

**Mechanismen der Transdifferenzierung
endothelialer Progenitorzellen in glatte
Gefäßmuskelzellen**

Inauguraldissertation zur
Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Vorgelegt von
Daniela Heß
aus
Bremerhaven
Gießen 2008

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen
Medizinische Klinik I, Abteilung für Kardiologie / Angiologie
Ärztl. Direktor: Prof. Dr. Harald Tillmanns

Gutachter: Herr Prof. Dr. Tillmanns

Gutachter: Frau PD Dr. K.Lips

Tag der Disputation 7.10.2009

**Meinen Eltern Ursula und Peter
und meinem Bruder Tobias**

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	7
1.1	Grundlagen der Arteriosklerose und der endothelialen Dysfunktion	8
1.2	Myokardremodeling	10
1.3	Therapiemöglichkeiten von vaskuloproliferativen Erkrankungen	10
1.4	Stammzellen und Progenitorzellen	12
1.5	Endotheliale Progenitorzellen (EPC)	13
1.6	Rolle von endothelialen Progenitorzellen (EPC) und die möglichen Mechanismen ihrer Mobilisation aus dem Knochenmark	14
1.7	Herkunft und Rolle glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC)	17
1.7.1	Rolle von zirkulierenden glattmuskulären Progenitorzellen bei der Entwicklung vaskuloproliferativer Erkrankungen	18
2	Fragestellung	19
3	Material und Methoden	20
3.1	Geräte	20
3.2	Chemikalien	20
3.3	Kits	22
3.4	Kulturmedien	22
3.4.1	Endothelzellmedium (EPC-Medium)	22
3.4.2	Glatte Muskelzellmedium (SMC-Medium)	22
3.4.3	Glatte Gefäßmuskelzellmedium (VSMC-Medium)	22
3.5	Antikörper	23
3.5.1	Primärantikörper	23
3.5.2	Sekundärantikörper	25
3.6	Isolation der humanen peripheren mononuklearen (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) Zellen	25
3.7	Behandlung der EPC mit Atorvastatin	26
3.8	Behandlung der Kokultur EPC und VSMC(Ratte) mit PDGF-BB	26
3.9	Färben der endothelialen Progenitorzellen mit DiLDL und Lectin	27
3.10	Isolation von AC133 positiven Zellen durch Magnet-aktivierte Zellsortierung (MACS)	27
3.11	Zellkulturen	28
3.11.1	Zellkulturen der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC)	28
3.11.2	Vorbehandlung der VSMC mit Mitomycin oder Paraformaldehyd	29
3.11.3	Zellkulturen der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) mit endothelialen Progenitorzellen Kokultur	29
3.11.4	Humane glatte Gefäßmuskelzellen , HCASMC (human coronary artery smooth muscle cells)	31
3.11.5	Humane koronare Endothelzellen , HCAEC (human coronary artery endothelial cells)	31
3.12	Fluoreszenz-Immunhistochemie zur Charakterisierung der endothelialen Zellen (VWF, CD31, Cadherin), der glatten Gefäßmuskelzellen (α -SMA, Calponin, SMMS) und der humanen Zellen (HLA-DR, HLA-ABC)	31
3.12.1	Fluoreszenz-Immunhistochemie für die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop(Leica)	31

3.12.2	Immunhistochemie für die Durchflußzytometrie (FACS cell sorter EPICs Altra, BECKMAN COULTER, Miami) USA	32
3.13	Durchflusszytometrie (FACS cell sorter EPICs Altra, BECKMAN COULTER, Miami, USA): FACS (Fluorescence activated cell sorter)	33
3.14	RNA Isolation	34
3.15	Herstellung von complemantary DNA (cDNA)	34
3.15.1	Reverse Transkription der mRNA	34
3.15.2	RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)	34
3.15.3	PCR Ansatz	35
3.15.4	Sequenzen, Amplikon-Größen und Lokalisationen der Primer	36
4	Ergebnisse	39
4.1	Charakterisierung endothelialer Progenitorzellen	39
4.1.1	Anfärbung der EPC mit Dil-ac-LDL und Lectin	39
4.1.2	Charakterisierung der EPC mit endothelspezifischen Markern	41
4.2	Versuch der Transdifferenzierung der EPC durch Kultivierung mit glattem Gefäßmuskelzellmedium (SMBM) und Überstand von VSMC	42
4.3	Dil-ac-LDL Aufnahme von EPC und VSMC	43
4.4	Charakterisierung der EPC mit Ratten-VSMC in Kokultur	43
4.4.1	Morphologie der Kokultur EPC und Ratten-VSMC	45
4.4.2	Transdifferenzierung der EPC in VSMC	47
4.4.3	Human-spezifische Genexpression nach Kokultivierung	48
4.5	Funktionelle Charakterisierung der transdifferenzierten VSMC	50
4.6	FACS Analyse der transdifferenzierten EPC	51
4.7	Transdifferenzierung versus Fusion	53
5	Diskussion	55
5.1	Bedeutung von VSMC und bisheriges Verständnis über die Herkunft von VSMC bei der Entstehung von vaskuloproliferativen Erkrankungen	55
5.2	Stellenwert der Stammzelltherapie	56
5.3	Zusammenhang zwischen In-Stent-Restenose nach Angioplastie und zirkulierenden aus dem Knochenmark stammenden Progenitorzellen	58
5.4	Mögliche molekulare Mechanismen der Transdifferenzierung endothelialer Progenitorzellen in glatte Muskelzellen	59
5.5	Grad der Differenzierung	61
5.6	Transdifferenzierung der EPC versus Zellfusion	62
5.7	Neoangiogenese versus Restenose	62
5.8	Therapiemöglichkeiten	64
5.9	Ausblick	64
6	Zusammenfassung	65
7	Literatur	67
8	Veröffentlichungen	73
9	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
10	Danksagung	74

1 Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache in Deutschland dar. Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes starben im Jahr 2003 396.622 Menschen an den Folgen einer Herz-Kreislauf-Erkrankung. Darunter erlagen 92.673 Menschen einem akuten Myokardinfarkt und 39.286 Menschen einem Schlaganfall. Die chronische ischämische Herzkrankheit war 2003 sowohl bei Männern als auch bei Frauen die häufigste Todesursache.

Kardiovaskuläre Erkrankungen, insbesondere eine koronare Herzerkrankung (KHK) und somit auch ein Myokardinfarkt, entstehen auf dem Boden arteriosklerotisch veränderter Gefäße. Man geht davon aus, dass einer manifesten Arteriosklerose funktionelle Störungen des Endothels durch gefäßschädigende Einflüsse vorausgehen¹.

Die gegenwärtigen präventiven oder therapeutischen Strategien konzentrieren sich auf eine Reduktion der Risikofaktoren (wie z.B. der Hypercholesterinämie, des Bluthochdruckes oder des Diabetes mellitus) oder eine therapeutische Wiederherstellung des Blutflusses mittels Angioplastie oder chirurgischer Revaskularisation (Bypass-Operation).

Invasiv-revaskularisierende Maßnahmen sind jedoch durch einen hohen Prozentsatz von Wiederverschlüssen (Restenosen) der betroffenen Gefäße limitiert: Bei 30%-50% der Patienten, die eine perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) erhalten haben, kommt es bereits in den ersten Monaten nach dem Eingriff zur Restenose der dilatierten Gefäße^{2,3}. Auch Gefäßprothesen (Stents) verhindern zwar das unmittelbare Wiederausammenziehen des Gefäßes nach Angioplastie, verstärken jedoch sogar die Proliferation intimaler Zellen und sind immer noch mit einer hohen Zahl an Restenosen behaftet⁴.

Auch nach Bypassoperationen kommt es jährlich in 10-30% der Fälle zu einer Stenosierung der venösen, implantierten Gefäße⁵.

1.1 Grundlagen der Arteriosklerose und der endothelialen Dysfunktion

Die Arteriosklerose bildet die Grundlage für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen wie z.B. die koronare Herzerkrankung, den Myokardinfarkt, die periphere arterielle Verschlusskrankheit oder einen Apoplex.

Zur Klärung der Ätiologie der Arteriosklerose hat die Framinghamstudie entscheidend beigetragen. Auf der Grundlage dieser Studie wurde das Konzept der kardiovaskulären Risikofaktoren etabliert⁶. Anhand empirisch erhobener Daten wurden Rauchen, arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Glukoseintoleranz sowie fortgeschrittenes Alter als bedeutende Ursachen in der Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit identifiziert^{6,7}. Die Entstehung einer Arteriosklerose ist ein multifaktoriell bedingter Prozess, an dem eine Vielzahl von pathogenetischen Mechanismen beteiligt sind. Störungen der wesentlichen Endothelfunktionen werden als initiales Ereignis in der Entwicklung der Arteriosklerose angesehen¹ und unter dem Oberbegriff der endothelialen Dysfunktion zusammengefasst⁸. Kardiovaskuläre Risikofaktoren schädigen das Endothel und führen so zu einer endothelialen Dysfunktion. In der Folge kommt es zu einer entzündlichen Infiltration der Gefäßintima mit Einwanderung von Leukozyten, Aktivierung und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen sowie Aktivierung von Thrombozyten mit Thrombusbildung. Die eingewanderten Leukozyten akkumulieren in den entstehenden atherosklerotischen Läsionen und sezernieren zusammen mit den geschädigten Endothelzellen, Entzündungszellen, Thrombozyten und glatten Gefäßmuskelzellen multiple Wachstumsfaktoren und Zytokine. Diese vermitteln dann die Chemotaxis, die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, die Apoptose und Synthese extrazellulärer Matrixproteine⁷. Durch zusätzliche extrazelluläre Fettakkumulation⁹, Migration und Proliferation glatter Muskelzellen, sowie durch im Verlauf auftretende regressive Veränderungen mit bindegewebigem Umbau und Verkalkungen entstehen fortgeschrittene Läsionen oder Atherome. Diese können zu einer progressiven hämodynamisch relevanten Stenosierung führen oder durch Thrombusbildung auf dem Boden eines rupturierten Plaques einen akuten Gefäßverschluss hervorrufen¹⁰. Die Zellvermehrung (Proliferation) stellt einen Schlüsselprozess sowohl bei der Entstehung der Arteriosklerose als auch bei der Entstehung restenotischer Prozesse dar²⁻⁵.

Im Zusammenhang mit dem entzündlichen Geschehen, wird die Migration und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen für die Entstehung der Arteriosklerose verantwortlich gemacht^{1,11,12}.

Zusammen mit den Zellen der Gefäßwand sezernieren Leukozyten Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC) und die Synthese extrazellulärer Matrixproteine induzieren. Die Wachstumsfaktoren PDGF (platelet-derived growth factor), TGFβ (transforming growth factor-β), EDGF (epidermal growth-factor) fördern unter anderem die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen¹³⁻¹⁵.

Der Ursprung der VSMC ist dabei jedoch noch nicht genau bekannt. VSMC können aus den schon bestehenden Zellen der Neointima hervorgehen, bzw. aus der Media und Adventitia in die Intima migrieren¹⁶. Auch eine Herkunft neointimaler glatter Gefäßmuskelzellen aus Endothelzellen scheint denkbar. In Studien konnte gezeigt werden, dass sich embryonale Endothelzellen zu mesenchymalen Zellen transdifferenzieren und „smooth muscle cell actin“ exprimieren können^{16,17}. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch eine Migration glatter Gefäßmuskelzellen aus der Media über die Lamina elastica interna oder sogar aus der Adventitia über die Media in die entstehende Neointima stattfindet¹⁶. Darüber hinaus konnten zirkulierende Glattmuskel-Progenitorzellen in humanem peripheren Blut identifiziert werden¹⁸, welche ihren Ursprung im dem Knochenmark haben könnten. In einer weiteren Studie wurde nachgewiesen, dass die Rekrutierung und Differenzierung zirkulierender Progenitorzellen in glatte Gefäßmuskelzellen in großem Umfang zur verstärkten Neointimabildung beitragen¹⁹.

Die Stabilisierung eines arteriosklerotischen Plaques ist im fortgeschrittenem Stadium der Arteriosklerose wichtig, um die Ruptur eines Plaques und somit einen Gefäßverschluss zu verhindern. Auch bei diesem Prozess spielen die VSMC eine bedeutende Rolle, indem sie zusammen mit Fibroblasten und Bindegewebe (extrazellulärer Matrix) eine stabile Abdeckung des Plaques bilden. In Regionen welche einen dünnen, instabilen fibrösen Überzug aufweisen, kann eine verstärkte Apoptose von glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden, die letztendlich zur Plaqueruptur führen kann.

1.2 Myokardremodeling

Nach einem Myokardinfarkt, werden als Folge der Ischämie strukturelle und funktionelle Umbauprozesse beobachtet, welche als „Myokardremodeling“ bezeichnet werden. Es kommt zu vegetativen und humoralen Wachstumsreizen, welche auf das Myokard wirken. Bei Sportlern ist das Myokardremodeling ein physiologischer Prozess und dient hier der Anpassung des Herzens an die erhöhte Anforderung. Nach einem Myokardinfarkt findet dagegen Myokardremodeling im Sinne einer Herzinsuffizienzentwicklung statt. Es dient kurzzeitig der Aufrechterhaltung der kardialen Leistung, welche durch das zugrunde gegangene Myokard eingeschränkt ist. Es handelt sich nach einem Myokardinfarkt um zeitlich unterschiedlich auftretende strukturelle und funktionelle Veränderungen des Myokards. Zu den frühen Remodelingprozessen zählt man den in der akuten Infarktphase eintretenden Zellverlust, gefolgt vom bindegewebigen Umbau und Narbenbildung im infarzierten Myokard. Die daraus resultierenden strukturellen Gewebeveränderungen, die in die Übergangsregion zum nichtinfarzierten Myokard hineinreichen, bilden die Grundlage für die Vergrößerung des infarzierten Gebietes. Zur Kompensation des Verlustes an funktionsfähigem Myokard reagiert das nichtinfarzierte Herzgewebe mit Dilatation und Myozytenhypertrophie. Endresultate sind ein vergrößerter Ventrikel, erhöhter linksventrikulärer enddiastolischer Druck, gesteigerte Wandspannung. Von großer Bedeutung bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz, ist das späte Remodeling im nichtinfarzierten, gut-perfundierten Myokard jenseits der akuten Infarktphase als Folge der hämodynamischen Belastung und permanent gesteigerten Wandspannung. Typisches Zeichen des „späten“ Remodelings ist die zunehmende Myokardhypertrophie, welche eine Anpassung an die gesteigerte hämodynamische Belastung darstellt. Zunehmende Fibrosierung, Vergrößerung des Kammervolumens und eine Dilatation führen dazu, dass das Herz „dekompensiert“, es wird „insuffizient“ und es kommt zum Pumpversagen.

1.3 Therapiemöglichkeiten von vaskuloproliferativen Erkrankungen

Im Vordergrund der Verhinderung arteriosklerotischen Plaquebildung steht eine Reduzierung der Risikofaktoren, durch Umstellung von Lebens- und Ernährungsgewohnheiten. Tritt dadurch kein Erfolg ein, stehen medikamentöse und

interventionelle Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung. Zum einen können die Risikofaktoren wie z.B. Hypertonus, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie medikamentös behandelt werden. Es werden heutzutage z.B. Thrombozytenaggregationshemmer, Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und Statine bevorzugt eingesetzt. An interventionellen Verfahren steht die PTCA und letztlich eine kardiochirurgische Bypassoperation zur Verfügung.

Einen weiteren Angriffspunkt zur Reduktion der Restenoserate nach PTCA stellt die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und hier die Hemmung des Zellzyklus dar. Hier stellt sich die Möglichkeit der Strahlentherapie²⁰⁻²², des Einsatzes pharmakologischer Substanzen²³ und es existieren gentherapeutische Ansätze. Des Weiteren richtet sich momentan die Aufmerksamkeit auf neueste Studien²⁴⁻²⁶, welche Erfolge in der Therapie von Patienten nach akutem Myokardinfarkt mit adulten Stammzellen aus peripherem Blut oder dem Knochenmark zeigten. Die Zunahme der linksventrikulären Funktion um 6,7% bei Patienten die nach erfolgreicher Reperfusionstherapie Knochenmarkprogenitorzellen erhielten versus 0,7% Zunahme der linksventrikulären Funktion bei Patienten ohne Knochenmarkzelltherapie²⁵, wird zum einen mit der Fähigkeit der Stammzellen zur Neovaskularisation des Myokards²⁷, zum anderen mit der Entwicklung von funktionellen Kardiomyozyten aus hämatopoetischen Progenitorzellen begründet²⁸.

Die TOPCARE-AMI-Studie (Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction²⁴) untersuchte zum einen die intrakoronare Infusion von Knochenmarkstammzellen, zum anderen die intrakoronare Infusion von peripheren endothelialen Progenitorzellen. Die Untersuchung erfolgte bei Patienten 3-7 Tage nach erfolgreicher perkutaner Revaskularisation. Hier konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit beiden Typen von Zellen machbar und sicher ist. Es zeigte sich eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Funktion, von im Mittel etwa 9%, eine deutliche Verbesserung der regionalen Wandbewegung in den dysfunktionellen Wandabschnitten der Infarktregion und eine Reduktion des enddiastolischen Ventrikelvolumens, vier Monate nach dem Myokardinfarkt. Als Ursache für die Verbesserung dieser Funktionsparameter scheint ein positiver Einfluss auf den Remodelingprozess verantwortlich zu sein²⁹.

Zudem normalisierte sich innerhalb von 4 Monaten die koronare Flussreserve, was für eine progenitorzellinduzierte Neovaskularisation spricht.

Zur Zeit wird untersucht welcher Typ von Zellen oder Subzellpopulationen und welche Applikationsart sich am besten für eine Stammzelltherapie nach akutem Myokardinfarkt eignen. In der TOPCARE-AMI-Studie waren Knochenmarkzellen ähnlich effektiv, wie die etwas weiter differenzierten endothelialen Progenitorzellen²⁴. Die neuste Studie REPAIR-AMI²⁵ (Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction) ist die erste doppelblinde, randomisierte, Placebo-kontrollierte und größte klinische Studie, welche die intrakoronare Knochenmark-Progenitorzelltherapie untersucht hat. Nach vier Monaten war die Pumpfunktion in der mit den Knochenmark-Progenitorzellen behandelten Gruppe signifikant größer als in der Placebo-Gruppe. Diese Ergebnisse bestätigen damit die Studien-Hypothese, dass die Infusion von Knochenmark-Progenitorzellen in das Herz ("intrakoronar") bei Patienten mit erfolgreich revaskularisiertem Herzinfarkt, zu einer signifikant verbesserten Erholung der Pumpfunktion führt. Zudem zeigte sich bei Doppler-Untersuchungen eine signifikant verbesserte Durchblutung im Infarktgefäß bei den mit Progenitorzellen behandelten Patienten, als möglicher Hinweis auf eine verstärkte Gefäßneubildung in der Infarktregion.

1.4 Stammzellen und Progenitorzellen

Die Vermehrung und Differenzierung von Stammzellen ist die Voraussetzung für die Entstehung von Organen und Geweben. Stammzellen sind nicht spezialisierte Zellen, welche die Fähigkeit besitzen sich uneingeschränkt zu vermehren und in verschiedene Zelltypen zu differenzieren. Man unterscheidet embryonale Stammzellen von adulten Stammzellen. Neben mesenchymalen^{30,31} und neuronalen Stammzellen³⁰ konnten postnatal Hämangioblasten nachgewiesen werden^{32,33}.

Bis vor einiger Zeit nahm man an, dass die Differenzierungsfähigkeit (Plastizität) von adulten Stammzellen auf bestimmte Zelllinien fixiert ist.

