

Aus der Klinik für Kardiologie und Pneumologie
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Die Überexpression der Integrin $\beta 5$ -Untereinheit fördert die
proangiogenetischen Fähigkeiten endothelialer
Progenitorzellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Gaby Neumann (geb. Conrad)

aus

Oberhausen

Göttingen 2015

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichtstatterin: Prof. Dr. med. K. Schäfer

II. Berichtstatterin: Prof. Dr. med. M. Schön

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2015

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Angiogenese	1
1.1.1 Allgemeines	1
1.1.2 Bildung neuer Blutgefäße mittels Vaskulogenese und Angiogenese.....	1
1.1.3 Physiologische und pathologische Relevanz der Angiogenese im adulten Organismus	2
1.1.4 Molekulare Mechanismen der Angiogenese.....	3
1.2 Endotheliale Progenitorzellen	4
1.2.1 Charakterisierung von EPCs.....	4
1.2.2 Mobilisation aus dem Knochenmark und EPC- <i>homing</i>	5
1.2.3 EPCs: klinische Relevanz und therapeutische Option.....	6
1.3 Integrine	7
1.3.1 Struktur und Einteilung der Integrine	7
1.3.2 Signaltransduktion von Integrezeptoren.....	9
1.3.2.1 Integrine als bidirektionale Signaltransduktoren	9
1.3.2.2 <i>Inside-out-signaling</i>	10
1.3.2.3 <i>Outside-in-signaling</i>	11
1.3.3 Funktion der αv -Integrine bei der EPC-vermittelten Angiogenese.....	12
1.4 Zielsetzung der Arbeit	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Zellkultur.....	16
2.1.1 Isolation und Kultivierung von EPCs	16
2.1.2 Plasmidvervielfältigung.....	17
2.1.2.1 Transformation von Bakterienzellen <i>Escherischia coli</i> (<i>E.coli</i>) TOP 10.....	17
2.1.2.2 Plasmidisolation	18
2.1.3 Plasmidtransfektion der EPCs	18
2.1.4 Stimulation der EPCs mit Leptin.....	19
2.1.5 Fluoreszenzmarkierung der EPCs	19
2.1.6 Ernte der EPCs.....	20

2.1.7	Herstellung von konditioniertem Medium	20
2.1.8	Funktionelle Blockade des Integrin $\alpha\beta 5$ und der Zytokine IL-8 und MCP-1 durch neutralisierende Antikörper	20
2.1.9	Hemmung spezifischer Signaltransduktionswege durch Inhibitoren	21
2.1.10	Kultivierung von humanen umbilikal Venenendothelzellen (<i>human umbilical vein endothelial cells</i> [HUVEC])	21
2.2	Durchflusszytometrie	22
2.3	Immunfluoreszenzfärbungen von EPCs.....	24
2.3.1	Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung der endothelialen Differenzierung	24
2.3.1.1	Analyse der acLDL-Aufnahme und Lectin-Bindung.....	24
2.3.1.2	Detektion der Endothelzellmarker vWF und PECAM-1	24
2.3.2	Immunfluoreszenzfärbung zur Lokalisation von pSTAT3 und Darstellung des Zytoskeletts.....	24
2.4	Proteinisolation, Immunpräzipitation und Western Blot-Analyse	25
2.4.1	Proteinisolation.....	25
2.4.2	Zellfraktionierung	26
2.4.3	Immunpräzipitation	26
2.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.....	27
2.4.5	Western Blot-Analyse	28
2.4.6	Immundetektion.....	28
2.4.7	Wiederholte Detektion von Immunblots (<i>Membranstripping</i>).....	29
2.5	Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i> [PCR])	30
2.5.1	RNA-Isolation aus EPCs	30
2.5.2	Synthese von cDNA durch reverse Transkriptase (rT).....	30
2.5.3	Polymerase-Kettenreaktion	31
2.5.4	Agarose-Gelelektrophorese	32
2.6	Effekt der $\alpha\beta 5$ -Überexpression auf Prozesse der Angiogenese.....	33
2.6.1	Zell-Adhäsions-Assay	33
2.6.2	Transmigrations-Assay	33
2.6.3	Zell-Proliferations-Assay.....	34

2.7 <i>In-vitro</i> -Angiogenese-Assays.....	35
2.7.1 Matrigel-Angiogenese-Assay	35
2.7.2 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay	36
2.7.3 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay unter Verwendung von CdM.....	37
2.8 <i>In-vivo</i> -Mausmodell der Hinterlaufischämie	37
2.8.1 Induktion der Ischämie im Maushinterlauf	37
2.8.2 Vorbereitung und Injektion von EPCs	38
2.8.3 Messung des Blutflusses mittels Laserdopplersonographie	38
2.8.4 <i>In-vivo</i> -Fixation des <i>Musculus (M.) gastrocnemius</i>	38
2.8.5 Präparation von Gefrierschnitten aus Muskelgewebe und Immunhistochemie	39
2.8.6 Quantifizierung der Kapillardichte	40
2.9 Zytokin-Antikörper Array	40
2.9.1 Zytokindetektion mittels des <i>Human cytokin antibody array-5</i>	40
2.9.2 Quantitative Bestimmung der Zytokinkonzentration mittels ELISA	40
2.10 Statistische Analysen.....	41
3 Ergebnisse	42
3.1 Nachweis der Effizienz nach Transfektion mit humaner <i>full-length</i> cDNA der Integrin β 5-Kette	42
3.1.1 Vermehrte Genexpression der Integrin β 5-Kette nach ITGB5-Transfektion	42
3.1.2 TGB5-transfizierte EPCs weisen eine gesteigerte Oberflächenexpression des α β 5- Integrins auf.....	43
3.1.3 Die ITGB5-Transfektion führte zu einer vermehrten Integrin α β 5-Aktivierung	45
3.2 Charakterisierung der EPCs nach ITGB5-Transfektion.....	46
3.2.1 Morphologie der EPCs und intrazelluläre Lokalisation von Integrin β 5	46
3.2.2 Detektion des Oberflächenmarkerprofils zum Nachweis des endothelialen Charakters.....	48
3.3 Die Überexpression der Integrin β 5-Kette fördert die proangiogenetischen Fähigkeiten endothelialer Vorläuferzellen <i>in vitro</i>	50
3.3.1 Die Überexpression der Integrin β 5-Kette führt zu einer vermehrten Bindung der EPCs an den α β 5-Liganden VN im Zell-Adhäsions-Assay.....	50

3.3.2 Die ITGB5-Transfektion führt zu einer vermehrten Transmigration der EPCs in Richtung VN im modifizierten <i>Boyden-chamber</i> -Assay.....	51
3.3.3 ITGB5-transfizierte Zellen weisen kein erhöhtes Proliferationspotential auf.....	52
3.3.4 Die Überexpression der Integrin β 5-Kette fördert die proangiogenetischen Eigenschaften von EPCs im Matrigel-Angiogenese-Assay	52
3.3.5 Nach ITGB5-Transfektion zeigen EPCs eine erhöhte Interaktion mit reifem Endothel im 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay	53
3.4 Die Integrin β 5-Überexpression verbessert die EPC-vermittelte Neovaskularisation im Mausmodell der unilateralen Hinterlaufischämie	55
3.4.1 Integrin β 5-überexprimierende EPCs zeigen eine vermehrte Akkumulation im ischämischen Maushinterlauf	55
3.4.2 Mit Integrin β 5-überexprimierenden EPCs behandelte Mäuse wiesen eine erhöhten Kapillardichte im ischämischen Gewebe des <i>M. gastrocnemius</i> auf	57
3.4.3 Die Behandlung der Mäuse mit Integrin β 5-überexprimierenden EPCs fördert die Reperfusion im ischämischen Maushinterlauf	58
3.5 Die proangiogenetischen Effekte der Integrin β 5-Überexpression in EPCs beinhalten parakrine Mechanismen.....	60
3.5.1 Die Inkubation mit CdM von ITGB5-transfizierten EPCs führt zu einer vermehrten Endothelzellaussprossung im 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay	60
3.5.2 Die ITGB5-Transfektion von EPCs führt zu einer gesteigerten Sekretion der angiogenetischen Zytokine IL-8 und MCP-1	61
3.5.3 Die vermehrte Sprossung im 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay beruht auf einer vermehrten Sekretion von IL-8 und MCP-1 in ITGB5-transfizierten EPCs.....	64
3.6 Die proangiogenetischen Fähigkeiten ITGB5-transfizierter EPCs werden über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 vermittelt.....	65
3.6.1 Die Integrin β 5-Überexpression führt zu einer vermehrten Aktivierung von STAT3 ...	65
3.6.2 Die angiogenetischen Effekte der Integrin β 5-Überexpression konnten durch Hemmung von STAT3 aufgehoben werden	69
3.6.2.1 Nachweis der verminderten Aktivierung von STAT3	69
3.6.2.2 Die Integrin α β 5-vermittelte Aktivierung von STAT3 erhöht spezifisch die angiogenetische Kapazität von EPCs.....	69

3.6.2.3 STAT3 ist Teil des Signaltransduktionsweges zwischen dem Integrin $\alpha\beta5$ und dem IL-8 und MCP-1-kodierenden Gen	71
4 Diskussion.....	74
4.1 Charakterisierung endothelialer Progenitorzellen und Definition als <i>early-outgrowth</i> EPCs	74
4.2 Effizienz der ITGB5-Transfektion: gesteigerte Ko-Expression von der α -Kette und deren Bindungspartnern	78
4.3 Die Überexpression der Integrin $\beta5$ -Kette steigert die angiogenetische Kapazität endothelialer Vorläuferzellen <i>in vitro</i>	80
4.4 Die Integrin $\alpha\beta5$ -Überexpression führt zu einer Verbesserung der EPC-induzierten Neovaskularisation nach Induktion einer Hinterlaufischämie im Mausmodell	87
4.5 Die proangiogenetischen Effekte der Integrin $\alpha\beta5$ -Überexpression werden durch die Zytokine MCP-1 und IL-8 vermittelt	89
4.6 Die Integrin $\alpha\beta5$ -abhängige Sekretion von MCP-1 und IL-8 wird über STAT3 reguliert...	91
4.7 Nachtrag	93
5 Zusammenfassung	95
6 Abkürzungsverzeichnis	97
7 Abbildungsverzeichnis	102
8 Tabellenverzeichnis	105
9 Literaturverzeichnis	106

1 Einleitung

1.1 Angiogenese

1.1.1 Allgemeines

Zur Aufrechterhaltung der Vitalfunktion unseres Organismus sind die Versorgung der Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen und der Abtransport von Metaboliten des Zellstoffwechsels essentiell, um Gewebswachstum, Gewebereparatur und Umbauprozesse zu ermöglichen. Durch den Transport hämatopoetischer Zellen und Hormone ist das Blut an der Aufrechterhaltung der Immunkontrolle und der Kommunikation zwischen verschiedenen Geweben beteiligt. Diese Aufgaben des Blutes setzen ein funktionierendes Gefäßsystem voraus, welches auf Grund des ständig wechselnden Bedarfs des umgebenden Gewebes einem kontinuierlichen Zyklus aus Auf-, Um- und Abbauprozessen unterliegt und einen hohen Grad an Adaptationsfähigkeit aufweist.

Zur Regulation des Gas-, Nährstoff-, und Flüssigkeitsaustausches ist das gesamte Blutgefäßsystem luminal durch eine einschichtige Endothelzellschicht ausgekleidet, die zusammen mit der Basalmembran die *Tunica interna* definieren. Sie stellt die Permeabilitätsbarriere zwischen dem Intravasalraum und der extrazellulären Matrix (ECM) dar. Während Kapillaren nur aus einer *Tunica interna* bestehen, weisen größere Blutgefäße zwei weitere Wandschichten auf. Die hauptsächlich aus glatten Muskelzellen bestehende *Tunica media* reguliert durch Beeinflussung des Gefäßwiderstandes den Blutdruck. Die *Tunica adventitia*, die aus lockerem Bindegewebe besteht, ist für die Verankerung des Blutgefäßes in der Umgebung verantwortlich.

1.1.2 Bildung neuer Blutgefäße mittels Vaskulogenese und Angiogenese

Bei der Neubildung von Gefäßen muss zwischen der Vaskulogenese und der Angiogenese differenziert werden. Als Vaskulogenese wird die *De-novo*-Bildung eines Gefäßnetzwerkes durch die *In-situ*-Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen (Angioblasten) zu reifen Endothelzellen bezeichnet (Risau 1997, Reyes et al. 2002). Initial entstehen sog. Blutinseln aus Zellen des extraembryonalen und embryonalen lateralen Mesoderms im Dottersack (Risau und Flamme 1995, Reyes et al. 2001, Swift und Weinstein 2009), aus denen sich über die gemeinsame Vorstufe der pluripotenten Hämangioblasten Angioblasten und hämatopoetische Stammzellen differenzieren (Flamme und Risau 1992, Vogeli et al. 2006). Durch Aggregation der Angioblasten entstehen primitive Gefäßstrukturen mit einem Lumen (Risau und Flamme 1995, Risau 1997), die als primärer Gefäßplexus bezeichnet werden. Durch endotheliale Aussprossung (sprossende

Angiogenese) oder Intussuszeption sowie Rekrutierung von glatten Muskelzellen und Perizyten entsteht ein funktionsfähiges Blutgefäß (Carmeliet und Jain 2000).

Unter dem Begriff der Angiogenese werden die Entstehung, das Wachstum und der Umbau präexistierender Gefäße subsummiert (Carmeliet 2000). Dabei können verschiedene Mechanismen unterschieden werden, die teilweise ineinander übergehen. Bei der sprossenden Angiogenese handelt es sich um die Gefäßneubildung, ausgehend von einem bestehenden Gefäßnetzwerk durch Invasion, Migration und Proliferation rekrutierter endothelialer Vorläuferzellen (Carmeliet und Jain 2011). Als Intussuszeption wird die nicht-sprossende Angiogenese bezeichnet, bei der es durch Einstülpung von interstitiellen Gewebssäulen in das Lumen eines bereits bestehenden Gefäßes zur longitudinalen Gefäßteilung und Entstehung von Tochtergefäßen kommt (Swift und Weinstein 2009). Als weitere Mechanismen der Angiogenese ist die Bildung transendothelialer Zellbrücken mit anschließender Auftrennung in einzelne Kapillaren (Carmeliet und Jain 2000), sowie die Fusion von kleinen Gefäßen zu einem größeren Gefäß (Risau 1997) bekannt.

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass die Vaskulogenese auf die Embryonalentwicklung beschränkt ist und dass die Angiogenese nur im adulten Organismus vorkommt. Heute ist jedoch belegt, dass die Angiogenese und die Vaskulogenese sowohl im Embryonalstadium als auch im adulten Organismus an der Gefäßneubildung beteiligt sind und häufig gemeinsam ablaufen (Swift und Weinstein 2009).

1.1.3 Physiologische und pathologische Relevanz der Angiogenese im adulten Organismus

Im adulten Organismus ist die Angiogenese in verschiedene physiologische Prozesse wie die Wundheilung, den Menstruationszyklus und das Haarwachstum involviert. Aber auch bei pathologischen Prozessen spielt die Angiogenese eine entscheidende Rolle. Einerseits fördert die Hypoxie-induzierte Angiogenese die Ausbildung von Kollateralgefäßen bei der ischämischen koronaren Herzkrankheit und der zerebralen Ischämie und beeinflusst so die Größe des Infarktareals (Carmeliet und Jain 2000). Andererseits führt die Angiogenese zur Größenprogression atherosklerotischer Plaques (Celletti et al. 2001) und ist im Falle der insuffizienten oder überschießenden Gefäßneubildung an der Entstehung der Retinopathie bei Frühgeborenen (Alon et al. 1995), der rheumatoiden Arthritis, der Alzheimer-Demenz, der pulmonalen Hypertonie und infantiler Hämangiome (Carmeliet und Jain 2000) beteiligt. Zudem ist die Vaskularisation eines malignen Tumors Voraussetzung für Tumorwachstum (Folkman 1995) und hämatogene Metastasierung (Liotta et al. 1974).

1.1.4 Molekulare Mechanismen der Angiogenese

Bei der Angiogenese handelt es sich um einen komplexen Prozess aus dem Zusammenspiel von Zellen, der ECM, Zytokinen, Wachstumsfaktoren (Ferrara 1999) und Zelladhäsionsmolekülen wie Integrine (Hynes und Landers 1992). Bei einem gesunden Erwachsenen befindet sich das Gefäßsystem in einem Ruhezustand, das heißt nur 0,01 % der Endothelzellen befinden sich in der Zellteilung (Carmeliet und Jain 2000). Ruhende Endothelzellen bilden durch Adhäsionsmoleküle wie vaskulär-endotheliales (*vascular endothelial* [VE]-) Cadherin und Claudin Zell-Zell-Kontakte. Sie sind extraluminal von periendothelialen Zellen (Perizyten und glatte Muskelzellen) umgeben. Diese inhibieren die Proliferation und Migration der Endothelzellen und tragen durch die Sekretion des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) und Angiopoietin (Ang)-1 zu deren Überleben bei (Carmeliet und Jain 2011). Ob es zur Neubildung von Gefäßen kommt, wird durch die Balance zwischen pro- und antiangiogenetischen Faktoren reguliert. Entsteht ein Übergewicht der proangiogenetischen Faktoren, zu denen *basic fibroblast growth factor* (bFGF), VEGF und Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1 (*insulin-like growth factor* [IGF]-1) zählen (Conway et al. 2001), gegenüber den inhibierenden Faktoren wie Angiostatin (O'Reilly et al. 1994), Endostatin (O'Reilly et al. 1997) und Angiopoietin (Ang)-2 (Maisonpierre et al. 1997), kommt es zur Induktion der Angiogenese, dem sog. *angiogenic switch*. Die Angiogenese wird im gesunden Organismus durch metabolischen Stress wie Hypoxie, Azidose und Hypoglykämie initiiert und führt durch eine gesteigerte Genexpression verschiedener Schlüsselfaktoren wie VEGF (Liu et al. 1995, Dor und Keshet 1997) zu einem kaskadenartigen Ablauf des angiogenetischen Prozesses.

Der erste Schritt der Angiogenese ist durch die Stickstoffmonoxid (*nitric oxide* [NO])-vermittelte Vasodilatation (Conway et al. 2001) und Steigerung der VEGF-Synthese (Kimura et al. 2000) gekennzeichnet. VEGF führt durch die Auflösung interendothelialer Zell-Zell-Kontakte zur Steigerung der Gefäßpermeabilität. Es kommt zur Extravasation von Plasmaproteinen wie Fibrinogen und Fibronectin (FN), die ein provisorisches ECM-Gerüst bilden und ein optimales Umgebungsmilieu für die Gefäßneubildung schaffen (Carmeliet und Jain 2011). Durch proteolytische Enzyme wie Matrix Metalloproteinasen (MMP) und Heparanasen erfolgt die Degradation der interstitiellen Matrix und der Basalmembran. Durch den Abbau der ECM werden proangiogenetische Faktoren wie bFGF und VEGF freigesetzt und aktiviert (Carmeliet und Jain 2011), welche die Migration und Proliferation endothelialer Zellen fördern. Schlüsselmolekül für die gerichtete Migration (*homing*) und Invasion der Endothelzellen an den Ort der Gefäßneubildung sind Integrine, die in ihrer Funktion als Adhäsionsmoleküle die Interaktion zwischen

Endothelzellen untereinander und mit der ECM ermöglichen (Chavakis et al. 2008). Die migrierten Endothelzellen lagern sich zu soliden Zellsträngen aneinander, die im Verlauf ein Lumen ausbilden. Es folgt die Fusion mit präexistierenden Gefäßen, die Elongation von Endothelzellen und deren Interkalation (Conway et al. 2001). Die Gefäßreifung wird durch die Rekrutierung der periendothelialen Zellen initiiert, die der Stabilisierung des heranreifenden Gefäßes dienen, es vor Regression schützen und zur Bildung der ECM beitragen (Carmeliet 2000).

1.2 Endotheliale Progenitorzellen

1.2.1 Charakterisierung von EPCs

Über viele Jahre wurde davon ausgegangen, dass die Regeneration des Endothels und die Neovaskularisation allein auf der Proliferation, Migration und dem Remodelling ortsständiger, reifer Endothelzellen basiert (Risau et al. 1988) und dass endotheliale Vorläuferzellen nur in der Embryonalperiode existieren (Carmeliet 2000). Da terminal differenzierte Endothelzellen nur ein geringes Proliferationspotential aufweisen, wurde die Hypothese formuliert, dass in die postpartale Angiogenese weitere Zellen involviert sein könnten (Hristov et al. 2003). Die Tatsache, dass sowohl Angioblasten als auch hämatopoetische Stammzellen große Ähnlichkeiten in ihrem Expressionsmuster aufweisen (*cluster of differentiation* [CD]34, fetale Leberkinase-1 [*fetal liver kinase* [Flk]-1], *tyrosine kinase with immunoglobulin-like and epidermal growth factor-like domain* [Tie]-2) und dass reife Endothelzellen im Gegensatz zu differenzierten hämatopoetischen Zellen weiterhin einen Großteil dieser Antigene exprimieren, führte 1997 Asahara et al. zu der Hypothese, dass im peripheren Blut aus dem Knochenmark stammende Zellen zirkulieren, die in der Lage sind, sich zu Endothelzellen zu differenzieren.

Die aus dem peripheren Blut isolierten mononukleären Zellen sind doppelpositiv für hämatopoetische Stammzellmarker und spezifische Endothelzellmarker wie CD31 (synonym [syn.]: Plättchen-Endothelzell-Adhäsionsmolekül-1 [*platelet endothelial cell adhesion molecule* [PECAM]-1]), Tie-2 und den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktorrezeptor-2 (*vascular endothelial growth factor receptor* [VEGFR]-2). Nach 7 Tagen in Kultur bilden die isolierten Zellen auf FN-beschichteten Kulturplatten Kolonien, die an die Blutinseln im Dottersack während der Vaskulogenese erinnern. Dabei nehmen die peripheren Zellen, die in den Blutinseln die Angioblasten repräsentieren, eine spindelförmige Morphologie an. Die *In-vitro*-Differenzierung dieser Zellen zu reifen Endothelzellen konnte durch den Anstieg der Expression der o.g. Endothelzellmarker, der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (*endothelial nitric oxide synthase* [eNOS]), E-Selectin, der Anfärbbarkeit der Zellen mit Lectin und Aufnahme von

acetyliertem *low density lipoprotein* (acLDL) belegt werden. Gleichzeitig konnte bei den als EPCs definierten Zellen eine Reduktion der Expression hämatopoetischer Zellmarker wie des gemeinsamen Leukozytenantigens (*leukocyte common antigen* [LCA]; syn.: CD45) und des Monozytenmarkers CD68 nachgewiesen werden (Asahara et al. 1997). Durch den Nachweis der Inkorporation der EPCs in die Kapillarwand der Neovaskularisationszone bei der Wundheilung, in ischämischem Gewebe sowie bei malignen Tumoren (Asahara et al. 1997 und 1999) konnte eine signifikante Rolle dieser Zellen in der postnatalen physiologischen und pathologischen Angiogenese gezeigt werden. Durch diese neu gewonnenen Erkenntnisse rückte die Erforschung der EPC-Biologie und Funktion in den Fokus der vaskulären Biologie. Hinsichtlich der Phänotypisierung der EPCs und des expliziten Mechanismus ihrer proangiogenetischen Fähigkeiten wurden kontroverse Daten erhoben, so dass davon auszugehen ist, dass unter dem Begriff der zirkulierenden Endothelzellen eine heterogene Gruppen von Zelltypen erfasst wird (Lin et al 2000). Gemeinhin wird zwischen zwei Gruppen von EPCs differenziert, die sich hinsichtlich ihres Phänotyps, ihres Isolationsprotokolls und ihres Verhaltens bei der Kultivierung unterscheiden: *early-outgrowth* EPCs, die auch als zirkulierende angiogenetische Zellen (*circulating angiogenic cell* [CAC]) bezeichnet werden, und die *late-outgrowth* EPCs (syn.: *endothelial colony unit-forming cell* [ECUF]) (Yoder et al. 2007, Hirschi et al. 2008). Hierin ist vermutlich der Grund zu sehen, warum in einigen Studien eine direkte, strukturelle Inkorporation der EPCs in die Gefäße der Neovaskularisationszone beobachtet werden konnte (Kawamoto et al. 2001, Zhang et al. 2002, Werner et al. 2003), wohingegen in anderen experimentellen Modellen die parakrine Stimulation benachbarter Endothelzellen und glatten Muskelzellen durch die Sekretion proangiogenetischer Faktoren wie VEGF, IGF-1 und *stromal cell-derived factor* (SDF)-1 im Vordergrund stand (Rehman et al. 2003, Urbich et al. 2005). Hierbei schließen sich jedoch beide Mechanismen nicht gegenseitig aus, denn sowohl in das neue Gefäß integrierte EPCs als auch paravaskuläre EPCs weisen proangiogenetische Fähigkeiten auf (Urbich et al. 2005).

