutversorgung durch Apoptose verloren gehen [232, 233].

Durch die therapeutische Induktion von Gefäßneubildung in größeren dreidimensionalen Gewebekonstrukten könnte bereits vor deren Implantation ein funktionsfähiges Gefäßnetz in die Konstrukte integriert werden. Auf diese Weise würde eine frühzeitige Vaskularisierung der Gewebekonstrukte gewährleistet und damit ein besseres Überleben des Implantats erzielt.

Erste Versuche hierzu wurden bereits unter Verwendung von HUVECs (engl. *human umbilical vein endothelial cells*) durchgeführt. Rouwenka et. al. beobachteten bei der *in vitro* Kokultur von HUVECs mit hMSCs (humanen MSCs) die Ausbildung eines dreidimensionalen prevaskulären Netzwerkes [234]. Steffens et al. konnten auch bei der Kokultur von HUVECs mit humanen primären Osteoblasten auf Knochengewebekonstrukten *in vivo* die Entwicklung eines komplexen dreidimensionalen Netzwerkes aus perfundierten neugebildeten humanen Gefäßen nachweisen, die auch Anschluss an das Wirtsgefäßnetz fanden [235].

Die Verbesserung der Blutgefäßversorgung von Tissue Engineering Konstrukten *in vivo* ist aktuell auch ein Ziel des EU-geförderten Projekts VasuBone, welches sich mit der Regeneration von Knochen *in vitro* und *in vivo* befasst. In einem Teilprojekt soll die Interaktion von MSCs und EPCs *in*

*vitro* und auf Konstrukten untersucht werden. Dabei soll unter anderem auch CYR61 zur *ex vivo* Vermehrung von EPCs eingesetzt werden, mit dem Ziel eine ausreichende Anzahl an EPCs für das Tissue Engineering zu erhalten.

#### IV.6.2. Hürden und Lösungsansätze

Um durch die Transplantation von EPCs einen relevanten vaskulogenen Effekt in einem minderperfundierten Gewebe zu erzielen, müssen Menge und Funktionalität der übertragenen EPCs ausreichend sein. Wie bereits angeführt, ist die Menge zirkulierender EPCs im menschlichen Blut sehr gering. Zudem scheint ungünstigerweise gerade bei Hochrisiko-Patienten die Funktion der EPCs beeinträchtigt zu sein [236]. Deshalb sind vermutlich gerade diejenigen Patienten, die den höchsten Bedarf an EPCs haben, am wenigsten in der Lage, ausreichend Zellen für eine autologe Zelltransplantation zu spenden [237]. Möglichkeiten zur Überwindung dieser Hürden wären eine *ex vivo* Expansion und gegebenenfalls eine genetische Modifikation der EPCs im Vorfeld der Transplantation. Bislang waren keine konkreten Methoden bekannt, um die Vermehrung der EPCs außerhalb des Körpers voranzutreiben. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen deutlich darauf hin, dass CYR61 dafür in Frage kommen könnte.

Erste Untersuchungen zur Verbesserung der Funktionalität der EPCs durch eine genetische Modifikation wurden von Iwaguro et al. durchgeführt [168]. Nach einem *ex vivo* Gentransfer von VEGF zeigte sich eine signifikante Verbesserung der EPC-Funktion. Als Maß für die Funktionsverbesserung galt *in vitro* eine Steigerung der Proliferation und der Adhäsion und *in vivo* eine vermehrte Inkorporation von genmodifizierten EPCs in das Gefäßnetz eines Gliedmaßenischämie-modells der Maus. Im menschlichen Organismus wurden diesbezüglich noch keine Studien durchgeführt.

Ein interessantes gentechnisches Experiment könnte auch ein Gentransfer des *CYR61*-Gens in EPCs darstellen. Es wäre denkbar, dass auf diese Weise gentechnisch modifizierte EPCs eine gesteigerte Proliferationsrate aufweisen. Eine Transplantation solcher EPCs in mindervaskularisiertes Gewebe könnte folglich auch *in vivo* eine Verbesserung der Gefäßbildung zur Folge haben.

Wie bei den meisten Therapieverfahren dürfen auch bei der therapeutischen Verwendung von EPCs mögliche negative Nebeneffekte nicht außer acht gelassen werden. Hierzu zählen in erster Linie die Induktion einer unkontrollierten Neovaskularisation, die eine Neointimabildung oder ein Wachstum von Tumoren oder arteriosklerotischen Plaques zur Folge haben könnte. Um dem entgegenzuwirken, ist eine gezielte lokale Applikation von *ex vivo* vermehrten EPCs in der Nähe des ischämischen Gebietes anzustreben [13]. Demzufolge könnte, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, CYR61 künftig eine entscheidende Rolle bei der EPC-vermittelten therapeutischen Neovaskularisation spielen.

## V. Zusammenfassung

Die Blutversorgung über intakte Blutgefäße ist eine Grundvoraussetzung für das Überleben und die Funktionsfähigkeit aller Gewebe im menschlichen Organismus. Da auch im adulten Organismus ständig Wachstums-, Regenerations- und Umbauprozesse stattfinden, die eine Anpassung des Gefäßsystems voraussetzen, muss auch postnatal die Möglichkeit zur Neubildung von Blutgefäßen bestehen. Neben der seit langem bekannten Angiogenese [9], ermöglichen EPCs auch postnatal die als Vaskulogenese [12, 13] bezeichnete *De-novo*-Bildung von Blutgefäßen ausgehend von endothelialen Vorläuferzellen [4]. EPCs können aus dem Knochenmark in die periphere Zirkulation mobilisiert und gezielt an die Stellen im Organismus rekrutiert werden, an denen Gefäßneubildung oder Endothelregeneration nötig sind [13]. Auf ihrem Weg vom Knochenmark zum Zielgewebe sind die im Blut zirkulierenden EPCs einem Reifungsprozess unterworfen [48]. Allerdings differenzieren sie erst im Zielgewebe *in situ* zu reifen Endothelzellen und tragen dort auf diese Weise zur Bildung neuer Blutgefäße und zur Reparatur von geschädigtem Endothel bei [48].

CYR61 ist ein Protein der Strukturfamilie der CCN-Familie, deren Mitglieder an der Steuerung grundlegender zellulärer Vorgänge beteiligt sind [88]. Für CYR61 konnte darüber hinaus eine angiogenetische Wirkung nachgewiesen werden [155]. So vermag CYR61 die Proliferation, Migration und Adhäsion von Endothelzellen *in vitro* zu steigern, aber auch *in vivo* kommt es CYR61-vermittelt zur Induktion von Neovaskularisation [97, 133, 153-156]. Beispielsweise führt Sauerstoffmangel zur *CYR61*-Überexpression im Gewebe, was eine Induktion der Gefäßneubildung zur Folge hat [115]. Dementsprechend konnte in verschiedenen, mit Neovaskularisation einhergehenden, physiologischen und pathologischen Prozessen im Organismus eine *CYR61*-Überexpression und infolgedessen eine CYR61-vermittelte Neovaskularisation beobachtet werden [119].