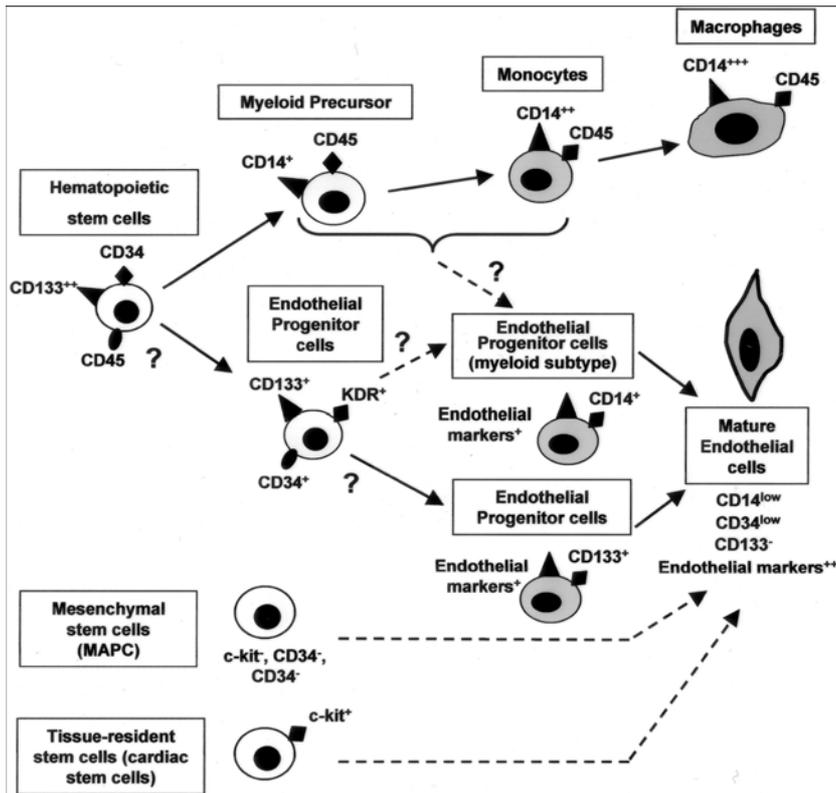
Es zeigte sich jedoch, dass eine einzelne aus dem Knochenmark entnommene adulte Stammzelle eine sehr hohe Plastizität besitzt. Adulte Stamm- und Progenitorzellen besitzen die Fähigkeit sich zu dedifferenzieren (eine unreifere Form anzunehmen) und sich zu transdifferenzieren, also zwischen den Zelllinien zu wechseln. Progenitorzellen (Vorläuferzellen) sind Zellen, welche bereits in eine Richtung einer bestimmten Zelllinie differenziert sind und daher in ihrer Differenzierungsfähigkeit leicht eingeschränkt sind. Sie können sich z.B. in bestimmte Gewebs- bzw.

Organzellen differenzieren (Endothelzellen, Kardiomyozyten, VSMC etc.). Andererseits besitzen sie noch die Möglichkeit in andere Zelllinien zu transdifferenzieren. Zur Identifizierung und Isolation von Stammzellen wird das Vorliegen bzw. das Fehlen von Oberflächenmolekülen genutzt³⁴.

1.5 Endotheliale Progenitorzellen (EPC)

Neueste Studien richten ihre Aufmerksamkeit in der Stammzelltherapie auf endotheliale Progenitorzellen. Hämangioblasten können in vitro abhängig von den Kulturbedingungen zu hämatopoetischen oder endothelialen Zellen differenzieren³².

Endotheliale Progenitorzellen (EPC) wurden erstmals im peripheren Blut als kleine Population CD34⁺ mononukleärer Zellen beschrieben, welche gleichzeitig die Stammzellmarker CD133⁺ und den KDR bzw. VEGF-Rezeptor2 (vascular endothelial growth factor rezeptor) tragen³⁵. CD34 und KDR werden auch von Subpopulationen hämatopoetischer Stammzellen und unreifen Endothelzellen exprimiert³⁶⁻⁴⁰. Endotheliale Progenitorzellen können von reifen Endothelzellen durch die Expression von CD133⁺ abgegrenzt werden. CD133⁺ ist auf einer relativ undifferenzierten Subpopulation der EPC nachweisbar, während reife Endothelzellen diesen Marker nicht mehr exprimieren⁴¹. Bei gesunden Erwachsenen Personen liegt der Anteil der EPC an der Gesamtzahl mononukleärer Zellen (MNC) im peripheren Blut unter 0,1%⁴¹⁻⁴⁴.



Urbich et al. 2004

Abb.1

Herkunft und Differenzierung von endothelialen Progenitorzellen

1.6 Rolle von endothelialen Progenitorzellen (EPC) und die möglichen Mechanismen ihrer Mobilisation aus dem Knochenmark

Endotheliale Progenitorzellen werden zum einen für die Neoangiogenese in ischämischem Gewebe verantwortlich gemacht^{35,45}, zum anderen besitzen sie die Fähigkeit sich in funktionelle Kardiomyozyten zu differenzieren²⁸.

Es wurde gezeigt, dass bei Menschen mit einer erhöhten Anzahl von Risikofaktoren für vaskuloproliferative Erkrankungen, sowie bei Menschen mit einer familiären Vorbelastung für vaskuloproliferative Erkrankungen eine verringerte Anzahl von zirkulierenden, endothelialen Progenitorzellen nachweisbar sind⁴³. Weitere Studien zeigten, dass eine regionale Ischämie die Anzahl von zirkulierenden, endothelialen Progenitorzellen steigert⁴⁶ und dass die Zytokin-induzierte Mobilisierung von endothelialen Progenitorzellen, die Neovaskularisierung von ischämischem Gewebe verstärkt⁴⁷. Es handelt sich hierbei um einen Reparaturmechanismus, bei dem im Rahmen einer Ischämie neben VEGF weitere Wachstumsfaktoren wie G-CSF

(Granulozytenkolonie-Stimulierungsfaktor) die Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark bewirken. An der Loslösung der Progenitorzellen von den Knochenmarkstromazellen und der Migration in die Blutsinusoide sind Stimuli wie das Erythropoietin oder G-CSF beteiligt.

Die Anzahl und Qualität der EPC korreliert mit der Anzahl von kardiovaskulären Ereignissen. Eine hohe Anzahl von EPC ist mit einer niedrigen Anzahl von kardiovaskulären Ereignissen verbunden^{48,49}. Zirkulierende Endotheliale Progenitorzellen scheinen die Reendothelialisierung nach Ballonangioplastie unterstützen zu können und somit einer Restenose entgegenzuwirken⁵⁰.

Während die exakten Mechanismen der Freisetzung der EPC aus dem Knochenmark noch nicht vollständig geklärt sind, sind verschiedene endogene oder exogene Faktoren bekannt, welche die Mobilisation der EPC im peripheren Blut erhöhen.

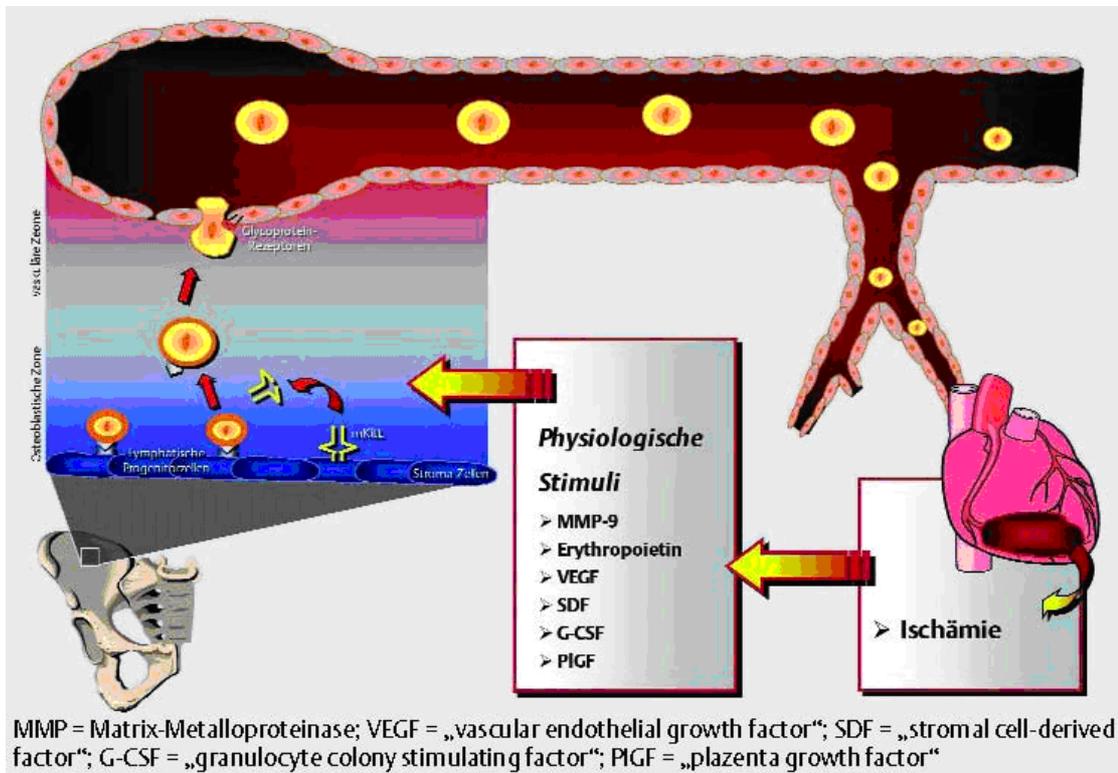
Die Gewebeischämie hat einen besonderen Einfluss auf die Mobilisation der endothelialen Progenitorzellen^{47,51,52}. Nach akutem Myokardinfarkt⁵², sowie nach Erzeugung einer Ischämie an einem Hinterlauf einer Maus⁴⁷, zeigten sich eine erhöhte Anzahl von EPC im peripheren Blut.

Von der Mobilisierung aus dem Knochenmark bis zur Neoangiogenese durchlaufen die EPC verschiedene wichtige Prozesse wie die Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung^{53,54}. Man geht davon aus, dass die Ischämie-bedingte Mobilisierung der EPC durch verschiedene Zytokine gesteuert wird. Es konnte ein Anstieg des VEGF (vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor)s bei Patienten nach einem akuten Myokardinfarkt nachgewiesen werden⁵². Der VEGF Spiegel steigt parallel zum Anstieg der zirkulierenden EPC nach Verbrennungstrauma oder nach Anlage eines Koronararterienbypasses⁵⁵. Auch die exogene Zufuhr verschiedener Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF, bewirkt eine Mobilisierung der EPC. Es konnte im Mausmodell eine erhöhte Anzahl zirkulierender sowie kultivierbarer EPC nach intraperitonealer Gabe von rekombinantem VEGF nachgewiesen werden⁴⁸. In klinischen Studien mit Patienten, die an chronischer Myokardischämie leiden, wurde eine Mobilisierung der EPC nach VEGF-Gentransfer beobachtet⁵⁶.

VEGF erhöht aber nicht nur die Anzahl der zirkulierenden EPC, sondern auch die Funktion der Zellen. Sowohl die Migration in ischämische Areale, als auch die Proliferation der EPC erhöhen sich^{48,57}.

Des Weiteren fördern die Zytokine und Wachstumsfaktoren: G-CSF, GM-CSF, SDF (Stromal Cell-Derived Factor), PlGF (Plazenta growth factor), Erythropoietin,

Östrogene, MMP (Matrixmetalloproteinase) die Mobilisation bzw. die Migration endothelialer Progenitorzellen^{41,47,58-62}.



Schächinger et al. 2006

Abb.2

Wege der Mobilisation von Progenitorzellen aus dem Knochenmark

Aktuelle Studien fanden heraus, dass HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine) eine Vermehrung und eine verbesserte Funktion der zirkulierenden EPC bewirken^{42,63,64}. Es zeigte sich hierbei jedoch kein Anstieg der mononuklearen Zellen, der CD 34+ Zellen, sowie kein Anstieg der CD 133+ hämatopoetischen Vorläuferzellen. Statine scheinen daher einen positiven Effekt auf die Differenzierung der EPC aus CD 34+ Zellen zu haben und nicht die absolute Anzahl der hämatopoetischen Vorläuferzellen zu erhöhen⁴². Vasa et al. beschreiben in ihrer Studie des Weiteren, dass sich die Migrationskapazität der EPC, bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit durch Behandlung mit Statinen erhöht⁴². Eine weitere Studie belegt, dass körperliches Training die Anzahl der EPC erhöht und einen Anstieg des Zytokins VEGF bewirkt⁶⁵.

1.7 Herkunft und Rolle glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC)

Die Migration und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen wird für die Entstehung der Arteriosklerose verantwortlich gemacht^{1,11,12}. Die Akkumulation von glatten Gefäßmuskelzellen stellt einen Schlüsselprozess sowohl in der Entstehung der Arteriosklerose als auch bei restenotischen Prozessen dar^{12,66,67}. Ein Vorläufer der sich entwickelnden Läsionen scheint die Akkumulation von glatten Gefäßmuskelzellen in der Intima zu sein, welche sich beim Menschen bereits im Kindesalter entwickelt und im Alter verdickt^{67,68}.

Die Herkunft der glatten Gefäßmuskelzellen ist nicht genau bekannt. Aufgrund der großen Plastizität von Knochenmark-Progenitorzellen, stellt sich die Frage, ob nicht nur EPC^{35,45}, sondern auch VSMC¹⁸ sich aus diesen Zellen differenzieren können.

Es wurde gezeigt, dass bei der Entwicklung von embryonalen Gefäßen, die glatten Gefäßmuskelzellen sich aus Endothel transdifferenzieren⁶⁹. Embryonale glatte Gefäßmuskelzellen sind in der Lage, sich durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren in endotheliale (VEGF) oder glatte Muskelzellen (PDGF-BB)⁶⁹⁻⁷¹ zu differenzieren⁷².

Simper et al. zeigten in ihrer Studie erstmals, dass es wahrscheinlich ist, dass auch zirkulierende glatte Gefäßmuskel-Progenitorzellen existieren¹⁸. Die Studie ergab, dass sich aus hämatopoetischen, mononuklearen Zellen, wachsende glatte Muskelzellen differenzieren können. Ihre Studie stützt die Theorie, dass PDGF-BB (platelet-derived-growth-factor) eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von glatten Muskelzellen aus zirkulierenden Vorläuferzellen spielt¹⁸. Sie zeigten, dass PDGF-BB sowohl das Wachstum, als auch die Differenzierung der glatten Gefäßmuskelzellen beschleunigt. Sowohl Yamashita et al.⁷² als auch Simper et al.¹⁸ unterstützen mit ihren Studien die Theorie, dass Endothelzellen und glatte Muskelzellen aus der gleichen Population von Vorläuferzellen entstehen können.

In weiteren Studien wurde nachgewiesen, dass die Rekrutierung und Differenzierung zirkulierender Progenitorzellen in glatte Gefäßmuskelzellen in großem Umfang zur verstärkten Neointimabildung beitragen^{19,73}.

1.7.1 Rolle von zirkulierenden glattmuskulären Progenitorzellen bei der Entwicklung vaskuloproliferativer Erkrankungen

Vaskuläre Progenitorzellen scheinen darüber hinaus auch eine maßgebliche Rolle bei der Entwicklung von vaskuloproliferativen Erkrankungen zu spielen. Die Rekrutierung und Differenzierung zirkulierender Progenitorzellen in glatte Gefäßmuskulzellen, trägt in großem Umfang zur Neointimabildung bei.

Sata et al.¹⁹ zeigten in ihrer Tierstudie, dass die Therapie mit Knochenmarkstammzellen inklusive hämatopoetischer Stammzellen nicht nur positive Effekte, sondern auch eine Rolle bei der Entwicklung vaskuloproliferativer Erkrankungen zu spielen scheint.

Zwei weitere klinische Studien ergaben Hinweise auf eine erhöhte Restenoserate bzw. eine vermehrte Progression der KHK distal der Infusionstelle^{74,75}. Allerdings wurden die Patienten in der MAGIC-Studie (Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction), nach akutem Myokardinfarkt vor der Stentimplantation mehrtägig mit G-CSF behandelt, bevor sie eine intrakoronare Infusion mit peripheren, CD34+, hämatopoetischen Stammzellen erhielten. G-CSF bewirkt unter anderem die Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark. Eine vorangehende Tierstudie zeigte, dass sich eine Mobilisation von Stammzellen mittels G-CSF positiv auf die Funktion des Herzens nach Myokardinfarkt auswirkt. Die Kombination von G-CSF Therapie und intrakoronarer Infusion von Stammzellen, ergab jedoch eine so hohe Restenoserate nach Stentimplantation, dass die Studie abgebrochen werden musste⁷⁵.

2 Fragestellung

Es wird postuliert, dass zirkulierende endotheliale Progenitorzellen (EPC) die Neoangiogenese und Wiederherstellung zugrundegegangenen Myokards günstig beeinflussen. EPC und Knochenmarkstammzellen werden daher bereits im Rahmen von klinischen Studien eingesetzt^{25,26,45,76}. Badorff et al. zeigten in ihrer Studie, dass endotheliale Progenitorzellen das Potential besitzen sich in Kardiomyozyten zu differenzieren²⁸.

Auf der anderen Seite scheinen zirkulierende vaskuläre Progenitorzellen eine maßgebliche Rolle bei der Entwicklung vaskuloproliferativer Erkrankungen zu spielen¹⁹. Die Rekrutierung und Differenzierung zirkulierender Progenitorzellen in glatte Gefäßmuskelzellen, trägt beispielsweise in großem Umfang zur verstärkten Neointimabildung bei⁷³. In der MAGIC-Studie ergab die Kombination von G-CSF Therapie und intrakoronarer Infusion von Stammzellen, eine so hohe Restenoserate nach Stentimplantation, dass die Studie abgebrochen werden musste⁷⁵.