1.2.2 Mobilisation aus dem Knochenmark und EPC-homing

Die Mobilisation der EPCs aus dem Knochenmark ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Enzyme, Wachstumsfaktoren und Oberflächenrezeptoren. Unter physiologischen Bedingungen verharren EPCs inaktiv mit Stromazellen im Knochenmark. Die Mobilisierung aus dem Knochenmark wird unter anderem via Aktivierung der MMP-9 durch VEGF, SDF-1, Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (*granulocyte colony-stimulating factor* [G-CSF]), bFGF und eNOS verstärkt (Heissig et al. 2002, Aicher et al. 2003, Urbich und Dimmeler 2004). Chemokine wie SDF-1 (Yamaguchi et al. 2003), VEGF (Lee et al. 2000) und Interleukin (IL)-8 (Kocher et al. 2006)

liegen auch in hohen Konzentrationen im Gewebe der Revaskularisationszone vor und sind für die Rekrutierung der EPCs in ischämisches Gewebe verantwortlich. Die Adhäsion im Zielgewebe wird über Integrine vermittelt, wobei hier je nach Zelltyp und Schädigungsmuster des Gewebes verschiedene Integrine involviert zu sein scheinen (Urbich und Dimmeler 2004). Integrine fungieren hierbei nicht als reine Adhäsionsmoleküle, sondern nehmen durch die Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionswege Einfluss auf die zellulären Eigenschaften der EPCs, wie Migration, Proliferation und Differenzierung (Eliceiri und Cheresch 1999). Anschließend erfolgt die Invasion der EPCs in die ECM, wo sie durch Inkorporation oder durch Sekretion angiogenetischer Faktoren aktiv die Angiogenese steuern und sich zu reifen Endothelzellen differenzieren.

1.2.3 EPCs: klinische Relevanz und therapeutische Option

Endothelzellen bilden die Permeabilitätsbarriere zwischen dem Intra- und Extravasalraum und gelten als wichtigster Regulator der vaskulären Homöostase. Durch die Synthese regulierender Faktoren wirken Endothelzellen vasoprotektiv (Davignon und Ganz 2004) und verhindern die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten an die Gefäßwand (Cines et al. 1998). Kommt es durch chronische Noxen-Einwirkung wie arterielle Hypertonie oder Rauchen zur Störung der Endothelzellintegrität, resultiert daraus eine Endotheldysfunktion mit Verlust der antithrombotischen und antiinflammatorischen Eigenschaften, was Ausgangspunkt für die Entstehung arteriosklerotischer Plaques ist (Davignin und Ganz. 2004). Hill et al. postulierten 2003, dass die Anzahl der zirkulierenden EPCs als Biomarker für die vaskuläre Funktion und das kumulative kardiovaskuläre Risiko zu sehen sind. In Studien konnte eine umgekehrte Korrelation zwischen dem Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren wie Diabetes mellitus Typ I (Loomans et al. 2004) und Typ II (Tepper et al. 2002), Übergewicht (Heida et al. 2008), Rauchen (Kondo et al. 2004) und Hypercholesterinämie (Chen et al. 2004) und der Anzahl zirkulierender EPCs und ihrer proliferativen und migratorischen Fähigkeiten gezeigt werden (Vasa et al. 2001). Demgegenüber führte eine erhöhte Anzahl zirkulierender EPCs zu einer Reduktion des Schweregrades kardiovaskulärer Ereignisse (Werner et al. 2005). Um EPCs therapeutisch nutzen zu können, rückten Faktoren in den Fokus der Wissenschaft, die die Anzahl zirkulierender EPCs im Blut erhöhen. Dieser Effekt konnte für 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A Reduktase-Inhibitoren (HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren [Statine]) (Dimmeler et al. 2001) und Rosiglitazon, ein Antidiabetikum aus der Gruppe der Insulin-Sensitizer (Pistrosch et al. 2005) und körperliche Bewegung beschrieben werden (Laufs et al. 2004).

Basierend auf den proangiogenetischen Fähigkeiten der EPCs sah man die Injektion *ex vivo* kultivierter EPCs als therapeutische Option der Verbesserung der Neovaskularisation nach Gewebischämie an. Nachdem im Tiermodell ein positiver Effekt durch die Injektion *ex vivo* expandierter EPCs auf die Gewebsreperfusion erzielt werden konnte (Kalka et al. 2000, Kocher et al. 2001, Kawamoto et al. 2001), folgten klinische Studien zur Exploration des Benefits nach Transplantation autologer angiogenetischer Progenitorzellen in der vaskulären Therapie. So konnte in einigen klinischen Studien bei Patienten mit Myokardinfarkt (MAGIC-cell randomised clinical trial, TOPCARE-AMI, the BOOST Trail, REPAIR-AMI) eine verbesserte Ejektionsfraktion und kardiale Reperfusion nach intrakoronarer Injektion autologer Progenitorzellen beobachtet werden (Assmus et al. 2002, Kang et al. 2004, Wollert et al. 2004, Schächinger et al. 2009). Ein positiver Langzeiteffekt ließ sich jedoch weder in der TOPCARE-AMI (Leistner et al. 2011) noch in der BOOST-Studie (Meyer et al. 2009) bestätigen. In der MAGIC-Studie wurde sogar ein signifikanter Anstieg der In-Stent-Restenosen beobachtet (Kang et al. 2004). In anderen Studien konnte schon primär kein Benefit auf die linksventrikuläre Ejektionsfraktion beobachtet werden (Lunde et al. 2006, Beitnes et al. 2011). Die kontroversen Daten legen nahe, dass die molekularen Mechanismen der EPC-Biologie noch nicht hinreichend verstanden sind, um diese therapeutisch nutzen zu können.

1.3 Integrine

1.3.1 Struktur und Einteilung der Integrine

Die Angiogenese wird nicht nur durch Wachstumsfaktoren und Zytokine reguliert, sondern beinhaltet auch die Interaktion von Proteinen der ECM mit ihren Rezeptoren, den Integrinen. Integrine gehören zu der Familie der Adhäsionsmoleküle, die ubiquitär auf verschiedensten Zellen in Wirbeltieren exprimiert werden. Sie ermöglichen die Kommunikation benachbarter Zellen und vermitteln den Kontakt zwischen Proteinen der ECM und dem Zytoskelett. Die Funktion von Integrinen ist nicht auf die reine Adhäsion beschränkt, sondern beinhaltet komplexe Signaltransduktionswege, welche die Proliferation, Migration, Organisation des Zytoskelettes und die Apoptose steuern (Aplin et al. 1998, Hynes 2002b). Sie sind in viele biologische Prozesse wie Gewebsreparatur und Erhaltung der Gewebsintegrität, Inflammation, Hämostase, Zellwachstum und -differenzierung involviert. Durch die Vermittlung der Adhäsion an und Migration in das Zielgewebe stellen Integrine Schlüsselmoleküle während der Angiogenese dar. Dadurch, dass eine vermehrte Expression verschiedener Integrine auf humanen malignen Tumorzellen detektiert und unter dem Einsatz von monoklonalen Antikörpern (AK) gegen Integrine eine Tumorrogression in

Studien beschrieben werden konnte (Brooks et al 1995, Reardon et al. 2011), rückt die Entwicklung von anti-angiogenetisch wirksamen Integrin-AK immer mehr in den Fokus der onkologischen Therapie.

Integrine sind heterodimere Transmembranrezeptoren, die aus je zwei nicht-kovalent gebundenen Glykoproteinen bestehen, die als alpha- und beta-Untereinheiten bezeichnet werden (Hynes 2002a). Jede Untereinheit besteht aus einem großen extrazellulären, globulären Segment ($>75\text{kDa}$ bei der β -Untereinheit, $>100\text{kDa}$ bei der α -Untereinheit), einem einzelnen, die Zellmembran durchspannenden hydrophoben Segment und einer kurzen intrazytoplasmatischen Domäne (bestehend aus 20-50 Aminosäuren) (Hynes 1992, Nermut et al. 1988). Mittlerweile sind 19 alpha- und 8 beta-Untereinheiten bekannt, die 24 verschiedene Integrine bilden (Luo et al. 2007). Integrine können auf Grund ihrer evolutionären Verwandtschaft und strukturellen Ähnlichkeit, ihrer Ligandenspezifität und, im Fall von $\beta 2$ - und $\beta 7$ -Integrinen, anhand ihrer ausschließlichen Expression auf Leukozyten in verschiedene Subklassen untergliedert werden (Hynes 2002a).

Der globuläre Kopf beinhaltet die Ligandenbindungsstelle, die durch beide Integrinuntereinheiten determiniert wird. Zu den Integrinliganden zählen Proteine der ECM wie Laminin, FN, Fibrinogen, Typ I- und IV-Kollagen, E-Cadherin, Vitronektin (VN) und der vWF. Aber auch Oberflächenmoleküle der Ig-Superfamilie können von Integrinen detektiert werden und ermöglichen so die Zell-Zell-Interaktion (Hynes 2002a, Springer und Wang 2004). Die meisten Integrine binden nicht hochspezifisch einen bestimmten Liganden, sondern gehen Interaktionen mit verschiedenen Liganden ein, wobei ein spezifischer Ligand je nach interagierendem Integrin zu unterschiedlichen zellulären Antworten führt (Hynes 1992). Integrine mit der gleichen α -Untereinheit weisen, genauso wie Integrine mit der gleichen β -Untereinheit, unterschiedliche Ligandenbindungsspezifitäten auf (Marinelli et al. 2004). Die Erkennung des spezifischen Liganden erfolgt über die Detektion bestimmter Aminosäuresequenzen innerhalb der ECM-Proteine. Dabei zählt die erstmalig 1984 von Pierschbacher und Ruoslathi in Fibrinogen beschrieben und als RGD- Sequenz bekannte Tripeptidsequenz Arg-Gly-Asp (Arginin, Glyzin, Aspartat) zu den wichtigsten Detektionssequenzen. Die RGD-Sequenz konnte in verschiedenen Proteinen der ECM wie Fibrinogen, VN, Laminin und vWF identifiziert werden.

1.3.2 Signaltransduktion von Integrinrezeptoren

1.3.2.1 Integrine als bidirektionale Signaltransduktoren

Integrine ermöglichen einen bidirektionalen Informationsaustausch zwischen der ECM und dem Intrazellularraum. Auf der Zelloberfläche exprimierte Integrine weisen meistens eine geringe Affinität zu ihrem Liganden auf. Durch einen Prozess der als *inside-out-signaling* bezeichnet wird, können Integrine die Spezifität und Affinität zu ihrem Liganden durch Änderung der Konformation aus dem Zellinneren heraus regulieren (Ginsberg et al. 2005). Die Bindung des Liganden an den Integrinrezeptor durch die Anlagerung zytoskelettaler Proteine führt zur Bildung intrazellulärer, hochorganisierter Adhäsionskomplexen. Die in den Fokalkontakten in hoher Konzentration vorliegenden Integrine erzeugen gemeinsam eine starke Bindung (Alberts et al. 1995, Liu et al. 2000). Da Integrine selbst keine intrinsische Aktivität besitzen, sind Signalmoleküle wie Tyrosinkinase, G-Proteine und Adaptermoleküle Teil der Fokalkontakte. Sie interagieren mit der zytoplasmatischen Domäne einer der beiden Untereinheiten des Integrinrezeptors (Alberts et al. 1995, Ginsberg et al. 2005) und bilden den Ausgangspunkt für die bidirektionale Signaltransduktion. Bei dem *outside-in-signaling* handelt es sich um das Auslösen intrazellulärer Signaltransduktionswege, die signifikanten Einfluss auf Zelldifferenzierung, Proliferation und Mobilität sowie die Genexpression haben (Ginsberg et al. 2005, Hynes et al. 2002a). Dadurch, dass Signale durch das *outside-in-signaling* von der ECM in die Zelle geleitet werden können, und Integrine durch das *inside-out-signaling* die Fähigkeit besitzen, ihren Aktivitätszustand zu verändern, kann einerseits die ECM Einfluss auf das Verhalten der Zelle nehmen und andererseits die Zelle adäquat an die Gegebenheiten des Extrazellularraumes adaptieren (Hynes 1992).

Sowohl beim *inside-out-* als auch beim *outside-in-signaling* wird die Funktion des Integrinrezeptors durch eine Änderung der Konformation erreicht. Es können zwei verschiedene Aktivitätszustände bei Integrinen unterschieden werden: der aktivierte Zustand, bei dem Integrine ihre Liganden mit hoher Affinität binden, und der inaktive Zustand. Der Aktivitätszustand wird sowohl durch Bindung verschiedener Moleküle an die extrazelluläre Domäne (AK, bivalente Kationen wie Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} [Springer und Wang 2004, Luo et al. 2007]) als auch durch das *inside-out-signaling* beeinflusst (Aplin et al. 1998). Elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten zeigen, dass Integrine mit einer abgewinkelten Konformation der extrazellulären Domäne in einem physiologisch inaktiven Zustand und geringer Affinität zu ihren Liganden vorliegen (Zhu et al. 2008). Zur Aufrechterhaltung des Inaktivitätszustandes ist eine Assoziation der zytoplasmatischen und der transmembranen Domäne beider Integrinuntereinheiten essentiell

(Woodside et al. 2001, Lu et al. 2001). Die Bindung der beiden Untereinheiten erfolgt über verschiedene chemische Verbindungen, vor allem Disulfidbrücken, welche die zysteinreichen Regionen der transmembranen Domäne verbinden (Beglova et al. 2002, Zhu et al. 2009) und durch Salzbrücken (Ginsberg et al. 2005). Bei der Aktivierung kommt es durch die Spaltung der Brücken zur „klappmesserartigen“ Bewegung. Durch die Separation der transmembranen Domäne richtet sich das Integrin in seiner gestreckten Konformation auf und liegt in einem Aktivitätszustand mit hoher Ligandenbindungsaffinität vor (Beglova et al. 2002). Die Aktivierung geht zum einen mit einer Konformationsänderung der Ligandenbindungsstelle einher, zum anderen kommt es zur Separation der zytoplasmatischen Domänen, so dass eine Bindung zytoplasmatischer Proteine ermöglicht wird und Ausgangspunkt für intrazelluläre Signalkaskaden darstellt (Hynes et al. 2002b).

1.3.2.2 *Inside-out-signaling*

Bei dem *inside-out-signaling* wird der Aktivität des Integrins durch die Interaktion des Zytoskelettes mit der zytoplasmatischen Domäne der Integrin- α - oder häufiger, der β -Untereinheit reguliert (Calderwood et al. 1999, Hynes 2002b). Bei der Kommunikation mit dem Zytoskelett sind vor allem verschiedene G-Protein-assoziierte Rezeptoren beteiligt (Kinbara et al. 2003). Einer der wichtigsten Vertreter der beteiligten G-Proteine ist *rat sarcoma (Ras) proximity (Rap)-1*, das zur Gruppe der kleinen GTPasen gehört und über seinen Bindungspartner dem *Rap1-GTPase-interacting adaptor molecule (RIAM)* mit dem Integrin-Aktivator Talin eine Komplexbildung eingeht (Han et al. 2006). Talin ist ein Protein des Zytoskeletts, das in hoher Konzentration in fokalen Adhäsionsstellen vorliegt, und aus einem N-terminalen globulären Kopf und einer C-terminalen Stabdomäne besteht (Hu und Luo 2013). Durch die Actinbindungsdomäne ist Talin an Actin im Zytoskelett gekoppelt. Im Rahmen der Integrinaktivierung bindet Talin mit der im Kopf lokalisierten Phosphotyrosin-bindenden (*phosphotyrosin-binding [PTB]*)-Domäne an die zytoplasmatische Domäne der β -Untereinheit, wodurch es zur Verkürzung der transmembranen Domäne und Spaltung der chemischen Verbindungen zwischen den zytoplasmatischen und transmembranen Domänen beider Untereinheiten kommt. Die Folge ist die Dissoziation beider Untereinheiten, die sich aufrichten und eine erhöhte Affinität der Ligandenbindung durch Änderung der Konformation erreichen (Hynes et al. 2002a, Ginsberg et al. 2005). Neben Talin sind noch weitere Zytoskelettproteine wie α -Actinin, Vinculin, Paxillin u.v.m. in den Fokalkontakten assoziiert und tragen zur strukturellen und funktionellen Verbindung zwischen dem Integrin und dem Zytoskelett bei (Aplin et al. 1998).

1.3.2.3 *Outside-in-signaling*

Beim *outside-in-signaling* geht der Aktivierung des Integrins die extrazelluläre Bindung des Liganden an die Ligandenbindungsstelle voraus (Hynes 2002a). Für die Initiierung des *outside-in-signaling*s sind zwei Schritte entscheidend: Zum einen führt die Bindung des Integrins an den Liganden zur Rekrutierung weiterer Integrine und damit zur Erhöhung der Konzentration der Integrine (*mikroclustering*) und der Integrin-assoziierten Signalmoleküle in den Fokalkontakten (Kim et al. 2011). Zum anderen resultiert aus der Adhäsion des Integrins an seinen Liganden eine Konformationsänderung des Integrins mit Separation der transmembranen und zyttoplasmatischen Domänen (Ginsberg et al. 2005, Kim et al. 2011), so dass sowohl das *clustering* als auch die Konformationsänderung das *outside-in-signaling* initiieren (Miyamoto et al. 1995).

Die Interaktion der unterhalb der Zellmembran lokalisierten Signalmoleküle mit dem Integrin hat die Phosphorylierung und Initiierung von Signaltransduktionswegen zur Folge (Aplin et al. 1998, Liu et al. 2000, Ginsberg et al. 2005). Bei der Induktion der Signalkaskaden besteht eine enge Interaktion zwischen Integrinen und Rezeptoren von Wachstumsfaktoren, so dass die Aktivierung einer der beiden Rezeptoren zu einer Koaktivierung des interagierenden Rezeptors führen kann (Miyamoto et al. 1995) und durch eine wechselseitige Kommunikation zwischen den Signaltransduktionswegen ein synergistischer Effekt spezifischer Wachstumsfaktoren und Integrinen erzielt wird (Mahabeleshwar et al. 2007). In *In-vivo*-Studien zur Regulation der Angiogenese konnte eine gesteigerte Integrin $\alpha\beta3$ -Phosphorylierung durch die Aktivierung des bFGF-Rezeptor-1 durch seinen löslichen Liganden bFGF beobachtet werden (Eliceiri et al. 2002), genauso wie nach der Bindung von VEGF an VEGFR-2 eine Aktivierung des Integrine $\alpha\beta5$ (Eliceiri et al. 2002) bzw. $\alpha\beta3$ (Mahabeleshwar et al. 2007) beschrieben werden konnte.

Zu den wichtigsten Vertretern der in den Fokalkontakten lokalisierten Signaltransduktoren gehören die Tyrosinkinasen wie die fokale Adhäsionskinase (*focal adhesion kinase* [FAK]) und die Src-Familie der Tyrosinkinasen. Sie stellen den proximalen Ausgangspunkt vieler Signaltransduktionswege von Integrinen dar (Giancotti und Ruoslati 1999). Die FAK steht direkt oder via Adapterproteine mit dem Zytoskelett und der Integrin- β -Untereinheit in Kontakt (Chen et al. 1995). Durch die Bindung des Integrins an seinen Liganden erfolgt die Autophosphorylierung von FAK (an Tyr 397), wodurch eine Interaktion unter anderem mit Mitgliedern der Src-Tyrosinkinasen ermöglicht wird (Giancotti und Ruoslati 1999, Playford und Schaller 2004). Die Src-Tyrosinkinasen stellen die zweite große Gruppe der in Säugetieren exprimierten Tyrosinkinasen dar. Sie werden in 9 Subtypen untergliedert (c-Src, Fyn, Lyn, c-Yes, Hck, Lck, Yrk, Blk, Fgr)

(Thomas und Brugge 1997) und spielen in der integrinvermittelten Signaltransduktion eine entscheidende Rolle. Sowohl der FAK als auch den Src-Kinasen werden entscheidende Rollen beim Auf- und Abbau fokaler Kontakte beigemessen und sie sind Ausgangspunkt verschiedenster integrinvermittelter Signaltransduktionswege, bei denen sie entweder isoliert oder durch Interaktion agieren (Aplin et al 1998, Playford und Schaller 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Mitglieder der Src-Familie mit α_v -Integrinen, insbesondere $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ Integrinen, interagieren und an der Vermittlung von Zelladhäsion, Proliferation und Interaktion mit Wachstumsfaktorrezeptoren beteiligt sind. Beispiele hierfür sind die $\alpha_v\beta_3$ -induzierte Hemmung der Apoptose von glatten Muskelzellen (Courter et al. 2005) und die Induktion der Proliferation oligodendrozytärer Vorläuferzellen (Colognato et al. 2004). Eine Schlüsselfunktion kommt den c-Src-Kinasen im Rahmen der $\alpha_v\beta_5$ -vermittelten Angiogenese zu. So scheint die c-Src-Kinase sowohl an der VEGF-induzierten (Eliceiri et al. 2002), als auch an der Leptin-vermittelten (Heida et al. 2010) Aktivierung des Integrins $\alpha_v\beta_5$ in endothelialen, angiogenetischen Zellen beteiligt zu sein.

Neben der Kontrolle der Zelladhäsion besitzen Integrine die Fähigkeit, durch die Induktion bestimmter Signalkaskaden Einfluss auf die Genexpression zu nehmen und somit zum einen den Zellzyklus zu regulieren (Courter et al. 2005), als auch spezifisch parakrine Effekte durch die Steigerung der Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zu vermitteln (Lin et al. 1994).