Die Beteiligung von EPCs und CYR61 an der Blutgefäßbildung legt nahe, dass diese beiden angiogenetischen Faktoren möglicherweise auch miteinander interagieren und sich im Bezug auf die Neubildung von Blutgefäßen positiv beeinflussen können. In dieser Arbeit wurden daher aus



dem peripheren Blut gewonnene, *in vitro* kultivierte EPCs mit rekombinantem CYR61 behandelt. Dabei konnte in mit CYR61 supplementierten EPC-Kulturansätzen eine deutlich gesteigerte Zellproliferation beobachtet werden, verglichen mit unbehandelten EPC-Kulturenansätzen.

Dies warf die Frage auf, ob CYR61 ein potenter Stimulator der *ex vivo* Expansion von EPCs ist. Führt die Behandlung von *in vitro* kultivierten EPCs mit CYR61 regelmäßig zu einer deutlichen Steigerung der EPC-Zahl? Wird durch den Einfluss von CYR61 die Oberflächenmarkerexpression und damit der Differenzierungsgrad der EPCs verändert?

Die *in vitro* Kultur von EPCs unter CYR61-Supplementierung erbrachte regelmäßig eine deutliche konzentrationsabhängige Steigerung der EPC-Zahl infolge der CYR61-Behandlung. Vergleichende durchflusszytometrische und immunhistochemische Analysen des Oberflächenexpressionsprofils von mit CYR61 behandelten EPCs und unbehandelten Kontrollzellen zeigten, dass es sich bei den untersuchten Zellen um EPCs handelte und, dass die Behandlung mit CYR61 keinen Einfluss auf den Phänotyp und damit die Differenzierung der Zellen hatte. Es konnte also gezeigt werden, dass es sich bei der Behandlung von aus dem peripheren Blut isolierten und *in vitro* kultivierten EPCs mit CYR61 um ein geeignetes Verfahren zur *ex vivo* Multiplikation von EPCs handelt.

Eine Modulation der Neovaskularisation oder Endothelregeneration mit Hilfe von EPCs könnte in verschiedenen medizinischen Bereichen künftig ein vielversprechendes therapeutisches Mittel darstellen. Hierzu zählen vor allem die Regeneration von ischämisch geschädigtem Gewebe, die Inhibition der Vaskularisation von Tumoren und die Verbesserung der Durchblutung von mittels Tissue Engineering erzeugten dreidimensionalen Gewebekonstrukten.

Nachdem in Tiermodellen mit Hilfe der Transplantation von EPCs die Regeneration von ischämischem Gewebe verbessert werden konnte [56, 77, 78, 206], kommen EPCs bereits heute im Rahmen von klinischen Studien zum Einsatz [79, 169, 226, 227]. Beispielsweise konnte durch intrakoronare und intramyokardiale Transplantation von autologen EPCs nach akutem

Myokardinfarkt die funktionelle Regeneration des geschädigten Ventrikels und das Remodeling des Infarktareals positiv beeinflusst werden [169, 226-229].

Allerdings ist der therapeutische Einsatz der EPCs derzeit noch durch die geringe Zellzahl limitiert, die aus dem Blut eines Patienten gewonnen werden kann. Eine Möglichkeit, um diese Hürde künftig zu überwinden, zeigt diese Arbeit: Die *ex vivo* Expansion von autologen EPCs mit Hilfe von CYR61. Die Zusammenschau der wissenschaftlichen Literatur und der Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass durch Stimulation mit CYR61, und gegebenenfalls weiteren angiogenetischen Faktoren, aus dem Blut isolierte EPCs *ex vivo* so stark vermehrt werden könnten, dass der klinischer Einsatz der Zellen erleichtert wird und damit vielversprechende neue Therapieoptionen eröffnet werden.

## VI. VERZEICHNISSE

### VI.1. Abkürzungsverzeichnis

AP-1	engl. <i>Activator protein-1</i>
Asc-2-P	<i>Ascorbat-2-Phosphat</i>
AMI	<i>Akuter Myokardinfarkt</i>
BFGF	engl. <i>Basic fibroblastic growth factor</i>
BPM	engl. <i>Bone morphogenic proteins</i>
CAC	engl. <i>Circulating angiogenic cell</i>
CCN	Akronym ( <i>CYR61, CTGF, NOV</i> ) für die Familie der CCN-Proteine
CEC	engl. <i>Circulating endothelial cell</i>
CD	engl. <i>Cluster of Differentiation</i> ,
CFU	engl. <i>colony forming unit</i> , koloniebildene Einheit
CTGF	engl. <i>Connective tissue growth factor</i> , CCN2
CYR61	engl. <i>Cystein-rich protein 61</i> , Cystein-reiches Protein 61, CCN1
<i>Cyr61</i>	Gen des CYR61-Proteins
EEPC	engl. <i>Early endothelial progenitor cell</i>
EGF	engl. <i>Endothelial growth factor</i>
EPC	engl. <i>Endothelial progenitor cell</i> , endotheliale Vorläuferzelle
ERK1/2	engl. <i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
EZ	Endothelzelle
EZM	Extrazellulärmatrix
FAK	engl. <i>fokal adhesion kinase</i>
FACS	engl. <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> , Durchflusszytometrie
Flt-1	engl. <i>Fms-like tyrosine kinase-1</i> , VEGF-Rezeptor-1
FSC	engl. <i>Forward Scatter</i>
G-CSF	engl. <i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
GM-CSF	engl. <i>Granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
HE	Haematoxylin/Eosin
HIF-1 $\alpha$	engl. <i>Hypoxia-inducible factor-1<math>\alpha</math></i>
HSC	engl. <i>Hematopoietic stem cell</i> , hämatopoetische Stammzelle
HSPG	Heparan-Sulfat-Proteoglykan
HUVEC	engl. <i>human umbilical vein endothelial cell</i>
IGF-1	engl. <i>Insulin-like growth factor-1</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KDR	engl. <i>Kinase domain region</i> , VEGF-Rezeptor-2
KHK	Koronare Herzkrankheit
KM	Knochenmark
AcLDL	Acetyliertes Low density Lipoprotein
LEPC	engl. <i>Late endothelial progenitor cell</i>
min	Minute
MAPK	engl. <i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MCAM	engl. <i>Melanoma-associated cell adhesion molecule</i> , CD146
MMP-9	Matrixmetalloproteinase-9
MNZ	Mononukleäre Zellen
MSC	engl. <i>Mesenchymal stem cell</i> , mesenchymale Stammzelle
$\mu$ m	Mikrometer
NO	engl. <i>Nitric oxide</i> , Stickstoffmonoxid