Vor dem Hintergrund, dass sich zirkulierende Progenitorzellen in glatte Gefäßmuskelzellen differenzieren können¹⁸ und gezeigt werden konnte, dass eine Therapie mit Stammzellen zu einer Steigerung der Neointimabildung führt⁷⁵, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob auch endotheliale Progenitorzellen das Potential besitzen, sich in glatte Gefäßmuskelzellen zu differenzieren und so eventuell nach therapeutischer Applikation zur Neointimaentstehung beitragen können. Insbesondere sollen in der vorliegenden Arbeit mögliche Mechanismen der Transdifferenzierung endothelialer Progenitorzellen in glatte Gefäßmuskelzellen untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Biofuge Fresco	HERAEUS INSTRUMENTS, Hanau
Blockthermostat 1302	HAEP LABOR CONSULT, Bovenden
Combitips	EPPENDORF, Hamburg
Elektrophoresekammer	BIO-RAD, München
FACS cell sorter EPICs Altra	BECKMAN COULTER, Miami, USA
Feinwaage	SARTORIUS, Göttingen
Grobwaage	SARTORIUS, Göttingen
Inkubator 1000	HEIDOLPH, Kehlheim
MACselect selections-Kit	MILTENYI-BIOTEC, Bergisch Gladbach
MACselect Magnet und Säulen	MILTENYI-BIOTEC, Bergisch Gladbach
Magnetrührer Ikamag	IKA LABORTECHNIK, Staufen
Mikrotiterplatte	GREINER, Frickenhausen
Photometer SLT Spectra	SLT LABINSTRUMENTS, Crailsheim
Pipetten	GILSON, Viliers-le-Bel, Frankreich
Pipettenspitzen	GILSON, Viliers-le-Bel, Frankreich
Polypropylen Röhrchen 15ml/50ml	GREINER, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0,65/1,5/2ml	EPPENDORF, Hamburg
Röntgenkassette	AMERSHAM PHARMACIA
Schüttler Duomax 1030	HEIDOLPH, Kehlheim
Serologische Einmalpipetten	BECKTON DICKINSON, Heidelberg
Sterile Zellkultur-Arbeitsbank	HERAEUS INSTRUMENTS, Hanau
Mini-Blot Gelapparatur	BIO-RAD, München
Whatman-Filterpapier	SCHLEICHER&SCHÜLL, Dassel

3.2 Chemikalien

30% Acrylamidstammlösung	MERCK, Darmstadt
Atorvastatin, Calcium Salt	CALBIOCHEM, Darmstadt
(8% Bisacrylamid)	ROTH, Karlsruhe

Aqua dest.	BRAUN, Melsungen
BSA (Bovines Serum Albumin)	BIO-RAD, München
BBE	CLONETICS, Heidelberg
Bromphenolblau	ROTH, Karlsruhe
Dulbecco's 1x PBS	Thermo Scientific Pierce Protein Research Products, Rockford
(Phosphate buffered saline)	PAA LABOR, Linz, Österreich
Dil-ac-LDL (1,1'-diotadecyl-3,3,3',3'- -teramethylindocarbocyanine- labeled acetylated LDL)	HARBOUR BIOPRODUCTS, Norwood, Massachusetts, USA
Lectin (FITC labeled lectin from <i>Ulex europaeus</i>)	SIGMA, RBI, Taufkirchen, Germany
Ethanol	RIEDEL-DE HAEN, Seelze
FCS	GIBCO, Karlsruhe
Glycerol	SIGMA, Steinheim
Glycin	ROTH, Karlsruhe
Horse Serum	PAA Laboratories, Germany
HCL 37,3% (rauchend)	SIGMA, Steinheim
Isopropanol	MERCK, Darmstadt
Methanol	RIEDEL DE HAEN, Seelze
2-Mercaptomethanol	SIGMA, Steinheim
Milchpulver	BIO-RAD, München
Mitomycin (from streptomyces caespitosus)	SIGMA, Steinheim
NaCl	ROTH, Karlsruhe
Protein Assay (A,B,C)	BIO-RAD, München
PFA (Paraformaldehyd)	SIGMA, Steinheim
Rainbow marker	AMERSHAM, Braunschweig
SDS ultra pure (Sodium Dodecyl Sulfate)	ROTH, Karlsruhe
Tween 20	SIGMA, Steinheim
Trypsin-EDTA-4Na 0,25%	GIBCO, Karlsruhe

3.3 Kits

Qiagen Rneasy

QIAGEN

3.4 Kulturmedien

3.4.1 Endothelzellmedium (EPC-Medium)

EBM-Medium (endothelial basal medium), welches mit 1 µg/ml Hydrocortison, 3 µg/ml bovine brain extract, 30 µg/mL Gentamycin, 50 µg/mL Amphotericin B, 10 µg/mL humanem vascular endothelial growth factor und 20% fetal calf serum (FCS) supplementiert wurde (CLONETICS Heidelberg).

Endotheliale Progenitorzellen und Kokultur mit VSMC (glatte Gefäßmuskelzellen Ratte).

3.4.2 Glatte Muskelzellmedium (SMC-Medium)

SMBM-Medium, CLONETICS Heidelberg, 5% Horse Serum:

Kokultur Endotheliale Progenitorzellen mit VSMC (glatte Gefäßmuskelzellen Ratte).

3.4.3 Glatte Gefäßmuskelzellmedium (VSMC-Medium)

DMS-HAMS 12 Medium, Clonetics Heidelberg:

VSMC (glatte Gefäßmuskelzellen Ratte)

3.5 Antikörper

3.5.1 Primärantikörper

Antigen	HLA- DR	HLA-ABC	h-Caldesmon
Wirt	Maus	Maus	Maus
Isotyp	Monoklonal IgG	Monoklonal IgG	Monoclonal IgG
Konz.	117µg/ml	100µg/ml	174µg/ml
Verwendete Konz.	1:200	1:50	1:100
Lagertemp.	4-8 C °	2-8 C °	2-8C °
Bezug	BD Biosciences	Immunotech	DAKO Corporation

Antigen	SMMS-1	Calponin	α -sma,
Wirt	Maus	Maus	Maus
Isotyp	Monoklonal IgG	Monoklonal IgG	Monoklonal IgG
Konz.	815µg/ml	86µg/ml	100µg/ml
Verwendete Konz.	1:50	1:50	1:1000
Lagertemp.	4-8 C °	2-8 C °	2-8C °
Bezug	Dako Corporation	Dako Corporation	SIGMA

Antigen	α -sma, Cy3 konjugiert
Wirt	Maus
Isotyp	Monoklonal IgG
Konz.	100 μ g/ml
Verwendete Konz.	1:500
Lagertemp.	2-8°C
Bezug	SIGMA

Antigen	vWF	CD31	Cadherin
Wirt	Maus	Maus	Maus
Isotyp	IgG	IgG	Monoklonal IgG
Konz.	200 μ g/ml	136 μ g/ml	250 μ g/ml
Verwendete Konz.	1:50	1:100	1:50
Lagertemp.	4 C °	4 C °	4 C °
Bezug	Dako Corporation	Dako Corporation	BD Biosciences

3.5.2 Sekundärantikörper

Sofern der Primärantikörper keine direkte Fluoreszenzmarkierung aufwies, wurde ein Fluoreszenz-markierter Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet war, eingesetzt.

Antigen	Anti Maus Alexa-Fluor 488	Anti Kaninchen Rhodamine Red x
Wirt	Ziege	Ziege
Isotyp	IgG	IgG
Konz.	2mg/ml	2mg/ml
Verwendete Konz.	1:200	1:200
Lagertemp.	Unter 6 C °	Unter 6°C
Bezug	Mo Bi Tec	Mo Bi Tec

3.6 Isolation der humanen peripheren mononuklearen (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) Zellen

Für die Isolation der humanen mononuklearen Zellen wurden sogenannte „Buffy Coats“ aus der Blutbank, Uniklinikum Giessen, verwendet. Der „Buffy Coat“ ist ein Lymphozytenkonzentrat, welches man nach dem Abzentrifugieren von Vollblut erhält. Aus dem Lymphozytenkonzentrat lassen sich mittels Dichtegradienten-Zentrifugation mit Ficoll-Hypaque, die mononuklearen Zellen des peripheren Blutes isolieren.

Die „Buffy Coats“ wurden zunächst über ein 70µm Sieb gegeben und dann 1:1 mit WBC-Puffer (PBS, 1mmol EDTA, 2% FCS, 10ml Penicillin/Streptomycin) gemischt. Es wurde dann 15 ml Ficoll-Hypaque in ein 50 ml Röhrchen gegeben und mit 25ml der obengenannten Mischung aus „Buffy Coat“ und WBC-Puffer überschichtet. Die Lymphozyten und Monozyten sammeln sich dabei entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen Überstand (Plasma/Thrombozyten) und Ficoll-Hypaque an. Es folgte eine Zentrifugation über 30 min. bei 1700g. Durch dieses „Ficollisieren“ wurden unterschiedliche Zell- und Serumbestandteile

voneinander getrennt. Die gewünschten mononuklearen Zellen befanden sich nach der Zentrifugation in der Interphase zwischen Überstand (Plasma/Thrombozyten) und Ficoll-Hypaque und konnten so vorsichtig abpipettiert werden und bei 1200g für 6 min. zentrifugiert werden.

Es folgte ein dreimaliges Waschen der Zellen, indem der WBC-Puffer nach jedem Zentrifugationsschritt (6min. bei 1200g) abpipettiert wurde und frischer WBC-Puffer hinzugegeben wurde. Nach dem dritten Waschschrift wurde das Zellpellet in 500µl vorgewärmten EBM-Medium (Endothelzellmedium), 0,4%Bovine Brain Extract, 20%FCS aufgenommen und auf Fibronectin beschichtete 6fach Zellkulturplatten ausplattiert. Diese Zellkultur wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Zellen welche über Nacht nicht an dem Fibronectin adhären geworden waren, wurden am nächsten Tag vorsichtig abpipettiert und die adhären Zellen mit vorgewärmtem EBM Medium überschichtet und bei 37°C kultiviert.



Abb.3
Isolation und Kultivierung von EPC

3.7 Behandlung der EPC mit Atorvastatin

Nach Isolierung der EPC wurde das EBM-Medium mit 0,1µmol Atorvastatin (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden) versetzt.

3.8 Behandlung der Kokultur EPC und VSMC(Ratte) mit PDGF-BB

Das SMBM-Medium wurde mit 50ng/ml PDGF-BB (RD Systems, Minneapolis, USA) versetzt.

3.9 Färben der endothelialen Progenitorzellen mit Dil-ac-LDL und Lectin

Die Anfärbung der endothelialen Progenitorzellen (EPC) erfolgte nach 3 Tagen Kultivierung der Zellen bei 37°C. Dil-ac-LDL wurde 1:100 zu dem Medium der EPC gegeben und weiter, für 1h bei 37°C inkubiert. Um die Zellen mit Lectin zu färben, wurde das Medium von den Zellen abgezogen und es wurde 4%-iges PFA zur Fixation der Zellen hinzugegeben. Nach 15 min. wurden die Zellen dreimal mit PBS in den Platten vorsichtig gewaschen. Nach dem Waschen wurde Lectin 1:100 zu den PBS überschichteten Zellen gegeben und für 1,5 h im Dunkeln inkubiert. Nach dem Anfärben wurde der überschüssige Farbstoff mit PBS vorsichtig abgewaschen und die Zellen mit PBS nochmals überschichtet. Die angefärbten Zellen wurden dann mittels eines Fluoreszenzmikroskopes (Leica DM R) ausgezählt.

3.10 Isolation von AC133 positiven Zellen durch Magnet-aktivierte Zellsortierung (MACS)

Zur weiteren Auftrennung der mononuklearen Zellen (PBMCs) aus der Dichtegradientenzentrifugation wurden AC133 positive Zellen mit Hilfe von AC133-Antikörpern, gekoppelt an Magnetpartikel, isoliert.

Hierzu wurden $1 \cdot 10^8$ PBMC in 300 μ l 4 °C kaltem Puffer (PBS/ 2 mM EDTA/ 0,5 % BSA) aufgenommen und auf Eis gestellt. Jeweils 100 μ l des FcR-Blocking Lösung und der AC133 Mikrobead Lösung wurden zu diesen $1 \cdot 10^8$ Zellen pipettiert. Die Zellsuspension wurde bei 4 °C für 30 min inkubiert. Bei höheren Ausgangszellzahlen wurden die Volumina entsprechend angepasst. Zellzahlen kleiner als $1 \cdot 10^8$ wurden ebenfalls mit 100 μ l FcR-Blocking Lösung beziehungsweise AC133 Mikrobeads sowie 300 μ l Puffer versetzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen in 50 ml Puffer aufgenommen und bei 250 g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 μ l pro $1 \cdot 10^8$ Zellen aufgenommen und auf eine Isolationssäule aus beschichtetem magnetisierbarem Feindrahtgewebe, die vorher in das Magnetfeld des MACS Separators gestellt wurde, gegeben. Zuvor wurde die Säule mit Puffer äquilibriert. Bis zu einer Gesamtzellzahl von maximal $2 \cdot 10^8$ Zellen wurde die MS

Säule und darüber bis maximal $2 \cdot 10^9$ Zellen wurde die LS Säule verwendet. Die MS Säule wurde mit 500 μ l und die LS Säule mit 5 ml Puffer äquilibriert. Nachdem die Zellsuspension vollständig durch die Säule gelaufen war, wurde mit 500 μ l (MS Säule) beziehungsweise 3 ml (LS Säule) Puffer 4x gespült. Die Säule wurde dann aus dem Magnetfeld genommen und eine neue äquilibrierte Säule in das Feld gestellt. Die Zellen wurden aus der ersten Säule mittels 1ml beziehungsweise 5ml Puffer und einem Kolben herausgedrückt und auf die neue Säule gegeben. Nach weiteren 4 Waschschritten wurde auch diese Säule aus dem Magnetfeld genommen und 2ml beziehungsweise 6ml Puffer auf die Säule pipettiert. Nachdem ca. 1ml der Lösung mittels Gravitation aus der Säule getropft war, wurde der Kolben verwendet und das restliche Volumen mechanisch herausgedrückt. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde zur Zellzählung verwendet, und die restlichen Zellen zur weiteren Untersuchung eingesetzt.

3.11 Zellkulturen

3.11.1 Zellkulturen der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC)

Primärkulturen glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC) wurden durch enzymatische Verdauung aus Aorten von 7-8 Wochen alten, männlichen Sprague-Dawley Ratten (Charles River Breeding Laboratories, Kingston New York) nach der Methode von Owens et al.⁷⁷ gewonnen. Es wurden ausschließlich Zellen der Passagen 2-6 verwendet. Die VSMC wurden mit einer Dichte von ungefähr 10.000 Zellen/ml auf Fibronectin-beschichtete Zellkulturflaschen ausgesät.

Die VSMC wurden in DMS-HAMS F12-Medium kultiviert. Die konfluenten Zellen wurden durch Trypsin-EDTA von den Fibronectin-beschichteten Zellkulturflaschen abgelöst, indem das Medium von den Zellkulturen abgezogen wurde, die Zellen einmalig mit PBS gewaschen wurden und dann 37°C warmes Trypsin (1-3ml) auf die Kultur gegeben wurde. Nach 1-2 Min. Inkubation konnten die Zellen durch leichtes Klopfen von dem Zellkulturboden gelöst werden und in DMS-HAMS F12 (mit FCS) neutralisiert werden. Die VSMC wurden dann in einer Dichte von ungefähr 10.000 Zellen/ml auf Fibronectin- beschichtete 6fach Zellkulturplatten und auf mit Zellen kultivierbare Objektträger („Chamberslides“) ausplattiert.

3.11.2 Vorbehandlung der VSMC mit Mitomycin oder Paraformaldehyd

Um zu untersuchen ob die EPC sich auf noch lebenden, aber nicht mehr teilungsfähigen (Mitomycin) oder auf abgetöteten VSMC (Paraformaldehyd) in glatte Gefäßmuskelzellen differenzieren, wurden die VSMC vor Zugabe der EPC, mit Mitomycin oder mit Paraformaldehyd vorbehandelt. Somit ist eine Aussage darüber möglich, ob die EPC zur Transdifferenzierung eine Fusion mit den VSMC eingehen müssen, oder ob die Oberflächenstrukturen und Integrine für eine Transdifferenzierung der EPCs ausreichen. Die Mitomycinvorbehandlung erfolgte, indem 2µg/ml Mitomycin zu den VSMC in das Medium gegeben wurde. Dieser Ansatz wurde für 2h bei 37°C inkubiert, dann dreimal mit Medium gewaschen. Die Paraformaldehydvorbehandlung (PFA) erfolgte indem vorerst das Medium abgezogen wurde, dann 4%iges PFA für 5-10 min zu den VSMC gegeben wurde, danach diese VSMC mindestens dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen wurden.

3.11.3 Zellkulturen der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) mit endothelialen Progenitorzellen Kokultur

Die VSMC-Kulturen in den 6fach Zellkulturplatten bzw. "Chamberslides" boten die Grundlage für die sogenannten Kokulturen mit den EPC-Kulturen. Die VSMC wurden unvorbehandelt, mit Mitomycin vorbehandelt oder mit Paraformaldehyd vorbehandelt, für die Kokulturen verwendet. Die EPC wurden nach der Isolation drei Tage bei 37°C in EBM-Medium inkubiert. Nach der Dil-ac-LDL Anfärbung wurden die EPC mit Trypsin-EDTA von den Fibronectin-beschichteten 6fach Zellkulturplatten bzw. "Chamberslides" abgelöst (Methode siehe VSMC), zentrifugiert und in EBM-Medium resuspendiert. Die EPC wurden dann auf die VSMC („Feederlayer“) gegeben. Die Kokultur wurde bei 37°C für weitere 2 Tage in EBM-Medium inkubiert. Nach 2 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel und die Kokultur wurde in SMBM-Medium, 5% Horse Serum inkubiert. Je nach Fragestellung wurde die Kokultur für die Charakterisierung eine bzw. zwei Wochen bei 37°C inkubiert (alle 2 Tage erfolgte ein Mediumwechsel).



Abb.4
Kokultivierung von EPC mit VSMC

3.11.4 Humane glatte Gefäßmuskelzellen, HCASMC (human coronary artery smooth muscle cells)

Humane glatte Gefäßmuskelzellen aus den Koronararterien wurden von der Firma CellSystems® (CellSystems® Biotechnologie Vertrieb GmbH, St. Katharinen) bezogen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Smooth Muscle Cell Growth Medium -2 (Firma CellSystems®).

Es wurden ausschließlich Zellen der Passagen 3- 7 verwendet.

3.11.5 Humane koronare Endothelzellen, HCAEC (human coronary artery endothelial cells)

Humane koronare Endothelzellen (HCAEC) wurden von der Firma CellSystems® (CellSystems® Biotechnologie Vertrieb GmbH, St. Katharinen) bezogen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Endothelial Cell Growth Medium (Firma CellSystems®). Es wurden ausschließlich Zellen der Passagen 2- 4 verwendet.

3.12 Fluoreszenz-Immunhistochemie zur Charakterisierung der endothelialen Zellen (VWF, CD31, Cadherin), der glatten Gefäßmuskelzellen (α -SMA, Calponin, SMMS) und der humanen Zellen (HLA-DR, HLA-ABC)

3.12.1 Fluoreszenz-Immunhistochemie für die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop (Leica)

- Schritt 1: Die Zellen wurden zunächst auf den „Chamberslides“ mittels 4% PFA, für 15 Min. bei 37°C fixiert.
- Schritt 2: Es wurde mit einer „Blocking solution“ (10% Ziegenserum) für 10 min. geblockt.
- Schritt 3: Nach dem Abziehen der „Blocking solution“ wurde der primäre Antikörper aufgetragen und die Zellen für 30-60 Min. abgedunkelt, bei Raumtemperatur inkubiert.

- Schritt 4: Der Antikörper wurde abgezogen und die Zellen dreimal mit PBS und 2,5% FCS gewaschen.
- Schritt 5: Der sekundäre Antikörper wurde aufgetragen und ungefähr 1h abgedunkelt, bei Raumtemperatur inkubiert.
- Schritt 6: Es folgt ein zweimaliges Waschen mit PBS und 2,5% FCS.
- Schritt 7: Nach der Färbung wurden die Zellkerne mit 100µl DAPI angefärbt und mit Vectashield eingedeckelt.

3.12.2 Immunhistochemie für die Durchflußzytometrie (FACS cell sorter EPICs Altra, BECKMAN COULTER, Miami) USA

- Schritt 1: Die Zellen wurden durch Trypsin von der Platte gelöst, neutralisiert und in ein 15ml Röhrchen aufgenommen und 5min bei 1200g zentrifugiert.
- Schritt 2: Resuspension der Zellen in 2ml 70% Methanol (-20°C)
- Schritt 3: Zentrifugation der Zellen und waschen in 2ml PBS, 1% BSA
- Schritt 4: Zellen in 300µl PBS+1%BSA+0,1%Triton-X resuspendieren und Antikörper in vorgegebener Konzentration (siehe 3.5.1) zu Zellen geben.
- Schritt 5: 1h abgedunkelt Zellen mit Antikörper unter leichtem Schütteln inkubieren.
- Schritt 6: Waschen der Zellen und resuspendieren der Zellen in 2000 µl PBS+1%BSA+0,1%Triton-X.
- Schritt 7: Zellen sind bereit für die FACS Analyse

3.13 Durchflusszytometrie (FACS cell sorter EPICs Altra, BECKMAN COULTER, Miami, USA): FACS (Fluorescence activated cell sorter)

Die Durchflusszytometrie (FACS steht für Fluorescence Activated Cell Sorting) ermöglicht das Zählen und die Analyse von Zellen oder Zellpopulationen mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern. Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern durchgeführt wurde.