1.3.3 Funktion der α_v -Integrine bei der EPC-vermittelten Angiogenese

α_v -Integrine nehmen eine Schlüsselfunktion im Rahmen der Angiogenese ein. α_v -Integrine bilden mit einer von 5 verschiedenen Integrin β -Ketten (β_1 , β_3 , β_5 , β_6 , β_8) funktionsfähige Integrin-heterodimere aus (Hynes 2002a). α_v -Integrine gehören zu der Gruppe der RGD-Rezeptoren (Felding-Habermann und Cheresch 1993, Ruoslahti 1996). Während ein Teil der α_v -Integrine wie $\alpha_v\beta_3$ eine Bindung mit verschiedenen Liganden eingeht, handelt es sich bei dem Integrin $\alpha_v\beta_5$ primär um einen Vitronektinrezeptor (Smith und Cheresch 1988).

α_v - Integrine, wie das Integrin $\alpha_v\beta_5$ werden auf verschiedenen Zellen wie Keratinozyten, Epithelzellen des Bronchialsystems, Fibroblasten und Osteoklasten exprimiert (Huang et al. 2000). Das Integrin $\alpha_v\beta_5$ wurde erstmalig aus dem Plazentagewebe isoliert (Smith et al. 1990) und zeigt eine hohe Expression in hämatopoetischen Organen und dem sich entwickelnden kardiovaskulären System bei Mausembryonen (LeGat et al. 2001). Während die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ auf inaktivem, ruhendem Endothel in sehr geringem Maße exprimiert werden, weisen beide Integrine

ein hohes Expressionsmuster auf aktivierten Endothelzellen im Rahmen der Wundheilung, der Inflammation, aber auch im Tumorgewebe auf (Brooks et al. 1994a, Drake et al. 1995, Eliceiri und Cheresch, 1999). Studien verschiedener Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass den Integrinen $\alpha v\beta 3$ und $\alpha v\beta 5$ eine entscheidende Rolle an der Regulation der Angiogenese durch die Vermittlung zytokinabhängiger Signaltransduktionswege zukommt (Friedlander et al. 1995, Eliceiri et al. 2002, Mahabeleshwar et al. 2007). Heute wird die Meinung vertreten, dass zwei verschiedene Signaltransduktionswege an der Neovaskularisation verschiedener Organe beteiligt sind. Ein bFGF-induzierter Signaltransduktionsweg, der über $\alpha v\beta 3$ vermittelt wird und ein zweiter, der hauptsächlich VEGF-induziert und über die Aktivierung von $\alpha v\beta 5$ zur zellulären Antwort führt (Friedlander et al. 1995, Eliceiri und Cheresch 1999).

Hinsichtlich ihrer exakten Funktion im Rahmen der Angiogenese haben verschiedene Studien diskrepante Daten erhoben. So wurde durch Studien in *knockout*-Mäusen die Schlüsselrolle der Integrine $\alpha v\beta 3$ und $\alpha v\beta 5$ an der Regulation der Angiogenese in Frage gestellt. Mäuse mit isolierten Null-Mutationen der $\beta 3$ -Untereinheit (Hodivala-Dilke et al. 1999), der $\beta 5$ -Kette (Huang et al. 2000) oder kompletter Defizienz der Integrin- αv -Gruppe (Bader et al. 1998, McCarty et al. 2002) weisen eine weitestgehend normale sprossende Angiogenese mit Ausbildung eines regelrechten Gefäßmusters auf. Reynolds et al. beschrieben 2002 eine gesteigerte Tumorangio-genese bei $\beta 3$ - bzw. $\beta 3$ - und $\beta 5$ -defizienten Mäusen. Dem gegenüber konnte durch den Einsatz monoklonaler αv - bzw. $\alpha v\beta 3$ und/oder $\alpha v\beta 5$ -AK oder zyklischer Peptide in einer Vielzahl von *In-vitro*-Assays (Kumar et al. 2001, Nisato et al. 2003, Pisano et al. 2013) oder in *In-vivo*-Studien (Brooks et al. 1994a, Brooks et al. 1994B, Brooks et al. 1995, Drake et al. 1995, Friedlander et al. 1996, Hammes et al. 1996, Kumar et al. 2001, Storgard et al. 1999) eine signifikante Hemmung sowohl der physiologischen als auch der Tumorangio-genese nachgewiesen werden.

Studien unserer Arbeitsgruppe konnten eine Expression der Integrine $\alpha v\beta 3$ und $\alpha v\beta 5$ auf EPCs nachweisen (Schroeter et al. 2008). Nach Inkubation mit monoklonalen $\alpha v\beta 5$ -AK bzw. RGD-Peptiden konnte eine verminderte Adhäsion von EPCs auf VN, an reife Endothelzellen sowie eine verminderte Akkumulation an thrombotischem Material und iatrogen gesetzten Gefäßläsionen beobachtet werden (Schroeter et al. 2008). Diese Ergebnisse deuten, ebenso wie die Daten der o.g. Studien mit monoklonalen AK, auf eine entscheidende Rolle des Integrins $\alpha v\beta 5$ bei dem *homing* von EPCs, der Reendothelialisierung und der Neovaskularisation hin. Nach Stimulation der EPCs mit dem Adipozyten-Zytokin Leptin konnte durch die Interaktion des Leptinrezeptors (*product of the obesity-gene receptor* [ObR]) mit dem $\alpha v\beta 5$ -Integrin die Expression des Integrins und die

angiogenetische Potenz von EPCs *in vitro* und *in vivo* $\alpha\beta 5$ -abhängig potenziert werden (Heida et al. 2010).

Zusammenfassend lassen diese Beobachtungen darauf schließen, dass das Integrin $\alpha\beta 5$ eine Schlüsselfunktion in der EPC-vermittelten Angiogenese einnimmt, und die angiogenetischen Fähigkeiten der EPCs durch eine vermehrte Migration in das Zielgewebe $\alpha\beta 5$ -abhängig steigern kann.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In vorangegangenen Studien wurden diskrepante Daten bezüglich der Rolle des Integrins $\alpha\beta 5$ in der Angiogenese erhoben (Huang et al. 2000, Bader et al. 1998, Brooks et al. 1995, Kumar et al. 2001). Studien unserer Arbeitsgruppe demonstrierten eine Leptin-induzierte Steigerung der Integrin $\alpha\beta 5$ -Oberflächenexpression und eine damit verbundenen $\alpha\beta 5$ -abhängige Steigerung der angiogenetischen Fähigkeiten von humanen EPCs (Schroeter et al. 2008, Heida et al. 2010). In jeweils zwei verschiedenen *In-vitro*- und *In-vivo*-Assays konnte nach Leptinstimulation eine Zunahme der migratorischen Fähigkeiten der EPCs bzw. Adhäsion an das Zielgewebe beobachtet werden. Beide Effekte ließen sich durch die Inkubation mit monoklonalen AK gegen das $\alpha\beta 5$ -Integrin aufheben was zeigt, dass die Effekte spezifisch durch das Integrin $\alpha\beta 5$ vermittelt wurden (Heida et al. 2010). Ursächlich wurde eine Interaktion von Signaltransduktionswegen zwischen dem VEGFR-2 und dem $\alpha\beta 5$ -Integrin mit konsekutiver Hochregulation der Expression des $\alpha\beta 5$ -Integrins dargelegt (Heida et al. 2010).

Das erste Ziel unserer Studie war, die Rolle des Integrins $\alpha\beta 5$ im Rahmen der Angiogenese zu untersuchen und die Hypothese zu testen, ob eine gesteigerte Expression des Integrins $\alpha\beta 5$ die proangiogenetischen Fähigkeiten von EPCs fördert, ohne dass zuvor eine Interaktion mit einem Zytokin- oder Wachstumsfaktor-Rezeptoren durch Stimulation der EPCs stattgefunden hat.

Die α -Untereinheit kann mit der $\beta 5$ -Kette, aber auch verschiedenen anderen Integrin β -Ketten ($\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 6$ und $\beta 8$) funktionsfähige Heterodimere ausbilden. Um eine spezifische Analyse zu ermöglichen, wurden EPCs nach Isolation mit der komplementären Desoxyribonukleinsäure (*complementary desoxyribonucleic acid* [cDNA]) der humanen Integrin $\beta 5$ -Untereinheit transfiziert. Die α -Untereinheit ist bislang der einzige bekannte Bindungspartner der erstmals durch Smith et al. 1990 beschriebenen Integrin $\beta 5$ -Kette (ITGB5). In der vorliegenden Arbeit wurde die Überexpression der $\beta 5$ -Kette auf *messenger* Ribonukleinsäure (*messenger ribonucleic*

acid [mRNA])- und Proteinebene sowie durch eine gesteigerte Oberflächenexpression in Durchflusszytometrie (syn.: *fluorescence-activated cell sorting* [FACS])-Analysen nachgewiesen.

Um die angiogenetische Potenz der ITGB5-transfizierten EPCs zu verifizieren, wurden diverse Assays zur Proliferation, Migration und Adhäsion sowie 2 verschiedenen *In-vitro*-Angiogenese-Assays und ein *In-vivo*-Mausmodell der unilateralen Hinterlaufischämie durchgeführt.

Das zweite Ziel unserer Studie war es, durch die Modifizierung der proangiogenetischen Fähigkeiten der EPCs nach ITGB5-Transfektion einen möglichen Therapieansatz für Patienten mit erhöhtem kardiovaskulären Risikoprofil und kardiovaskulären Erkrankungen zu bieten, da wie oben beschrieben, die Verbesserung der EPCs-Funktion die Prognose dieser Patienten verbessern würde.

Über die genauen intrazellulären Signaltransduktionswege, welche für die Vermittlung des Integrin $\alpha\beta 5$ -Effektes verantwortlich sind, ist kaum etwas bekannt. Es wird eine Schlüsselfunktion im Rahmen der Migration vermutet (Kim et al. 1994, Klemke et al. 1994).

Das dritte Ziel unserer Studie war, den intrazellulären Signaltransduktionsweg sowie mögliche beteiligte Zytokine oder Wachstumsfaktoren zu ermitteln, die an der Vermittlung des Integrin $\alpha\beta 5$ -Effektes beteiligt sind.

Auf Grund der durch die Ergebnisse unserer vorherigen Studien bestehenden Hypothese, dass an der Vermittlung des $\alpha\beta 5$ -Integrin-Effektes parakrine Mechanismen beteiligt sind, wurde ein Zytokin-Array mit konditioniertem Medium (*conditioned medium* [CdM]) der EPCs zur Detektion möglicher involvierter Zytokine und Wachstumsfaktoren durchgeführt. Die Regulation der detektierten Zytokine wurde im Anschluss auf Genexpressionsebene bestätigt. Durch den Einsatz neutralisierender AK wurde die Spezifität der $\alpha\beta 5$ -vermittelten Zytokinexpression erhärtet. Abschließend wurden verschiedene Signaltransduktionsmoleküle, die laut Literatur an der Vermittlung des Signals des $\alpha\beta 5$ -Integrins bis zur Steigerung der Genexpression der Zytokine involviert sein könnten, mittels Western Blot-Analyse oder der Immunpräzipitation detektiert.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Reinraumwerkbank durchgeführt, die in regelmäßigen Abständen mittels Ultraviolett (UV)-Lampen Bestrahlung sterilisiert wurde. Die Zellen wurden in einem Zellkultur-Inkubator (Sanyo-Biomedical; Bad Nenndorf, Deutschland) bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) inkubiert. Alle verwendeten Materialien und Geräte wurden vor ihrem Gebrauch desinfiziert oder sterilisiert.

2.1.1 Isolation und Kultivierung von EPCs

Die Isolation der EPCs erfolgte nach der Methode der Dichtegradientenzentrifugation in Anlehnung an das Isolationsprotokoll, welches 2001 durch Vasa et al. etabliert wurde.

Die EPCs wurden aus der Leukozytenfraktion von *Buffy Coats* freiwilliger gesunder Vollblutspender, die am selben Tag vom Transfusionsmedizinischen Institut des Universitätsklinikums in Göttingen bereitgestellt wurden, isoliert. 12,5 ml des *Buffy Coats* wurden im Verhältnis von 1:1 mit vorgewärmter phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate-buffered saline* [PBS]; Gibco; Darmstadt, Deutschland) in einem 50 ml-Röhrchen (Falcon; Olbersdorf, Deutschland) verdünnt. Die Verdünnung wurde vorsichtig über 20 ml Ficollreagenz (Histopaque 1077, Sigma; Taufkirchen, Deutschland) mit einem Dichtegradient von 1,077 g/ml geschichtet und bei Raumtemperatur (RT) mit 1800 Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute* [rpm]) über 30 Minuten (min) ohne Bremse zentrifugiert (Eppendorf; Wesseling-Berzdorf, Deutschland). Während der Zentrifugation erfolgte die Beschichtung von 4-Well- (NUNC A/S, Roskilde, Dänemark) bzw. 10 cm-Zellkulturplatten (Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland) mit 500 µl bzw. 5 ml Fibronektin (Tebu-Bio; Le Perray en Yvelines Cedex, Frankreich) welches zuvor mit steriler PBS auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt worden war. Die Zellkulturplatten wurden für 60 min bei RT inkubiert. Nach der Zentrifugation stellten sich die mononukleären Zellen (*mononuclear cells* MNC) als dünne Interphase zwischen den Schichten dar, welche mit einer sterilen Pasteurpipette aspiriert wurde. Die MNC-Interphasen zweier Falconröhrchen wurden dann in einem Röhrchen mit 10 ml PBS gepoolt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, die Zentrifugationsschritte erfolgten jeweils bei RT für 10 min bei 1500 rpm. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellpellets in EPC-Kultivierungsmedium (EPC-Medium) (s.u.) resuspendiert, unter dem Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Neubauer

Zählkammersystem, Assistant; Deutschland) gezählt und auf eine Konzentration von $2,5 \times 10^7$ Zellen/ml eingestellt.

Die mit FN beschichteten Zellkulturplatten wurden 2x mit je 2 ml bzw. 10 ml vorgewärmter PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml bzw. 10 ml EPC-Medium befüllt. Es erfolgte die Zellaussaat mit 80 µl oder 2 ml der Zell-Suspension, so dass anschließend die totale Zellzahl pro Well bzw. pro Zellkulturplatte 2×10^6 bzw. 5×10^7 betrug. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Zellkultur-Inkubator bis zum Tag 4 kultiviert. An Tag 4 wurden die nicht-adhärenenten Zellen durch zweimaliges Waschen der Zellkulturplatten mit vorgewärmter PSB entfernt, und 2 ml oder 10 ml frisches, vorgewärmtes EPC-Medium auf jede Zellkulturplatte pipettiert und die Zellen bis zum Tag 5 inkubiert.

Endothelial cell growth Medium Kit MV zur Kultivierung von EPCs (PromoCell C-22220; Heidelberg, Deutschland):

15 % fetales Rinderserum (*fetal bovine serum* [FBS]), 5 % fetales Kälberserum (*fetal calf serum* [FCS]), 0,4 % *endothelial cell growth supplement*/Heparin, 10 ng/ml epidermaler Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor* [EGF]), 1 µg/ml Hydrocortison (PromoCell Supplement Pack C-39220), 100 µg/ml Streptomycin (Gibco), 100 U/ml Penicillin (Gibco)

2.1.2 Plasmidvervielfältigung

2.1.2.1 Transformation von Bakterienzellen *Escherichia coli* (*E.coli*) TOP 10

Die Transformation der verwendeten Plasmide erfolgte in *E. Coli* TOP 10 (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland). Auf 50 µl kompetenter Bakterienzellen wurden 10 ng Plasmid-DNA pipettiert und diese anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 42 °C für 30 Sekunden (sek) im Thermoblock (Biometra; Göttingen, Deutschland) erfolgte die erneute Inkubation auf Eis für 2 min. Anschließend wurden 250 µl *super optimal broth with catabolite repression*-Medium (SOC-Medium; Invitrogen) hinzugegeben und der Ansatz für 60 min im Schüttelinkubator (Behr Labor-Technik; Düsseldorf, Deutschland) bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Pelletierung der Bakterien für 5 min bei 4000 rpm bei RT. In der Zwischenzeit wurde das *lysogeny broth*-Medium (LB-Medium; Sigma-Aldrich; München, Deutschland), in Abhängigkeit von der auf dem transformierten Plasmid kodierten Antibiotikaresistenz, mit Ampicillin in einer Konzentration von 50 µg/ml bzw. 30 µg/ml Kanamycin (beide Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland) versetzt. Das Bakterienpellet wurde in 3 ml LB-Medium mit Antibiotikazusatz resuspendiert und

über 16 Std. bei 37°C im Schüttel-inkubator bei 225 rpm kultiviert. Am Folgetag erfolgte die Überführung der 3 ml Vorkultur in einen mit 100 ml LB-Medium mit Antibiotikazusatz befüllten, autoklavierten Glaskolben mit anschließender Inkubation im Schüttelinkubator für weitere 16 Std.

Super optimal broth with catabolite repression-Medium:

0,5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glukose

2.1.2.2 Plasmidisolation

Die Extraktion der DNA-Plasmide erfolgte unter Verwendung des Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen; Hilden, Deutschland) nach der Anleitung des Herstellers. Das Prinzip der DNA-Isolation besteht in der unter alkalischen Bedingungen stattfindenden Lyse der Bakterienzellen mit anschließender selektiver Adsorption an einer Silica-Membran, gefolgt von Waschung und Elution der Plasmid-DNA. Als Lösungsmittel für die DNA wurde steriles Wasser für Injektionszwecke (Braun; Melsungen, Deutschland) verwendet. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über die Messung der optischen Dichte mittels Photometer (Bio-Tek; Bad Friedrichshall, Deutschland)

2.1.3 Plasmidtransfektion der EPCs

Um die Effekte der Integrin $\alpha\beta 5$ -Überexpression untersuchen zu können, wurden die EPCs an Tag 5 nach Isolation mit 3 $\mu\text{g}/4\text{-Well-}$ bzw. 20 $\mu\text{g}/10\text{ cm-Zellkulturplatte}$ mit humaner *full-length* Integrin $\beta 5$ -cDNA (pCMV-ITGB5; NM_002213.3) oder mit dem leeren Kontroll-Vektor pCMV6-XL5 (beide OriGene, Rockville, USA) transfiziert. Für die Detektion von EPCs in den *In-vivo*-Versuchen wurde die Integrin $\beta 5$ cDNA mit pDsRed-Monomer-N1-Vektor kloniert (Clontech; Mountain View, CA, USA). Durch im Vorfeld stattgefundene Studien hatte sich in unsere Arbeitsgruppe ein Verhältnis des DNA-Transfektionsreagenz Metafectene TM Pro (Biontex; Martinsried, Deutschland) mit der DNA von 4:1 etabliert. 3 μg bzw. 20 μg der Plasmid-DNA sowie 12 μl bzw. 80 μl des Transfektionsreagenz wurden je mit Endothelzell-Basalmedium (EBM; PromoCell), ohne Zusätze von Antibiotika auf je 106 μl bzw. 700 μl aufgenommen. Die Lösung, die die Plasmid-DNA enthielt, wurde dem Ansatz mit dem Transfektionsreagenz zugeführt, bei RT zur Bildung von DNA/Lipid-Komplexen für 20 min inkubiert und auf die Zellkulturplatten pipettiert. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37 °C bis zum Mediumwechsel nach 6 Stunden. Die Inkubation bei 37 °C im Zellkulturinkubator wurde bis zum Tag 7 nach Isolation fortgeführt.

Tabelle 1: verwendete Plasmide

Plasmidname:	pCMV-ITGB5 (6892 bp)
Vektor:	pCMV6-XL5 (4482 bp)
Insert:	ITGB5 (2410 bp)
Hersteller:	OriGene; Rockville, USA
Besonderheit:	Human full length cDNA für Integrin beta 5
Plasmidname:	pCMV6-XL5 (4482 bp)
Vektor:	pCMV6-XL5 (4482 bp)
Insert:	-
Hersteller:	OriGene
Besonderheit:	Kontroll-Vektor für pCMV-ITGB5
Plasmidname:	pDsRed-Monomer-N1 (4691 bp)
Vektor:	pDsRed-Monomer-N1 (4691 bp)
Insert:	-
Hersteller:	Clontech; Heidelberg, Deutschland
Besonderheit:	Klonierungs-Vektor, Kontroll-Vektor für pITGB5-DsRed Klon 6
Plasmidname:	pITGB5-DsRed Klon 6 (7,1 kb)
Vektor:	pDsRed-Monomer-N1 (4691 bp)
Insert:	ITGB5 (2410 bp)
Hersteller:	-
Besonderheit:	Klonierung durch Fr. Dr. rer. nat. M. Leifheit-Nestler aus unserer Arbeitsgruppe

2.1.4 Stimulation der EPCs mit Leptin

Die Stimulation der EPCs erfolgte an Tag 6 nach Isolation. Die EPCs wurden mit PBS gewaschen und mit 10 ng/ml rekombinantem humanen Leptin (R&B Systems; Minneapolis, MN, USA) bzw. PBS als Kontrolle für 24 Std. bei 37 °C inkubiert und anschließend den Versuchen zugeführt.

2.1.5 Fluoreszenzmarkierung der EPCs

Zur Durchführung des Matrigel- und des 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assays wurden die EPCs an Tag 7 vor Versuchsbeginn unter Verwendung von 2,5 µl der Substanz DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate), einem lipophilen Carbozyanin aus der Gruppe

der Chloromethylbenzamidoderivate (CellTracker™ CM-DiI; Invitrogen) pro ml serumfreies EBM fluoreszenzmarkiert. Nach dem Waschen der Zellen mit vorgewärmter PBS, folgte die Inkubation mit 3 ml des Markierungsreagenzgemisches pro 10 cm-Zellkulturplatte für 20 min bei 37 °C im Zellkulturinkubator und weitere 5 min bei 4 °C. Anschließend erfolgten die erneute Waschung mit vorgewärmter PBS und die Ernte der EPCs.

2.1.6 Ernte der EPCs

Um die Zellen zu lösen, wurden die Zellkulturplatten mit vorgewärmter PBS gewaschen und mit 3 ml 5 mmol/l Ethylen-Diamin-Tetraacetat (EDTA; Sigma-Aldrich) in PBS für 5 min bei 37 °C inkubiert. Zur Neutralisation des EDTA wurden 7 ml vorgewärmtes EPC-Medium auf die Zellkulturplatte pipettiert, die Zellen durch mehrfaches Spülen geerntet und in ein 15 ml- Falconröhrchen überführt. Die EPCs wurden durch Zentrifugation bei RT für 10 min und 1400 rpm gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 1 ml EPC-Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde nach Färbung der Zellen mit Trypanblau (Biochrom AG; Berlin, Deutschland) unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer lichtmikroskopisch bestimmt. Anschließend erfolgte die Einstellung der gewünschten Zellzahl durch Zugabe definierter Volumina.

2.1.7 Herstellung von konditioniertem Medium

Zur Erstellung von CdM wurden am Tag der Isolation 2×10^6 EPCs in mit 500 µl FN (10 µg/ml) beschichteten 4-Well-Zellkulturplatten mit 1 ml EPC-Medium ausgesät, an Tag 5 nach Isolation mit 3 µg pro Well pCMV-ITGB5 oder mit dem Kontroll-Vektor pCMV6-XL5 transfiziert. Nach stattgehabtem Mediumwechsel 6 Std. nach Transfektion erfolgte die Kultivierung für 48 Std. in EBM bei 37 °C. An Tag 7 wurde der Überstand abpipettiert und zur Entfernung von Zellbestandteilen mit 1300 rpm für 10 min zentrifugiert. Die Aufbewahrung erfolgte bis zur Versuchsdurchführung bei -80 °C.