ENOS	endotheliale <u>NO</u> -Synthase
NOV	engl. <u>N</u> ephroblastoma <u>o</u> verexpressed, CCN3
PDGF	engl. <u>P</u> latelet- <u>d</u> erived <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
PECAM-1	engl. <u>P</u> latelet <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ell <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule-1, CD31
Pen/Strep	Penicillin/ Streptomycin
PMT	engl. <u>P</u> hotom <u>u</u> ltiplier <u>t</u> ube
PTCA	Perkutane <u>t</u> ransluminale <u>C</u> oronar- <u>A</u> ngioplastie
ROS	engl. <u>R</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies
SDF-1	engl. <u>S</u> tromal <u>c</u> ell- <u>d</u> erived <u>f</u> actor-1
SSC	engl. <u>S</u> ideward <u>S</u> catter
TGF- $\beta$	engl. <u>T</u> ransforming <u>g</u> rowth <u>f</u> actor- $\beta$
TNF- $\alpha$	engl. <u>T</u> umor- <u>N</u> ekrosis- <u>F</u> aktor- $\alpha$
OEC	engl. <u>O</u> utgrowth <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ells
PBS	engl. <u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
SRE	engl. <u>S</u> erum <u>r</u> esponse <u>e</u> lement
VCAM	engl. <u>V</u> ascular <u>c</u> ell <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule-1, CD106
VE-Cad	engl. <u>V</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>c</u> adherin, CD144
VEGF	engl. <u>V</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
VSMC	engl. <u>V</u> ascular <u>s</u> mooth <u>m</u> uscle <u>c</u> ell
WISP	engl. <u>W</u> nt-1 <u>i</u> nduced <u>s</u> ecreted <u>p</u> roteins, CCN4-6

## VI.2. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b>	Mechanismen der postnatalen Neovaskularisation.	6
<b>Abbildung 2</b>	EPC-Reifung.	8
<b>Abbildung 3</b>	Modulare Sekundärstruktur der CCN-Proteine.	13
<b>Abbildung 4</b>	Zelluläre Wirkungsvermittlung von CYR61.	17
<b>Abbildung 5</b>	Isolierung mononukleärer Zellen (MNZ) aus Vollblut.	28
<b>Abbildung 6</b>	CYR61-Proteinkonzentrationen in den Eluatfraktionen.	40
<b>Abbildung 7</b>	Konzentrationsreihe.	42
<b>Abbildung 8</b>	Zunahme der EPC-Zahl nach CYR61-Behandlung.	43
<b>Abbildung 9</b>	Morphologie und Wachstumsverhalten der EPCs.	45
<b>Abbildung 10</b>	Morphologie und Wachstumsverhalten im Zeitverlauf.	46
<b>Abbildung 11</b>	FACS-Analysen der Oberflächenmarkerexpression.	49
<b>Abbildung 12</b>	Immunhistochemische Charakterisierung von EPCs.	54

## VI.3. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b>	Geräte.	21
<b>Tabelle 2</b>	Verbrauchsmaterialien.	21
<b>Tabelle 3</b>	Chemikalien.	22
<b>Tabelle 4</b>	Kommerzielle Laborkits.	22
<b>Tabelle 5</b>	Puffer und Lösungen.	23
<b>Tabelle 6</b>	Zellen und Zellkulturmedien.	23
<b>Tabelle 7</b>	Antikörper für die FACS-Analysen.	24
<b>Tabelle 8</b>	Antikörper für die Immunhistochemischen Analysen.	24
<b>Tabelle 9</b>	Software zur Datenauswertung.	24
<b>Tabelle 10</b>	Versuchsreihen und zugehörige Zellkulturansätze.	30

#### VI.4. Literaturverzeichnis

1. Griffioen, A.W. and G. Molema, *Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation*. *Pharmacol Rev*, 2000. **52**(2): p. 237-68.
2. Buschmann, I. and W. Schaper, *Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth*. *News Physiol Sci*, 1999. **14**: p. 121-125.
3. Flamme, I. and W. Risau, *Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro*. *Development*, 1992. **116**(2): p. 435-9.
4. Risau, W. and I. Flamme, *Vasculogenesis*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995. **11**: p. 73-91.
5. Choi, K., *Hemangioblast development and regulation*. *Biochem Cell Biol*, 1998. **76**(6): p. 947-56.
6. Choi, K., et al., *A common precursor for hematopoietic and endothelial cells*. *Development*, 1998. **125**(4): p. 725-32.
7. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. *Nat Med*, 2000. **6**(4): p. 389-95.
8. Conway, E.M., D. Collen, and P. Carmeliet, *Molecular mechanisms of blood vessel growth*. *Cardiovasc Res*, 2001. **49**(3): p. 507-21.
9. Folkman, J. and Y. Shing, *Angiogenesis*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(16): p. 10931-4.
10. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. *Nature*, 1997. **386**(6626): p. 671-4.
11. Patan, S., L.L. Munn, and R.K. Jain, *Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma xenograft: a novel mechanism of tumor angiogenesis*. *Microvasc Res*, 1996. **51**(2): p. 260-72.
12. Asahara, T., et al., *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis*. *Science*, 1997. **275**(5302): p. 964-7.
13. Hristov, M. and C. Weber, *Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance*. *J Cell Mol Med*, 2004. **8**(4): p. 498-508.
14. Aicher, A., A.M. Zeiher, and S. Dimmeler, *Mobilizing endothelial progenitor cells*. *Hypertension*, 2005. **45**(3): p. 321-5.
15. Peichev, M., et al., *Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors*. *Blood*, 2000. **95**(3): p. 952-8.
16. Powell, T.M., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(2): p. 296-301.
17. Takahashi, T., et al., *Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization*. *Nat Med*, 1999. **5**(4): p. 434-8.
18. Moore, M.A., et al., *Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1*. *Ann N Y Acad Sci*, 2001. **938**: p. 36-45; discussion 45-7.
19. Yamaguchi, J., et al., *Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization*. *Circulation*, 2003. **107**(9): p. 1322-8.

20. Kalka, C., et al., *VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease*. *Ann Thorac Surg*, 2000. **70**(3): p. 829-34.
21. Hattori, K., et al., *Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells*. *J Exp Med*, 2001. **193**(9): p. 1005-14.
22. Heeschen, C., et al., *Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization*. *Blood*, 2003. **102**(4): p. 1340-6.
23. Bahlmann, F.H., et al., *Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells*. *Blood*, 2004. **103**(3): p. 921-6.
24. Iwakura, A., et al., *Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury*. *Circulation*, 2003. **108**(25): p. 3115-21.
25. Strehlow, K., et al., *Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation*. *Circulation*, 2003. **107**(24): p. 3059-65.
26. Dimmeler, S., et al., *HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(3): p. 391-7.
27. Llevadot, J., et al., *HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(3): p. 399-405.
28. Vasa, M., et al., *Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease*. *Circulation*, 2001. **103**(24): p. 2885-90.
29. Laufs, U., et al., *Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis*. *Circulation*, 2004. **109**(2): p. 220-6.
30. Yin, T. and L. Li, *The stem cell niches in bone*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(5): p. 1195-201.
31. Papayannopoulou, T., *Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization*. *Blood*, 2004. **103**(5): p. 1580-5.
32. Heissig, B., et al., *Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand*. *Cell*, 2002. **109**(5): p. 625-37.
33. Aicher, A., et al., *Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells*. *Nat Med*, 2003. **9**(11): p. 1370-6.
34. Vajkoczy, P., et al., *Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis*. *J Exp Med*, 2003. **197**(12): p. 1755-65.
35. Dimmeler, S., A.M. Zeiher, and M.D. Schneider, *Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(3): p. 572-83.
36. Ceradini, D.J., et al., *Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1*. *Nat Med*, 2004. **10**(8): p. 858-64.
37. De Falco, E., et al., *SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells*. *Blood*, 2004. **104**(12): p. 3472-82.