Im Durchfluss werden die FITC-markierten Zellen über einen Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, und entsprechend der physikalischen Eigenschaften und der Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffs kommt es zur Streuung des Lichtes. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in einem Punktdiagramm beziehungsweise Histogramm.

Die bei der Isolation gewonnenen Durchflusszellen wurden phänotypisch analysiert. Hierzu wurden die isolierten Zellen aliquotiert und in 100 µl PBS aufgenommen und mit dem entsprechenden Antikörper für 30 min bei 4 °C inkubiert. Es wurden $1-2 \cdot 10^5$ AC133 positive sowie $1-2 \cdot 10^6$ Durchflusszellen pro Antikörperinkubation eingesetzt. Die verwendeten Antikörper wiesen eine direkte Fluoreszenzmarkierung (α -sma, HLA-DR, vWF, VE Cadherin, KDR) oder eine Phycoerythrinmarkierung (HLA-DR) auf. Nach dieser Inkubation erfolgte ein Waschschrift mit 2 ml PBS. Die Inkubation mit diesem Antikörper wurde ebenfalls in 100 µl PBS für 30 min bei 4 °C durchgeführt. Danach wurde zweimal gewaschen, um die nichtgebundenen Antikörper zu entfernen. Die Zellen wurden daraufhin mit 4 % Formaldehyd (in PBS) fixiert und im FACS analysiert.

3.14 RNA Isolation

Die Isolation der RNA erfolgte mit einem Rneasy Kit (Qiagen). Die Zellen wurden in der Kulturflasche mit 300-600µl RPE Puffer lysiert und eine „Qiashreddersäule“ überführt. Nach einer Zentrifugation bei 15000g für eine Minute wurde 1 Volumen Ethanol zu dem Überstand gegeben. Es wird dann nochmals durch eine „Qiashreddersäule“ zentrifugiert. Dann wurden 700µl RW1-Puffer hinzugegeben nochmals zentrifugiert und die Säule mit RPE-Puffer zweimal gewaschen. Die RNA wurde mit 30-50µl RNase freiem Wasser aus der Säule isoliert. Die Konzentration der RNA wurde mittels eines Photometers OD260/280 (Photometer SLT Spectra, SLT LABINSTRUMENTS, Crailsheim) gemessen.

3.15 Herstellung von complementary DNA (cDNA)

3.15.1 Reverse Transkription der mRNA

Um die Transkription eines Genes nachzuweisen, wird dessen Expression auf RNA-Ebene detektiert. Hierfür wird die RNA mittels einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und diese später in einer real-time Reaktion amplifiziert und detektiert.

3.15.2 RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)

Für eine 20 µl Reaktion galt das folgende Pipettierschema:

5 x RT Buffer	4 µl
DTT (100 mM)	2,5 µl
RNase Inhibitor (30 U/µl)	0,5 µl
Random Primer (50 A ₆₀ Units)	1,5 µl
dNTPs (10 nM)	1 µl
RT (200 U/µl)	1 µl

diesen 10,5 µl wurden je Reaktion einheitliche Konzentrationen an RNA beigegeben und das Volumen mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt.

Als Negativ-Kontrollen wurden jeweils zwei zusätzliche Reaktionen pipettiert: eine No Template Control (NTC), bei der statt dem RNA-Template RNase-freies Wasser eingesetzt wurde, um generelle unspezifische DNA Kontaminationen zu detektieren, und eine No Reverse Transkriptase (NRT) Kontrolle, bei der das Volumen der Reversen Transkriptase mit RNase-freiem Wasser ersetzt wird, hiermit sollen genomische DNA Kontaminationen ausgeschlossen werden. Bei mehreren Reaktionen wurde ein Mastermix mit 15% Pipettierverlust vorpipettiert. Die Reaktion wurde 60 min bei 37°C, dann 15 min bei 95°C inkubiert. Die resultierende cDNA wurde bei -20°C gelagert oder auf Eis bis zur real-time PCR aufbewahrt.

3.15.3 PCR Ansatz

20 pmol Primer 3`
20 pmol Primer 5`
1 µl DNTP
3 µl 10fach Puffer
0,3µl Taq Polymerase
3 µl cDNA
mit H2O auf 30µl aufgefüllt

„Cycling“ Konditionen:

1,5 Min. 94°C

35 Zyklen:

30 sec.94°C

30 sec.54°C

30 sec.72°C

1 Zyklus : 10 Min. 72°C

3.15.4 Sequenzen, Amplicon-Größen und Lokalisationen der Primer

Für die interne Kontrolle wurde hierfür die mRNA des Gens, welches für die Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) kodiert, verwendet.

GAPDH (Amplicon Größe: 121 bp)

GAPDH-vorwärts: 5`GTGATGGGTGTGAACCACGAG3`

GAPDH-rückwärts: 5`CCACGATGCCAAAGTTGTCA3`

Hum.α-smooth muscle Actin (Amplicon Größe: 283bp)

α-SMA-vorwärts: 5`GGAATCCTGTGAAGCAGCTC3`

α-SMA-rückwärts: 5`CTTTTCCATGTCGTCCCAGT3`

Hum. Caldesmon (Amplicon Größe: 166bp)

Hum.Caldesmon-vorwärts: 5`TTGCTCTCTGGCTGTGCTCC3`

Hum.Caldesmon-rückwärts: 5`GCATCTCCTCCCTCTTTTGCC`

Hum. von Willebrand-Faktor vWF (Amplicon Größe: 572 bp)

Hum.vWF-vorwärts: 5`AGCTGTCCCCTTGGGTACTION3`

Hum.vWF-rückwärts: 5`CCACAGGGTAGATGGTGCTT3`

KDR (Amplicon Größe: 180 bp)

KDR-vorwärts 5`ACTTTGAG ATGGAAGAGGATT3`

KDR-rückwärts 5`GTCCATTCCACCAAAGATG3`

Hum. ENOS (endotheliale NO Synthase, Amplicon Größe: 409 bp)

ENOS-vorwärts 5`-CCAGCTAGCCAAAGTCACCAT-3`

ENOS-rückwärts 5`-GTCTCGGAGCCATACAGGATT-3`

Hum. Calponin (Amplicon Größe: 245 bp)

Calponin-vorwärts 5'-GAGTGTGCAGACGGAAGCTTCAGCC-3`
Calponin-rückwärts 5'-GTCTGTGCCCAACTTGGGGTC-3`

3.16 Kultivierung glatter Gefäßmuskelzellen aus der Mauseorta

Herkunft der Mäuse:

C57BL/6 TgN(ACTbEGFP) lOsb Mäuse wurden von Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine bezogen. Diese Mäuse exprimieren eGFP ubiquitär, was in einer grün Fluoreszenz aller Zellen mit Ausnahme von Erythrozyten und Haarvorkörperzellen führt.

Kultivierung glatter Gefäßmuskelzellen aus der Maus Aorta:

Primärkulturen glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC) wurden mittels Explantationstechnik aus Aorten von 7-8 Wochen alten, männlichen C57BL/6 Mäusen (Charles River Breeding Laboratories, Kingston, New York) nach der Methode von Owens et al. Gewonnen:

(Owens GK, Loeb A, Gordon D, Thompson MM. Expression of smooth muscle-specific alpha-actin in cultured vascular smooth muscle cells: relationship between growth and cytodifferentiation. J Cell Biol. 1986;102:343-52.)

Das nötige Operationsbesteck (2 Pinzetten, 1 Schere, 1 Scalpell) wurde zuvor 1h bei 180°C hitzesterilisiert.

Die Tiere wurden mittels CO₂ Narkose getötet und die thorakale Aorta unter aseptischen Bedingungen exzidiert und in Phosphat gepufferter Lösung (PBS) überführt.

Anhängendes Fett- und Bindegewebe wurde mit Hilfe von Pinzetten stumpf entfernt.

Unter einem Dissektions-Mikroskop wurde danach die Adventitia vorsichtig abpräpariert. Etwaige Gefäßstümpfe kleinerer Arterien wurden dabei mit entfernt werden.

Hiernach wurden mit Hilfe von Pinzetten die Endothelzellen von der luminalen Seite der Arterie vorsichtig abgeschabt.

Die Media-Präparation wurde in ein neues Gefäß mit frischem PBS überführt und erneut gewaschen.

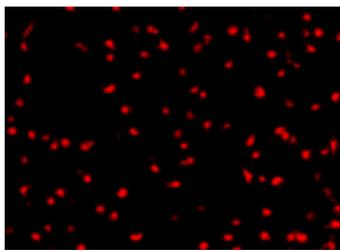
Die Media-Präparation wurde nun mit einem Skalpell in etwa 1-2mm² große Rechtecke disseziert und die zerschnittenen Explantate gleichmäßig in einer Petri-Schale verteilt. (Ggf. können die Explantate mit dem Skalpell noch weiter zerkleinert werden.)

4 Ergebnisse

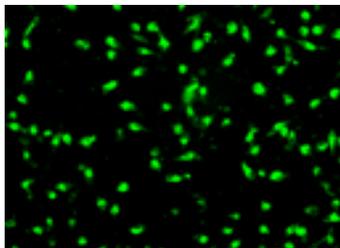
4.1 Charakterisierung endothelialer Progenitorzellen

4.1.1 Anfärbung der EPC mit Dil-ac-LDL und Lectin

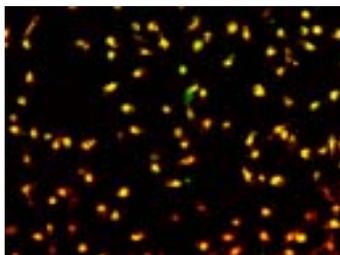
Die peripheren mononuklearen Zellen wurden, wie in 3.6 beschrieben isoliert und charakterisiert. Um die Zahl der endothelialen Progenitorzellen zu bestimmen erfolgte, nach drei Tagen Kultivierung auf Fibronectin in EBM Medium mit 20% FCS, die Anfärbung der EPC mit Dil-ac-LDL und Lectin.



Dil-ac-LDL angefärbte EPC



Lectin angefärbte EPC



Dil-ac-LDL/Lectin angefärbte EPC

Abb.5

Exemplarische Aufnahme der Dil-ac-LDL und Lectin gefärbten EPC nach 3 Tagen Kultivierung.

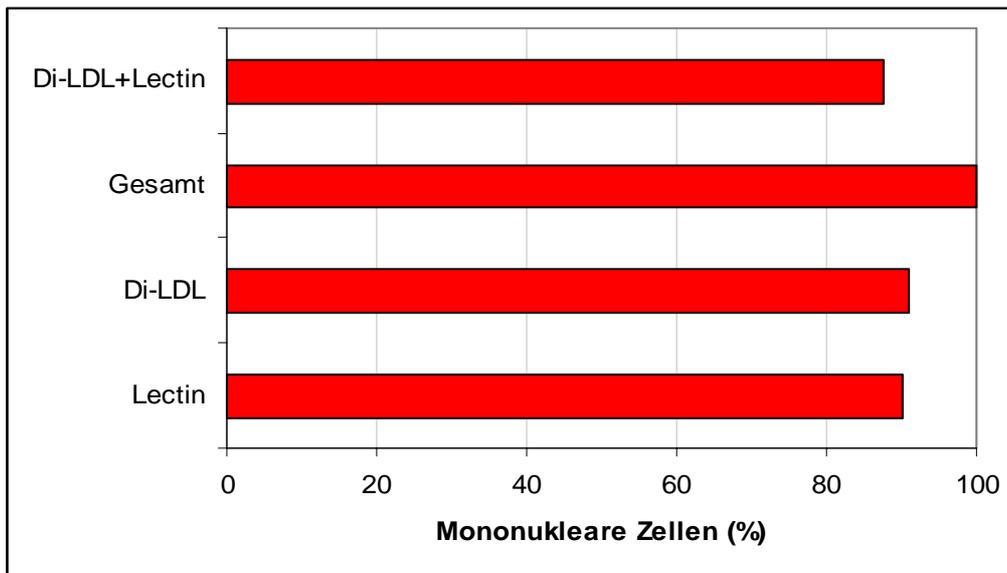


Abb.6

Anteil der Dil-ac-LDL und Lectin gefärbten Zellen an der Gesamtzahl der mononuklearen Zellen (n=23).

3 Tage nach Kultivierung der Zellen, zeigten sich 87,5% der Zellen doppelt positiv für die Expression von Lectin und phagozytiertes Dil-ac-LDL, somit erfolgte die Markierung der endothelialen Progenitorzellen, aus den isolierten mononuklearen Zellen.

4.1.2 Charakterisierung der EPC mit endothelspezifischen Markern

Zur weiteren Charakterisierung des endothelialen Phenotyps der EPC, wurden die so kultivierten Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS) auf die Expression von endothelspezifischen Markern untersucht. Die EPC wurden, wie in 3.6 beschrieben isoliert. Um die endothelialen Progenitorzellen zu charakterisieren erfolgte, nach drei Tagen Kultivierung auf Fibronectin in EBM Medium mit 20% FCS, die Markierung der EPC mit den Antikörpern gegen die endothelspezifischen Marker vWF, KDR und VE-Cadherin.

FACS Analyse:

Das grau markierte Areal zeigt die jeweilige Expression des Markers :

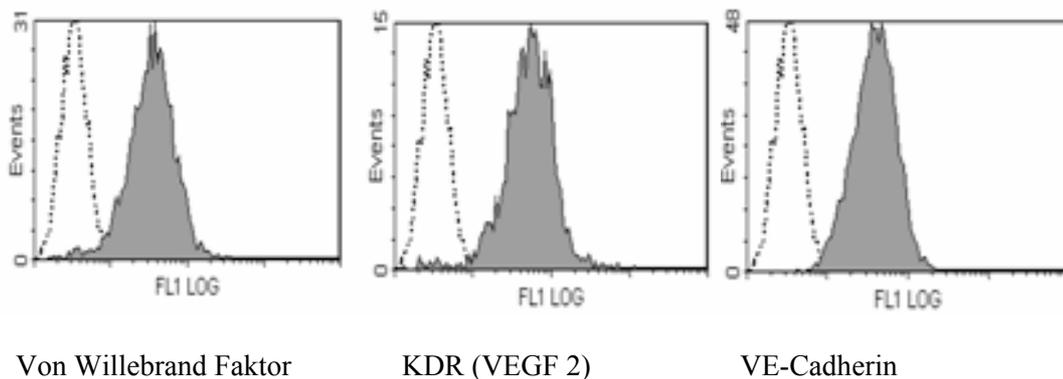


Abb.7

FACS Analyse von frisch isolierten EPC nach 3 Tagen Kultur. Die Zellen wurden mit den fluoreszierenden Antikörpern gegen vWF, KDR und VE-Cadherin markiert.

Wie diese Ergebnisse zeigen, exprimieren die so kultivierten Zellen nach 3 Tagen spezifische Markermoleküle, welche nur auf Endothelzellen exprimiert werden. Dadurch erfolgte die eindeutige Charakterisierung des endothelialen Phenotyps der isolierten Zellen. Diese endothelialen Progenitorzellen wurden in den nachfolgenden Transdifferenzierungsversuchen eingesetzt.

4.2 Versuch der Transdifferenzierung der EPC durch Kultivierung mit glattem Gefäßmuskelzellmedium (SMBM) und Überstand von VSMC

Um zu untersuchen, ob die Kultivierung von EPC in speziellem Medium (SMBM) für glatte Muskelzellen oder Überstand (konditioniertes Kulturmedium) von glatten Muskelzellen allein bereits zu einer Transdifferenzierung in VSMC führt, wurden die Zellen über sieben Tage unter den entsprechenden Konditionen kultiviert und für einen speziellen Glattmuskelzellmarker α -sma (α -smooth-muscle-actin), mit Hilfe von Durchflusszytometrie analysiert.

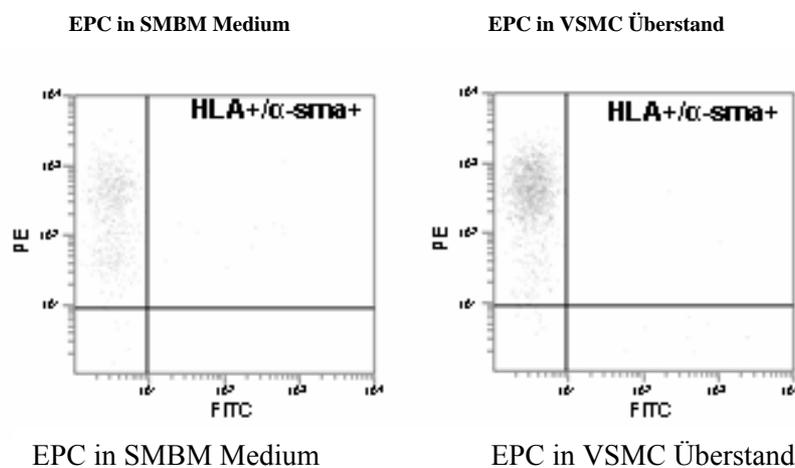


Abb.8

Um die Kulturen zu charakterisieren wurden die transdifferenzierten EPC mit dem glattmuskelzellspezifischen Marker α -sma (α -smooth-muscle-actin) und dem humanen HLA+ (humanes Klasse II Antigen des MHC, major histocompatibility complex) markiert. Die Quantifizierung der transdifferenzierten EPC erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

Es zeigte sich in der Durchflusszytometrie, keine Transdifferenzierung der EPC in VSMC. Es konnte weder durch die Kultivierung der EPC in speziellem Medium der glatten Muskelzellen, noch durch Kultivierung der EPC in Überstand von VSMC eine Transdifferenzierung der EPC in VSMC beobachtet werden.

4.3 Dil-ac-LDL Aufnahme von EPC und VSMC

Da unter den in 4.2 genannten Bedingungen keine Transdifferenzierung der EPC in VSMC beobachtet werden konnte, stellte sich die Frage, ob sich eventuell EPC in Kokultur mit Ratten-VSMC zu VSMC transdifferenzieren.

Um zwischen EPC und VSMC in einer Kokultur unterscheiden zu können, wurde mittels FACS-Analyse untersucht, ob neben den EPC auch VSMC Dil-ac-LDL phagozytieren. Die EPC wurden wie in 3.6 beschrieben aus peripheren mononuklearen Zellen isoliert. Um die Zahl der endothelialen Progenitorzellen zu bestimmen, erfolgte nach 3 Tagen Kultivierung auf Fibronectin in EBM Medium mit 20% FCS, die Anfärbung mit Dil-ac-LDL und Lectin.

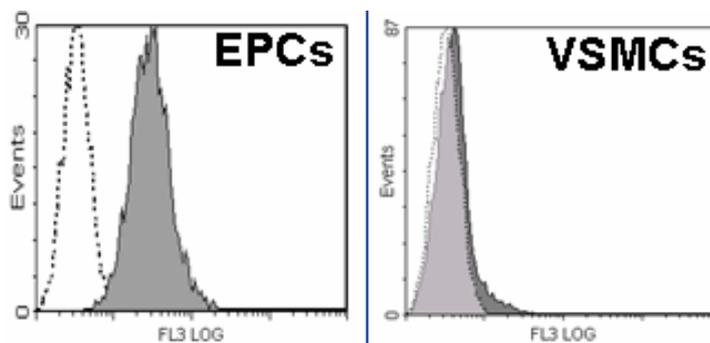


Abb.9

Sowohl EPC als auch VSMC wurden nach Anfärbung mit Dil-ac-LDL durch das FACS analysiert.