2.1.8 Funktionelle Blockade des Integrin $\alpha\beta 5$ und der Zytokine IL-8 und MCP-1 durch neutralisierende Antikörper

Zur Ermittlung, ob die durch die Überexpression der Integrin $\beta 5$ -Kette hervorgerufenen Effekte spezifisch gehemmt werden können, wurden neutralisierende AK verwendet, die die Bindung von Liganden an das Integrin $\alpha\beta 5$ verhinderten. Dazu wurden die EPCs nach der Ernte mit 10 µg/ml eines monoklonalen AK gegen das humane Integrin $\alpha\beta 5$ (Klon P1F6; Chemicon; Temecula, USA) oder in der Kontrollgruppe mit 10 µg/ml monoklonalem IgG (Chemicon) für 30 min bei 37 °C vorinkubiert und anschließend den Versuchsansätzen zugeführt. Zur Spezifizierung der Rolle der

Zytokine CXCL8 (auch bekannt als IL-8) und CCL2 (syn: *monocyte-chemoattractant-protein* [MCP]-1) wurden die Vektor- bzw. ITGB5-transfizierten EPCs für 48 Std. mit 10 µg/ml anti-hCXCL8 bzw. 100 µg/ml anti-CCL2 (beide R&B Systems) oder 10 µg/ml anti-αvβ5 (Klon P1F6; Chemicon) bzw. der äquivalenten Menge monoklonalem IgG (R&B Systems bzw. Chemicon) inkubiert und der Überstand bis zur Analyse im Sphäroid-Angiogenese-Assay bei -80 °C gelagert.

2.1.9 Hemmung spezifischer Signaltransduktionswege durch Inhibitoren

Um den Einfluss der Hemmung spezifischer Signaltransduktionswege auf die angiogenetischen Fähigkeiten von EPCs zu untersuchen, wurden die EPCs an Tag 6 mit 100 µM des spezifischen *signal transducer and activator of transcription* (STAT)-3-Inhibitors (VI, S31-201; Calbiochem; Darmstadt, Deutschland) für 1 Std. bei 37 °C vorinkubiert. Als Negativkontrolle wurden die äquivalenten Mengen des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma Aldrich) eingesetzt.

2.1.10 Kultivierung von humanen umbilikalen Venenendothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells* [HUVEC])

Aus Endothelzellen postpartaler Nabelschnurvenen gezüchtete HUVECs werden in Modellversuchen als makrovaskuläre Endothelzellen eingesetzt. HUVECs (PromoCell) wurden auf Trockeneis verschickt und bis zur Aussaat bei -80 °C gelagert. 10 cm-Zellkulturplatten wurden mit 5 ml Gelatine (Gibco) für 30 min bei RT beschichtet und anschließend mit 10 ml HUVEC-Kultivierungsmedium (HUVEC-Medium; PromoCell) neutralisiert. Die Zellen wurden aufgetaut, auf die beschichtete Zellkulturplatte mit 12 ml vorgewärmten HUVEC-Medium gesät und bei 37 °C bis zur Bildung von Konfluenzen im Zellkulturinkubator kultiviert. Der Mediumwechsel mit Waschung der Zellen erfolgte 3x pro Woche. Da die Zellen lediglich als Monolayer wachsen, erfolgte 1x wöchentlich das Splitten der Zellen im Verhältnis von 1:3 bis 1:5, je nach Zelldichte. Die Zellen wurden nach einmaliger Waschung mit vorgewärmter PBS durch anschließende Inkubation mit 2 ml 0,05 % Trypsin (Gibco) für 2 min bei RT von der Zellkulturplatte gelöst, durch Zugabe von 10 ml des HUVEC-Mediums zur Neutralisierung des Trypsins geerntet und zur weiteren Kultivierung ausgesät oder den entsprechenden Versuchsansätzen zugeführt. Zur Durchführung der *In-vitro*-Angiogenese-Assays wurden die HUVECs von Passage 2 bis 5 eingesetzt.

***Endothelial cell growth* Medium zur Kultivierung von HUVECs:**

2 % FCS, 0,4 % *endothelial cell growth supplement*/Heparin, 0,1 ng/ml EGF, 1 µg/ml Hydrocortison, 1 ng/ml bFGF (PromoCell Supplement Pack C-39210)

2.2 Durchflusszytometrie

Zur Detektion spezifischer endothelialer Antigene (AG), zur Demonstration der $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ -Oberflächenexpression sowie zum Nachweis der Aktivierung von STAT3 anhand einer gesteigerten Tyrosinphosphorylierung in den ITGB5-transfizierten EPCs wurde die Durchflusszytometrie nach 7 Tagen Zellkultivierung angewandt. Die Zellen wurden wie oben beschrieben geerntet und das Zellpellet nach Zentrifugation für 10 min bei RT und 1400 rpm in vorgekühlten 0,5 % Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin* [BSA])/PBS (Sigma-Aldrich) resuspendiert. Die Zellen wurden zweimal mit 0,5 % BSA/PBS durch Zentrifugation bei RT und 1400 rpm für 10 min gewaschen, die Zellzahl lichtmikroskopisch bestimmt und auf eine Zellkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml in 0,5 % BSA/PBS eingestellt. Zur Durchführung der FACS-Analyse wurden 50 μl der Zellsuspension (entspricht 1×10^5 Zellen) in ein spezielles 5 ml-FACS-Röhrchen (Falcon) überführt, mit der benötigten Menge der Fluoresceinisothiocyanat (FITC)- bzw. Phycoerythrin (PE)-konjugierten AK versetzt (s.u.) und das Volumen jeder Probe auf 100 μl mit Puffer aufgefüllt. Entsprechend konjugierte IgG-Antikörper wurden als Isotypkontrolle verwendet. Die Ansätze wurden für 45 min bei 4 °C im Dunklen inkubiert, zweimal mit BSA/PBS gewaschen und anschließend das Zellpellet in 200 μl BSA/PBS gelöst.

Im Rahmen der FACS-Analysen zur Detektion der Tyrosinphosphorylierung von STAT3 wurden auf Grund der intrazellulären Lokalisation von phospho (p) STAT3 zunächst 1×10^5 EPCs mit 2 % PFA/PBS für 15 min bei RT fixiert und nach einem Waschschrift mit 1 ml 0,05 % Triton-X (Polyethylenglykol tert-octylphenyl Ether; Sigma-Aldrich) für 10 min bei RT permeabilisiert. Nach erneutem Waschen wurde das Pellet in 100 μl BSA/PBS aufgenommen, dann erfolgte die Zugabe des ersten AK gegen pSTAT 3 in einer Verdünnung von 1:50. Durch einen weiteren Waschschrift wurden nicht gebundene AK entfernt und der sekundäre fluoreszenzkonjugierte AK in einem Verhältnis von 1:250 hinzugegeben. Beide AK wurden für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Das Zellpellet wurde nach dem letzten Waschschrift in 200 μl BSA/PBS resuspendiert. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des FACScan-Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson (Franklin Lake, USA). Bei jeder Messung wurden mindestens 10000 Signale pro Zellpopulation erfasst. Die Daten wurden mit Hilfe der Cell Quest-Software (BD Bioscience; Heidelberg, Deutschland) ausgewertet.

Tabelle 2: verwendete Antikörper für die FACS-Analyse

Antikörper	Markierung	Volumen (µl)	Hersteller	Kat.-No.
<i>mouse anti-human VEGFR-2</i>	PE	10	R&D Systems; Minneapolis, MN, USA	FAB357P
Isotypkontrolle: <i>mouse-IgG1</i>	PE	10	R&D Systems	
<i>mouse anti-human CD31 (PECAM)</i>	FITC	20	BD Biosciences; Heidelberg, Deutschland	555445
Isotypkontrolle: <i>mouse-IgG1</i>	FITC	20	BD Biosciences	
<i>mouse anti-human vWF</i>	FITC	5	DakoCytomation; Glostrup, Dänemark	A0082
Isotypkontrolle: <i>mouse-IgG1</i>	FITC	10	DakoCytomation	A0198
<i>mouse anti-human Integrin αvβ5</i>	FITC	5	Chemicon	MAB1961F
Isotypkontrolle: <i>mouse-IgG1</i>	FITC	10	Chemicon	MABC002F
<i>mouse anti-human CD51 (Integrin αv-Kette)</i>	FITC	10	Chemicon	CBL490F
Isotypkontrolle: <i>mouse-IgG1</i>	FITC	10	Chemicon	MABC002F
<i>mouse anti-human Integrin αvβ3</i>	FITC	5	Chemicon	MAB1976F
Isotypkontrolle: <i>mouse-IgG1</i>	FITC	10	Chemicon	MABC002F
<i>mouse anti-human CD29 (Integrin β1-Kette)</i>	FITC	10	Chemicon	CBL481F
Isotypkontrolle: <i>mouse-IgG1</i>	FITC	10	Chemicon	MABC002F
<i>mouse anti-human CD18 (Integrin β2-Kette)</i>	FITC	10	Chemicon	CBL158F
Isotypkontrolle: <i>mouse-IgG1</i>	FITC	10	Chemicon	MABC002F
1. AK: <i>rabbit anti-human pSTAT3</i>	-	2	Cell Signaling Technologies; Frankfurt am Main, Deutschland	#9131
2.AK: <i>goat anti-rabbit</i>	FITC	4	Cell Signaling Technologies	#8469
Isotypkontrolle:				CBL158F
1. AK: <i>rabbit IgG pur</i>	-	2	DAKO; Düsseldorf, Deutschland	X0936
2. AK: <i>goat anti-rabbit</i>	FITC	4	DAKO	X0691

2.3 Immunfluoreszenzfärbungen von EPCs

2.3.1 Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung der endothelialen Differenzierung

2.3.1.1 Analyse der acLDL-Aufnahme und Lectin-Bindung

Die adhärenenten EPCs wurden an Tag 7 nach Isolation mit 2,5 µg/ml acLDL (Invitrogen) in EBM für 1 Std bei 37 °C inkubiert. Nach zwei Waschschrinen wurden die Zellen mit 2 % PFA/PBS für 10 min bei RT im Dunklen fixiert und die Zellkerne nach drei weiteren Waschschrinen mit 4',6'-Diamidino-2-phenylinhydrochlorid (DAPI; Verdünnung 1:100, Inkubation 15 min bei RT; Sigma-Aldrich) gefärbt. Nach der Anfärbung der Zellkerne wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 10 µg/ml FITC-labeled *Ulex europaeus* Agglutinin-I (Lectin; Sigma-Aldrich), verdünnt mit PBS, überdeckt. Nach Inkubation für 1 Std. bei RT wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 200; Carl Zeiss; Göttingen, Deutschland) in 200facher Vergrößerung analysiert.

2.3.1.2 Detektion der Endothelzellmarker vWF und PECAM-1

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und mit 100 % Aceton (Merck; Darmstadt, Deutschland) bei -20 °C für 10 min fixiert. Nach dreimaligem Spülen mit PBS wurde der primäre polyklonale *rabbit anti-human* vWF-AK (Verdünnung 1:200; H-300, sc-14014, Santa Cruz Biotechnology) bzw. dem polyklonalen *mouse anti-human* CD31-AK (Verdünnung 1:100; H-300, sc-8306, Santa Cruz Biotechnology) für 1 Std. bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation des sekundären *goat anti-rabbit* bzw. *rabbit anti-mouse* FITC-markierten AK (sc-2012 bzw. sc-358949, Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1:500 für 1 Std. bei RT im Dunkeln. Die Zellkerne wurden mit DAPI (s.o.) gegengefärbt. und anschließend die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop in 200facher Vergrößerung fotografiert und analysiert.

2.3.2 Immunfluoreszenzfärbung zur Lokalisation von pSTAT3 und Darstellung des Zytoskeletts

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 % Paraformaldehyd (PFA; Sigma-Aldrich) in PBS für 15 min bei RT fixiert. Nach 3maligem Spülen mit PBS erfolgte die Permeabilisierung mit 0,1 % Triton-X in PBS für 5 min bei 37 °C. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch 30-minütige Inkubation in 0,5 % BSA/PBS geblockt, so dass nach drei weiteren Waschschrinen die Inkubation des polyklonalen pSTAT3-AK (Tyr705; #9131; Cell Signaling Technologies) mit einer Verdünnung von 1:50 in PBS für 1 Std. bei RT folgte. Zur isolierten

Darstellung des Zytoskeletts mit dem Ziel der morphologischen Charakterisierung der EPCs wurde anstelle des pSTAT3-AK der *mouse anti-human Vinculin-AK* (G-11, sc-55465; Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1:100 in PBS inkubiert. Die Zellen wurden erneut 3x mit PBS gespült und der sekundäre FITC-markierte *goat anti-rabbit* bzw. *rabbit anti-mouse AK* (sc-2012 bzw. sc-358949; Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1:100 für 1 Std. bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Actinfilamente des Zytoskeletts wurden mit Rhodamin-Phalloidin (Invitrogen; Verdünnung 1:500 in PBS für 20 min bei RT) einem Tetramethylrhodamin (TRITC)-markierten Toxin des Knollenblätterpilzes, visualisiert. Rhodamin-Phalloidin bindet in seiner Eigenschaft als Actinfilamentstabilisator an F-Actin und führt zur selektiven Anfärbung des Zytoskeletts (Chazotte et al. 2010). Die Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop in einer 200fachen Vergrößerung analysiert.

2.4 Proteinisolation, Immunpräzipitation und Western Blot-Analyse

2.4.1 Proteinisolation

Zur Herstellung von Proteinlysaten aus EPCs wurden die Zellen zweimal mit eiskalter PBS gewaschen, mit einem Zellspatel von der Zellkulturplatte entfernt und bei 4 °C und 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 µl Lysepuffer resuspendiert. Nach Inkubation für 20 min auf Eis erfolgte die Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min bei 4 °C, wodurch sich die unlöslichen Zellbestandteile von den Proteinen separierten und die Proteine im Überstand verblieben. Die Proteinkonzentration in den Proben wurde unter Verwendung des *bicinchoninic acid* (BCA)-Assays (Fisher Thermo Scientific; Schwerte, Deutschland) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Reagenz A und Reagenz B wurden im Verhältnis von 1:50 vermischt, und 200 µl des Gemisches zusammen mit 25 µl der Standard-Albumin-Verdünnungsreihe (Fisher Thermo Scientific) sowie 25 µl der Probe pro Well einer 96-Well-Platte (BD Bioscience) pipettiert. Nach Inkubation für 30 min bei 37 °C erfolgte die photometrische Bestimmung des Proteingehaltes bei einer Wellenlänge von 562 nm. 25 µg Proteinlysate wurden bei der Western Blot-Analyse pro Ansatz verwendet.

Lyse-Puffer:

1 % Triton-X 100 (Sigma-Aldrich), 150 mM NaCl, 50 mM Trishydroxymethylaminomethan-Hydrochlorid (C₄H₁₁NO₃-ClH; TRIS-HCl [Sigma-Aldrich]), 5 mM EDTA

Proteaseinhibitoren (alle Sigma-Aldrich):

4 mg/ml Aprotinin, 4 µg/ml Leupeptin, 4 µg/ml Pepstatin A, 1 mM Phenylmethansulfonylfluoride (PMSF)

Phosphataseinhibitoren (alle Sigma-Aldrich):

20 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM Na₄O₇P₂

2.4.2 Zellfraktionierung

Zur Separation der Proteine der einzelnen Zellkompartimente und anschließenden Nachweis bestimmter Proteine in einem Zellkompartiment erfolgte vor den weiteren Analyseverfahren die Zellfraktionierung. Dazu wurden 3×10^6 schockgefrorene Zellen unter Verwendung des ProteoExtractR Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem) nach Anleitung des Herstellers fraktioniert. Die Fraktionierung erfolgte nach dem Prinzip der differentiellen Zentrifugation.

2.4.3 Immunpräzipitation

Zur Detektion von p-Integrin $\alpha\beta 5$ wurde die Methode der Immunpräzipitation herangezogen, die es ermöglicht, ein Antigen mitsamt Interaktionspartner aus einem Zelllysat mittels AK zu präzipitieren und anschließend durch die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* [SDS-PAGE]) und Western Blot-Analyse nachzuweisen. Dazu wurden 50 µg des Zelllysates mit 50 µl nProtein A Sepharose™ 4 Fast Flow *beads* (GE Healthcare; Upsala, Schweden) und 500 µl Lyse-Puffer (s.o.) für 2 Std. bei 4 °C über Kopf rotiert, anschließend für 1 min bei 1000 g zentrifugiert und danach der Überstand mit 2 µg AK (s.u.) versetzt und für weitere 2 Std. unter Rotation bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde der AG-AK-Komplex mit 50 µl Protein A Sepharose *beads* (GE Healthcare) präzipitiert und das Lysat-*bead*-Gemisch erneut über Nacht bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Nach Zentrifugation des Protein-AK-AG-Komplexes für 1 min bei 1000 g wurden durch vier Waschschrte mit Lysepuffer unspezifische Proteine von den *bead*-Protein-Komplexen entfernt. Zu jedem Ansatz wurde danach 2x Lämmli-Puffer in einem Verhältnis von 1:1 zugefügt und die Proteine durch Denaturierung im Hitzeblock bei 95 °C für 5 min von den *beads* gelöst. Die *beads* wurden durch Zentrifugation separiert und der proteinhaltige Überstand zur weiteren Analyse verwendet.

Der Nachweis von $\alpha\beta 5$ Integrin erfolgte indirekt durch die Präzipitation des Integrin $\alpha\beta 5$ mittels dem anti-Integrin $\alpha\beta 5$ -AK (Chemicon) und anschließenden Nachweis der Tyrosinphosphorylierung durch den Phosphotyrosin-AK (phospho-Tyr[PY20]); Santa Cruz Biotechnology) im Rahmen der Immunodetektion.

2x Lämmli-Puffer:

0,125 M 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol ($C_4H_{11}NO_3$; Trizma[®]Base;Sigma-Aldrich), 4 % Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate* [SDS] [Sigma-Aldrich]), 20 % Glycerol (Sigma-Aldrich), 0,01 % Bromphenolblau (Serva, Heidelberg, Deutschland), 10% β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), Auffüllen mit Aqua dest.

2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde die von Lämmli 1970 (Laemmli 1970) etablierte Methode der SDS-PAGE angewendet. Das Prinzip beruht auf der Verwendung eines anionischen Detergens, dem SDS, welches sich nach Aufspaltung der Proteine in Abhängigkeit des Molekulargewichtes (MG) an einzelne Fragmente anlagert, die Eigenladung der Proteine überdeckt und folglich die Proteine im elektrischen Feld proportional zu ihrem MG wandern.

Die Polyacrylamidgele wurden in einer Mini-PROTEAN[®] *slab cell* Apparatur (BioRad; München, Deutschland) gegossen. Zunächst wurde je nach Größe der zu analysierenden Proteine ein 6-10 %iges Trenngel angesetzt, zwischen die Glasplatten gegossen, und mit Isopropanol (Merck) überschichtet. Nach Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen und das 4 %ige Sammelgel über das Trenngel pipettiert. Ein Teflonkamm, der die Probetaschen formt, wurde in das Sammelgel eingesetzt. Während der Polymerisation des Sammelgels wurden die Proben gleichen Proteingehaltes (je 25 μ g) mit 2x Lämmli-Puffer (s.o.) verdünnt, bei 100 °C für 5 min denaturiert, anschließend auf Eis abgekühlt und kurz anzentrifugiert. Der Kamm wurde aus den Probetaschen entfernt, die Pufferreservoirs mit Laufpuffer befüllt und die Proben zusammen mit einem entsprechenden Größenstandard (Precision Plus ProteinTM, Dual Color Standards; BioRad) auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bis zum Erreichen des Trenngels bei 100 Volt (V), dann bei 170 V bis zum Erreichen der Markerbanden der verwendeten Größenstandards.

6-10 %iges Trenngel:

5,4-4,1 ml steriles Aqua dest., 2-3,3 ml Gas-stabilisierte 30 % Acrylamid-,Bisacrylamid-Stammlösung (Rotiphorese[®]; [Roth; Karlsruhe, Deutschland]), 2,5 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl; pH 8,8), 100 μ l 10 % w/v SDS, 50 μ l 10 % Ammoniumpersulfat (APS; Sigma-Aldrich), 5 μ l N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED; Roth)

4 %iges Sammelgel:

6,1 ml steriles Aqua dest., gasstabilisierte 30 % Acrylamid-,Bisacrylamid-Stammlösung (Rotiphorese[®]), 2,5 ml Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl; pH 6,8), 100 µl 10 % w/v SDS, 50 µl 10 % APS, 10 µl TEMED

5x Laufpuffer:

123 mM Trizma[®]Base, 959 mM Glyzin (Roth), 1 mM SDS, Auffüllen mit Aqua dest.

2.4.5 Western Blot-Analyse

Vor der Immundetektion erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Trägermembran (Protran[®], Whatman; Dassel, Deutschland) nach dem Prinzip des *semidry-electroblottings*. Nach erfolgter Elektrophorese wurden das Gel, die Nitrozellulosemembran sowie das Whatman Filterpapier mit Transferpuffer äquilibriert. Das SDS-Gel wurde zwischen einem Filterpapier und einem Schwamm auf jeder Seite blasenfrei auf die Nitrozellulosemembran gelegt und unter Berücksichtigung der elektrischen Polung in die *semidry*-Apparatur installiert. Die Transferdauer betrug bei einer Spannung von 100 V 1 Std. Zur Kontrolle des Transfers wurden die transferierten Proteine reversibel mit Ponceau S-Färbung angefärbt. Dafür wurde die Membran für 5 min in Ponceau S (Sigma-Aldrich) gelegt und anschließend mit Wasser gewaschen. Bei gleichmäßiger Farbtintensität der Proteinbanden wurde von einer hohen Qualität der Transfers ausgegangen. Gegebenenfalls konnten Markerbanden markiert werden. Die Färbung wurde durch 2maliges Waschen mit Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)-gepuffertes Kochsalzlösung und Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween) (*Tris-buffered saline and Tween [TBS-T]*) entfernt.

1x Transferpuffer:

100 ml 10x Transferpuffer (250 mM TrisBase, 1,92 M Glycin, Aqua dest.)

200 ml Methanol (Merck), 700 ml Aqua dest.

Tris-gepufferte Kochsalzlösung + Tween; pH 7,5:

100 ml 10x TBS (1 M Tris-HCl, 1,54 M NaCl, Aqua dest. [Verhältnis 1:10 zum Endvolumen]),

1 ml Tween 20 (Verhältnis 1:1000 zum Endvolumen), 1 l Aqua dest.

2.4.6 Immundetektion

Zur Detektion der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine erfolgte der Einsatz monoklonaler oder polyklonaler AK. Zunächst wurde die Nitrozellulosemembran zur Blockierung unspezifischer

Bindungsstellen in 1 % BSA/TBS-T für 2 Std. bei RT inkubiert. Der erste AK wurde in geeigneter Verdünnung in TBS-T auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit dem Blockierungspuffer folgte die Inkubation des Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase* [HRP])-konjugierten, sekundären *donkey anti-rabbit* oder *sheep anti-mouse* IgG-AK (Verdünnung 1:3000/1:20000 in 1 % BSA/TBS-T) (beide Amersham Bioscience; London, UK) der sich gegen die konstante Region des ersten AK richtete, für 2 Std. bei RT. Die Detektion der HRP erfolgte unter Verwendung eines Chemilumineszenz-Substrates (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrat) nach Angaben des Herstellers (Fisher ThermoScientific) Der Blot wurde mit einem SuperRX Fuji-Film (SuperRX Fuji; Fuji Medical; Düsseldorf, Deutschland) in einer Entwicklungsmaschine (SRX-101A; Konica Minolta; München, Deutschland) belichtet.