38. Chavakis, E., et al., *Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells*. J Exp Med, 2005. **201**(1): p. 63-72.
39. Gulati, R., et al., *Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood*. Circ Res, 2003. **93**(11): p. 1023-5.
40. Rehman, J., et al., *Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors*. Circulation, 2003. **107**(8): p. 1164-9.
41. Hur, J., et al., *Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(2): p. 288-93.
42. Ingram, D.A., N.M. Caplice, and M.C. Yoder, *Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1525-31.
43. Khan, S.S., M.A. Solomon, and J.P. McCoy, Jr., *Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry*. Cytometry B Clin Cytom, 2005. **64**(1): p. 1-8.
44. Blann, A.D. and A. Pretorius, *Circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells: two sides of the same coin, or two different coins?* Atherosclerosis, 2006. **188**(1): p. 12-8.
45. Bagley, R.G., et al., *Endothelial precursor cells as a model of tumor endothelium: characterization and comparison with mature endothelial cells*. Cancer Res, 2003. **63**(18): p. 5866-73.
46. *synovium*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(6): p. 1817-26.
54. Zammaretti, P. and A.H. Zisch, *Adult 'endothelial progenitor cells'. Renewing vasculature*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(3): p. 493-503.
55. Urbich, C. and S. Dimmeler, *Endothelial progenitor cells functional characterization*. Trends Cardiovasc Med, 2004. **14**(8): p. 318-22.
56. Kalka, C., et al., *Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3422-7.
57. Galiano, R.D., et al., *Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting* Gehling, U.M., et al., *In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells*. Blood, 2000. **95**(10): p. 3106-12.
47. Badorff, C., et al., *Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes*. Circulation, 2003. **107**(7): p. 1024-32.
48. Iwami, Y., H. Masuda, and T. Asahara, *Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future*. J Cell Mol Med, 2004. **8**(4): p. 488-97.
49. Shi, Q., et al., *Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells*. Blood, 1998. **92**(2): p. 362-7.
50. Kaushal, S., et al., *Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo*. Nat Med, 2001. **7**(9): p. 1035-40.
51. Hristov, M., W. Erl, and P.C. Weber, *Endothelial progenitor cells: isolation and characterization*. Trends Cardiovasc Med, 2003. **13**(5): p. 201-6.

52. Masuda, H. and T. Asahara, *Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration*. *Cardiovasc Res*, 2003. **58**(2): p. 390-8.
53. Silverman, M.D., et al., *The role of vascular cell adhesion molecule 1/ very late activation antigen 4 in endothelial progenitor cell recruitment to rheumatoid arthritis bone marrow-derived cells*. *Am J Pathol*, 2004. **164**(6): p. 1935-47.
58. Asai, J., et al., *Dibutyl cAMP influences endothelial progenitor cell recruitment during wound neovascularization*. *J Invest Dermatol*, 2006. **126**(5): p. 1159-67.
59. Hanahan, D., et al., *Transgenic mouse models of tumour angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models*. *Eur J Cancer*, 1996. **32A**(14): p. 2386-93.
60. Lee, D.Y., et al., *Mobilization of endothelial progenitor cells in fracture healing and distraction osteogenesis*. *Bone*, 2008. **42**(5): p. 932-41.
61. Umemura, T. and Y. Higashi, *Endothelial progenitor cells: therapeutic target for cardiovascular diseases*. *J Pharmacol Sci*, 2008. **108**(1): p. 1-6.
62. Colville-Nash, P.R. and D.L. Scott, *Angiogenesis and rheumatoid arthritis: pathogenic and therapeutic implications*. *Ann Rheum Dis*, 1992. **51**(7): p. 919-25.
63. Bergers, G. and L.E. Benjamin, *Tumorigenesis and the angiogenic switch*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(6): p. 401-10.
64. Shintani, S., et al., *Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction*. *Circulation*, 2001. **103**(23): p. 2776-9.
65. Park, S., et al., *Selective recruitment of endothelial progenitor cells to ischemic tissues with increased neovascularization*. *Plast Reconstr Surg*, 2004. **113**(1): p. 284-93.
66. Zhang, H., et al., *Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: implications and significance*. *Blood*, 2005. **105**(8): p. 3286-94.
67. Rafii, S., B. Heissig, and K. Hattori, *Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors*. *Gene Ther*, 2002. **9**(10): p. 631-41.
68. Shaked, Y., et al., *Genetic heterogeneity of the vasculogenic phenotype parallels angiogenesis; Implications for cellular surrogate marker analysis of antiangiogenesis*. *Cancer Cell*, 2005. **7**(1): p. 101-11.
69. Moldovan, N.I. and T. Asahara, *Role of blood mononuclear cells in recanalization and vascularization of thrombi: past, present, and future*. *Trends Cardiovasc Med*, 2003. **13**(7): p. 265-9.
70. Asahara, T., et al., *VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells*. *Embo J*, 1999. **18**(14): p. 3964-72.
71. Murohara, T., et al., *Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization*. *J Clin Invest*, 2000. **105**(11): p. 1527-36.
72. Lyden, D., et al., *Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth*. *Nat Med*, 2001. **7**(11): p. 1194-201.
73. Peters, B.A., et al., *Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature*. *Nat Med*, 2005. **11**(3): p. 261-2.



74. Voswinckel, R., et al., *Circulating vascular progenitor cells do not contribute to compensatory lung growth*. *Circ Res*, 2003. **93**(4): p. 372-9.
75. Rajantie, I., et al., *Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells*. *Blood*, 2004. **104**(7): p. 2084-6.
76. Ziegelhoeffer, T., et al., *Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature*. *Circ Res*, 2004. **94**(2): p. 230-8.
77. Kocher, A.A., et al., *Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function*. *Nat Med*, 2001. **7**(4): p. 430-6.
78. Rauscher, F.M., et al., *Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis*. *Circulation*, 2003. **108**(4): p. 457-63.
79. Tendera, M. and W. Wojakowski, *Clinical trials using autologous bone marrow and peripheral blood-derived progenitor cells in patients with acute myocardial infarction*. *Folia Histochem Cytobiol*, 2005. **43**(4): p. 233-5.
80. Ding, Y.T., S. Kumar, and D.C. Yu, *The role of endothelial progenitor cells in tumour vasculogenesis*. *Pathobiology*, 2008. **75**(5): p. 265-73.
81. Schutze, N., et al., *Differential expression of CCN-family members in primary human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation*. *Cell Commun Signal*, 2005. **3**(1): p. 5.
82. Rouwkema, J., et al., *The Use of Endothelial Progenitor Cells for Prevascularized Bone Tissue Engineering*. *Tissue Eng Part A*, 2009.
83. Usami, K., et al., *Composite implantation of mesenchymal stem cells with endothelial progenitor cells enhances tissue-engineered bone formation*. *J Biomed Mater Res A*, 2008. **90A**(3): p. 730-741.
84. Hristov, M., W. Erl, and P.C. Weber, *Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(7): p. 1185-9.
85. Lau, L.F. and D. Nathans, *Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells*. *Embo J*, 1985. **4**(12): p. 3145-51.
86. O'Brien, T.P., et al., *Expression of *cyr61*, a growth factor-inducible immediate-early gene*. *Mol Cell Biol*, 1990. **10**(7): p. 3569-77.
87. Jay, P., et al., *The human growth factor-inducible immediate early gene, *CYR61*, maps to chromosome 1p*. *Oncogene*, 1997. **14**(14): p. 1753-7.
88. Schutze, N., et al., *The human analog of murine cystein rich protein 61 [correction of 16] is a 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 responsive immediate early gene in human fetal osteoblasts: regulation by cytokines, growth factors, and serum*. *Endocrinology*, 1998. **139**(4): p. 1761-70.
89. Bork, P., *The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor*. *FEBS Lett*, 1993. **327**(2): p. 125-30.
90. Bradham, D.M., et al., *Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product *CEF-10**. *J Cell Biol*, 1991. **114**(6): p. 1285-94.