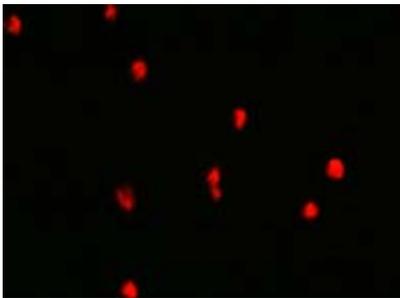
Wie unsere Ergebnisse zeigen, ergab die FACS Analyse, dass die VSMC kein Dil-ac-LDL aufnahmen und nur die EPC mit Dil-ac-LDL anfärbten. Somit konnte die Dil-ac-LDL Anfärbung als spezifische Markierung für die EPC in der Kokultur mit VSMC genutzt werden, um zwischen VSMC und EPC zu unterscheiden.

4.4 Charakterisierung der EPC mit Ratten-VSMC in Kokultur

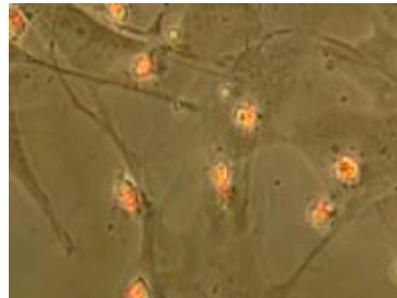
Da weder mit Medium von glatten Gefäßmuskelzellen, noch mit Überstand von glatten Gefäßmuskelzellen eine Transdifferenzierung von endothelialen

Progenitorzellen (EPC) in glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) zu beobachten war (siehe 4.2), wurden die EPC in einer Kokultur, mit glatten Ratten-Gefäßmuskelzellen kultiviert .

Die EPC wurden, wie in 3.6 beschrieben aus peripheren mononuklearen Zellen isoliert. Zur Markierung der endothelialen Progenitorzellen erfolgte, nach drei Tagen Kultivierung auf EBM Medium mit 20% FCS, die Anfärbung Dil-ac-LDL. Wie unsere Ergebnisse in 4.3 zeigen, wird Dil-ac-LDL von den lebenden EPC phagozytiert und nicht von VSMC. Nach drei Tagen Kultivierung wurden die EPC auf eine Ratten-VSMC Kultur gegeben und weitere zwei Tage in EBM-Medium kultiviert. Es erfolgte ein Mediumwechsel und die Kokultur wurde weiter 5 Tage in SMBM-Medium (5% Horse Serum, PDGF-BB) kultiviert. Die VSMC wurden, um das Wachstum und somit ein Überwuchern der Kokultur durch VSMC zu stoppen, mit Mitomycin vorbehandelt.



Durchlichtmikroskop



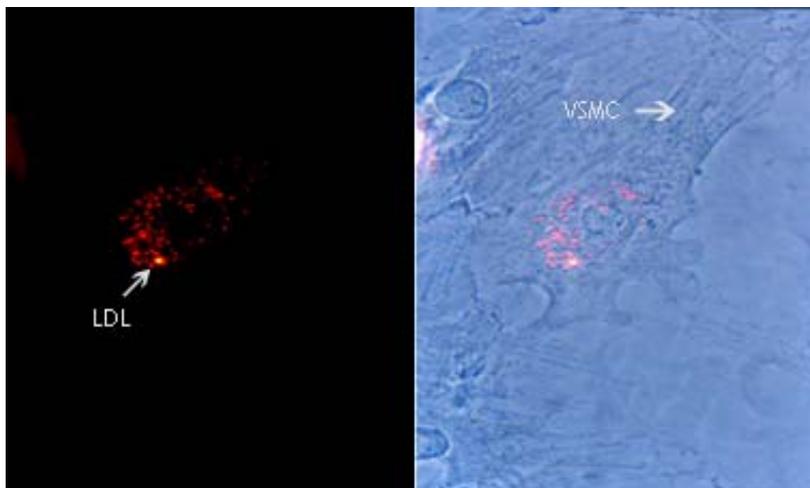
Durchlicht und Fluoreszenzmikroskop

Abb.10

Exemplarische Aufnahmen von Dil-ac-LDL markierten EPC nach 1 Tag Kokultivierung mit VSMC und nach 3 Tagen Kokultivierung mit VSMC

Diese Bilder zeigen, dass bereits nach 1 Tag Kokultivierung die EPC in der Kokultur mit glatten Gefäßmuskelzellen beginnen sich an die VSMC zu heften, dabei zeigte sich noch eine weitgehend ursprüngliche, runde Morphologie der EPC.

4.4.1 Morphologie der Kokultur EPC und Ratten-VSMC



Durchlichtmikroskop

Abb.11

Diese Abbildung zeigt die Dil-ac-LDL angefärbten EPC in Kokultur mit VSMC nach 4 Tagen Kokultivierung. Rechts in Durchlicht abgebildet.

Nach 4 Tagen Kokultivierung ist die weitere morphologische Veränderung der EPC unter Durchlicht deutlich erkennbar. Die endotheliale Progenitorzelle passt sich in ihrer morphologischen Gestalt im Sinne einer glatten Muskelzelle an.

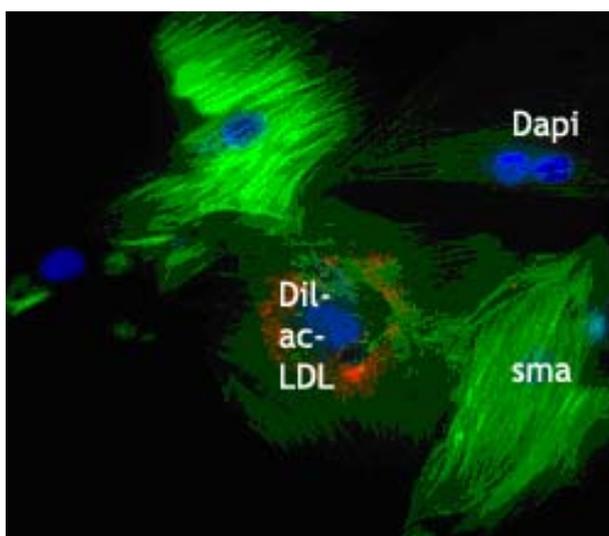
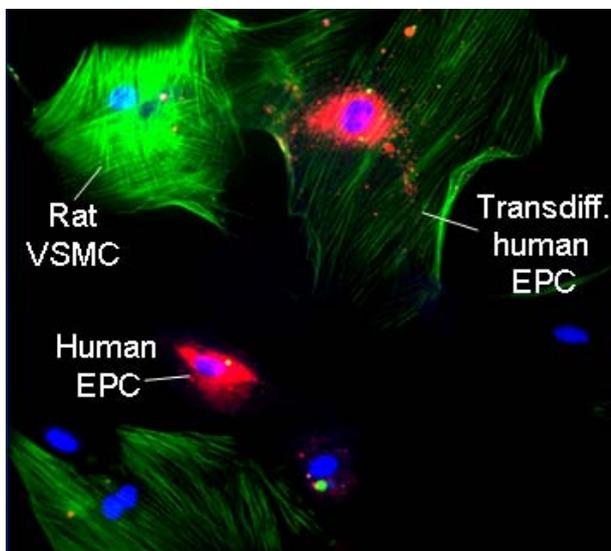


Abb.12

Morphologie und Markierung der VSMC mit dem spezifischen Marker für glatte Muskelzellen, α -sma (grün) und Markierung der EPC mit Dil-ac-LDL(rot) und Zellkernanfärbung mit DAPI nach 5 Tage Kokultur.

Nach 5 Tagen Kokultur passt sich die sich differenzierende endotheliale Progenitorzelle weiter morphologisch den glatten Muskelzellen an und exprimiert bereits den glattmuskelspezifischen Marker α -sma (grün).

Die weitere Entwicklung der sich transdifferenzierenden EPC ist in der nächsten Abbildung dargestellt. Sie zeigt die Kokultur der EPC mit VSMC nach 7 Tagen Kokultivierung.

**Abb 14.**

Dil-ac-LDL (rot) und Zellkernanfärbung mit DAPI nach 7 Tagen Morphologie und Markierung der VSMC mit dem spezifischen Marker für glatte Muskelzellen, α -sma (grün) und Markierung der EPC mit Kokultur.

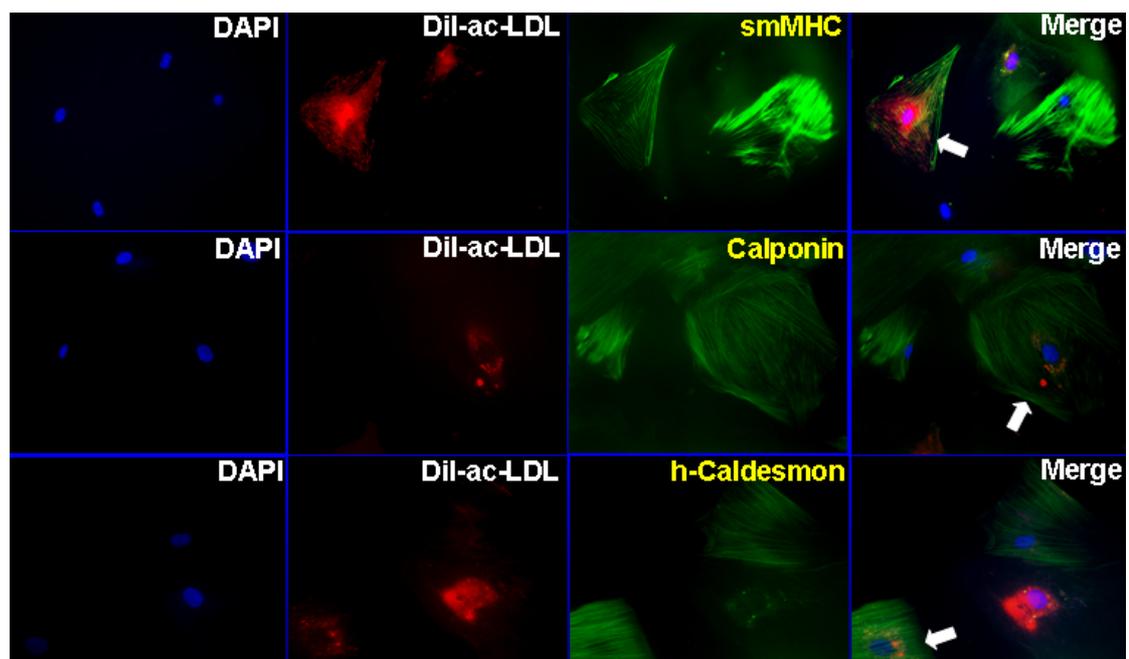
Nach 7 Tagen Kokultivierung hat morphologisch die Transdifferenzierung einer EPC in eine VSMC stattgefunden. Zusätzlich zur Expression des α -sma (grün), exprimierten ein Großteil der sich transdifferenzierenden EPC weitere, spezifischere Markermoleküle (siehe 4.4.2).

4.4.2 Transdifferenzierung der EPC in VSMC

Da α -sma (grün) nur einen spezifischen Glattmuskelzellmarker darstellt, wurden zur genaueren Charakterisierung und um den Grad der Differenzierung der EPC in VSMC zu bestimmen, weitere spezifischere Glattmuskelzellmarker quantifiziert.

Die EPC wurden aus peripheren mononuklearen Zellen isoliert. Um die Zahl der endothelialen Progenitorzellen zu bestimmen erfolgte, nach drei Tagen Kultivierung auf EBM Medium mit 20% FCS, die Anfärbung Dil-ac-LDL. Nach drei Tagen Kultivierung wurden die EPC auf eine Ratten-VSMC Kultur gegeben und weitere zwei Tage in EBM-Medium kultiviert. Dann erfolgte ein Mediumwechsel und die Kokultur wurde 5 Tage in SMBM-Medium (5% Horse Serum, PDGF-BB) kultiviert. Die VSMC wurden, um das Wachstum zu stoppen mit Mitomycin vorbehandelt.

Es erfolgte der immunhistochemische Nachweis der EPC mit Dil-ac-LDL, der aus EPC transdifferenzierten VSMC und der Ratten-VSMC gegen die glattmuskelzellspezifischen Marker smMHC (smooth-muscle-myosin-heavy-chain), Calponin, h-Caldesmon. Zellen welche positiv für Dil-ac-LDL und die glattmuskelzellspezifischen Marker sind, entsprechen transdifferenzierten EPC, da Dil-ac-LDL nicht Ratten-VSMC anfärbt (Abb.8). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.



Zellkerne(blau)

EPC(rot)

VSMC(grün)

gesamte Kokultur
(Pfeil in VSMC transdifferenzierte EPC)

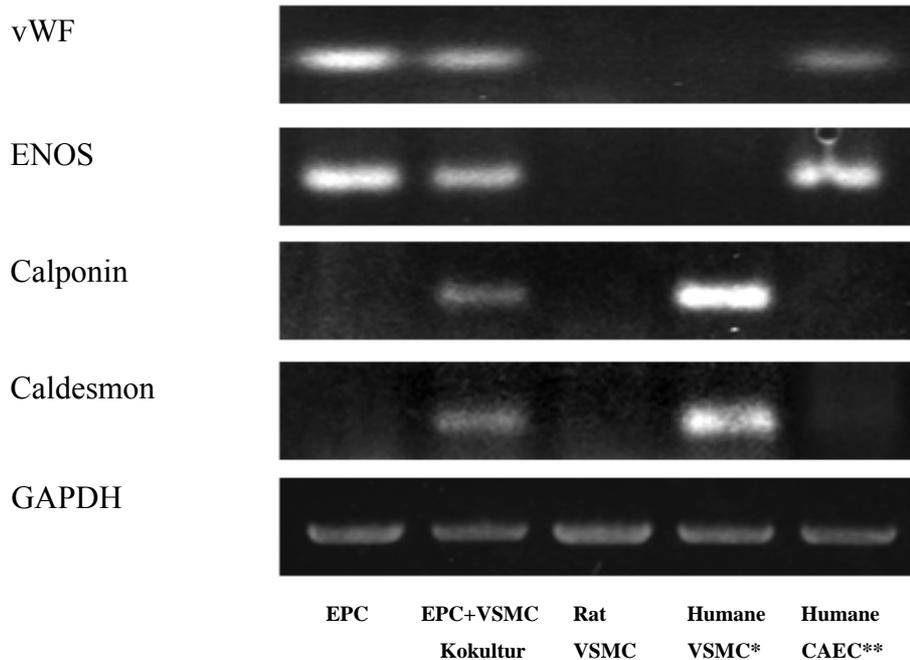
Abb.15

Anfärbung von transdifferenzierten EPC mit Dil-ac-LDL und Expression von den spezifischeren Markermolekülen smMHC (smooth-muscle-myosin-heavy-chain), Calponin und h-Caldesmon, welche von höhergradig differenzierten glatten Muskelzellen exprimiert werden.

Diese Bilder zeigen, dass die transdifferenzierten endothelialen Progenitorzellen nicht nur positiv für den glattmuskelzellspezifischen Marker α -sma sind, sondern weitere Marker für glatte Muskelzellen exprimieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die EPC sich weiter, höhergradig in VSMC differenzieren. Die doppelte Anfärbung von Dil-ac-LDL und den spezifischen Markern smMHC (smooth-muscle-myosin-heavy-chain), Calponin und h-Caldesmon, zeigt dass es sich um transdifferenzierte EPC handelt. Die Ratten-VSMC der Kokultur färbten sich nicht mit Dil-ac-LDL (siehe 4.3). Somit ließ sich eine höhergradige Differenzierung der EPC in VSMC nachweisen und es erfolgte daraufhin die Untersuchung der Genexpression der transdifferenzierten EPC.

4.4.3 Human-spezifische Genexpression nach Kokultivierung

Neben dem immunhistochemischen Nachweis der VSMC Markermoleküle, erfolgte der zusätzliche Nachweis von VSMC-Markern, auf m-RNA Ebene mittels RT-PCR. Die endothelspezifischen Marker vWF und ENOS wurden von den EPC, der EPC-VSMC Kokultur und von den humanen CAEC, mittels humanspezifischer Primer untersucht. Es wurden humanspezifische Primer verwendet, um ausschließlich eine Transdifferenzierung der humanen EPC zu erfassen und nicht die von den glatten Ratten-Muskelzellen der Kokulturen exprimierten Marker. GAPDH (Glyzerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase) wurde als Haushaltsgen und als Kontrolle für die gleiche Beladung der Proben eingesetzt.



**humane glatte Gefäßmuskelzellen, **humane koronare Endothelzellen*

Abb.16

Es wurden von den jeweiligen Zellen Kulturen angelegt und für 7 Tage bei 37 C° inkubiert. Die EPC-VSMC Kokultur wurde wie in 4.4.2 beschrieben, angelegt. Nach 7 Tagen erfolgte eine m-RNA Aufarbeitung und es wurde eine reverse Transkriptase eingesetzt, um die RNA in cDNA umzuschreiben. Die cDNA wurde als Ausgangsprodukt für die PCR verwendet

Calponin und Caldesmon als glattmuskelzellspezifische Marker, wurden von der EPC-VSMC Kokultur und den humanen VSMC exprimiert.

Es wurde keine Expression der Marker Caldesmon und Calponin von den Ratten-VSMC beobachtet, aber von den humanen VSMC. Was den Nachweis für die humane Spezifität der Primer belegt. Die PCR zeigte, dass die EPC nach 7 Tagen Kokultur mit Ratten-VSMC humanspezifische, glattmuskellzellspzifische Marker exprimierten.

Dies zeigte, dass die transdifferenzierten Zellen nicht nur morphologisch, sondern auch auf m-RNA-Ebene VSMC Markergene exprimieren. Um eine komplette Charakterisierung der transdifferenzierten Zellen durchzuführen, wurden die sich transdifferenzierten VSMC auf funktioneller Ebene analysiert.

4.5 Funktionelle Charakterisierung der transdifferenzierten VSMC

Zur Ergänzung der Charakterisierung der transdifferenzierten Zellen, wurde die Kontraktionsfähigkeit der Zellen getestet. Es wurde die Kontraktionsfähigkeit der transdifferenzierten VSMC durch die Zugabe von 10^{-6} Angiotensin II nachgewiesen.