2.4.7 Wiederholte Detektion von Immunblots (*Membranstripping*)

Um eine weitere Immundetektion durchzuführen zu können, wurden die zuvor gebundenen AK durch sog. *stripping* von der Membran entfernt. Die Blotmembran wird zunächst 4 min mit Aqua dest. gewaschen und dann abhängig von dem zuvor verwendeten AK für 4-8 min in Natriumhydroxid (NaOH) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff in Aqua dest. für 4 min kann die Detektion mit einem zweiten Erst-AK stattfinden.

Tabelle 3: verwendete Antikörper für die Western Blot-Analyse

Antikörper	Katalognummer	Hersteller	Verdünnung
<i>mouse anti-human</i> Integrin $\alpha\beta5$	(MAB1961Z)	Chemicon	1:1000
<i>rabbit anti-human</i> $\beta5$ Integrin	(H-96; sc-14010)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
<i>rabbit anti-human</i> phospho-STAT3	(Tyr705; #9131)	Cell Signaling Technologies	1:1000
<i>rabbit anti-human</i> STAT3	(79D7; #4904)	Cell Signaling Technologies	1:1000
<i>mouse anti-human</i> phospho-Tyrosin	(PY20; sc-508)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
<i>mouse anti-human</i> Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	(BT46-9995-55)	Biotrend Köln Deutschland	1:20000
<i>rabbit anti-human</i> Histon H1	(FL-219; sc-10806)	Santa Cruz Biotechnologie	1:1000

2.5 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction* [PCR])

2.5.1 RNA-Isolation aus EPCs

Die Expression von mRNA wurde durch die *reverse transkription*-PCR evaluiert. Die RNA-Isolation aus den EPCs erfolgte mit dem RNeasy® Protect Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip dieses Säulensystems beruht darauf, dass nach der Zelllyse die Proben mit Ethanol versetzt werden, was die Bindungskapazität der Nukleinsäuren erhöht, die sich dann selektiv an eine Silica-Gel-Membran anlagern, während die Probe von Kontaminationen wie Proteinen durch Zentrifugation gereinigt wird. Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde spektrophotometrisch bestimmt. Die Probe wurde 1:50 in RNA/DNA-Messpuffer (pH 9,9; 53,4 mg Dinatriumhydrogenphosphat [Na₂HPO₄] à 3 mM, mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt) verdünnt, die Extinktion bei 260 nm gemessen und die Konzentration unter Einbeziehung der Formel:

$$\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40 = \text{ng RNA}/\mu\text{l} \text{ (es gilt } 1A_{260} = 40 \mu\text{g/ml RNA)}$$

berechnet. Aus der Bestimmung der Ratio der OD_{260nm}/ OD_{280nm} ließ sich eine Aussage über eine mögliche Proteinkontamination der Probe machen, wobei von einer Verunreinigung bei einem Wert < 1,6 ausgegangen wurde.

2.5.2 Synthese von cDNA durch reverse Transkriptase (rT)

Die reverse Transkription wurde unter Verwendung des Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche; Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

Vor Beginn der reversen Transkription wurden die Reaktionsvolumina der einzelnen Proben auf 11,4 µl standardisiert. Pro Ansatz wurde 1 µg RNA benötigt, wobei das Volumen durch Zugabe von 2 µg *random hexamer* Primer (60 µM, bestehend aus verschiedenen Oligonukleotiden, mit verschiedenen Sequenzen, die die Bindung an einen 6 Basen-langen RNA-Abschnitt ermöglicht) und entsprechenden Volumina bis zum Erreichen des Reaktionsvolumens Diethylpyrocarbonat (DEPC; C₆H₁₀O₅)-Wasser (Sigma) aufgefüllt wurde. Die Proben wurden für 10 min bei 70 °C im ThermoCycler (BioRad) denaturiert, um restliche DNAsen zu zerstören und zufällig entstandene Wasserstoffbrücken zwischen 2 komplementären RNA-Abschnitten aufzubrechen. In der Zwischenzeit wurde der Master-Mix, bestehend aus 4 µl 5x *transcriptor high fidelity reverse transkriptase* Reaktions-Puffer und 1,1 µl der *transcriptor high fidelity reverse transkriptase* (10 U) pro Probe, hergestellt. Nach erfolgter Denaturierung wurde jedem Ansatz der Master-Mix auf Eis

zugeführt, so dass ein finales Volumen von 20 µl entstand. Die reverse Transkription erfolgte durch enzymatische Katalysierung durch die RNA-abhängigen Polymerasen im Thermo-Zykler bei 48 °C für 1 Std. und wurde durch die Denaturierung der rT bei 95 °C für 5 min beendet.

5x *Transcriptor high fidelity reverse transkriptase* Reaktions-Puffer:

8 mM MgCl₂, 0,5 µl RNase-Inhibitoren [20U], 2 µl Desoxynukleotidmix (dNTP; je 10 mM), 1 µl DTT (5 mM)

2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die aus der reversen Transkription gewonnene cDNA diente als Ausgangsprodukt in der PCR zur Amplifikation verschiedener Sequenzen. Die Wahl der Primer richtete sich nach dem Gen, dessen Expression untersucht werden sollte. Für jedes Gen wurde ein Vorwärts- und ein Rückwärtsprimer eingesetzt, die sich komplementär zu den 5'- bzw. 3'-Enden der DNA-Einzelstränge verhielten und somit den Beginn und das Ende der gesuchten Genregion definierten. 10 µl cDNA, welche auf Eis bereitgestellt war, wurde mit einem Master-Mix auf ein Endvolumen von 50 µl gebracht. Zur relativen Quantifizierung des Zielgens wurde β-Actin (Promega) als *housekeeping*-Gen verwendet. *Housekeeping*-Gene sind sog. „nicht-regulierte Gene“, die unabhängig vom Zelltyp, Zellzyklus und äußeren Einflüssen exprimiert werden. Die Amplifikation erfolgte exponentiell in mehreren aufeinander folgenden Zyklen (30-40, je nach untersuchtem Gen), jeweils bestehend aus drei Phasen, durchgeführt im ThermoCycler. In der ersten Phase, der Denaturierung bei 95 °C wurden die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA-Stränge aufgebrochen und ermöglichten so die Anlagerung der Primer an die komplementären Basensequenzen nach Temperatursenkung auf 60 °C (sog. *annealing*). Als letzter Teilschritt erfolgte die Extension, die Synthese der DNA durch die Taq-Polymerase bei 72 °C. Jede der Phasen dauerte 30 sek (abweichende PCR-Bedingungen siehe Tabelle).

Master-Mix:

10 µl 5x *green* GoTaq[®] Flexi Reaktions-Puffer, 2 µl MgCl₂ (25 mM), 0,25 µl, GoTaq[®] DNA Polymerase (5 U/µl), 1 µl dNTPs (10 mM) (alle Promega, Mannheim, Deutschland), 5 µl Vorwärtsprimer, 5 µl Rückwärtsprimer (s.u.) auffüllen mit Aqua dest.

Tabelle 4: verwendete Primer bei der RT-PCR-Analyse

Gen	Primer-Sequenz 5'-3'	Bedingungen	Zyklen
β -Actin	Vorwärtsprimer: CCC AAG GCC AAC CGC GAG AAG AT Rückwärtsprimer: GTC CCG GCC AGC CAG GTC CAG	95 °C – 30“ 60 °C – 30“ 72 °C – 30“	30
Integrin β 5 (2,4kb)	Vorwärtsprimer: GTG CTC CAA AGA GGA CTT CG Rückwärtsprimer: GAA GTT GCT GGT GAG CTT CC	95 °C – 30“ 60 °C – 30“ 72 °C – 30“	40
CXCL8/ IL-8 (Yao et al. 2008)	Vorwärtsprimer: CCA CCG GAA GGA ACC ATC TCA Rückwärtsprimer: TCC ACA ACC CTC TGC ACC C	95 °C – 30“ 60 °C – 45“ 72 °C – 1“	40
CCL2/ MCP-1 (Lee et al., 2003)	Vorwärtsprimer: CAG CCA GAT GCA ATC AAT GC Rückwärtsprimer: GTG GTC CAT GGA ATC CTG AA	95 °C – 45“ 60 °C – 45“ 72 °C – 45“	35

2.5.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Trennung der PCR-Produkte nach ihrer Größe wurden die Proben auf ein 1,5 % w/v Agarosegel (Invitrogen) in 1x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Laufpuffer, versetzt mit 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid, aufgetragen und in einem elektrischen Feld durch Anlage eines Stromgradienten separiert. Die Nukleotide sind durch ihre Phosphatgruppen negativ geladen und wandern im elektrischen Feld Richtung Katode, wobei die kurzen DNA-Moleküle schneller durch die engmaschige Matrix aus Agarosepolymeren wandern als große Moleküle. Nach Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gegeben und vollständig mit 1x TAE-Laufpuffer bedeckt. 20 μ l des PCR-Produktes wurden zusammen mit DNA-Leitern (*DNA molekular weight standards* Marker XIII/XIV; Promega) sowie TAE-Laufpuffer ohne PCR-Produkte als Negativkontrolle in die Geltaschen aufgetragen. Auf das Einbringen einer Indikatorfarbe konnte auf Grund der Verwendung des 5x *green* GoTaq[®] Flexi Reaktions-Puffer verzichtet werden. An das elektrische Feld wurde eine Spannung von 100 V angelegt, die Laufzeit betrug 30 min. Zur Quantifizierung der PCR-Produkte unter UV-Licht wurde der ChemiImager 4400, Version 5.1 (Alpha Innotech Corporation; San Leandro, CA, USA) verwendet. Dabei rief Ethidiumbromid, welches sich zwischen die DNA-Stränge interkalierte, ein Fluoreszenzsignal hervor, welches sich proportional zur mRNA-Konzentration verhält.

50x Tris-Acetat-EDTA-Laufpuffer (TAE-Puffer):

242 g Trizma[®]Base, 57,1 ml 100 % Essigsäure (C₂H₄O₂), 100 ml 0,5M EDTA, mit Aqua dest. auf 1l auffüllen (für 1x TAE-Puffer vor Gebrauch 1:50 verdünnen.)

2.6 Effekt der $\alpha\beta 5$ -Überexpression auf Prozesse der Angiogenese

2.6.1 Zell-Adhäsions-Assay

Die Adhäsion endothelialer Vorläuferzellen an die ECM ist ein wichtiger Bestandteil der Angiogenese. Um die Rolle der Integrin $\beta 5$ -Untereinheit bei der Adhäsion an den $\alpha\beta 5$ -spezifischen Ligand, das ECM-Protein VN, zu demonstrieren, wurde der Zell-Adhäsions-Assay durchgeführt. Vor Versuchsbeginn erfolgte die Beschichtung einer sterilen 24-Well-Zellkulturplatte mit $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ VN (Promega; Mannheim, Deutschland). Nach Inkubation für 1,5 Std. bei RT wurde jedes Well einmal mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit 1 ml 2 % BSA/PBS pro Well bei 37°C für 30 min geblockt und die Platte anschließend mit PBS gewaschen. Die EPCs wurden von der Zellkulturplatte geerntet, mit PBS gewaschen und bei 1400 rpm für 10 min bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frisch angesetzten Adhäsionsmedium resuspendiert und 6×10^4 Zellen in 500 μl Adhäsionsmedium in jedes Well überführt. Nach Inkubation für 30 min bei 37°C wurden nichtadhärente Zellen durch zwei Waschschrte mit PBS entfernt. Die Fixierung der adhärenen Zellen erfolgte mit 2 % PFA/PBS für 10 min. Nach drei weiteren Waschschrten mit PBS wurden die nun fixierten Zellen zur Darstellung der Zellkerne mit DAPI in einer Verdünnung von 1:100 in PBS (300 μl /Well) für 10 min im Dunkeln inkubiert und anschließend 2x mit PBS gewaschen. Die Anzahl der adhärenen Zellen wurde durch manuelles Zählen der DAPI-positiven Zellen in 5 randomisiertem Gesichtsfeldern pro Well unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt.

Adhäsionsmedium:

EBM (PromoCell), 1 mmol/l MgCl_2 , 1 mmol/l CaCl_2 , 1 mmol/l MnCl_2 , 0,05 % BSA

2.6.2 Transmigrations-Assay

Neben der Zelladhäsion spielt die Transmigration im angiogenetischen Prozess eine elementare Rolle. Um die Zellmigration in Richtung des Integrin $\alpha\beta 5$ -spezifischen Liganden VN zu untersuchen, wurde der modifizierte *Boyden-chamber*-Assay verwendet. Dabei handelt es sich um ein Transwell-Filtersystem, dessen Filtermembran einem Durchmesser von 12 mm und eine Porengröße von 8 μm aufweist. Die untere Seite der Porenmembran wurde mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ VN in PBS für 1 Std. bei 37°C beschichtet und anschließend mit PBS gewaschen. Die EPCs wurden von der Zellkulturplatte gelöst, mit PBS gewaschen und bei RT für 10 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in EPC-Migrationsmedium aufgenommen und durch Zugabe definierter Volumina

eine Zellzahl von 1×10^6 pro ml eingestellt. Die beschichteten Migrationskammern wurden je in ein mit 1 ml EPC-Migrationsmedium befülltes Well einer vorgewärmten 24-Well-Platte (Falcon) gesetzt. In das obere Kompartiment wurden 900 μ l EPC-Migrationsmedium sowie 100 μ l der EPC-Zellsuspension pipettiert, so dass jedes Well 1×10^5 Zellen beinhaltet. Nach 18 Std. Inkubation bei 37 °C wurden die Filter 2x mit PBS gewaschen und die obere Seite der Porenmembran mit einem Wattestäbchen gesäubert um die nicht migrierten Zellen zu entfernen. Die migrierten Zellen wurden für 10 min bei RT mit 2 % PFA/PBS fixiert. Nach zwei erneuten Waschschritten mit PBS erfolgte die Färbung der Zellen mit 1 ml Hämatoxylin pro Well (Sigma) mit anschließender Bläuung durch zweimalige Zugabe von 1 ml Leitungswasser pro Well und Inkubation für 5 min bei RT. Die Membranen der Migrationskammern wurden nach Trocknung an der Luft für 5 min vorsichtig mit einem sterilen Skalpell aus der Halterung gelöst und mit Xylol-Ersatz-Eindeckmedium (Shandon; Frankfurt am Main, Deutschland) auf einem Objektglas fixiert. Die manuelle Quantifizierung der Zellen erfolgte in 20facher Vergrößerung lichtmikroskopisch in 5 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern pro Filter und wird als absolute Zellzahl transmigrierter Zellen pro Feld angegeben.

EPC-Migrationsmedium:

EBM (PromoCell), 0,5 % FCS, 0,1 % BSA (Sigma-Aldrich; München, Deutschland), 100 μ g/ml Streptomycin (Gibco), 100 U/ml Penicillin (Gibco)

2.6.3 Zell-Proliferations-Assay

Um den Einfluss der ITGB5-Überexpression auf die Proliferation der EPCs zu untersuchen, wurde der CellTiter 96[®] A_{Queous} One Solution Cell Proliferation-Assay (Promega) verwendet. Das Prinzip dieses Assays basiert auf der Messung der mitochondrialen Aktivität, die sich proportional zu der Anzahl vitaler Zellen verhält. Das hier verwendete Reagenz 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) wird durch ein Elektrotransferreagenz (ETR) durch mitochondriale Aktivität zu seinem ultraviolett-absorbierenden Formazan reduziert, dessen Konzentration photometrisch bestimmt werden kann (Denizot und Lang 1986). Die Elektronen, die das ETR zur Reduktion des MTS zu seinem Formazan benötigt, werden von den Reduktionsäquivalenten Nicotinamidadenindinukleotid (NADH)/Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) der NADH/NADPH-Dehydrogenase bezogen, die in metabolisch aktiven Zellen vorkommt. An Tag 7 nach Aussaat der EPCs wurden die Zellen von der Platte nach dem oben beschriebenen Protokoll von der Platte gelöst, mit PBS gewaschen und nach Zentrifugation bei 1400 rpm für 10 min in EBM resuspendiert. Die Zellzahl wurde auf 2×10^4 /ml eingestellt, 100 μ l/Well der Zellsuspension (entspricht 2000 Zellen) auf eine 96-Well-Platte

überführt und für 24 Std. bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 20 µl Proliferationsreagenz/Well. Das Photometer wurde gegen EBM mit Proliferationsreagenz kalibriert und die Absorption photometrisch (Bio-Tek) nach 1, 2, 3 und 4 Std. bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen.

2.7 *In-vitro*-Angiogenese-Assays

2.7.1 Matrigel-Angiogenese-Assay

Die Adhäsion von EPCs an vorbestehendes Endothel ist ein wichtiger Bestandteil der Angiogenese. Im MatrigelTM-Angiogenese-Assay wurde *in vitro* die Adhäsionsfähigkeit von EPCs an durch HUVECs gebildete, endotheliale vaskuläre Strukturen untersucht. Das Versuchsprotokoll richtete sich nach dem von Tepper et al. 2002 veröffentlichten Versuchsprotokoll.

Zur Erstellung der Matrigel Matrix wurden auf Grund des raschen Aushärtens des Geles bei RT vorgekühlte, auf Eis gelagerte Pipettenspitzen und Eppendorfcups verwendet. Zunächst wurden die ECMatrixTM mit ECMatrix Diluent (beides Bestandteile des ECMatrixTM-Kit; Chemicon) im Verhältnis von 9:1 ohne Bildung von Luftblasen vorsichtig vermischt und je 50 µl der Matrigel Matrix in jedes Well der ebenfalls vorgekühlten 96-Well-Platte mit Flachboden (NunclonTM Surface; NUNC A/S) überführt. Pro Versuchsgruppe wurden 2 Well vorbereitet. Die Aushärtung der Matrix erfolgte bei 37 °C für 1 Std. im Zellkulturinkubator. In der Zwischenzeit wurden die EPCs wie beschrieben gelabelt, die EPCs und HUVECs von der Zellkulturplatte geerntet und im Medium auf eine Konzentration von 3×10^4 Zellen/ml bzw. $1,2 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Je 100 µl der EPC bzw. HUVEC-Suspension wurden auf die ausgehärtete Gelmatrix pipettiert, durch vorsichtiges Schwenken der 96-Well-Platte verteilt und bei 37 °C für 8 Std. inkubiert. Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes wurde unter Verwendung der AxioVision 3.1-Software (Carl Zeiss) in 10 randomisierten Feldern (5 pro Well) die Zahl der in das HUVEC-Netzwerk inkorporierten, CM-DiI-positive Zellen bestimmt. Die Länge des HUVEC-Netzwerkes wurde unter Verwendung der ImagePro Plus Software (Media Cybernetics; Bethesda, MD, USA) gemessen. Für jedes randomisierte Gesichtsfeld wurde der Quotient aus der absoluten Zahl der inkorporierten EPCs und der in mm gemessenen Länge des HUVEC-Netzwerkes bestimmt und als durchschnittliche Zellzahl pro mm HUVEC-Netzwerk angegeben.

2.7.2 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay

Die Durchführung des 3D-Sphäroid-Assays erfolgte in Anlehnung an das von Korff und Augustin 1998 veröffentlichte Protokoll.

CM-Dil-gelabelte EPCs und HUVECs wurden von der Zellkulturplatte nach dem oben beschriebenen Protokoll geerntet und 8×10^3 EPCs gemeinsam mit $3,2 \times 10^4$ HUVECs in ein mit 10 ml vorgewärmten EPC-Medium befüllten 15 ml-Falconröhrchen überführt und durch Zentrifugation bei 1300 rpm für 10 min gewaschen. Das Zellpellet wurde in 10 ml EPC-Medium, versetzt mit 20 % Methylzellulose-Stammlösung, welche das Absinken der Zellen auf den Boden der Zellkulturplatte während der Sphäroidbildung verhindern soll, resuspendiert. Die Methylzellulose-Stammlösung wurde zuvor unter sterilen Bedingungen durch Lösung von 6 g Methylzellulose (Sigma) in 500 ml M199-Medium (Gibco) hergestellt und bei 4 °C gelagert. 100 µl der Zellsuspension, entspricht 400 Zellen pro Sphäroid, wurden in jedes Well einer 96-Well Zellkulturplatten mit rundem Boden (NUNC) aufgetragen und für 24 Std. bei 37 °C zur Bildung der Sphäroide inkubiert.

An Tag 2 erfolgte die Überführung der Sphäroide in das Kollagengel. Zunächst wurde der Methylzellulose-Stammlösung 5 % FCS zugegeben, vorsichtig gemischt und bei 1400 rpm für 5 min abzentrifugiert. Zudem wurden die randständigen Wells einer 24-Well-Zellkulturplatte (Falcon) je mit 1 ml sterilem PBS befüllt und die Zellkulturplatte bei 37 °C vorgewärmt.

Zur Ernte der Sphäroide wurde die Pipettenspitze zur Vergrößerung des Lumens um 3 mm mit einem sterilen Skalpell gekürzt. Die Sphäroide wurden vorsichtig aus der 96-Well-Platte entnommen, in 15 ml-Falconröhrchen überführt und bei 1400 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet durch Entlangreiben der Falconröhrchen an einer unebenen Oberfläche vorsichtig gelöst und anschließend mit je 1 ml des 5 % FCS/Methylzellulose-Stammlösung-Gemisches bedeckt.

Die Vorbereitung des Kollagens erfolgte auf Eis, um eine vorzeitige Polymerisation des Kollagens zu verhindern. Das Kollagen wurde in einem Verhältnis von 1:1 mit 0,1 %-iger Essigsäure verdünnt und mit 10x M199-Medium (Sigma) in einer Menge von 10 % des Gesamtvolumens gemischt. Die Einstellung der pH-Wertes erfolgte durch tröpfchenweise Zugabe von 0,2 N Natriumhydroxid (Sigma-Aldrich), bis die Neutralisierung durch einen Farbumschlag des Indikators Phenolrot von gelb (sauer) nach rosa (neutral) sichtbar wurde. Unmittelbar nach Neutralisierung erfolgte die Zugabe von 1 ml der Kollagenlösung pro Falconröhrchen. Nach Durchmischung des Kollagens mit der Sphäroidsuspension durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurde je 1 ml des Gels in die

8 mittleren Wells der vorgewärmten 24-Well-Platte aufgetragen. Nach Inkubation bei 37 °C für 30 min und Polymerisation der Kollagens zu einem festen Gel wurden auf jedes Well 500 µl EBM aufgetragen und für 24 Std. bei 37 °C inkubiert. Mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden aus 10 randomisierten Sphäroiden pro Versuchsansatz die Aussprossung der HUVECs sowie die Anzahl der migrierten EPCs entlang der Aussprossung analysiert. Die Längen der HUVEC-Aussprossung wurde unter Verwendung der ImagePro Plus Software ermittelt.

2.7.3 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay unter Verwendung von CdM

An Tag 7 wurden HUVECs von der Zellkulturplatte geerntet und $3,2 \times 10^4$ Zellen in 20 % Methylzellulose-Stammlösung nach dem unter 2.5.2 beschriebenen Protokoll in jedes Well einer 96-Well-Platte zur Bildung von Sphäroiden überführt. Nach 24 Std. Inkubation wurden die Sphäroide geerntet und in Kollagen gebettet. Nach Polymerisation des Kollagens nach 30 min bei 37 °C wurden zu jedem Well 500 µl des CdM pipettiert und die Aussprossung von 10 randomisierten Sphäroiden pro Versuchsansatz nach weiteren 24 Std. Inkubation bei 37 °C mikroskopisch dokumentiert und mit der ImagePro Plus Software ausgewertet.