91. Joliot, V., et al., *Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (nov) in myeloblastosis-associated virus type 1-induced nephroblastomas*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(1): p. 10-21.
92. Brigstock, D.R., et al., *Proposal for a unified CCN nomenclature*. Mol Pathol, 2003. **56**(2): p. 127-8.
93. Brigstock, D.R., *The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family*. Endocr Rev, 1999. **20**(2): p. 189-206.
94. Schutze, N., et al., *Expression, purification, and functional testing of recombinant CYR61/CCN1*. Protein Expr Purif, 2005. **42**(1): p. 219-25.
95. Perbal, B., *CCN proteins: multifunctional signalling regulators*. Lancet, 2004. **363**(9402): p. 62-4.
96. Lechner, A., et al., *The immediate early gene product hCYR61 localizes to the secretory pathway in human osteoblasts*. Bone, 2000. **27**(1): p. 53-60.
97. Brigstock, D.R., *The CCN family: a new stimulus package*. J Endocrinol, 2003. **178**(2): p. 169-75.
98. Kireeva, M.L., et al., *Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(4): p. 1326-34.
99. Leask, A. and D.J. Abraham, *All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 23): p. 4803-10.
100. Schutze, N., et al., *5' flanking sequence of the human immediate early responsive gene ccn1 (cyr61) and mapping of polymorphic CA repeat sequence motifs in the human ccn1 (cyr61) locus*. Mol Pathol, 2001. **54**(3): p. 170-5.
101. Grotendorst, G.R., L.F. Lau, and B. Perbal, *CCN proteins are distinct from and should not be considered members of the insulin-like growth factor-binding protein superfamily*. Endocrinology, 2000. **141**(6): p. 2254-6.
102. Perbal, B., *NOV (nephroblastoma overexpressed) and the CCN family of genes: structural and functional issues*. Mol Pathol, 2001. **54**(2): p. 57-79.
103. Chen, C.C. and L.F. Lau, *Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins*. Int J Biochem Cell Biol, 2008.
104. Bornstein, P. and E.H. Sage, *Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(5): p. 608-16.
105. Charles, C.H., A.S. Abler, and L.F. Lau, *cDNA sequence of a growth factor-inducible immediate early gene and characterization of its encoded protein*. Oncogene, 1992. **7**(1): p. 187-90.
106. Latinkic, B.V., T.P. O'Brien, and L.F. Lau, *Promoter function and structure of the growth factor-inducible immediate early gene cyr61*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(12): p. 3261-7.
107. Brunner, A., et al., *Identification of a gene family regulated by transforming growth factor-beta*. DNA Cell Biol, 1991. **10**(4): p. 293-300.
108. Parisi, M.S., et al., *Expression and regulation of CCN genes in murine osteoblasts*. Bone, 2006. **38**(5): p. 671-7.
109. Bartholin, L., et al., *The human Cyr61 gene is a transcriptional target of transforming growth factor beta in cancer cells*. Cancer Lett, 2007. **246**(1-2): p. 230-6.
110. Latinkic, B.V., et al., *Promoter function of the angiogenic inducer Cyr61 gene in transgenic mice: tissue specificity, inducibility during wound healing, and*

- role of the serum response element.* Endocrinology, 2001. **142**(6): p. 2549-57.
111. Hilfiker, A., et al., *Expression of CYR61, an angiogenic immediate early gene, in arteriosclerosis and its regulation by angiotensin II.* Circulation, 2002. **106**(2): p. 254-60.
  112. Sampath, D., et al., *Aberrant expression of Cyr61, a member of the CCN (CTGF/Cyr61/Cef10/NOVH) family, and dysregulation by 17 beta-estradiol and basic fibroblast growth factor in human uterine leiomyomas.* J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(4): p. 1707-15.
  113. Gashaw, I., et al., *Premenstrual regulation of the pro-angiogenic factor CYR61 in human endometrium.* Endocrinology, 2008. **149**(5): p. 2261-9.
  114. Chen, C.C., F.E. Mo, and L.F. Lau, *The angiogenic factor Cyr61 activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts.* J Biol Chem, 2001. **276**(50): p. 47329-37.
  115. Kunz, M., et al., *Mechanisms of hypoxic gene regulation of angiogenesis factor Cyr61 in melanoma cells.* J Biol Chem, 2003. **278**(46): p. 45651-60.
  116. Quan, T., et al., *Elevated cysteine-rich 61 mediates aberrant collagen homeostasis in chronologically aged and photoaged human skin.* Am J Pathol, 2006. **169**(2): p. 482-90.
  117. Chaqour, B. and M. Goppelt-Struebe, *Mechanical regulation of the Cyr61/CCN1 and CTGF/CCN2 proteins.* FEBS J, 2006. **273**(16): p. 3639-49.
  118. Moussad, E.E. and D.R. Brigstock, *Connective tissue growth factor: what's in a name?* Mol Genet Metab, 2000. **71**(1-2): p. 276-92.
  119. Kubota, S. and M. Takigawa, *CCN family proteins and angiogenesis: from embryo to adulthood.* Angiogenesis, 2007. **10**(1): p. 1-11.
  120. Kim, S.M., et al., *Coxsackievirus B3 infection induces cyr61 activation via JNK to mediate cell death.* J Virol, 2004. **78**(24): p. 13479-88.
  121. Wiedmaier, N., et al., *Bacteria induce CTGF and CYR61 expression in epithelial cells in a lysophosphatidic acid receptor-dependent manner.* Int J Med Microbiol, 2008. **298**(3-4): p. 231-43.
  122. Frazier, K., et al., *Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor.* J Invest Dermatol, 1996. **107**(3): p. 404-11.
  123. Yang, G.P. and L.F. Lau, *Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate early gene, is associated with the extracellular matrix and the cell surface.* Cell Growth Differ, 1991. **2**(7): p. 351-7.
  124. Perbal, B., *The CCN family of genes: a brief history.* Mol Pathol, 2001. **54**(2): p. 103-4.
  125. Lau, L.F. and S.C. Lam, *The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection.* Exp Cell Res, 1999. **248**(1): p. 44-57.
  126. Rachfal, A.W. and D.R. Brigstock, *Structural and functional properties of CCN proteins.* Vitam Horm, 2005. **70**: p. 69-103.
  127. Yeger, H. and B. Perbal, *The CCN family of genes: a perspective on CCN biology and therapeutic potential.* J Cell Commun Signal, 2007. **1**(3-4): p. 159-64.
  128. Kireeva, M.L., S.C. Lam, and L.F. Lau, *Adhesion of human umbilical vein endothelial cells to the immediate-early gene product Cyr61 is mediated through integrin alphavbeta3.* J Biol Chem, 1998. **273**(5): p. 3090-6.
  129. Jedsadayanmata, A., et al., *Activation-dependent adhesion of human platelets to Cyr61 and Fisp12/mouse connective tissue growth factor is*