Kontraktion transdifferenzierter VSMC:

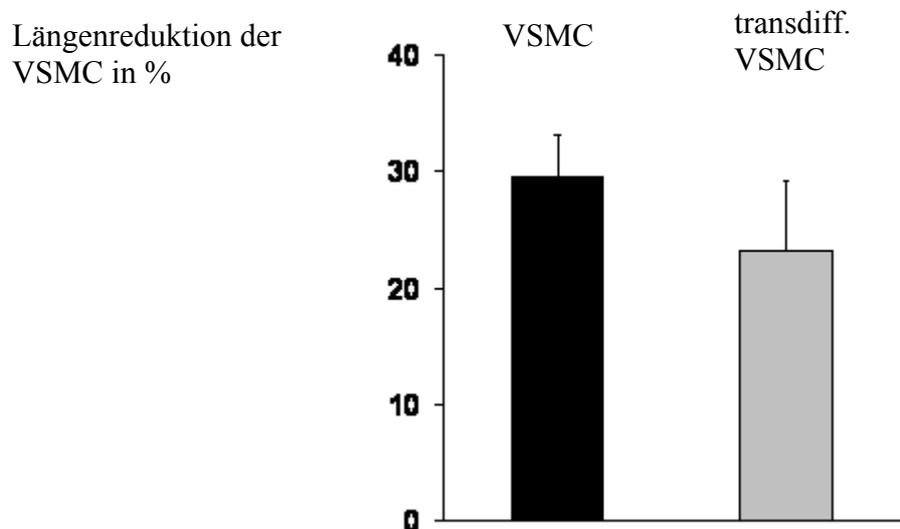
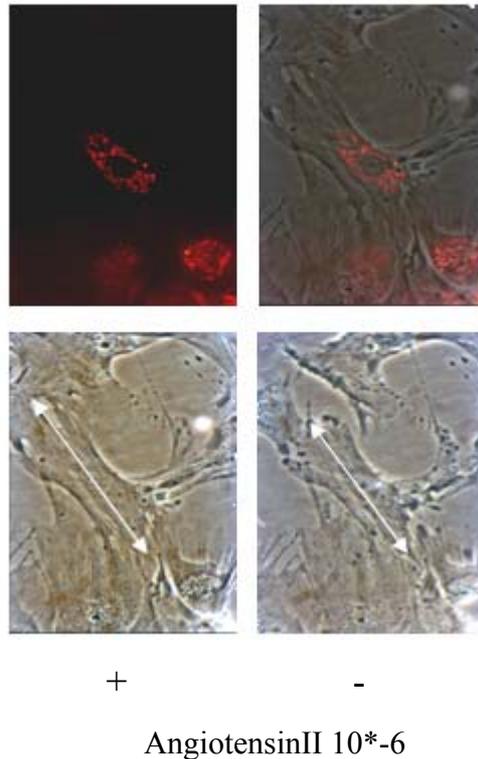


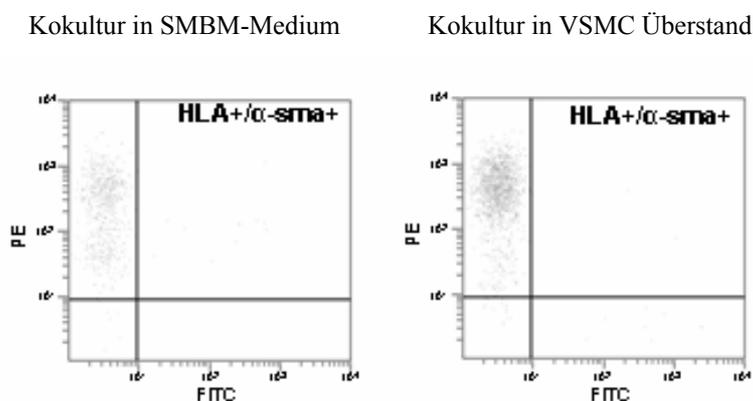
Abb.17

Funktionelle Charakterisierung durch Testung der Kontraktionsfähigkeit der transdifferenzierten EPC, durch die Zugabe von 10^{-6} Angiotensin II.

Wie unsere Ergebnisse zeigen, war 5 min. nach Zugabe des Angiotensins eine Längenreduktion der transdifferenzierten Zellen von EPC in VSMC von 25% zu beobachten. Dieses zeigt, dass die sich transdifferenzierten VSMC auch funktionell glatten Gefäßmuskelzellen entsprechen.

4.6 FACS Analyse der transdifferenzierten EPC

Da unsere obigen Ergebnisse zeigten, dass Kulturüberstand allein keine Transdifferenzierung der EPC bewirkte, unter der Kokultur mit lebenden VSMC jedoch eine Transdifferenzierung zu beobachten war, stellte sich die Frage, ob bereits der alleinige Kontakt von EPC mit den VSMC-Oberflächenmolekülen ausreicht, um eine Transdifferenzierung der EPC in VSMC zu induzieren. Um die Zellen zu fixieren (keine Freisetzung parakriner Faktoren mehr), aber gleichzeitig ihre Oberflächenstruktur zu erhalten, wurden die VSMC, vor Zugabe der EPC mit 5% PFA fixiert.



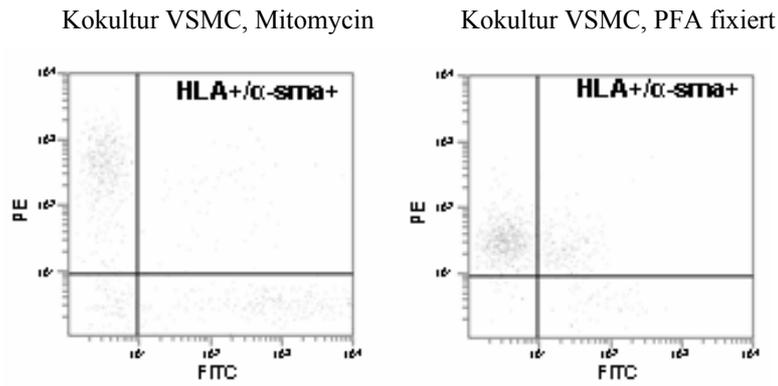


Abb.18

Zur weiteren Charakterisierung, wurde eine EPC-VSMC Kokultur mit Mitomycin vorbehandelten Ratten-VSMC kultiviert. Diese VSMC sind in ihrem Wachstum gestoppt, sekretieren aber weiterhin parakrine Faktoren, und eine weitere Kokultur mit PFA (Paraformaldehyd) vorbehandelten VSMC angelegt und mit Hilfe der Durchflusszytometrie für α -sma und HLA quantifiziert.

α -sma positive Zellen in %

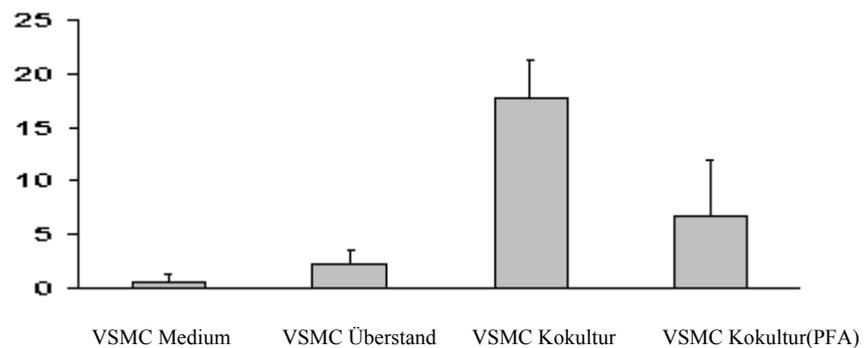


Abb.19

HLA und α -sma positive Zellen aus einer VSMC-EPC-Kokultur in SMBM-Medium kultiviert und in VSMC Überstand kultiviert im Vergleich zu Kokulturen mit Mitomycin vorbehandelten VSMC und PFA fixierten VSMC.

Die Durchflusszytometrie ergab, eine nur minimale Transdifferenzierung der EPC in VSMC nach Kultivierung in VSMC Medium (Überstand). Es zeigte sich jedoch eine hohe Transdifferenzierungsrate der EPC in VSMC, nach Kultivierung mit PFA fixierten VSMC. Dieses spricht dafür, dass extrazelluläre Adhäsionsmoleküle, bei der Transdifferenzierung der EPC in VSMC eine Rolle spielen und nicht ausschließlich die mitogenen parakrinen Faktoren. Den höchsten Anteil der transdifferenzierten EPC

in VSMC ergab die EPC-VSMC Kokultur mit lebenden Mitomycin vorbehandelten Ratten-VSMC. Mitomycin hemmt das Wachstum, aber nicht die Sekretion von parakrinen Faktoren der VSMC. Im Gegensatz zu Mitomycin vorbehandelten VSMC sezernieren die PFA fixierten VSMC keine parakrinen Faktoren. Dieses spricht dafür, dass sowohl extrazelluläre Adhäsionsmoleküle, als auch sezernierte parakrine Faktoren in Kombination die Transdifferenzierung der EPC in VSMC vermitteln.

4.7 Transdifferenzierung versus Fusion

Bei genauer Beobachtung der immunhistochemisch angefärbten Kokulturen fiel auf, dass in einigen der transdifferenzierten EPC doppelte Zellkerne waren (Abb.20). In vorausgegangenen Arbeiten wurde bereits beschrieben, dass ein signifikanter Anteil der sich differenzierenden Stammzellen auf eine Fusion mit den umliegenden Zellen zurückzuführen ist. Daher haben wir uns in dieser Arbeit die Frage gestellt inwieweit es sich bei unseren Beobachtungen (Abb. 20) ebenfalls um eine Fusion oder eher um eine tatsächliche Transdifferenzierung der EPC handelt.

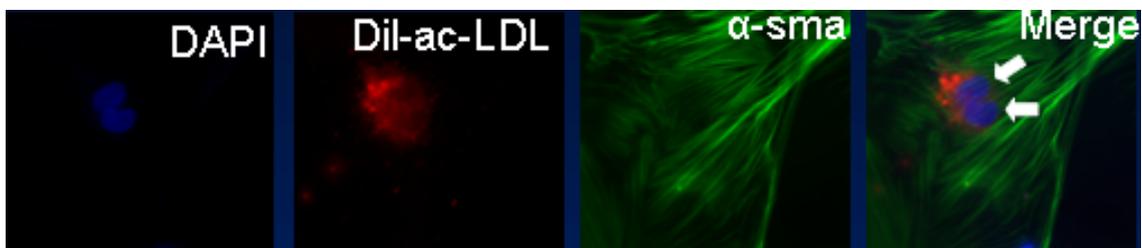


Abb.20

Transdifferenzierte (α -sma-exprimierende; grün) EPC (angefärbt mit Dil-Ac-LDL; rot) mit zwei Zellkernen (blau). Der fehlende Nachweis von GFP in den transdifferenzierten EPC schließt jedoch eine Fusion aus.

Um den Anteil von transdifferenzierten bzw. fusionierten zu quantifizieren wurden die Dil-ac-LDL markierten EPC für unterschiedliche Zeiträume (1,4,7 Tage) mit GFP exprimierenden glatten Gefäßmuskelzellen kokultiviert (GFP und smooth-muscle Cells wurden zuvor aus ubiquitär GFP exprimierenden Mäusen isoliert). Der Übertritt von GFP in die zugegebenen EPC wäre hierbei ein Hinweis für eine Fusion von EPC und den kokultivierten VSMC. Der fehlende Nachweis von GFP in den

transdifferenzierten EPC schließt jedoch eine Fusion aus. Es wurde daher der Anteil Dil-ac-LDL positiven und α -sma positiven Zellen sowie GFP positiven Zellen (fusionierte EPC) ins Verhältnis zu den Dil-ac-LDL und smooth-muscle-actin positiven und GFP negativen Zellen (transdifferenzierte Zellen) gesetzt (Abb.21).

Hierbei zeigte sich, dass hauptsächlich eine Transdifferenzierung und nur in einem sehr geringem Ausmaß eine Fusion stattfand. Die Fusion scheint daher bei unseren in-vitro Beobachtungen eine sehr untergeordnete Rolle zu spielen.

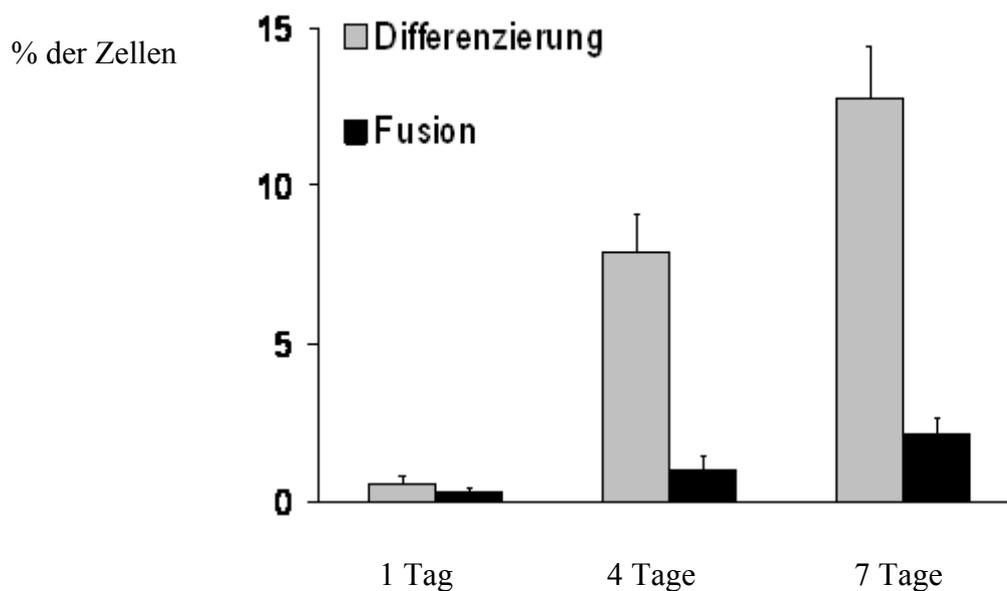


Abb.21

Die Graphik zeigt die Quantifizierung transdifferenzierter bzw. fusionierter EPC. Die Ergebnisse belegen, dass die Transdifferenzierung in weit grösserem Ausmaß zur phänotypischen Veränderung beiträgt als die Fusion. Die Fusion von EPC und VSMC scheint somit bei den beobachteten Prozessen eine untergeordnete Rolle zu spielen

5 Diskussion

5.1 Bedeutung von VSMC und bisheriges Verständnis über die Herkunft von VSMC bei der Entstehung von vaskuloproliferativen Erkrankungen

Störungen der wesentlichen Endothelfunktionen werden als initiales Ereignis in der Entwicklung der Arteriosklerose angesehen¹. Die Migration und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen wird neben dem entzündlichen Vorgang für die Entstehung vaskuloproliferativen Erkrankungen verantwortlich gemacht^{1,11,12}. Verletzung und mechanische Reize bewirken eine Migration von VSMC in die Intima des Gefäßes. Dort findet eine Proliferation der VSMC und somit eine Verdickung der Gefäßwand statt. Diese Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen bildet die Grundlage für die Entwicklung vaskuloproliferativer Erkrankungen.

Die Herkunft dieser VSMC und die molekularen Mechanismen der Mobilisierung und das so genannte „Homing“ sowie letztlich die Differenzierung von glatten Vorläufer-Muskelzellen ist noch nicht genau bekannt.

Neben der Migration aus den schon bestehenden Zellen der Neointima ist die Migration aus der Media und Adventitia denkbar¹⁶. Die aktuellen Studien geben allerdings keine eindeutigen Hinweise darauf, dass dieser Mechanismus ausschließlich für die Neointimaentstehung verantwortlich gemacht werden kann. Es gibt nur wenige Studien, die dokumentieren, dass VSMC von der Media über die Lamina elastica interna in die subendotheliale Schicht migrieren^{7,78}. Im Gegensatz dazu konnte beobachtet werden, dass es auch zu einer Neointimaentwicklung kommen kann, nachdem die Zellen einer Media fast vollständig eliminiert wurden⁷⁹. Weiterhin konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass eine Woche nach Gefäßverletzung neointimale Zellen keine VSMC-Marker exprimierten, sondern morphologisch eher an hämatopoetische Zellen erinnerten. Diese Beobachtung wird von der Erkenntnis unterstützt, dass vor Entstehung einer Neointima Blutzellen sich von luminal an die verletzte Arterie heften^{79,80}. Des Weiteren hat es Studien über die Adhäsionsmoleküle und Chemokine gegeben, welche eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von

Blutzellen spielen, aber keinen Einfluss auf die Migration beziehungsweise auf die Proliferation von VSMC haben. Es wurde beobachtet, dass nach ihrer Blockierung eine neointimale Hyperplasie weitestgehend verhindert werden konnte^{81,82}.

Durch die genannten Erkenntnisse stellt sich die Frage, ob die Neointimaentstehung nicht nur durch in der Gefäßwand ansässige Zellen bedingt ist, sondern zirkulierende hämatogene, aus dem Knochenmark stammende Zellen zur Neointimaentstehung beitragen können. Für diese Theorie spricht, dass Simper et al. zeigen konnten, dass zirkulierende Glattmuskel-Progenitorzellen in humanem peripherem Blut existieren¹⁸. Weitere Studien zeigten, dass hämatopoetische, aus dem Knochenmark stammende Zellen an der Bildung von arteriosklerotischen Plaques beziehungsweise an der Neointimabildung beteiligt sind^{19,73}. Es wurde weiterhin berichtet, dass Flk-1 positive, aus embryonalen Stammzellen stammende Zellen als Gefäß-Progenitorzellen agieren können und sowohl beim Fötus als auch bei Erwachsenen zur Neovaskularisierung beitragen^{72,83}. Das Knochenmark könnte daher eine zusätzliche Quelle von Gefäßzellen sein, die bei der Post-Angioplastie-Restenose zum pathologischen Remodeling beitragen.

5.2 Stellenwert der Stammzelltherapie

In der Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen spielt seit neuestem die Stammzelltherapie eine wichtige Rolle. Es werden sowohl die Stammzelltherapie nach akutem Myokardinfarkt und Ballonangioplastie als auch die therapeutische Angiogenese bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit durch Stammzellen in neusten Studien untersucht⁸⁴. Sowohl die TOPCARE-AMI-Studie und die BOOST-Studie als auch die REPAIR-AMI-Studie²⁴⁻²⁶ zeigten Erfolge in der Therapie von Patienten nach akutem Myokardinfarkt, sowohl mit adulten Stammzellen als auch mit endothelialen Progenitorzellen aus dem peripheren Blut oder dem Knochenmark.

Zirkulierende, endotheliale Progenitorzellen stellen eine Vorläuferzellart aus dem Knochenmark stammend dar.

Eine japanische Arbeitsgruppe⁸⁴ konnte 2002 erstmals in einer doppelblinden, randomisierten Studie Daten präsentieren, welche Erfolge in der therapeutischen Angiogenese durch autologe Stammzelltherapie für Patienten mit chronischer Extremitätenischämie dokumentierten.

Neben den positiven Effekten einer Stammzelltherapie, ist das Risikopotential einer Stammzelltherapie allerdings noch nicht genau abschätzbar. Zirkulierende vaskuläre Progenitorzellen scheinen beispielsweise eine maßgebliche Rolle bei der Entwicklung vaskuloproliferativer Erkrankungen wie der Arteriosklerose oder Restenose nach Ballonangioplastie zu spielen¹⁹. So zeigte die Studie von Sata et al.¹⁹, dass hämatopoetische Stammzellen durch Differenzierung in glatte Gefäßmuskelzellen zu der Entwicklung einer Arteriosklerose beitragen. Die klinische MAGIC-Studie⁷⁵ wurde sogar aufgrund einer erhöhten Restenoserate bzw. einer vermehrten Progression der KHK distal der Infusionstelle nach G-CSF Therapie und intrakoronarer Infusion von Stammzellen abgebrochen.

Untersuchungen der letzten Zeit haben gezeigt, dass nicht nur primitive Stammzellen sondern auch bereits prädifferentiierte vaskuläre Progenitorzellen wie endotheliale Progenitorzellen weiterhin das Potential zur Transdifferentiiierung sogar über die Differenzierungslinien hinaus besitzen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sich EPC unter anderem in quergestreifte Muskelzellen oder sogar Kardiomyozyten differenzieren können²⁸.

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit, ob eventuell die bereits in klinischen Studien eingesetzten²⁴, zirkulierenden, endothelialen Progenitorzellen ebenfalls noch das Potential zur Transdifferentiiierung in VSMC besitzen und so an der Neointimaentstehung beteiligt sind, wird durch die Erkenntnis unterstützt, dass bei der Entwicklung von embryonalen Gefäßen, sich die glatten Gefäßmuskelzellen aus Endothel differenzieren⁶⁹ und endotheliale Progenitorzellen das Potential besitzen, sich über die Differenzierungslinien hinaus zu differenzieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass embryonale Endothelzellen die Fähigkeit besitzen, zu

mesenchymalen Zellen zu transdifferenzieren und „smooth muscle cell actin“ zu exprimieren, was eine Herkunft der neointimalen glatten Gefäßmuskelzellen von Endothelzellen denkbar erscheinen lässt¹⁷.