2.8 *In-vivo*-Mausmodell der Hinterlaufischämie

2.8.1 Induktion der Ischämie im Maushinterlauf

Zur Durchführung des *In-vivo*-Versuchs am Mausmodell der Hinterlaufischämie wurden acht bis zehn Wochen alte männliche, athymische Nacktmäuse der Firma Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) verwendet. Die Mäuse wurden in der zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Georg-August Universität Göttingen bzw. der Medizinischen Hochschule Hannover unter pathogenfreien Bedingungen gehalten. In der Einrichtung herrschte ein 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus, die Mäuse hatten freien Zugang zu Nagerfutter (Sniff; Soest, Deutschland) und Wasser. Die Tierhaltung sowie die Versuchsdurchführung war zuvor von der Tierforschungskommission der Georg-August Universität Göttingen genehmigt worden und folgte den nationalen und internationalen Richtlinien für die Haltung und Verwendung von Labortieren.

Die Anästhesie erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 25 % von 2 %-igem Xylazin-Hydrochlorid (cp-Pharma; Burgdorf, Deutschland) und 25 % von 4 %-igem Ketamin-Hydrochlorid (Pharmanovo; Hannover, Deutschland), gelöst in 0,9 %igem Natriumchlorid (NaCl). Nach Wirkungseintritt der Narkose wurde die Maus in Rückenlage auf ein Wärmekissen gelegt, die Hinterläufe in abduzierter Stellung fixiert. Die mediale Seite des rechten Maushinterlaufs wurde mit 70 %-iger Ethanollösung (Merck; Darmstadt, Deutschland) desinfiziert und der Schnitt

unmittelbar unterhalb des *Ligamentum inguinale* sowie ein weiterer ca. 4 mm proximal des Knies geführt. Durch dauerhafte Ligatur der rechten *Arteria (A.) femoralis* direkt distal des Ursprungs der tiefen Femoralarterie, sowie durch Ligatur des distalen Anteils der *A. saphena* mit 6-0 Seidenfäden (Ethicon, Johnson & Johnson GmbH; Norderstedt, Deutschland) wurde die einseitige Hinterlaufischämie induziert. Anschließend wurde die Wunde mit 6-0 Nylonfäden (Ethicon) vernäht und die Maus bis zum Erwachen aus der Narkose auf einem Wärmekissen belassen und engmaschig beobachtet.

2.8.2 Vorbereitung und Injektion von EPCs

Einen Tag nach Induktion der Hinterlaufischämie wurden die 7 Tage kultivierten, mit pCMV-ITGB5- oder pCMV6-XL5-Vektor-transfizierten EPCs nach dem oben beschriebenen Protokoll von der Zellkulturplatte gelöst und nach einem Waschschrift auf eine Zellzahl von 1×10^6 eingestellt. Für die Analyse der Mobilisation und Akkumulation der injizierten EPCs im ischämischen Gewebe des Maushinterlaufs wurden pDsRed-Monomer-N1- bzw. pITGB5-DsRed-transfizierte EPCs in gleicher Zellzahl injiziert. Die Zellen wurden in 200 μ l Adhäsionspuffer (s.o.) resuspendiert, die Mäuse narkotisiert und die EPCs intrakardial injiziert.

2.8.3 Messung des Blutflusses mittels Laserdopplersonographie

Zur Quantifizierung der Gewebepfusion im Bereich der distalen Hinterläufe der Maus wurde die Methode der Laser-Dopplersonographie angewandt. Die Messungen wurden unmittelbar prä- und post-operativ sowie an Tag 3, 7 und 14 nach Induktion der Hinterlaufischämie durchgeführt. Sie erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um PD Dr. Florian Limbourg an der Medizinischen Hochschule Hannover und wurden übereinstimmend mit dem Protokoll von Limbourg (Limbourg et al. 2007) durchgeführt. Während der Messung wurden die Mäuse in Narkose gelegt und auf einer Wärmeplatte fixiert. Der Blutfluss in den Hinterläufen der Maus wurde mittels Laser-Dopplersonographie (PIM II; Perimed, Schweden) analysiert und als Verhältnis zwischen der Perfusion im ligierten zu der im nicht-ligierten Hinterlauf berechnet.

2.8.4 *In-vivo*-Fixation des *Musculus (M.) gastrocnemius*

Zur Durchführung immunhistologischer Analysen am Muskelgewebe distal der Ligatur der Femoralarterie wurden die *Musculi (Mm.) gastrocnemii* beider Hinterläufe 10 Tage nach Induktion der Hinterlaufischämie nach dem Protokoll von Brazelton und Blau (2005) *in vivo* durch Perfusion fixiert.

Die Mäuse wurden narkotisiert und der Thoraxraum eröffnet. Es wurde eine kleine Inzision im

Bereich des rechten Atriums gesetzt, um den venösen Rückstrom zum Herzen zu unterbrechen und eine 20-Gauge Nadel in den linken Ventrikel eingeführt. Zunächst wurden 10-20 ml eiskaltes PBS durch den Blutkreislauf der Maus gespült, bis klare Perfusionslösung das rechte Atrium verließ. Anschließend wurden 2,5 ml/min eiskaltes PBS, welches mit 1,5 % PFA und 0,1 % Glutaraldehyd (GA; Sigma) angereichert war, infundiert. Der *M. gastrocnemius* wurde vorsichtig mit einem Skalpell exzidiert und in ein mit 3 ml PBS, versetzt mit 1,5 % PFA, 0,1 % GA und 20 % Saccharose, befülltem 15 ml-Röhrchen überführt. Es folgte die Inkubation des Muskelgewebes für 5 Std. bei 4 °C, um das Absetzen von Wasser in dem Gewebe zu ermöglichen.

2.8.5 Präparation von Gefrierschnitten aus Muskelgewebe und Immunhistochemie

Zur Herstellung von Gefrierschnitten aus dem *M. gastrocnemius* wurde das fixierte Muskelgewebe zunächst in Tissue-Tek (Sakura Finetek; Zoeterwoude, Niederlande) und anschließend in geeistes Methylbutan getaucht, so dass das Muskelgewebe vollständig bedeckt war. Das gefrorene Muskelgewebe wurde in Tissue-Tek gebettet und bei -20 °C aufbewahrt. Die Anfertigung von Gefrierschnitten mit einer Dicke von 5 µm erfolgte bei -20 °C unter Verwendung des Cryostats Jung Frigocut 2800 N (Leica; Wetzlar, Deutschland). Die Schnitte wurden auf Objektträger (Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA) gebracht, für 24 Std. getrocknet und anschließend für 10 min in -20° C kaltem Aceton nachfixiert, vor ihrer weiteren immunhistochemischen Bearbeitung. Zur Visualisierung kapillarer Endothelzellen im Gewebe des *M. gastrocnemius* wurde das Gewebe aufgetaut, mit PBS gewässert und mit Aceton für 10 min bei -20 °C fixiert. Nach erneutem Wässern wurde das Gewebe mit 0,05 % Triton X-100 permeabilisiert und mit einem *rat* anti-*mouse* AK gegen PECAM-1 (sc-18916; Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1:50 in AK-Diluent (Dako) für 60 min bei RT inkubiert. Als sekundärer AK wurden ein 555-fluoreszenzmarkierter *goat* anti-*rat* AK (sc-362273; Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt (Inkubation 60 min bei RT). Zur Detektion von MCP-1 wurde das Gewebe bei -20 °C für 10 min mit Aceton fixiert, bei RT getrocknet, mit PBS 3x für 5 min gewässert und anschließend mit 10 % BSA/PBS geblockt. Der erste, polyklonale *goat* anti-*mouse* MCP-1-AK (sc-1784; Santa Cruz Biotechnology) wurde in einer Verdünnung von 1:50 in PBS bei 4 °C über Nacht inkubiert und durch die Inkubation des sekundären 488-markierten *donkey* anti-*goat* AK (sc-362255; Santa Cruz Biotechnology) für 1 Std bei RT visualisiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (Verdünnung 1:200, Inkubation 30 min bei RT im Dunklen) gegengefärbt und die Schnitte mit VectaShield (Shandon Histomount[®], Thermo Fisher Scientific) eingedeckt.

2.8.6 Quantifizierung der Kapillardichte

Die Analyse des Muskelgewebes erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop in 200facher Vergrößerung in 7 randomisierten Gesichtsfeldern pro Muskelquerschnitt. Die CD31-/DAPI-immunpositiven Endothelzellen wurden manuell gezählt und pro mm² angegeben. Bei der Quantifizierung von Arteriolen wurden CD31-/DAPI-positive Strukturen, die ein Lumen umgeben, in die Analyse eingeschlossen. Bei Verwendung des fluoreszenzkonjugierten Vektors bzw. Plasmids wurde die Anzahl der rot-fluoreszierenden, DsRed-positiven Zellen nach Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI pro mm² Muskelgewebe bestimmt.

2.9 Zytokin-Antikörper Array

2.9.1 Zytokindetektion mittels des *Human cytokin antibody array-5*

Zum Nachweis der Präsenz verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren im CdM wurde der *Human cytokin antibody array-5* (RayBiotech über Hoelzel Diagnostika; Köln, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Das Screening auf humane Zytokine mittels des Zytokin-Arrays basiert auf dem Prinzip des *sandwich-enzym-linked immunosorbent-Assay (ELISA)*. Der Nachweis verschiedener AG erfolgt durch AK, die an verschiedene Epitope der AG binden. Die ersten *capture* AK gegen verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren sind an die Array-Membran gebunden. Nach Blockierung der Membranen erfolgt die Inkubation des CdM und somit die Bindung der sich im Medium befindenden AG an die entsprechenden *capture* AK. Nach einem Waschschrift, bei dem unspezifische Proteine entfernt werden, wird ein Gemisch von Biotin-konjugierten AK, die an ein anderes Epitop der AG binden, mit den Arrays inkubiert. Durch einen weiteren Waschschrift werden überschüssige Detektions-AK entfernt und zur Visualisierung des AK-AG-AK-Komplexes HRP-konjugiertes Streptavidin zugeführt. Streptavidin bindet mit hoher Affinität an das Biotin des 2. AK. Durch Zugabe zweier Detektionspuffer im Verhältnis von 1:1 wird von HRP eine Chemilumineszenzreaktion katalysiert. Die Array-Membranen wurden mit einem X-Ray-Film (Kodak X-Omat AR Film; Eastman Kodak Company; Rochester, NY, USA) exponiert und die Signale in der Entwicklungsmaschine detektiert.

2.9.2 Quantitative Bestimmung der Zytokinkonzentration mittels ELISA

Die quantitative Bestimmung der Konzentration von IL-8 und MCP-1 in CdM wurde durch die Verwendung von ELISA-Assay Kits (KHC0082 für IL-8, KHC1011 für MCP-1, beide Invitrogen) nach Angaben des Herstellers ermittelt. Dabei wurden neben dem CdM mit unbekannter AG-Konzentration die gleichen Antigene einer Standardreihe mit bekannter Konzentration eingesetzt.

Nach erfolgter Inkubation der Proben und Standards mit dem sich im Mikrotitergefäß befindenden *capture* AK und anschließendem Nachweis des AK-AG-Komplexes mittels sekundärem, enzymgebundenen AK im zweiten Inkubationsschritt werden die gebundenen sekundären AK durch eine Farbreaktion der Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung, die durch das gebundene Enzym katalysiert wird, dargestellt. Der Farbumschlag ist proportional zu IL-8- bzw. MCP-1-Konzentration. Die Absorptionsmessung erfolgte im ELISA-Reader (SLT Labinstrumente; Achterwehr, Deutschland) bei 450 nm. Die Werte der Proben wurden mit den Kalibrationskurven der Standardreihen verglichen, um die absolute Konzentration im C_{dM} zu bestimmen.

2.10 Statistische Analysen

Alle Ergebnisse werden als Mittelwert (Höhe der Balken) \pm Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean* [SEM]; T-Balken in den Diagrammen) angegeben. Die statistischen Unterschiede wurden unter Anwendung des unverpaarten *Student's t-test* ermittelt. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet. Die Anzahl der unabhängig durchgeführten und analysierten Experimente sind als $n = x$ im Text angegeben. Die Anzahl der Symbole über den Balken geben den Grad der Signifikanz an, wobei ein Zeichen (z.B. *) $p < 0,05$, zwei Zeichen (z.B. **) $p < 0,01$ und drei Zeichen (z.B. ***) $p < 0,001$ symbolisieren. Für die statistischen Analysen wurde die GraphPad Prism 4.01 Software (GraphPad Software Inc; San Diego, CA, USA) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der Effizienz nach Transfektion mit humaner *full-length* cDNA der Integrin β 5-Kette

3.1.1 Vermehrte Genexpression der Integrin β 5-Kette nach ITGB5-Transfektion

EPCs wurden aus der mononukleären Zellfraktion des peripheren Blutes isoliert und nach 4 Tagen *In-vitro*-Kultivierung mit humaner *full-length* cDNA der Integrin β 5-Kette transfiziert. Zum Nachweis der Transfektionseffizienz wurde an Tag 7 die Genexpression der Integrin β 5-Kette mittels RT-PCR und Western Blot analysiert. Wie in **Abbildung 1A und 1B** gezeigt, ließ sich bei ITGB5-transfizierten eine signifikante Zunahme der mRNA-Expression ($134,6 \pm 13,3$ % bezogen auf die Kontroll-EPC) nachweisen, die auf eine vermehrte Transkription des Genabschnittes, der für die Integrin β 5-Kette kodiert, hinweist. Zur Evaluation der Proteinexpression der Integrin β 5-Kette wurden Proteine aus den Zelllysaten beider Versuchsgruppen gewonnen und zur Quantifizierung die Western Blot-Analyse durchgeführt. Es ließ sich eine signifikant erhöhte Proteinexpression der Integrin β 5-Untereinheit bei ITGB5-transfizierten EPCs ($137,9 \pm 9,8$ %) (**Abbildung 2A und 2B**) feststellen, was auf eine erhöhte Translation der mRNA in eine Aminosäuresequenz zur Synthese eines Proteins hindeutet. Somit ließ sich anhand der erhobenen Daten eine vermehrte ITGB5-Expression auf mRNA- und auf Proteinebene nachweisen.

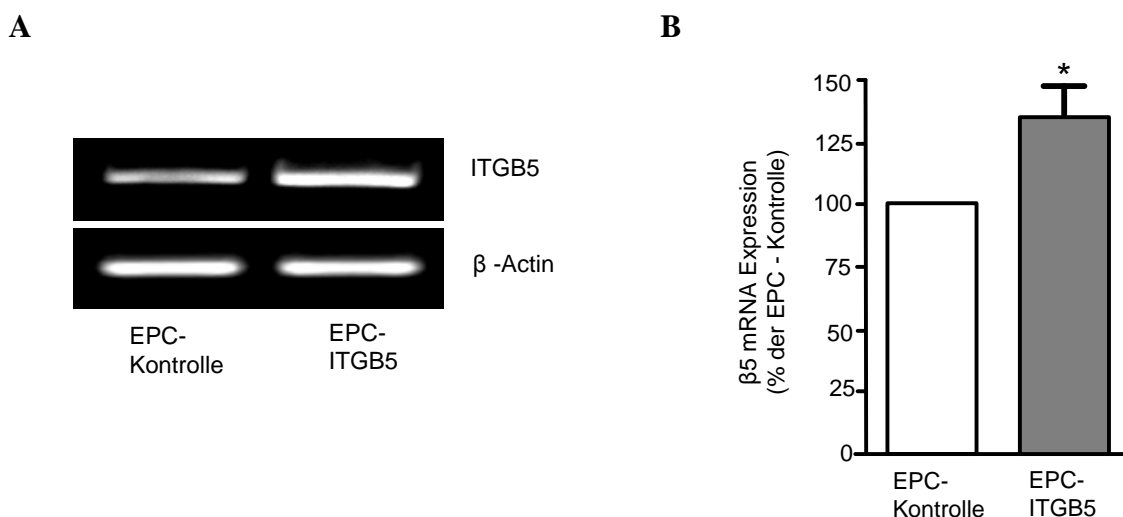


Abb. 1: Effizienz der ITGB5-Transfektion in der RT-PCR-Analyse. A) Repräsentative RT-PCR-Analyse zum Nachweis der Integrin β 5-Kette nach ITGB5-Transfektion. Der Abgleich erfolgte mit dem *housekeeping*-Gen β -Actin. B) Quantitative Auswertung der densitometrischen Messungen von n=5 unabhängigen Experimenten angegeben in % der EPC-Kontrolle. *p<0,05.

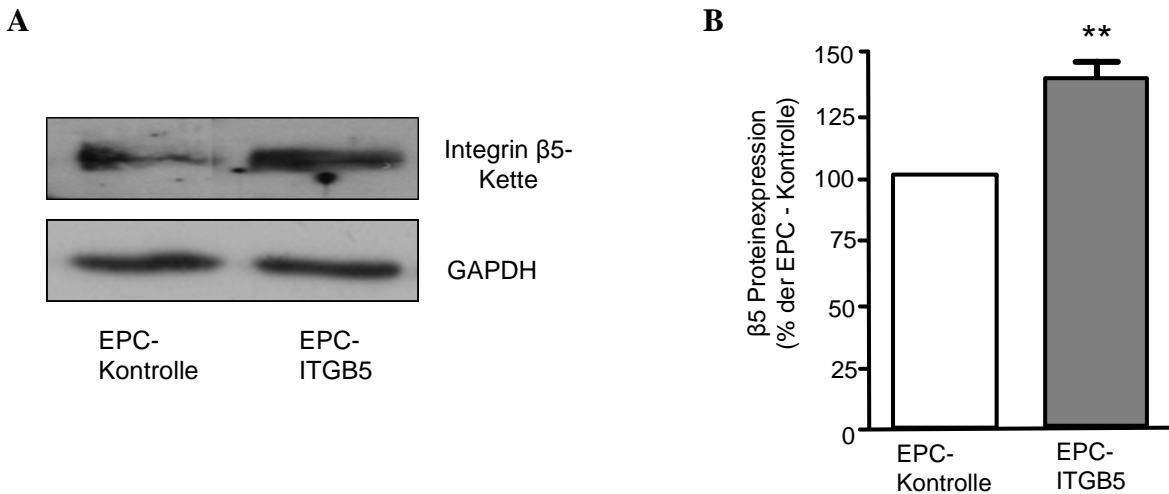


Abb. 2: Effizienz der ITGB5-Transfektion in der Western Blot-Analyse. **A)** In der Western Blot-Analyse zeigte sich, dass die Transfektion von EPCs mit humaner *full-length* cDNA der Integrin β5-Kette zu einer erhöhten Proteinexpression des Integrins β5 führt. **B)** Quantitative Analyse von n=4 Experimenten. Die Ergebnisse werden in % Anstieg im Vergleich zur EPC-Kontrolle angegeben. **p<0,01.

3.1.2 TGB5-transfizierte EPCs weisen eine gesteigerte Oberflächenexpression des αβ5-Integrins auf

Nachdem eine Überexpression der Integrin β5-Kette bestätigt werden konnte, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt, um zu verifizieren, ob dies mit einer vermehrten Oberflächenexpression des Integrin αβ5-Heterodimers einhergeht. Durchflusszytometrisch konnte eine signifikante Erhöhung der αβ5-Oberflächenexpression (149,2±12,0% der EPC-Kontrolle) (**Abbildung 3A und B**) gezeigt werden. Wie in **Abbildung 4A** dargestellt und in **Abbildung 4B** zusammengefasst, war die Oberflächenexpression der Integrin αv-Kette, der einzige mögliche Bindungspartner der Integrin β5-Kette zur Bildung eines Integrinheterodimers, ebenfalls signifikant erhöht (379,7±150,5 % der EPC-Kontrolle). Zudem zeigte sich eine Steigerung der Oberflächenexpression weiterer αv-Bindungspartner wie des Integrins β1 (207,9±40,9% der EPC-Kontrolle) und des Integrins αβ3 (164,2±54,8 % der EPC-Kontrolle). Die Expression der Integrin β2-Kette (89,4±6,2%), die kein Bindungspartner von der αv-Kette darstellt, blieb unverändert.

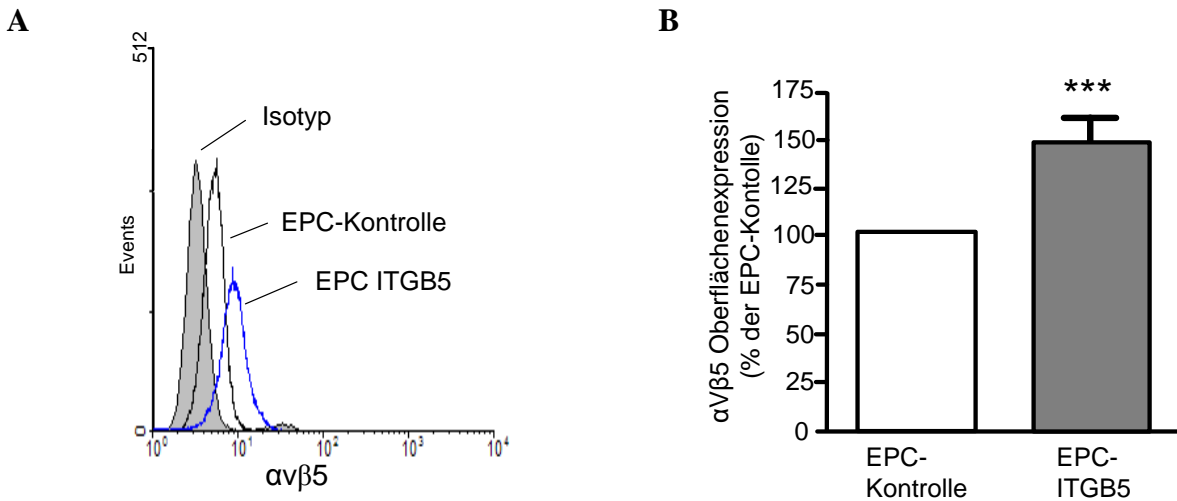


Abb. 3: FACS-Analyse zum Nachweis der Integrin $\alpha\beta 5$ -Überexpression nach ITGB5-Transfektion.
 A) Repräsentatives Histogramm der durchflusszytometrischen Bestimmung der $\alpha\beta 5$ -Oberflächenexpression.
 B) Quantitiven Zusammenfassung der Daten von n=15-19 unabhängigen Experimenten. ***p< 0,001.