- mediated through integrin alpha(IIb)beta(3)*. J Biol Chem, 1999. **274**(34): p. 24321-7.
130. Chen, N., C.C. Chen, and L.F. Lau, *Adhesion of human skin fibroblasts to Cyr61 is mediated through integrin alpha 6beta 1 and cell surface heparan sulfate proteoglycans*. J Biol Chem, 2000. **275**(32): p. 24953-61.
  131. Grzeszkiewicz, T.M., et al., *CYR61 stimulates human skin fibroblast migration through Integrin alpha vbeta 5 and enhances mitogenesis through integrin alpha vbeta 3, independent of its carboxyl-terminal domain*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21943-50.
  132. Grzeszkiewicz, T.M., et al., *The angiogenic factor cysteine-rich 61 (CYR61, CCN1) supports vascular smooth muscle cell adhesion and stimulates chemotaxis through integrin alpha(6)beta(1) and cell surface heparan sulfate proteoglycans*. Endocrinology, 2002. **143**(4): p. 1441-50.
  133. Leu, S.J., S.C. Lam, and L.F. Lau, *Pro-angiogenic activities of CYR61 (CCN1) mediated through integrins alphavbeta3 and alpha6beta1 in human umbilical vein endothelial cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 46248-55.
  134. Schober, J.M., et al., *Identification of integrin alpha(M)beta(2) as an adhesion receptor on peripheral blood monocytes for Cyr61 (CCN1) and connective tissue growth factor (CCN2): immediate-early gene products expressed in atherosclerotic lesions*. Blood, 2002. **99**(12): p. 4457-65.
  135. Lin, M.T., et al., *Elevated expression of Cyr61 enhances peritoneal dissemination of gastric cancer cells through integrin alpha2beta1*. J Biol Chem, 2007. **282**(47): p. 34594-604.
  136. Schober, J.M., et al., *Identification of a novel integrin alphaMbeta2 binding site in CCN1 (CYR61), a matricellular protein expressed in healing wounds and atherosclerotic lesions*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25808-15.
  137. Yakubenko, V.P., S.P. Yadav, and T.P. Ugarova, *Integrin alphaDbeta2, an adhesion receptor up-regulated on macrophage foam cells, exhibits multiligand-binding properties*. Blood, 2006. **107**(4): p. 1643-50.
  138. Nishida, T., et al., *CTGF/Hcs24, hypertrophic chondrocyte-specific gene product, interacts with perlecan in regulating the proliferation and differentiation of chondrocytes*. J Cell Physiol, 2003. **196**(2): p. 265-75.
  139. Chen, N., et al., *Identification of a novel integrin alphavbeta3 binding site in CCN1 (CYR61) critical for pro-angiogenic activities in vascular endothelial cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(42): p. 44166-76.
  140. Todorovic, V., et al., *The matrix protein CCN1 (CYR61) induces apoptosis in fibroblasts*. J Cell Biol, 2005. **171**(3): p. 559-68.
  141. Aggarwal, B.B., *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 745-56.
  142. Chen, C.C., et al., *Cytotoxicity of TNFalpha is regulated by integrin-mediated matrix signaling*. EMBO J, 2007. **26**(5): p. 1257-67.
  143. Abreu, J.G., et al., *Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(8): p. 599-604.
  144. Latinkic, B.V., et al., *Xenopus Cyr61 regulates gastrulation movements and modulates Wnt signalling*. Development, 2003. **130**(11): p. 2429-41.
  145. Wang, J.F., et al., *Connective tissue growth factor siRNA modulates mRNA levels for a subset of molecules in normal and TGF-beta 1-stimulated porcine skin fibroblasts*. Wound Repair Regen, 2004. **12**(2): p. 205-16.

146. Shi-wen, X., et al., *CCN2 is necessary for adhesive responses to transforming growth factor-beta1 in embryonic fibroblasts*. J Biol Chem, 2006. **281**(16): p. 10715-26.
147. Kolesnikova, T.V. and L.F. Lau, *Human CYR61-mediated enhancement of bFGF-induced DNA synthesis in human umbilical vein endothelial cells*. Oncogene, 1998. **16**(6): p. 747-54.
148. Ginsberg, M.H., A. Partridge, and S.J. Shattil, *Integrin regulation*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(5): p. 509-16.
149. Menendez, J.A., et al., *A novel CYR61-triggered 'CYR61-alpha3 integrin loop' regulates breast cancer cell survival and chemosensitivity through activation of ERK1/ERK2 MAPK signaling pathway*. Oncogene, 2005. **24**(5): p. 761-79.
150. Xie, D., et al., *Cyr61 is overexpressed in gliomas and involved in integrin-linked kinase-mediated Akt and beta-catenin-TCF/Lef signaling pathways*. Cancer Res, 2004. **64**(6): p. 1987-96.
151. Li, C.L., et al., *A role for CCN3 (NOV) in calcium signalling*. Mol Pathol, 2002. **55**(4): p. 250-61.
152. Safadi, F.F., et al., *Expression of connective tissue growth factor in bone: its role in osteoblast proliferation and differentiation in vitro and bone formation in vivo*. J Cell Physiol, 2003. **196**(1): p. 51-62.
153. Babic, A.M., et al., *CYR61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6355-60.
154. Mo, F.E., et al., *CYR61 (CCN1) is essential for placental development and vascular integrity*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(24): p. 8709-20.
155. Babic, A.M., C.C. Chen, and L.F. Lau, *Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin alpha3beta3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(4): p. 2958-66.
156. Fataccioli, V., et al., *Stimulation of angiogenesis by Cyr61 gene: a new therapeutic candidate*. Hum Gene Ther, 2002. **13**(12): p. 1461-70.
157. Grote, K., et al., *The angiogenic factor CCN1 promotes adhesion and migration of circulating CD34+ progenitor cells: potential role in angiogenesis and endothelial regeneration*. Blood, 2007. **110**(3): p. 877-85.
158. Hilfiker-Kleiner, D., et al., *Regulation of proangiogenic factor CCN1 in cardiac muscle: impact of ischemia, pressure overload, and neurohumoral activation*. Circulation, 2004. **109**(18): p. 2227-33.
159. Lienau, J., et al., *CYR61 (CCN1) protein expression during fracture healing in an ovine tibial model and its relation to the mechanical fixation stability*. J Orthop Res, 2006. **24**(2): p. 254-62.
160. Meyhas, R., et al., *A Key role for cyclic AMP-responsive element binding protein in hypoxia-mediated activation of the angiogenesis factor CCN1 (CYR61) in Tumor cells*. Mol Cancer Res, 2008. **6**(9): p. 1397-409.
161. Vaughn, J.L., et al., *The establishment of two cell lines from the insect Spodoptera frugiperda (Lepidoptera; Noctuidae)*. In Vitro, 1977. **13**(4): p. 213-7.
162. Edgell, C.J., C.C. McDonald, and J.B. Graham, *Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(12): p. 3734-7.