Diese Arbeit zeigt erstmals, dass endotheliale Progenitorzellen das Potential besitzen, sich in funktionelle glatte Muskelzellen zu transdifferenzieren. Sie gibt Hinweise auf die hieran beteiligten Mechanismen. Wie die obigen Ergebnisse zeigen, transdifferenzieren sich die EPC nach 7 Tagen in Kokultur mit VSMC, aber nicht in VSMC-Medium und VSMC-Überstand alleine. Dabei zeigte sich, dass die Inkubation in Medium alleine nicht ausreicht, um eine Transdifferenzierung von EPC hervorzurufen. Erst in Kokultur mit VSMC zeigte sich eine Transdifferenzierung der EPC in VSMC. Dieses zeigt, dass sowohl die Zell-Zell Interaktion als auch sezernierte parakrine Faktoren bei der Transdifferenzierung der EPC in VSMC eine Rolle spielen.

5.3 Zusammenhang zwischen In-Stent-Restenose nach Angioplastie und zirkulierenden aus dem Knochenmark stammenden Progenitorzellen

Die Faktoren, die zur Restenosierung des dilatierten Gefäßes beitragen, sind im Wesentlichen das unmittelbare elastische Zusammenziehen des Gefäßes nach Angioplastie (Recoil), ein negatives vaskuläres Remodeling und die durch Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen bedingte Intimahyperplasie^{85,86}.

In obengenannten klinischen Studien wurden EPC beziehungsweise Knochenmarkstammzellen nach einer Ballonangioplastie, nach akutem Myokardinfarkt eingesetzt^{24-26,75}. Die Zellen wurden nach Ballonangioplastie intrakoronar appliziert, in der MAGIC Studie mit der vorherigen Gabe von GCSF kombiniert. Eine neue Studie zeigte einen Zusammenhang zwischen der Anzahl von aus dem Knochenmark stammenden, zirkulierenden CD34+ Zellen und einer In-Stent-Restenose. In dieser Studie wurde beobachtet, dass die Patienten, welche eine Restenose nach Stentimplantation entwickelten, einen Anstieg von CD34+ Zellen aufwiesen. Bei den Patienten welche keine Restenose entwickelten, war ein Absinken der CD34+ Zellen zu beobachten. Die Anzahl der CD34+ Zellen wurde vor und nach

der Ballonangioplastie mit Stentimplantation gemessen⁸⁷. Dieses spricht für einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der zirkulierenden CD34+ Progenitorzellen und der Entwicklung einer Re-intent Stenose.

Eine Frage ist, ob die Anzahl der aus dem Knochenmark rekrutierten Progenitorzellen von der Schwere der Gefäßläsion abhängt. Hinweise hierzu gibt eine tierexperimentelle Studie von Sata et al.⁸⁸, welche ergab, dass nach schweren Läsionen eine bedeutende Zahl der neointimalen und medialen Zellen gefunden wurden, welche aus dem Knochenmark stammen. Im Gegensatz dazu wurden nach leichten Läsionen in der Neointima kaum aus dem Knochenmark stammende Zellen gefunden. Auch beim Menschen wird angenommen, dass aus dem Knochenmark stammende Zellen immer dann wesentlich zur Plaquebildung beitragen, wenn Arterien schwere Läsionen, wie Ballondilatation zugefügt werden⁷³.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Stammzelltherapie mit peripheren, aus dem Knochenmark stammenden Zellen beziehungsweise EPC, besonders nach Ballonangioplastie ein Risikopotential durch Rekrutierung dieser applizierten Zellen und dadurch vermehrt bedingte Restenose, darstellen könnte.

5.4 Mögliche molekulare Mechanismen der Transdifferenzierung endothelialer Progenitorzellen in glatte Muskelzellen

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, scheint eine Inkubation von EPC mit glattmuskulären Wachstumsfaktoren (VSMC Medium) für eine Transdifferenzierung dieser Zellen nicht ausreichend zu sein. Erst die Kokultivierung von EPC mit VSMC führt zu einer Transdifferenzierung eines gewissen Prozentsatzes dieser Zellen. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass der Zell-Zellkontakt eine essentielle Voraussetzung für die Transdifferenzierung darstellt. Entsprechend hierzu zeigen unsere Ergebnisse in der Tat, dass eine Kokultur von EPC mit nicht mehr lebenden VSMC, bei denen lediglich die Struktur der oberflächlichen Adhäsionsmoleküle erhalten ist (PFA), bereits zu einer Transdifferenzierung von EPC in VSMC führt. Obwohl die interzellulären Kontakte für eine Transdifferenzierung offensichtlich essentiell sind, können aus VSMC sezernierte soluble Faktoren die Transdifferenzierung dieser Zellen weiter steigern. Diese Beobachtungen entsprechen auch jüngsten Untersuchungen von Xiao et al. die zeigen konnten, dass die

Differenzierung endothelialer Progenitorzellen (sca+) in glatte Muskelzellen sowohl von den Integrinen alpha1, alpha V und beta 1, als auch von PDGF-BB abhängig ist⁸⁹. Welche intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen jedoch an der Differenzierung beteiligt sind, bleibt noch völlig unklar.

Simper et al.¹⁸ zeigte, dass die Differenzierung unselektierter humaner mononuklearer Zellen in glatte Muskelzellen auch ohne Zell-Zellkontakt, allein durch PDGF-BB möglich ist. Im Vergleich zu unserer Arbeit verwendeten sie aber zum einen Zellen, welche, anders als die EPC in der vorliegenden Arbeit, nur zu einem geringeren Grad differenziert waren. Zum anderen wurden die mononuklearen Zellen über 5 Wochen inkubiert, bevor sie die Morphologie von glatten Muskelzellen zeigten. In unserer Arbeit zeigten die EPC in Kokultur mit VSMC bereits nach 4 Tagen die beginnende Anpassung an die Morphologie von VSMC. Möglicherweise spielt auch bei der Transdifferenzierung der Grad der Vordifferenzierung der verwendeten Zellen eine Rolle. Auch eine Studie von Badorff et al.²⁸ zeigt, dass eine Zell-Zell-Interaktion nötig ist, damit EPC sich in funktionelle Kardiomyozyten differenzieren und durch diesen Prozess eventuell zu einer Verbesserung der systolischen Funktion des Herzens nach Myokardinfarkt beitragen könnten. In dieser Studie wurden die EPC in Kokultur mit Kardiomyozyten kultiviert.

Die Zell-Zell-Interaktion wurde in der vorliegenden Arbeit, durch das Anlegen der Kokultur EPC-VSMC geschaffen und gewährleistet letztlich den für die Transdifferenzierung der EPC in VSMC nötigen Zellkontakt. Durch dieses Phänomen wird gezeigt, dass EPC, wie es scheint, je nach Zell-Zell-Kontakt in der Lage sind, sich in verschiedene Zellpopulationen zu differenzieren und somit sowohl einen negativen Effekt wie die Restenose, als auch positive Effekte wie Neoangiogenese, Reendothelialisierung und Myokardegeneration haben können.

Ein weiterer wichtiger Diskussionspunkt ist momentan die Applikationsart, die Art der Zellaufreinigung und Zellpopulation und die kombinierte Applikation der aus dem Knochenmark stammenden Stammzellen mit Cytokinen (zB. GCSF). Es stellt sich die Frage ob eine bestimmte Applikationsart die Transdifferenzierung von EPC in VSMC besonders fördert beziehungsweise hemmt. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass sowohl extrazelluläre Adhäsionsmoleküle als auch sezernierte parakrine Faktoren, bei der Transdifferenzierung der EPC in VSMC eine Rolle spielen.

Der Granulocyte Colony-Stimulation Factor ist ein natürlicher Stimulus der Stammzellmobilisation aus dem Knochenmark. In der MAGIC Studie wurden Patienten nach akutem Myokardinfarkt 4 Tage mit GCSF behandelt, dann erfolgte die Ballonangioplastie, Stenting und die intrakoronare Applikation von CD34+ Zellen. Es zeigte sich, dass die einzelne Gabe von GCSF sicher war, die kombinierte Gabe mit CD34+ Zellen allerdings neben einer verbesserten systolischen Funktion, eine erhöhte Restenoserate zeigte. Eine angenommene Ursache dieser erhöhten Restenose könnte neben der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen in VSMC¹⁹ eine Transdifferenzierung der applizierten Stammzellen in VSMC sein, welche aber auf der anderen Seite eine Verbesserung der systolischen Funktion bewirkten. Es scheint daher besonders die Kombination einer aus dem Knochenmark stammenden Stammzellapplikation mit GCSF, einen erhöhten Risikofaktor in der intrakoronaren Stammzellapplikation darzustellen, da die alleinige Therapie mit aus dem Knochenmark stammenden Stammzellen, in anderen Studien eine verbesserte linksventrikuläre Funktion und keine erhöhte Restenose zeigte²⁴⁻²⁶.

5.5 Grad der Differenzierung

In vielen Zellarten wird die Expression von α -sma beobachtet, welches nicht immer eine vollständige Transdifferenzierung dieser Zellen in glatte Muskelzellen zur Folge hat. Wir zeigen in den vorgestellten Ergebnissen, dass die transdifferenzierten Zellen, weitere kontraktile, glattmuskelspezifische Marker exprimieren. Die Expression dieser Markerproteine spricht für eine hochgradige Ausdifferenzierung dieser Zellen, da ein entsprechendes Expressionsmuster nur in terminal differenzierten VSMC zu beobachten ist⁷⁷. Entsprechend dem von uns beobachteten Expressionsmuster, welches eine Ausdifferenzierung in funktionelle VSMC nahe legt, konnten wir auch in funktionellen Untersuchungen zeigen, dass sich diese Zellen ähnlich wie aus der koronaren Strombahn isolierte VSMC kontrahieren. Diese Ergebnisse liefern zusammen genommen eine starke Evidenz für eine tatsächlich funktionelle Differenzierung von EPC in VSMC. Ungeachtet dieser Ergebnisse bleibt jedoch die Frage offen, ob diese von uns *in vitro* beobachtete Transdifferenzierung tatsächlich *in vivo* auftritt und dort funktionelle Bedeutung hat. Hierüber gibt es zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Untersuchungen.

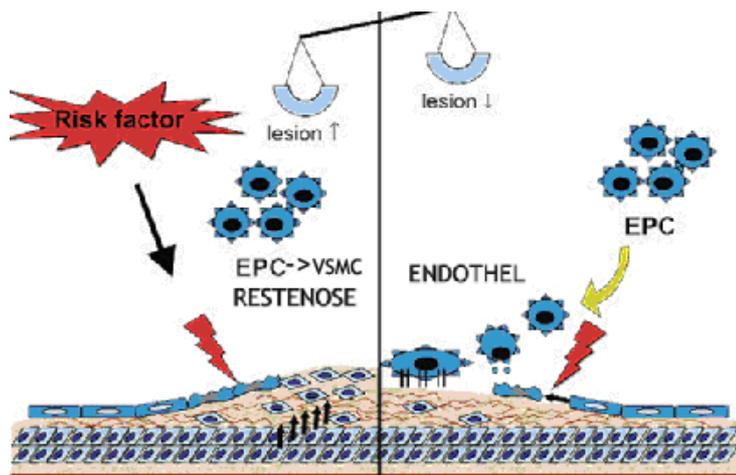
5.6 Transdifferenzierung der EPC versus Zellfusion

Viele Tierstudien zeigten, dass Stammzellen in der Lage sind, sich in andere Zelllinien zu differenzieren⁹⁰⁻⁹².

Auf der anderen Seite, zeigen jüngste Studien, dass Zellfusion eine wichtige Rolle für die phenotypische Differenzierung von Zellen spielen kann⁹³. Wie unsere Ergebnisse zeigen, kommt es nur in einem sehr geringen Prozentsatz zu einer Fusion von EPC und VSMC, die in der Folge eine phenotypische Transdifferenzierung der EPC in VSMC bewirkt. Vorangegangene Studien konnten jedoch auch zeigen, dass Zellfusion auch in der sich entwickelnden Neointima zu beobachten ist⁸⁸. Dieses wird durch Beobachtungen unterstützt, die eine Fusion von VSMC (Polyploidisierung) nach unterschiedlichen mechanischen und humoralen Stimuli beschreiben⁹⁴. Jüngste Untersuchungen zeigen jedoch, dass in einem *in vivo* Modell nach Herztransplantation die Fusion von Spender und Empfängerzellen ein äußerst seltenes Ereignis darstellt⁹⁵. Sowohl die Beobachtungen vorrausgegangener Studien als auch unsere eigenen Ergebnisse legen somit nahe, dass eine Fusion von EPC und VSMC zwar in seltenen Fällen zu beobachten ist, wahrscheinlich jedoch nicht in größerem Ausmaße zur phenotypischen Veränderung und Ausdifferenzierung der Zellen *in vitro* als auch *in vivo* beiträgt.

5.7 Neoangiogenese versus Restenose

Es stellt sich die Frage, ob die teilweise Transdifferenzierung von endothelialen Progenitorzellen in glatte Muskelzellen neben des eventuellen Risikopotentials durch die Entwicklung einer Restenose auch von Bedeutung für die Reifung und Stabilisierung neuer Gefäße während der der Angiogenese sein könnte.



Werner et al. modifiziert

Es wird daraus ersichtlich, dass die genaue und komplette Funktion von endothelialen Progenitorzellen noch nicht vollends bekannt ist. Die Ursache des in den beschriebenen Studien^{24,26,76,96} positiven Therapieeffektes der Stammzelltherapie wird zum einen mit der Fähigkeit der Stammzellen zur Neovaskularisation des Myokards²⁷, zum anderen mit der Entwicklung von funktionellen Kardiomyozyten aus hämatopoetischen Progenitorzellen begründet²⁸. Die in der TOPCARE Studie gemessenen Parameter unterstützen die Theorie, dass eine progenitorzellinduzierte Neovaskularisation einen beträchtlichen Anteil an dem Therapieeffekt hat.

EPC spielen eine wichtige Rolle bei der Neoangiogenese. Angiogenese bezeichnet das Wachstum von Blutgefäßen, ausgehend von bestehenden Gefäßstrukturen durch Rekrutierung, Integration und Proliferation endothelialer Progenitorzellen, welche zu einem Aussprossen neuer Kapillaren führen. Zu Beginn der Gefäßneubildung, werden EPC durch die chemotaktische Wirkung von VEGF (vascular endothelial growth factor) zur Endothelbildung rekrutiert. Scherkräfte bewirken eine Induktion von PDGF- β (platelet derived growth factor) und aktivieren somit perivaskuläre, mesenchymale Zellen und glatte Muskelzellen, sich an das proliferierende Endothel anzulagern⁹⁷⁻⁹⁹. Auch GCSF zählt zu den rekrutierenden angiogenetischen Zytokinen. Durch das hier gezeigte Potential der EPC, sich in VSMC zu differenzieren, ergibt sich die Überlegung ob endotheliale Progenitorzellen bei der Angiogenese zum einen durch VEGF die Endothelbildung bewirken, zum anderen durch die Transdifferenzierung in VSMC zur endothelumgebenden Muskelschicht beitragen

können und somit die Stabilisierung des Gefäßes unterstützen. Es wird beschrieben, dass diese sogenannten Perizyten unterschiedlichen Ursprungs sind¹⁰⁰. Yamashita et al zeigten in ihrer Studie bereits, dass eine embryonale Vorläuferzelle existiert, welche abhängig vom Wachstumsfaktor, in der Lage ist sich in Endothelzellen und glatte Muskelzellen zu differenzieren⁷².

5.8 Therapiemöglichkeiten

Wie diese Diskussion zeigt, ist die Konsequenz der hier vorgestellten Ergebnisse nicht genau einschätzbar. Auf der einen Seite kann die Transdifferenzierung von EPC in VSMC nach Stammzelltherapie ein Risikopotential für die Entstehung einer Restenose nach Ballonangioplastie darstellen, auf der anderen Seite kann dieses Potential wichtig für die Reifung und Stabilisierung von Gefäßen bei der Angiogenese sein und somit die Durchblutung von Myokard nach einem Myokardinfarkt verbessern. Es stellt sich daher die Frage, ob eine generelle therapeutische Hemmung der Transdifferenzierung von EPC, zwar das Risiko der Entstehung einer Restenose vermindern würde, aber auf der anderen Seite eine effektive Angiogenese verhindern würde. Eine weitergehende Überlegung wäre, dass die Reendothelialisierung⁵⁰ durch EPC, durch die Hemmung der Transdifferenzierung von EPC in VSMC, eine verbesserte Heilung von Gefäßschäden bewirken könnte.

5.9 Ausblick

Obwohl unsere Ergebnisse erste Hinweise darauf geben, welche Faktoren an der Transdifferenzierung endothelialer Progenitorzellen in glatte Muskelzellen beteiligt sind, müssen weitere Untersuchungen klären, welche Rolle insbesondere den Zell-Zell Adhäsionsmolekülen beziehungsweise den löslichen Faktoren zukommt. Eine Kombination multipler Faktoren bei diesen Prozessen ist jedoch denkbar. Hieraus könnten nun Strategien entwickelt werden, um die Transdifferenzierung von EPC in VSMC effektiv zu hemmen und so die Differenzierung dieser Zellen in ausschließlich eine Linie (Endothelzellen) zu fördern. Auf diese Weise ließe sich dann untersuchen,

welche physiologische Bedeutung die Transdifferenzierung von EPC in VSMC in vivo tatsächlich hat. In einem in vivo Modell der Angiogenese könnte beispielsweise untersucht werden, ob die so vorbehandelten EPC noch effektiv eine Angiogenese induzieren können. Eine mangelnde Gefäßreifung aufgrund der unzureichenden Rekrutierung von VSMC würde hier nur eine Bildung von vorläufigen, fragilen und nicht funktionellen Gefäßen nach sich ziehen.

In einem weiteren in vivo Modell einer Gefäßverletzung (arterielle Dilatation) könnte mit so vorbehandelten endothelialen Progenitorzellen untersucht werden, welche Rolle die Transdifferenzierung von EPC bei der Entstehung von vaskuloproliferativen Erkrankungen spielt. Hier wäre es von großem Interesse, ob eine mangelnde Transdifferenzierung tatsächlich eine verbesserte Reendothelialisierung und gleichzeitig eine verringerte, neointimale Akkumulation von glatten Gefäßmuskelzellen und somit eine verringerte Restenosierung bewirkt. Aufgrund der vorbeschriebenen Komplikationen in klinischen Studien, bei denen EPC zum Einsatz kamen, ist eine genaue Kenntnis ihres Differenzierungsverhaltens notwendig. Die hier vorgestellte Arbeit soll daher eine Grundlage bieten, um den Nutzen künftiger klinischer Anwendungen zu optimieren und gleichzeitig potentielle Risiken ausschließen zu können.