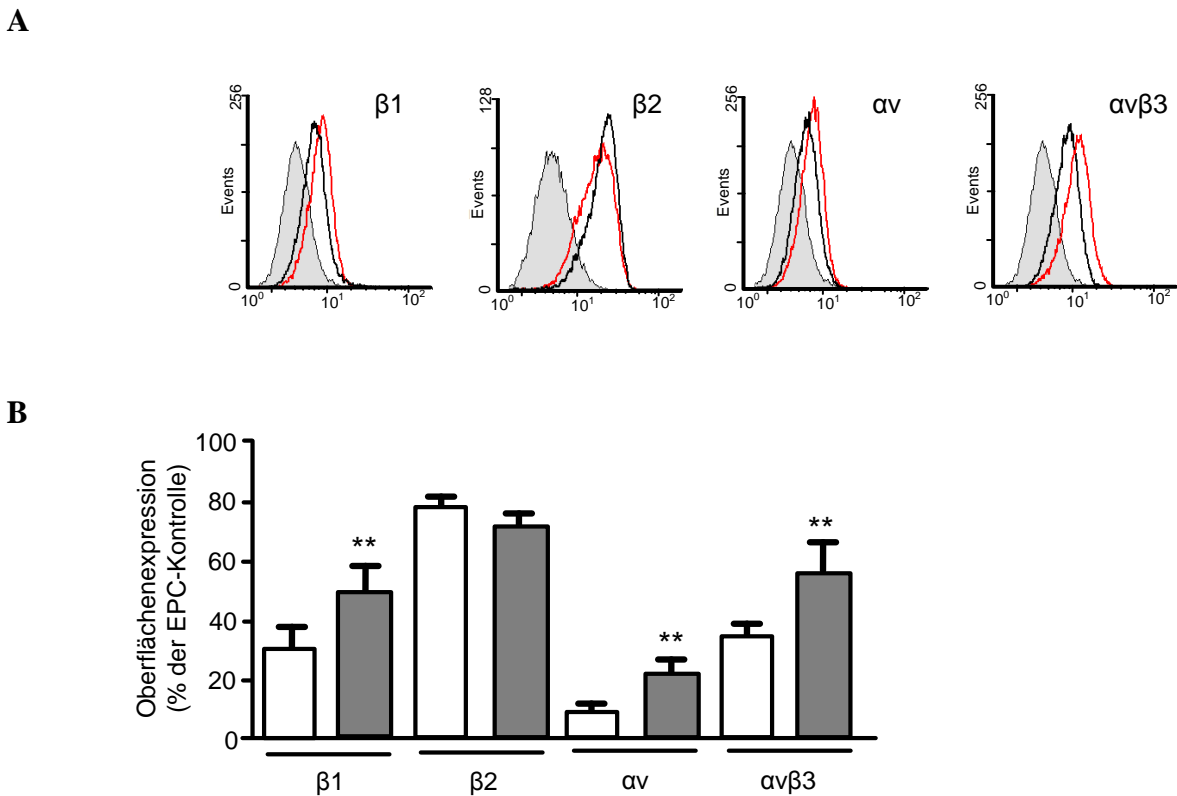


Abb. 4: Effekte der ITGB5-Transfektion auf die Oberflächenexpression verschiedener Integrine in der FACS-Analyse. A) Repräsentative Histogramme der FACS-Analyse zur Detektion der Oberflächenexpression des Integrins $\alpha\beta 3$ sowie von möglichen Bindungspartnern der Integrin $\beta 5$ - bzw. der $\alpha\beta$ -Kette. Vergleich zwischen Vektor- und ITGB5-transfizierten EPCs; graue Kurve: Isotypkontrolle, schwarze Kurve: Vektor-transfizierte EPCs, rote Kurve: ITGB5-transfizierte EPCs B) Quantitative Analyse von n=9-11 unabhängigen Experimenten, weißer Balken: Vektor-transfizierte EPCs, grauer Balken: ITGB5-transfizierte EPCs. **p<0,01.

3.1.3 Die ITGB5-Transfektion führte zu einer vermehrten Integrin $\alpha\beta 5$ -Aktivierung

Die Funktion von Integrinen wird über die Autophosphorylierung von Tyrosinresten der zytoplasmatischen Domäne reguliert, die die Affinität und Avidität der Ligandenbindung des Integrins beeinflussen und Ausgangspunkt für wichtige Signaltransduktionskaskaden im Rahmen der Kommunikation zwischen dem Intrazellularraum und der ECM ist (Blystone et al. 1997; Datta et al. 2002; Mahabeleshwar et al. 2006). Um zu untersuchen, ob es durch die Transfektion von EPCs mit humaner *full-length* cDNA der Integrin $\beta 5$ -Kette zu einer vermehrten Aktivierung des $\alpha\beta 5$ Integrins als Grundvoraussetzung zur Beeinflussung des angiogenetischen Prozesses kommt, wurde die Methode der Western Blot-Analyse herangezogen. Wie in **Abbildung 5A** dargestellt und in **Abbildung 5B** quantifiziert, konnten wir eine signifikante Erhöhung der $\alpha\beta 5$ Integrin-Tyrosinphosphorylierung in ITGB5-transfizierten EPCs im Vergleich zu Vektor-transfizierten EPCs nachweisen ($144,5 \pm 8,6\%$, wobei die Vektor-transfizierten EPCs als 100% definiert wurden). Zum Nachweis der Effizienz des verwendeten $\alpha\beta 5$ -neutralisierenden AK konnten wir in der Western Blot-Analyse eine signifikante Reduktion der Tyrosinphosphorylierung nach Inkubation mit anti- $\alpha\beta 5$ nachweisen (Reduktion der Expression auf $98,6 \pm 9,5\%$ nach Präinkubation mit neutralisierenden anti- $\alpha\beta 5$ Integrin-AK) (**Abbildung 5A und B**).

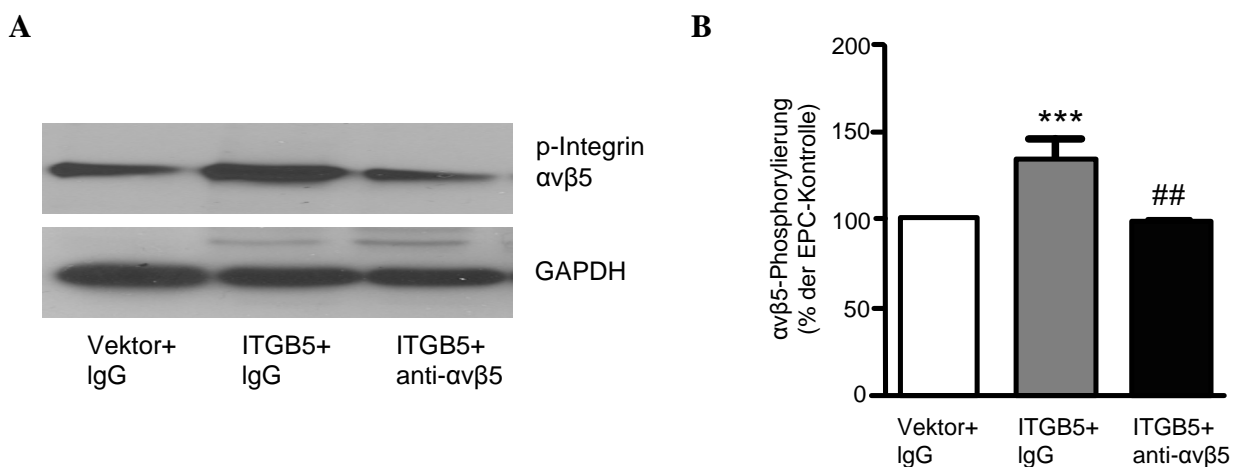


Abb. 5: Nachweis der gesteigerten Integrin $\alpha\beta 5$ -Phosphorylierung nach ITGB5-Transfektion und Effizienz der Hemmung durch $\alpha\beta 5$ -neutralisierende AK. A) Mittels Immunpräzipitation (IP) des $\alpha\beta 5$ Integrins mit anschließender Immundetektion der Tyrosinphosphorylierung (PY20) im Western Blot konnte gezeigt werden, dass die ITGB5-Transfektion zu einer vermehrten Tyrosinphosphorylierung des Integrins $\alpha\beta 5$ in EPCs führt. Durch die Verwendung eines neutralisierenden $\alpha\beta 5$ -AK konnte eine signifikante Reduktion der Tyrosinphosphorylierung erzielt werden. B) Quantitative Zusammenfassung von n=6 unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse sind als %-Anstieg im Vergleich zur Vektor-transfizierten Kontrollgruppe dargestellt. * vs. Vektor-transfizierte EPCs, # vs. ITGB5-transfizierte EPCs. ***p<0,001 und ##p<0,01.

3.2 Charakterisierung der EPCs nach ITGB5-Transfektion

3.2.1 Morphologie der EPCs und intrazelluläre Lokalisation von Integrin $\beta 5$

2 Tage nach der Transfektion zeigte sich sowohl bei den Kontroll-, als auch den ITGB5-transfizierten EPCs die für endotheliale Progenitorzellen typische spindelförmige Morphologie, wobei die ITGB5-transfizierte Zelle, wie in **Abbildung 6A-F** zu sehen, im Vergleich größer und länglicher imponierten. **Abbildungen 7A und B** belegen, dass die Zelloberfläche ($640,5 \pm 20,2 \mu\text{m}^2$ vs. $470,8 \pm 27,8 \mu\text{m}^2$) ebenso wie die Zelllänge ($60,9 \pm 3,3 \mu\text{m}$ vs. $46,2 \pm 3,2$) signifikant vergrößert waren. Für Lokalisationsstudien des Integrins $\beta 5$ wurden die EPCs mit einem pDsRed-Kontrollvektor oder einem ITGB5-DsRed-Plasmid transfiziert und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die ITGB5-DsRed-transfizierten Zellen wiesen eine primär vesikuläre, randständige Fluoreszenz auf, so dass von einer primär Zellmembran-assoziierten Lokalisation der Integrin $\beta 5$ -Kette auszugehen ist, wohingegen die Vektor-transfizierten EPCs eine diffuse Fluoreszenz im Zytoplasma zeigten.

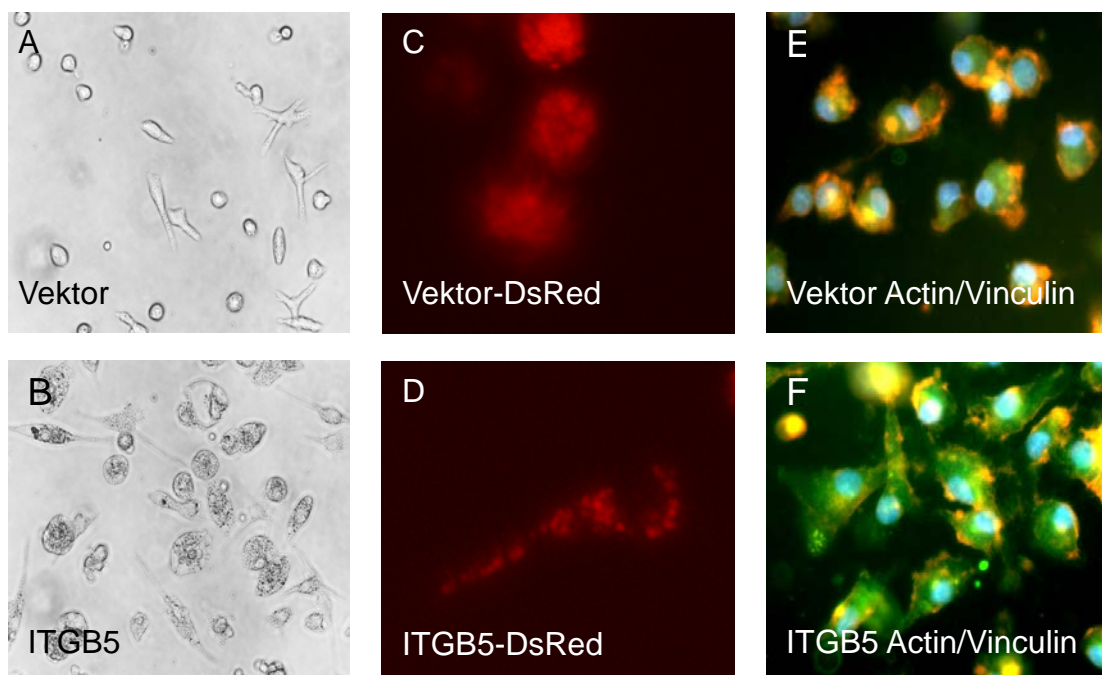


Abb 6: Vergleichende Analyse der EPC-Morphologie. A) und B) Lichtmikroskopische Darstellung transfizierter EPCs an Tag 7 der *In-vitro*-Kultivierung, 100fache Vergrößerung. C) und D) Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Darstellung DsRed-Monomer-N1-transfizierter EPCs (C) vs. ITGB5-DsRed-transfizierter EPCs (D), 400fache Vergrößerung. E) und F) Immunfluoreszenzfärbung der Zytoskelettproteine F-Actin (rot) und Vinculin (grün) sowie der Zellkerne mit DAPI (blau), 200fache Vergrößerung.

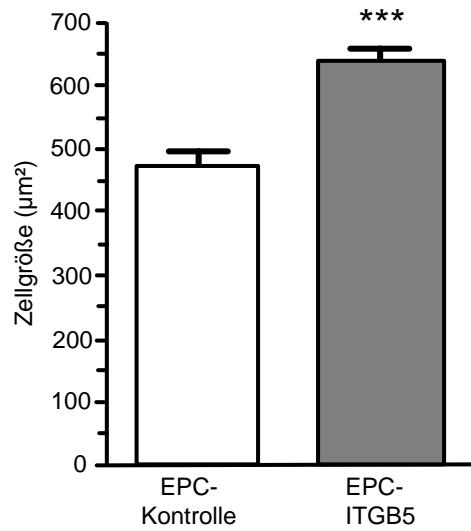
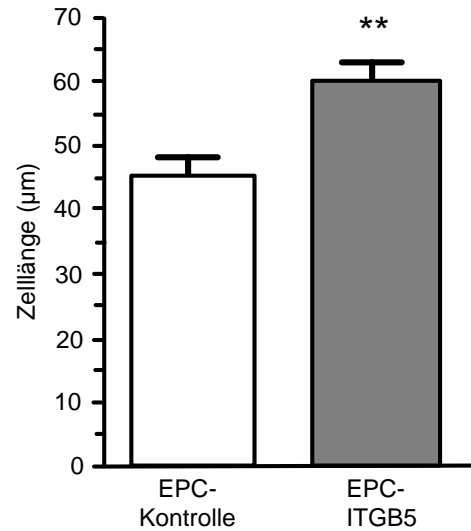
A**B**

Abb. 7: Quantifizierung der Zellgröße und -länge im Vergleich zwischen Vektor- und ITGB5-transfizierten EPCs. A) Quantifizierung der Zellgröße B) Quantifizierung der Zelllänge; n=10-16 unabhängige Experimente.

*** $p < 0,001$ und ** $p < 0,01$.

3.2.2 Detektion des Oberflächenmarkerprofils zum Nachweis des endothelialen Charakters

Zum Nachweis, dass der endotheliale Charakter der EPCs auch nach der ITGB5-Transfektion erhalten blieb, erfolgte eine fluoreszenzbasierte Detektion verschiedener etablierter Endothelzellmarker und endothelialer Proteine. Die Zellen wurden mit FITC-markiertem Lectin angefärbt, das durch seine spezifische Bindung an ein Oberflächenglykoprotein auf humanen endothelialen Zellen zum Nachweis des endothelialen Charakters herangezogen werden kann (Hormia et al., 1983). Zellen beider Versuchsgruppen zeigten sich positiv für die Bindung von Lectin. Zudem konnte sowohl bei den Vektor-transfizierten als auch bei den ITGB5-transfizierten adhären Zellen eine Aufnahme von Dil-markiertem acLDL nachgewiesen werden, welches über einen endothelzellspezifischen Scavenger Rezeptor aufgenommen wird (Voyta et al. 1984) (**Abbildung 8**). Dreifach positive Zellen für die Bindung von Lectin, die Aufnahme von acLDL sowie die Anfärbung des Zellkerns mit DAPI wurden als *early-outgrowth* EPCs identifiziert (Vasa et al., 2001, Hirschi et al., 2008; Schroeter et al., 2008). In einem zweiten Ansatz konnten mittels Immunfluoreszenzfärbung der endotheliale Oberflächenmarker CD31 (**Abbildung 8**) und die Anwesenheit des vWF verifiziert werden (**Abbildung 8**).

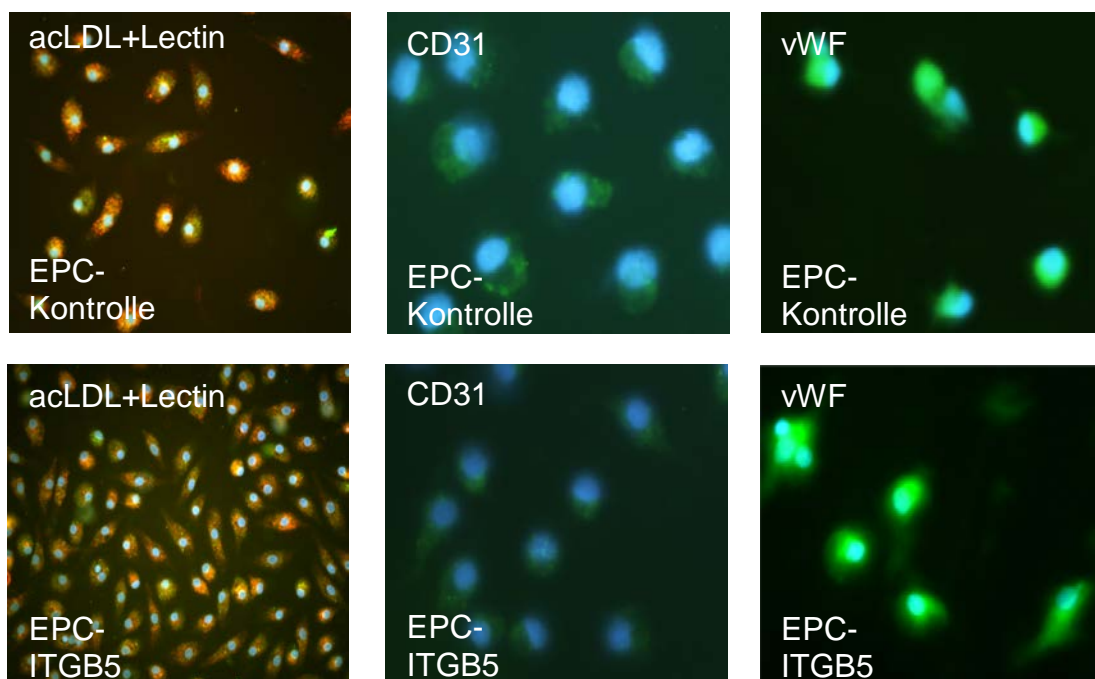


Abb. 8: Immunfluoreszenzanalyse zur Darstellung des endothelialen Charakters. Immunfluoreszenzfärbungen konnten sowohl bei den Vektor-transfizierten, als auch bei den ITGB5-transfizierten EPCs die Aufnahme von Dil-labeled acLDL (rot), die Bindung von Lectin (grün), und die Endothelzellmarker CD31 (grün) und vWF (grün) nachweisen. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. 200fache Vergrößerung bei acLDL/Lectin, 400fache Vergrößerung bei CD31 und vWF.

Ergänzend wurden durchflusszytometrisch unterschiedliche Oberflächenmarker in Vektor-transfizierten EPCs mit denen in ITGB5-transfizierten EPCs verglichen. Wie in **Abbildung 9A und B** dargestellt zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der endothelialen Oberflächenmarker CD31 ($75,1 \pm 12,5\%$, $p=0,75$), vWF ($87,8 \pm 30,1\%$, $p=0,75$) oder VEGFR-2 ($84,5 \pm 13,8\%$, $p=0,7$).

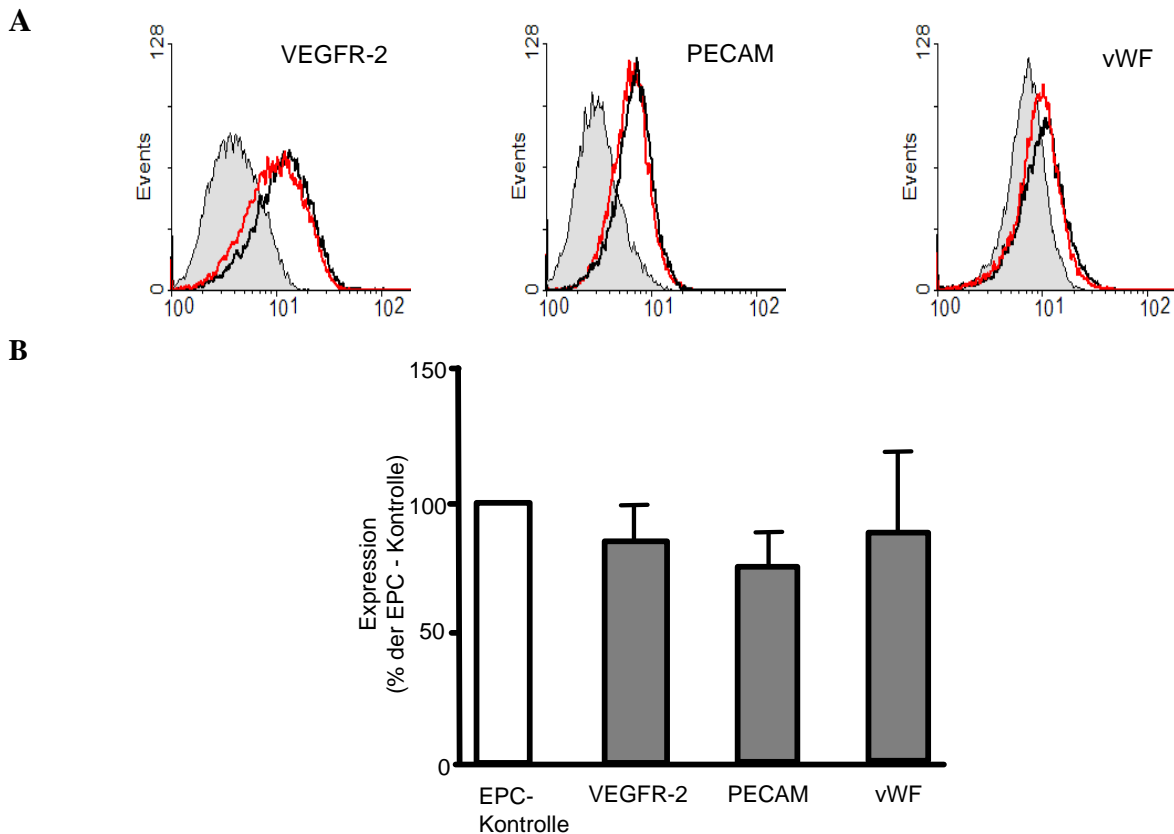


Abb. 9: Durchflusszytometrischer Nachweis der Oberflächenexpression etablierter Endothelzellmarker.

A) Repräsentative Histogramme der durchflusszytometrischen Analysen. Die Isotypkontrolle ist durch die graue Kurve dargestellt. Es zeigt sich keine signifikante Änderung des Oberflächenmarkerprofils nach ITGB5-Transfektion (rote Kurve) im Vergleich zu Transfektion mit Kontroll-Vektor (schwarze Kurve). **B)** Quantitative Analyse des Vergleichs des Oberflächenmarkerprofils von Vektor-transfizierten EPCs mit ITGB5-transfizierten EPCs. Darstellung von n=3-6 unabhängigen Experimenten. Weißer Balken: Vektor-transfizierte EPCs; grauer Balken: ITGB5-transfizierte EPCs.

Basierend auf dem zugrundeliegenden Isolationsprotokoll, der Kultivierung unter endothelialen Wachstumsbedingungen, der beschriebenen Morphologie in Kultur sowie dem immunfluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch detektierten Oberflächenmarkerprofil konnten die aus dem peripheren Blut isolierten mononukleären Zellen auch nach Transfektion mit humaner *full-length* cDNA der Integrin $\beta 5$ -Kette in Übereinstimmung mit der Literatur (Vasa et al., 2001, Hirschi et al., 2008; Schroeter et al., 2008) als *early-outgrowth* EPCs klassifiziert werden.