163. Bouis, D., et al., *Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research*. *Angiogenesis*, 2001. **4**(2): p. 91-102.
164. Fernandez Pujol, B., et al., *Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes*. *Differentiation*, 2000. **65**(5): p. 287-300.
165. Fuchs, S., et al., *Outgrowth endothelial cells isolated and expanded from human peripheral blood progenitor cells as a potential source of autologous cells for endothelialization of silk fibroin biomaterials*. *Biomaterials*, 2006. **27**(31): p. 5399-408.
166. Sellner, W., *Gewebe und Zellkultur*. Romeis Mikroskopische Technik, ed. B. P. Vol. 16. Auflage. 1988: Urban u. Schwarzenberg. S. 37-69.
167. Herzenberg, L.A. and S.C. De Rosa, *Monoclonal antibodies and the FACS: complementary tools for immunobiology and medicine*. *Immunol Today*, 2000. **21**(8): p. 383-90.
168. Iwaguro, H., et al., *Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration*. *Circulation*, 2002. **105**(6): p. 732-8.
169. Assmus, B., et al., *Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI)*. *Circulation*, 2002. **106**(24): p. 3009-17.
170. Sandri, M., et al., *Effects of exercise and ischemia on mobilization and functional activation of blood-derived progenitor cells in patients with ischemic syndromes: results of 3 randomized studies*. *Circulation*, 2005. **111**(25): p. 3391-9.
171. Rehman, J., et al., *Exercise acutely increases circulating endothelial progenitor cells and monocyte-/macrophage-derived angiogenic cells*. *J Am Coll Cardiol*, 2004. **43**(12): p. 2314-8.
172. Sugawara, J., et al., *Circulating endothelial progenitor cells during human pregnancy*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. **90**(3): p. 1845-8.
173. Umemura, T., et al., *Aging and Hypertension Are Independent Risk Factors for Reduced Number of Circulating Endothelial Progenitor Cells*. *Am J Hypertens*, 2008.
174. Kondo, T., et al., *Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(8): p. 1442-7.
175. Crockett, J.C., et al., *The matricellular protein CYR61 inhibits osteoclastogenesis by a mechanism independent of  $\alpha$ v $\beta$ 3 and  $\alpha$ v $\beta$ 5*. *Endocrinology*, 2007. **148**(12): p. 5761-8.
176. Schutze, N., et al., *CYR61/CCN1 and WISP3/CCN6 are chemoattractive ligands for human multipotent mesenchymal stroma cells*. *BMC Cell Biol*, 2007. **8**: p. 45.
177. Liu, H., et al., *Cysteine-rich protein 61 and connective tissue growth factor induce deadhesion and anoikis of retinal pericytes*. *Endocrinology*, 2008. **149**(4): p. 1666-77.
178. Fujiyama, S., et al., *Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells*. *Circ Res*, 2003. **93**(10): p. 980-9.
179. Rookmaaker, M.B., et al., *Endothelial progenitor cells: mainly derived from the monocyte/macrophage-containing CD34- mononuclear cell population*

- and only in part from the hematopoietic stem cell-containing CD34+ mononuclear cell population.* Circulation, 2003. **108**(21): p. e150; author reply e150.
180. Mutin, M., et al., *Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells.* Blood, 1999. **93**(9): p. 2951-8.
  181. George, F., et al., *Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo1 monoclonal antibody coupled to immuno-magnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty.* Thromb Haemost, 1992. **67**(1): p. 147-53.
  182. Choi, K., *The hemangioblast: a common progenitor of hematopoietic and endothelial cells.* J Hematother Stem Cell Res, 2002. **11**(1): p. 91-101.
  183. Krause, D.S., et al., *CD34: structure, biology, and clinical utility.* Blood, 1996. **87**(1): p. 1-13.
  184. Fina, L., et al., *Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells.* Blood, 1990. **75**(12): p. 2417-26.
  185. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors.* Nat Med, 2003. **9**(6): p. 669-76.
  186. Millauer, B., et al., *High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis.* Cell, 1993. **72**(6): p. 835-46.
  187. Ziegler, B.L., et al., *KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells.* Science, 1999. **285**(5433): p. 1553-8.
  188. Yin, A.H., et al., *AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells.* Blood, 1997. **90**(12): p. 5002-12.
  189. Solovey, A., et al., *Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia.* N Engl J Med, 1997. **337**(22): p. 1584-90.
  190. DeLisser, H.M., P.J. Newman, and S.M. Albelda, *Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31.* Immunol Today, 1994. **15**(10): p. 490-5.
  191. Baldwin, H.S., et al., *Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during mammalian cardiovascular development.* Development, 1994. **120**(9): p. 2539-53.
  192. Robson, P., et al., *Inner cell mass-specific expression of a cell adhesion molecule (PECAM-1/CD31) in the mouse blastocyst.* Dev Biol, 2001. **234**(2): p. 317-29.
  193. Newman, P.J., *The biology of PECAM-1.* J Clin Invest, 1997. **99**(1): p. 3-8.
  194. Sawano, A., et al., *Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans.* Blood, 2001. **97**(3): p. 785-91.
  195. Kabrun, N., et al., *Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors.* Development, 1997. **124**(10): p. 2039-48.
  196. Sylven, C., *Angiogenic gene therapy.* Drugs Today (Barc), 2002. **38**(12): p. 819-27.
  197. O'Neill, T.J.t., et al., *Mobilization of bone marrow-derived cells enhances the angiogenic response to hypoxia without transdifferentiation into endothelial cells.* Circ Res, 2005. **97**(10): p. 1027-35.
  198. Abe, M. and Y. Sato, *cDNA microarray analysis of the gene expression profile of VEGF-activated human umbilical vein endothelial cells.* Angiogenesis, 2001. **4**(4): p. 289-98.