6 Zusammenfassung

Mit wachsendem Interesse werden Stammzellen in klinischen Studien bei der Therapie von vaskuloproliferativen Erkrankungen eingesetzt. Sie ist derzeit eine vielversprechende, innovative Therapiemöglichkeit nach akutem Myokardinfarkt und Ballonangioplastie, aber auch bei anderen kardiovaskulären Erkrankungen. Die Patienten zeigten nach Stammzelltherapie mit aus dem Knochenmark stammenden Stammzellen eine deutlich verbesserte linksventrikuläre Funktion, welches zum einen mit einer verbesserten Neoangiogenese^{35, 45}, zum anderen mit der Differenzierung von EPC in Kardiomyozyten²⁸ begründet wird. Weitere jüngere Studien zeigen, dass endotheliale Progenitorzellen, die eine kleine Population von Vorläuferzellen in peripherem Blut darstellen, durch verbesserte Reendothelialisierung eine Restenose nach Ballonangioplastie verringern⁵⁰. Jüngere Studien zeigten jedoch auch, dass aus dem Knochenmark stammende Stammzellen nicht nur einen positiven Effekt

Gefäßwände hat, sondern auch zum pathologischen Remodeling der Gefäßwände beitragen kann¹⁹. Bisher ist das Differenzierungspotential von endothelialen Progenitorzellen noch nicht genau bekannt. Wir stellen uns die Frage, ob endotheliale Progenitorzellen das Potential besitzen, sich in glatte Muskelzellen zu differenzieren und so eventuell zu einer Restenose, oder aber zu einer Stabilisierung und Ausreifung von Gefäßen beitragen können. Neben dem Differenzierungspotential der EPC waren für uns die molekularen Mechanismen der Transdifferenzierung endothelialer Progenitorzellen in glatte Muskelzellen von Interesse.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen nun, dass endotheliale Progenitorzellen in der Lage sind, sich in glatte Muskelzellen zu differenzieren. Unsere Arbeit zeigte dabei eine komplette Ausdifferenzierung der EPC in VSMC. Die Ergebnisse belegen, dass der Zell-Zellkontakt eine essentielle Voraussetzung für die Transdifferenzierung der EPC darstellt. Trotz der offensichtlich für die Transdifferenzierung der EPC in VSMC essentiellen interzellulären Kontakte kann die Transdifferenzierung durch die von VSMC sezernierten, solublen Faktoren noch gesteigert werden. Unsere Ergebnisse zeigen weiterhin, dass es nur in einem sehr geringen Prozentsatz zu einer Fusion von EPC und VSMC kommt, welche und in der Folge eine phenotypische Differenzierung der EPC in VSMC bewirkt.

Welche genaue Rolle das in dieser Arbeit gezeigte Potential der Transdifferenzierung endothelialer Progenitorzellen in der Entstehung beziehungsweise der Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen spielt, ist noch nicht abzuschätzen. Zum einen kann die Stammzelltherapie mit endothelialen Progenitorzellen durch verbesserte Reendothelialisierung und Angiogenese zur Myokardregeneration beitragen, zum anderen ist es möglich, dass sie durch verstärkte Neointimabildung zur Progression vaskuloproliferativer Erkrankungen führt. Zukünftige *in vivo* Untersuchungen sind daher notwendig um die Bedeutung der hier beschriebenen Untersuchungsergebnisse richtig zu verstehen und einordnen zu können.

Die hier vorgestellte Arbeit soll daher eine Grundlage bieten, um den Nutzen künftiger klinischer Anwendungen zu optimieren und gleichzeitig potentielle Risiken ausschließen zu können.

7 Literatur

1. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis--an update*. N Engl J Med, 1986. 314(8): p. 488-500.
2. Nobuyoshi, M., et al., *Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients*. J Am Coll Cardiol, 1988. 12(3): p. 616-23.
3. Serruys, P.W., et al., *Incidence of restenosis after successful coronary angioplasty: a time-related phenomenon. A quantitative angiographic study in 342 consecutive patients at 1, 2, 3, and 4 months*. Circulation, 1988. 77(2): p. 361-71.
4. Kuntz, R.E. and D.S. Baim, *Prevention of coronary restenosis : the evolving evidence base for radiation therapy*. Circulation, 2000. 101(18): p. 2130-3.
5. Mangi, A.A. and V.J. Dzau, *Gene therapy for human bypass grafts*. Ann Med, 2001. 33(3): p. 153-5.
6. Kannel, W.B., et al., *Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study*. Ann Intern Med, 1961. 55: p. 33-50.
7. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. 340(2): p. 115-26.
8. Kelm, M. and B.E. Strauer, [*Endothelial dysfunction. Therapeutic and prognostic issues*]. Internist (Berl), 1999. 40(12): p. 1300-7.
9. Stary, H.C., et al., *A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Circulation, 1994. 89(5): p. 2462-78.
10. Stary, H.C., et al., *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. 15(9): p. 1512-31.
11. Dzau, V.J., R.C. Braun-Dullaeus, and D.G. Sedding, *Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies*. Nat Med, 2002. 8(11): p. 1249-56.
12. Ross, R., *Cell biology of atherosclerosis*. Annu Rev Physiol, 1995. 57: p. 791-804.
13. Dzau, V.J., G.H. Gibbons, and R.E. Pratt, *Molecular mechanisms of vascular renin-angiotensin system in myointimal hyperplasia*. Hypertension, 1991. 18(4 Suppl): p. II100-5.
14. Majesky, M.W., et al., *Production of transforming growth factor beta 1 during repair of arterial injury*. J Clin Invest, 1991. 88(3): p. 904-10.
15. Nabel, E.G., et al., *Recombinant platelet-derived growth factor B gene expression in porcine arteries induce intimal hyperplasia in vivo*. J Clin Invest, 1993. 91(4): p. 1822-9.
16. Scott, N.A., et al., *Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries*. Circulation, 1996. 93(12): p. 2178-87.
17. DeRuiter, M.C., et al., *Embryonic endothelial cells transdifferentiate into mesenchymal cells expressing smooth muscle actins in vivo and in vitro*. Circ Res, 1997. 80(4): p. 444-51.

18. Simper, D., et al., *Smooth muscle progenitor cells in human blood*. *Circulation*, 2002. 106(10): p. 1199-204.
19. Sata, M., et al., *Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis*. *Nat Med*, 2002. 8(4): p. 403-9.
20. Teirstein, P.S., et al., *Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting*. *N Engl J Med*, 1997. 336(24): p. 1697-703.
21. Barleon, B., et al., *Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1*. *Blood*, 1996. 87(8): p. 3336-43.
22. Costa, M.A., et al., *Late coronary occlusion after intracoronary brachytherapy*. *Circulation*, 1999. 100(8): p. 789-92.
23. Morice, M.C., et al., *A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization*. *N Engl J Med*, 2002. 346(23): p. 1773-80.
24. Assmus, B., et al., *Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI)*. *Circulation*, 2002. 106(24): p. 3009-17.
25. Schachinger, V., et al., *Bone-marrow-derived progenitor cell therapy in need of proof of concept: design of the REPAIR-AMI trial*. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2006. 3 Suppl 1: p. S23-8.
26. 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.
27. Urbich, C., et al., *Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells*. *Circulation*, 2003. 108(20): p. 2511-6.
28. Badorff, C., et al., *Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes*. *Circulation*, 2003. 107(7): p. 1024-32.
29. 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.
30. Asahara, T., C. Kalka, and J.M. Isner, *Stem cell therapy and gene transfer for regeneration*. *Gene Ther*, 2000. 7(6): p. 451-7.
31. Prockop, D.J., *Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues*. *Science*, 1997. 276(5309): p. 71-4.
32. Pelosi, E., et al., *Identification of the hemangioblast in postnatal life*. *Blood*, 2002. 100(9): p. 3203-8.
33. Schattman, G.C. and O. Awad, *Hemangioblasts, angioblasts, and adult endothelial cell progenitors*. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2004. 276(1): p. 13-21.
34. Weissman, I.L., *Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities*. *Science*, 2000. 287(5457): p. 1442-6.
35. Asahara, T., et al., *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis*. *Science*, 1997. 275(5302): p. 964-7.
36. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. *Nat Med*, 2003. 9(6): p. 669-76.
37. Fina, L., et al., *Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells*. *Blood*, 1990. 75(12): p. 2417-26.

38. Krause, D.S., et al., *CD34: structure, biology, and clinical utility*. Blood, 1996. 87(1): p. 1-13.
39. 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.
40. Ziegler, B.L., et al., *KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells*. Science, 1999. 285(5433): p. 1553-8.
41. 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.
42. 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.
43. Vasa, M., et al., *Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease*. Circ Res, 2001. 89(1): p. E1-7.
44. Walter, D.H. and S. Dimmeler, *Endothelial progenitor cells: regulation and contribution to adult neovascularization*. Herz, 2002. 27(7): p. 579-88.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. Schmidt-Lucke, C., et al., *Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair*. Circulation, 2005. 111(22): p. 2981-7.
50. Werner, N., et al., *Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury*. Circ Res, 2003. 93(2): p. e17-24.
51. 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.
52. Shintani, S., et al., *Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction*. Circulation, 2001. 103(23): p. 2776-9.
53. 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.
54. Urbich, C. and S. Dimmeler, *Endothelial progenitor cells functional characterization*. Trends Cardiovasc Med, 2004. 14(8): p. 318-22.
55. Gill, M., et al., *Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells*. Circ Res, 2001. 88(2): p. 167-74.
56. 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.

57. Iwaguro, H. and T. Asahara, *Endothelial progenitor cell culture and gene transfer*. Methods Mol Med, 2005. 112: p. 239-47.
58. 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.
59. 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.
60. Heeschen, C., et al., *Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization*. Blood, 2003. 102(4): p. 1340-6.
61. Bahlmann, F.H., et al., *Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells*. Blood, 2004. 103(3): p. 921-6.
62. Strehlow, K., et al., *Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation*. Circulation, 2003. 107(24): p. 3059-65.
63. 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.
64. Llevadot, J., et al., *HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow--derived endothelial progenitor cells*. J Clin Invest, 2001. 108(3): p. 399-405.
65. Laufs, U., et al., *Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis*. Circulation, 2004. 109(2): p. 220-6.
66. Ross, R. and J.A. Glomset, *Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis*. Science, 1973. 180(93): p. 1332-9.
67. Schwartz, S.M., R. Virmani, and M.E. Rosenfeld, *The good smooth muscle cells in atherosclerosis*. Curr Atheroscler Rep, 2000. 2(5): p. 422-9.
68. Velican, C. and D. Velican, *Coronary arteries in children up to the age of ten years II. Intimal thickening and its role in atherosclerotic involvement*. Med Interne, 1976. 14(1): p. 17-24.
69. Nakajima, Y., et al., *Expression of smooth muscle alpha-actin in mesenchymal cells during formation of avian endocardial cushion tissue: a role for transforming growth factor beta3*. Dev Dyn, 1997. 209(3): p. 296-309.
70. Hellstrom, M., et al., *Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse*. Development, 1999. 126(14): p. 3047-55.
71. Hirschi, K.K., S.A. Rohovsky, and P.A. D'Amore, *PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate*. J Cell Biol, 1998. 141(3): p. 805-14.
72. Yamashita, J., et al., *Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors*. Nature, 2000. 408(6808): p. 92-6.
73. Tanaka, K., et al., *Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries*. Circ Res, 2003. 93(8): p. 783-90.
74. Bartunek, J., et al., *Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety*. Circulation, 2005. 112(9 Suppl): p. I178-83.
75. Kang, H.J., et al., *Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic*

- function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial.* Lancet, 2004. 363(9411): p. 751-6.
76. Schachinger, V., et al., *Normalization of coronary blood flow in the infarct-related artery after intracoronary progenitor cell therapy: intracoronary Doppler substudy of the TOPCARE-AMI trial.* Clin Res Cardiol, 2006. 95(1): p. 13-22.
 77. Owens, G.K., et al., *Expression of smooth muscle-specific alpha-isoactin in cultured vascular smooth muscle cells: relationship between growth and cytodifferentiation.* J Cell Biol, 1986. 102(2): p. 343-52.
 78. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.* Nature, 1993. 362(6423): p. 801-9.
 79. Sata, M., et al., *A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia.* J Mol Cell Cardiol, 2000. 32(11): p. 2097-104.
 80. Feldman, L.J., et al., *Differential expression of matrix metalloproteinases after stent implantation and balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit.* Circulation, 2001. 103(25): p. 3117-22.
 81. Furukawa, Y., et al., *Anti-monocyte chemoattractant protein-1/monocyte chemotactic and activating factor antibody inhibits neointimal hyperplasia in injured rat carotid arteries.* Circ Res, 1999. 84(3): p. 306-14.
 82. Hayashi, S., et al., *Roles of P-selectin in inflammation, neointimal formation, and vascular remodeling in balloon-injured rat carotid arteries.* Circulation, 2000. 102(14): p. 1710-7.
 83. Yurugi-Kobayashi, T., et al., *Effective contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage.* Blood, 2003. 101(7): p. 2675-8.
 84. Tateishi-Yuyama, E., et al., *Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial.* Lancet, 2002. 360(9331): p. 427-35.
 85. Faxon, D.P., et al., *Restenosis following transluminal angioplasty in experimental atherosclerosis.* Arteriosclerosis, 1984. 4(3): p. 189-95.
 86. Faxon, D.P., et al., *Acute effects of transluminal angioplasty in three experimental models of atherosclerosis.* Arteriosclerosis, 1982. 2(2): p. 125-33.
 87. Schober, A., et al., *Peripheral CD34+ cells and the risk of in-stent restenosis in patients with coronary heart disease.* Am J Cardiol, 2005. 96(8): p. 1116-22.
 88. Sata, M., *Circulating vascular progenitor cells contribute to vascular repair, remodeling, and lesion formation.* Trends Cardiovasc Med, 2003. 13(6): p. 249-53.
 89. Xiao, Q., et al., *Stem Cell-derived Sca-1+ Progenitors Differentiate into Smooth Muscle Cells, which is Mediated by Collagen IV-Integrin $\alpha 1/\beta 1/\alpha v$ and PDGF Receptor Pathways.* Am J Physiol Cell Physiol, 2006.
 90. Korbling, M., Z. Estrov, and R. Champlin, *Adult stem cells and tissue repair.* Bone Marrow Transplant, 2003. 32 Suppl 1: p. S23-4.
 91. Korbling, M., et al., *Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells.* N Engl J Med, 2002. 346(10): p. 738-46.
 92. Krause, D.S., et al., *Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell.* Cell, 2001. 105(3): p. 369-77.

93. Ying, Q.L., et al., *Changing potency by spontaneous fusion*. Nature, 2002. 416(6880): p. 545-8.
94. Campbell, J.H., et al., *Molecular biology of vascular hypertrophy*. Basic Res Cardiol, 1991. 86 Suppl 1: p. 3-11.
95. Saiura, A., et al., *Little evidence for cell fusion between recipient and donor-derived cells*. J Surg Res, 2003. 113(2): p. 222-7.
96. 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.
97. Edelberg, J.M., et al., *PDGF mediates cardiac microvascular communication*. J Clin Invest, 1998. 102(4): p. 837-43.
98. Franke, R.P., et al., *Induction of human vascular endothelial stress fibres by fluid shear stress*. Nature, 1984. 307(5952): p. 648-9.
99. Martins, R.N., et al., *The role of PDGF-BB on the development of the collateral circulation after acute arterial occlusion*. Growth Factors, 1994. 10(4): p. 299-306.
100. Carmeliet, P., *Developmental biology. One cell, two fates*. Nature, 2000. 408(6808): p. 43, 45.

8 Veröffentlichungen:

Publikationen:

1. *Endothelial Progenitor Cells Transdifferentiation Into Smooth Muscle Cells: Impact on Vascular Lesion Formation*
Sedding DG, **Hess D**, Brunsch H, Tillmanns H, Braun-Dullaeus RC
Manuskript in Vorbereitung
2. *The role and relevance of phospholipase D1 during growth and dimorphism of Candida albicans*
Bernhard Hube^{1,3}, **Daniela Hess**¹, Carol A. Baker², Martin Schaller⁴, Wilhelm Schäfer¹ and Joseph W. Dolan² *Microbiology* (2001), **147**, 879-889.
3. *Differential regulation of SAP8 and SAP9, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in Candida albicans*
Michel Monod, Bernhard Hube, **Daniela Hess** and Dominique Sanglard
Microbiology (1998), **144**, 2731–2737
4. *Individual acid aspartic proteinases (Saps) 1-6 of Candida albicans are not essential for invasion and colonization of the gastrointestinal tract in mice*
Marianne Kretschmar, Angelika Felk, Peter Staib, Martin Schaller, **Daniela Heß**, Melvin Callapina, Joachim Morschhäuser, Wilhelm Schäfer, Hans Christian Korting, Herbert Hof, Bernard Hube and Thomas Nichterlein
Microbial Pathogenesis, Volume 32, Issue 2, February 2002, Pages 61-70

Abstracts:

1. *Endothelial Progenitor Cells Transdifferentiation Into Smooth Muscle Cells: Impact on Vascular Lesion Formation*
Sedding DG, **Hess D**, Brunsch H, Tillmanns H, Braun-Dullaeus RC
Annual Scientific Sessions of the American Heart Association 2005
2. *Potential of Blood-Derived Human Endothelial Progenitor Cells to Transdifferentiate Into Smooth Muscle Cells*
Hess D, Brunsch H, Tillmanns H, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG
Kardiologen-Physiologen Workshop Bern, 2005
3. *Potential of Blood-Derived Human Endothelial Progenitor Cells to Transdifferentiate Into Smooth Muscle Cells*
Sedding DG, **Hess D**; Brunsch H, Tillmanns H, Braun-Dullaeus RC
Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Frühjahrstagung 2005

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. H. Tillmanns danke ich für die breite Unterstützung und Förderung wissenschaftlichen Arbeitens in seiner Abteilung, in deren Rahmen diese Arbeit entstehen konnte.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Daniel Sedding für das interessante Thema und die engagierte Betreuung, aber auch für die Möglichkeit zum unabhängigen Arbeiten. Er hat mich durch seine Ideen und engagierte Betreuung fortlaufend in dem wissenschaftlichen Arbeiten unterstützt. Es hat mich gefreut in seinem Labor, welches sich durch eine beispiellos gute Arbeitsatmosphäre auszeichnet, meine wissenschaftlichen Arbeiten durchführen zu dürfen. Mein Dank gilt ihm auch für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Ich danke allen Mitarbeitern des Labors für Molekulare Kardiologie und Jan Gils für die hilfsbereite Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Endothelial Progenitor Cells Transdifferentiation into Smooth Muscle Cells: Impact on Vascular Lesion Formation

Background: Endothelial progenitor cells (EPC) significantly contribute to vessel regeneration, and clinical application of EPC emerges as therapeutic option to restore blood supply to ischemic tissue. However, further transdifferentiation of EPC into other lineages may modulate the beneficial or adverse effects of cell therapy. We therefore sought to determine the potential of EPC to transdifferentiate into vascular smooth muscle cells (VSMC) and their impact on neointimal lesion formation.

Methods and Results: EPCs were obtained from peripheral blood mononuclear cells by cultivation with endothelial cell medium and growth factors. After 3 days, more than 95% of adherent cells show endothelial characteristics, as demonstrated by Dil-acetylated LDL uptake, lectin binding and the expression of VEGFR2, von Willebrand factor and VE-Cadherin. EPC were then co-cultivated with freshly isolated rat VSMC for 7 days. Co-cultivated EPC increased in size and developed a smooth muscle cell like phenotype. After 6 days of co-culture, $16.7 \pm 3.8\%$ of EPCs expressed alpha smooth muscle actin as determined by FACS analysis. Transdifferentiated EPC also expressed calponin and smooth muscle myosin heavy chain. Furthermore, VSMC specific mRNA expression (calponin and h-caldesmon) was detected in co-cultured EPCs using human-specific primers. Importantly, the angiotensin II-induced contractile response of co-cultured EPC was similar to VSMC, indicating functional activity. Transdifferentiation of EPC into VSMC was not detected in EPC cultured in conditioned medium, suggesting an essential role of cell-cell contacts. As determined by co-cultivation with GFP-expressing VSMC, phenotypical changes are due to transdifferentiation rather than fusion.

Conclusion: As demonstrated by morphological, histochemical and functional parameters, adult human EPC can transdifferentiate into functionally active smooth muscle cells in vitro and in vivo. Transdifferentiation of EPC to VSMC may improve vessel maturation during vasculogenesis or plaque stabilisation but may also contribute to vascular lesion formation.

“Ich erkläre: ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften genommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der “Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“