199. Freedman, S.B. and J.M. Isner, *Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease*. *Ann Intern Med*, 2002. **136**(1): p. 54-71.
200. Henry, T.D., et al., *The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis*. *Circulation*, 2003. **107**(10): p. 1359-65.
201. Zhou, D., et al., *Cyr61 mediates the expression of VEGF, alphav-integrin, and alpha-actin genes through cytoskeletally based mechanotransduction mechanisms in bladder smooth muscle cells*. *J Appl Physiol*, 2005. **98**(6): p. 2344-54.
202. Wu, K.J., et al., *Characterization of differential gene expression in monkey arterial neointima following balloon catheter injury*. *Int J Mol Med*, 2000. **6**(4): p. 433-40.
203. Matsumae, H., et al., *CCN1 knockdown suppresses neointimal hyperplasia in a rat artery balloon injury model*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(6): p. 1077-83.
204. Orlic, D., et al., *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium*. *Nature*, 2001. **410**(6829): p. 701-5.
205. Orlic, D., et al., *Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(18): p. 10344-9.
206. Kawamoto, A., et al., *Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia*. *Circulation*, 2003. **107**(3): p. 461-8.
207. Werner, N., et al., *Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(10): p. 999-1007.
208. Asahara, T., et al., *Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization*. *Circ Res*, 1999. **85**(3): p. 221-8.
209. Santarelli, J.G., et al., *Incorporation of bone marrow-derived Flk-1-expressing CD34+ cells in the endothelium of tumor vessels in the mouse brain*. *Neurosurgery*, 2006. **59**(2): p. 374-82; discussion 374-82.
210. Spring, H., et al., *Chemokines direct endothelial progenitors into tumor neovessels*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(50): p. 18111-6.
211. Lin, M.T., et al., *Cyr61 expression confers resistance to apoptosis in breast cancer MCF-7 cells by a mechanism of NF-kappaB-dependent XIAP up-regulation*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(23): p. 24015-23.
212. Tong, ., et al., *Cyr61, a member of CCN family, is a tumor suppressor in non-small cell lung cancer*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(50): p. 47709-14.
213. Laing, A.J., et al., *Mobilization of endothelial precursor cells: systemic vascular response to musculoskeletal trauma*. *J Orthop Res*, 2007. **25**(1): p. 44-50.
214. Brigstock, D.R., *Regulation of angiogenesis and endothelial cell function by connective tissue growth factor (CTGF) and cysteine-rich 61 (CYR61)*. *Angiogenesis*, 2002. **5**(3): p. 153-65.
215. Hadjiargyrou, M., W. Ahrens, and C.T. Rubin, *Temporal expression of the chondrogenic and angiogenic growth factor CYR61 during fracture repair*. *J Bone Miner Res*, 2000. **15**(6): p. 1014-23.
216. Yu, Y., et al., *The matrix protein CCN1 (CYR61) promotes proliferation, migration and tube formation of endothelial progenitor cells*. *Exp Cell Res*, 2008.



217. Wu, Y., et al., *Essential role of ICAM-1/CD18 in mediating EPC recruitment, angiogenesis, and repair to the infarcted myocardium*. *Circ Res*, 2006. **99**(3): p. 315-22.
218. Koyanagi, M., et al., *Differentiation of circulating endothelial progenitor cells to a cardiomyogenic phenotype depends on E-cadherin*. *FEBS Lett*, 2005. **579**(27): p. 6060-6.
219. Miller-Kasprzak, E. and P.P. Jagodzinski, *Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2007. **55**(4): p. 247-59.
220. Mohle, R., et al., *Regulation of transendothelial migration of hematopoietic progenitor cells*. *Ann N Y Acad Sci*, 1999. **872**: p. 176-85; discussion 185-6.
221. Janowska-Wieczorek, A., et al., *Growth factors and cytokines upregulate gelatinase expression in bone marrow CD34(+) cells and their transmigration through reconstituted basement membrane*. *Blood*, 1999. **93**(10): p. 3379-90.
222. Missirlis, E., G. Karakiulakis, and M.E. Maragoudakis, *Angiogenesis is associated with collagenous protein synthesis and degradation in the chick chorioallantoic membrane*. *Tissue Cell*, 1990. **22**(4): p. 419-26.
223. Janowska-Wieczorek, A., et al., *Differential MMP and TIMP production by human marrow and peripheral blood CD34(+) cells in response to chemokines*. *Exp Hematol*, 2000. **28**(11): p. 1274-85.
224. Gigant, C., et al., *Quantitative expression of adhesion molecules on granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood, bone marrow, and cord blood CD34+ cells*. *J Hematother Stem Cell Res*, 2001. **10**(6): p. 807-14.
225. Thoma, S.J., C.P. Lamping, and B.L. Ziegler, *Phenotype analysis of hematopoietic CD34+ cell populations derived from human umbilical cord blood using flow cytometry and cDNA-polymerase chain reaction*. *Blood*, 1994. **83**(8): p. 2103-14.
226. Schachinger, V., et al., *Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial*. *J Am Coll Cardiol*, 2004. **44**(8): p. 1690-9.
227. Britten, M.B., et al., *Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging*. *Circulation*, 2003. **108**(18): p. 2212-8.
228. Wollert, K.C., et al., *Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial*. *Lancet*, 2004. **364**(9429): p. 141-8.
229. Stamm, C., et al., *Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration*. *Lancet*, 2003. **361**(9351): p. 45-6.
230. Bell, E., et al., *Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness*. *Science*, 1981. **211**(4486): p. 1052-4.
231. Kaiser, H.W., et al., *Cultured autologous keratinocytes in fibrin glue suspension, exclusively and combined with STS-allograft (preliminary clinical and histological report of a new technique)*. *Burns*, 1994. **20**(1): p. 23-9.
232. Borges, J., et al., *Chorioallantoic membrane angiogenesis model for tissue engineering: a new twist on a classic model*. *Tissue Eng*, 2003. **9**(3): p. 441-50.

233. Kneser, U., et al., *Long-term differentiated function of heterotopically transplanted hepatocytes on three-dimensional polymer matrices*. J Biomed Mater Res, 1999. **47**(4): p. 494-503.
234. Rouwkema, J., J. de Boer, and C.A. Van Blitterswijk, *Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct*. Tissue Eng, 2006. **12**(9): p. 2685-93.
235. Steffens, L., et al., *In vivo engineering of a human vasculature for bone tissue engineering applications*. J Cell Mol Med, 2008.
236. Hill, J.M., et al., *Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk*. N Engl J Med, 2003. **348**(7): p. 593-600.
237. Rosenzweig, A., *Circulating endothelial progenitors--cells as biomarkers*. N Engl J Med, 2005. **353**(10): p. 1055-7.

## **DANKSAGUNG**

Hiermit möchte ich allen danken, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. rer. nat. Norbert Schütze, Orthopädisches Zentrum für Muskuloskelettale Forschung der Universität Würzburg, für die Überlassung des Themas, die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die engagierte und professionelle fachliche Betreuung und die ausserordentlich verständnisvolle persönliche Unterstützung.

Ebenfalls besonders danken möchte ich meiner Betreuerin, Frau Dr. Rita Schenk, für die Einführung in die Labortechniken, die hilfsbereite Betreuung bei der Durchführung der Arbeit und die angenehme Zusammenarbeit.

Auch allen Blutspendern möchte ich danken, ohne die die Versuche nicht möglich gewesen wären.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Zentrums für Muskuloskelettale Forschung, König-Ludwig-Haus Würzburg, die mir mit ihren Erfahrungen stets tatkräftig zur Seite standen. Insbesondere danke ich Frau Susanne Jatzke für alle Hilfe rund um CYR61 und Frau Christa Amrehn für die Unterstützung bei der Durchführung der FACS-Analysen. Daran möchte ich auch einen Dank an die Mitarbeiter des Labors des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg anschliessen, die mir ihr FACS-Gerät zur Verfügung gestellt haben.

Insbesondere möchte ich auch meiner Familie danken, für die persönliche und materielle Unterstützung während meines gesamten Studiums, aber auch für die Hilfe bei der Rechtschreibkorrektur und allen Formalitäten bezüglich dieser Arbeit.

Meinem Freund danke ich herzlich für sein Verständnis, seine unendliche Geduld und die Hilfe beim Layout. Und auch allen meinen Freunden an dieser Stelle ein großes Dankeschön für die schöne Studienzeit.