3.3 Die Überexpression der Integrin $\beta 5$ -Kette fördert die proangiogenetischen Fähigkeiten endothelialer Vorläuferzellen *in vitro*

3.3.1 Die Überexpression der Integrin $\beta 5$ -Kette führt zu einer vermehrten Bindung der EPCs an den $\alpha v\beta 5$ -Liganden VN im Zell-Adhäsions-Assay

Voraussetzung für vaskuloregenerative und angiogenetische Prozesse ist die Bindung zirkulierender endothelialer Vorläuferzellen an die ECM an der Lokalisation, an der es zur Gefäßaussprossung kommen soll. Dadurch wird eine Interaktion zwischen den EPCs und den ortsständigen, reifen Endothelzellen der Elternkapillaren ermöglicht. Aus diesem Grund wurde die Fähigkeit der EPCs untersucht, nach ITGB5-Transfektion an VN, einem Protein der ECM und Ligand des $\alpha v\beta 5$ Integrins, zu adhären. Wie in **Abbildung 10A** dargestellt und in **Abbildung 10B** quantifiziert, zeigte sich eine signifikant vermehrte Adhäsion der Integrin $\beta 5$ -überexprimierenden Zellen an VN im Vergleich zur Vektor-transfizierten Kontrollgruppe ($212,5 \pm 20,8$ %). Um zu analysieren, ob die im Zell-Adhäsions-Assay beobachteten Effekte spezifisch auf die Überexpression der Integrin $\beta 5$ -Kette zurückzuführen sind, wurden die ITGB5-transfizierten EPCs vor der Durchführung des Zell-Adhäsions-Assays auf VN für 30 min mit dem Integrin $\alpha v\beta 5$ -neutralisierenden AK präinkubiert und mit Kontroll-IgG-behandelten Zellen verglichen. Hier zeigte sich, wie in **Abbildung 10A** und **10B** dargestellt, dass durch den Einsatz des $\alpha v\beta 5$ -neutralisierendem-AK's die Effekte der ITGB5-Transfektion komplett aufgehoben werden konnten (Reduktion auf $76,1 \pm 22,7$ %). Die Daten belegten ausserdem, dass die gesteigerte Adhäsion spezifisch auf der Überexpression der Integrin $\beta 5$ -Kette basierte.

A

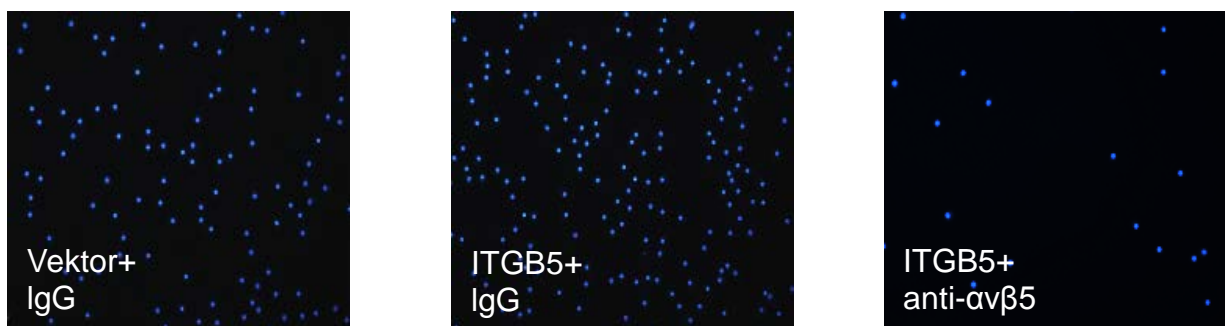


Abb. 10: Effekt der ITGB5-Transfektion auf die Adhäsion von EPCs auf VN. A) Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Bilder: Die Adhäsion ITGB5- bzw. Vektor-transfizierter EPCs auf VN. Zur Detektion der Zellen wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) angefärbt. 200fache Vergrößerung.

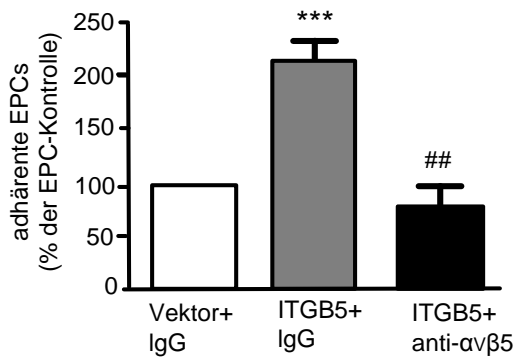


Abb. 10: B) Quantitative Analyse: Anzahl der adhären Zellen nach Inkubation mit IgG-Kontrolle bzw. $\alpha\beta 5$ -neutralisierenden AK. $n=10$. Die Ergebnisse sind in % Anstieg/Reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe angegeben. * vs. Vektor-transfizierte EPCs, # vs. EPC-ITGB5. *** $p<0,001$ und ## $p<0,01$.

3.3.2 Die ITGB5-Transfektion führt zu einer vermehrten Transmigration der EPCs in Richtung VN im modifizierten *Boyden-chamber*-Assay

Neben der Adhäsion ist die Transmigration der zirkulierenden EPCs aus dem Gefäßsystem hinaus in die ECM eine Grundvoraussetzung dafür, an angiogenetischen Prozessen beteiligt zu sein. Um die transmigratorischen Fähigkeiten der Integrin $\beta 5$ -überexprimierenden EPCs in Richtung des extrazellulären Matrixproteins VN mit denen der Vektor-transfizierten Kontrollgruppe zu vergleichen, wurde der modifizierte *Boyden-chamber*-Assay verwendet. Nach Inkubation der EPCs in einem Transwell-Filtersystem wurden die auf die Unterseite der Porenmembran transmigrierten Zellen quantifiziert. Wie in **Abbildung 11A** optisch dargestellt und in **Abbildung 11B** zusammengefasst, führte die ITGB5-Transfektion zu einem Anstieg ($373,4\pm 55,7$ % der EPC-Kontrolle) der Zahl migrierter Zellen und demonstrierte damit eine Erhöhung der transmigratorischen Fähigkeiten Integrin $\beta 5$ -überexprimierender EPCs in Richtung der $\alpha\beta 5$ -Liganden VN im Vergleich zur Kontrollgruppe. Durch die Präinkubation der ITGB5-transfizierten EPCs mit dem $\alpha\beta 5$ -neutralisierenden AK konnte der Effekt aufgehoben werden (Reduktion von $373,4\pm 55,7$ % auf $16,7\pm 5,0$ %), womit gezeigt werden konnte, dass der Effekt spezifisch für die Integrin $\beta 5$ -Überexpression war.

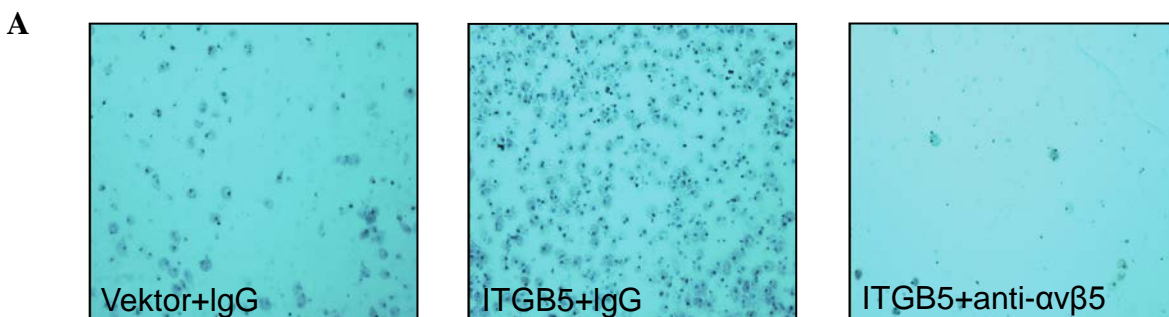


Abb. 11: Vergleich der transmigratorischen Fähigkeiten der EPCs im modifizierten *Boyden-chamber*-Assay.

A) Repräsentative lichtmikroskopischer Bilder: Darstellung der Unterseite der Porenmembran des verwendeten Transwell-Filtersystems. Die EPCs wurden zur Detektion mit Hämatoxylin gefärbt. 20fache Vergrößerung.

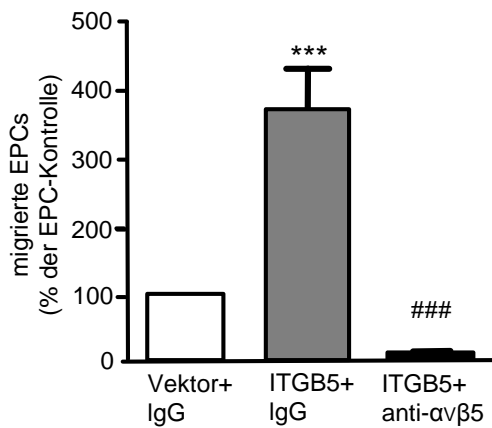


Abb. 11: B) Quantitative Auswertung: n=12 unabhängige Versuche. Die Ergebnisse sind in % von der Vektor-transfizierten Kontrollgruppe angegeben. * vs. Vektor-transfizierte EPC, # vs. EPC-ITGB5. ***p<0,001 und ###p<0,001.

3.3.3 ITGB5-transfizierte Zellen weisen kein erhöhtes Proliferationspotential auf

Bei der Bildung neuer Blutgefäße ist die Proliferation endothelialer Zellen essentiell, um eine Kapillaraussprossung aus dem bestehenden Gefäßsystem zu ermöglichen. Um den Einfluss der ITGB5-Transfektion auf die Proliferation der EPCs zu untersuchen, wurde der CellTiter 96[®] A_{Queous} One Solution Cell Proliferation-Assay (MTS) verwendet. In den durchgeführten Assays zeigte sich in Abhängigkeit von der Zeit sowohl bei der EPC-Kontrollgruppe als auch bei den ITGB5-transfizierten EPCs keine Zunahme der Reduktionsäquivalente. So konnte weder für die Vektor-, noch für die ITGB5-transfizierten EPCs, ein proliferatives Potential nachgewiesen werden.

3.3.4 Die Überexpression der Integrin β5-Kette fördert die proangiogenetischen Eigenschaften von EPCs im Matrigel-Angiogenese-Assay

Zur Analyse der Interaktionsfähigkeit mit den reifen Endothelzellen der Elternkapillaren wurde der Matrigel-Angiogenese-Assay durchgeführt. Hierbei wurden 3000 CM-Dil-markierte EPCs mit 12000 HUVECs auf einer dünnen Matrigel-Membran für 8 Std. koinkubiert. In dieser Zeit formten die reifen Endothelzellen Netzwerke, an welche die EPCs adhärten. Als Maß für die Interaktion wurde die Anzahl der adhären EPCs pro mm HUVEC-Netzwerk herangezogen. Wie in **Abbildung 12A** dargestellt, stieg die Zahl der an das HUVEC-Netzwerk adhären EPCs signifikant nach ITGB5-Transfektion (192,1±15,0 % von der EPC-Kontrolle, ***p<0,001). Auch hier konnte nach der Präinkubation der EPCs mit dem neutralisierenden αvβ5-AK der Effekt komplett aufgehoben werden (96,4±13,2 %, ###p<0,001). Die erhöhte angiogenetische Kapazität war somit spezifisch auf die Integrin αvβ5-Überexpression zurückzuführen (Reduktion von 192,1±15,0 % auf 88,0±13,4 %, wobei die EPC-Kontrolle als 100% definiert ist).

In vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe hatte sich gezeigt, dass das Adipozytenhormon Leptin die angiogenetischen Fähigkeiten von EPCs im gleichen Maß fördert wie VEGF und dass

diese Wirkung von Leptin auf einer vermehrten Aktivierung des $\alpha v \beta 5$ Integrins basiert (Heida et al. 2010). Um das Ausmaß des ITGB5-Effektes zu verifizieren, wurden EPCs daher nach 6 Tagen Kultivierung mit 10 ng/ml Leptin stimuliert. Beim Vergleich des Leptineffektes mit der ITGB5-Transfektion ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($181,3 \pm 19,0$ % vs. $192,1 \pm 15,0$ %; p-Wert=0,66). Die Zusammenfassung der quantitativen Analyse ist in **Abbildung 12B** dargestellt.

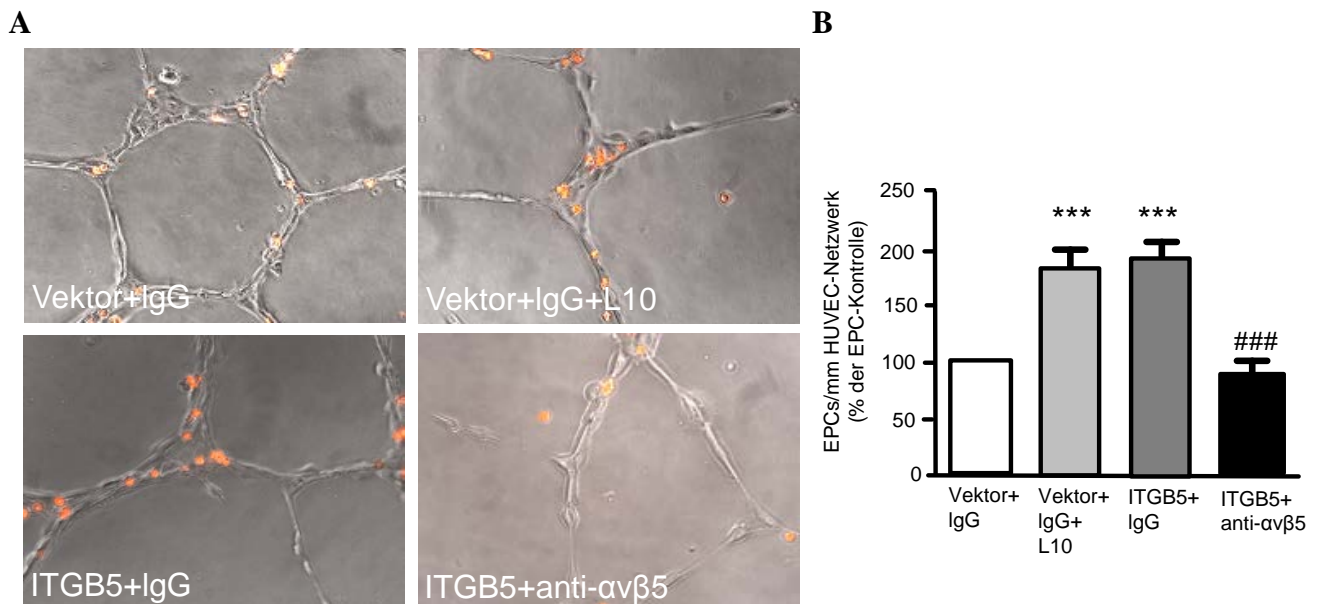


Abb. 12: Einfluss der ITGB5-Transfektion auf die angiogenetischen Fähigkeiten von EPCs im Matrigel-Angiogenese-Assay. **A)** Kokultivierung von HUVECs (transparent) und EPCs (rot) im Matrigel-Angiogenese-Assay. Die ITGB5-Transfektion führt zu einer vermehrten Adhäsion von EPCs an das von HUVECs gebildete endotheliale Netzwerk. Der Effekt der ITGB5-Transfektion war mit dem Effekt der Leptin-Stimulation (10 ng/ml) vergleichbar. 200fache Vergrößerung. **B)** Zusammenfassung der quantitativen Analyse von n=11 unabhängigen Experimenten, Ergebnisse werden in % der Vektor-transfizierten EPCs angegeben. * vs. Vektor-transfizierte EPCs, # vs. ITGB5-transfizierte EPCs. ***p<0,001 und ###p<0,001.

3.3.5 Nach ITGB5-Transfektion zeigen EPCs eine erhöhte Interaktion mit reifem Endothel im 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay

Zur Komplettierung unserer *In-vitro*-Studien zur Analyse der angiogenetischen Kapazität ITGB5-transfizierter EPCs im Vergleich zur Vektor-transfizierten Kontrollgruppe, wurde der der 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay durchgeführt. Die aus EPCs und HUVECs in einem Verhältnis von 1:4 bestehenden Sphäroiden wurden in eine Kollagenmatrix gebettet und das Ergebnis nach 24 Std. Inkubation ausgewertet. Die Interaktionsfähigkeit der EPCs mit HUVECs, die das reife Endothel in diesem Assay verkörperten, wurde anhand 1) der Aussprossungsaktivität der HUVECs sowie 2) der

Migration der EPCs entlang den neu geformten HUVEC-Sprossen, beurteilt. Die Ergebnisse, in **Abbildung 13A** und **13B** dargestellt, demonstrierten eine signifikant gesteigerte Migration der ITGB5-transfizierten EPCs entlang der HUVEC-Sprossen im Vergleich zur Vektor-transfizierten Kontrollgruppe ($361,3 \pm 84,0$ % der EPC-Kontrolle, $**p < 0,01$). Interessanterweise förderte die Koinkubation der Integrin $\beta 5$ -überexprimierenden EPCs mit HUVECs auch die Sphäroidaussprossung der HUVECs selbst, so dass diese Sphäroide signifikant längere ($227,1 \pm 15,62$ % der EPC-Kontrolle) und eine vermehrte Anzahl an Sprossen bildeten, wie in **Abbildung 13A** und **13C** gezeigt. Beide Effekte konnten durch die Präinkubation mit neutralisierenden $\alpha\beta 5$ -AK aufgehoben werden (Reduktion der migrierten EPCs auf $93,9 \pm 55,9\%$, $\#p < 0,05$, bzw. der Sprossenlänge auf $106,7 \pm 18,8$ %, $###p < 0,001$), so dass diese Effekte spezifisch auf die Integrin $\beta 5$ -Überexpression zurückzuführen waren.

Wie im Matrigel-Angiogenese-Assay wurden auch in diesem Assay die Effekte der Integrin $\beta 5$ -Überexpression in Bezug auf die Anzahl der migrierten EPCs pro Sphäroid und der kumulativen Sprossenlänge mit dem Effekt des Zytokins Leptin verglichen und zeigten ähnliche Effekte ($263,7 \pm 50,3$ % [L10] vs. $305,1 \pm 44,6$ % [ITGB5], $p = 0,55$ bzw. $233,6 \pm 39,0$ % [L10] vs. $200,5 \pm 21,41$ % [ITGB5], $p = 0,47$ bei $n=8$ unabhängigen Experimenten) (**nicht dargestellt**).

A

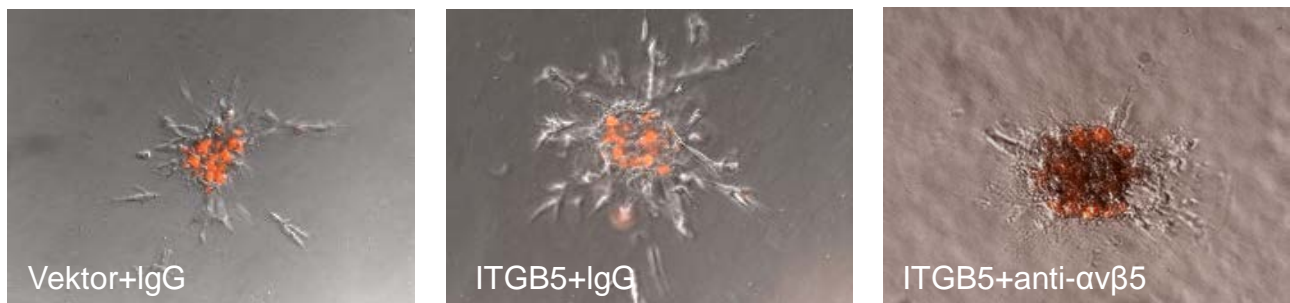


Abb. 13: Angiogenese im 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay nach ITGB5-Transfektion. A) Repräsentative mikroskopische Bilder: Die Integrin $\beta 5$ -Überexpression führte zu einer Erhöhung der migratorischen Fähigkeiten von EPCs (CM-Dil-markiert, rot fluoreszent) entlang der HUVEC-Sprossen (ungefärbt, durchscheinend) und zu einer Steigerung der kumulativen Sprossenlänge. 200fache Vergrößerung.

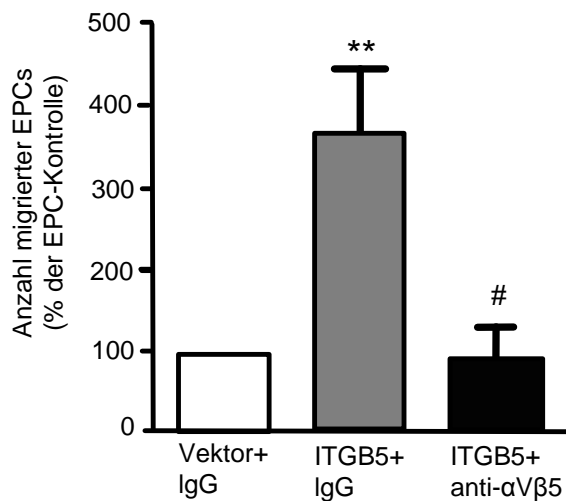
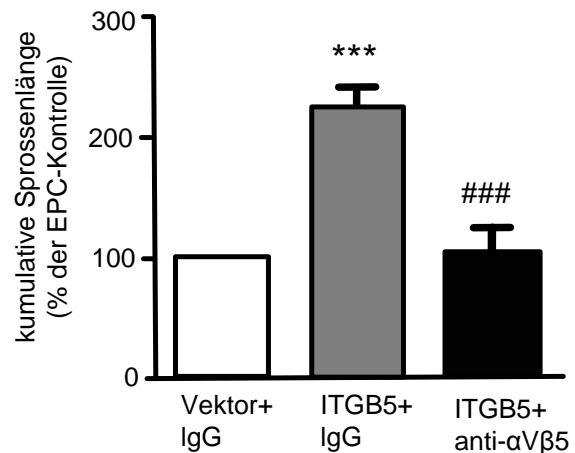
B**C**

Abb. 13B und C: Quantitative Auswertung: **B)** Quantitative Analyse der Anzahl migrierter EPCs entlang der HUVEC-Sprossen: n=6-9 unabhängige Experimente **C)** Quantitative Analyse der kumulativen Sprossenlänge der HUVECs: n=6-16 unabhängige Experimente. Die EPC-Kontrolle ist in beiden Diagrammen als 100% definiert. * vs. Vektor-transfizierte EPCs, # vs. ITGB5-transfizierte EPCs. **p<0,01, ***p<0,001, #p<0,05 und ###p<0,001.

3.4 Die Integrin β5-Überexpression verbessert die EPC-vermittelte Neovaskularisation im Mausmodell der unilateralen Hinterlaufischämie

3.4.1 Integrin β5-überexprimierende EPCs zeigen eine vermehrte Akkumulation im ischämischen Maushinterlauf

Während die Vorteile der in dieser Studie durchgeführten *In-vitro*-Assays darin lagen, einzelne Teilprozesse der Angiogenese, wie die Interaktion mit reifen Endothelzellen, gezielt untersuchen zu können, besteht der Nachteil darin, dass die Komplexität des angiogenetischen Prozesses als Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren nicht in der Gesamtheit erfasst und analysiert werden kann. Um die Angiogenese als komplexen Prozess besser darzustellen, wurde das *In-vivo*-Mausmodell des unilateralen ischämischen Hinterlaufs durchgeführt. 24 Std. nach Induktion einer unilateralen Ischämie im Maushinterlauf durch Ligatur und Exzision der rechten Femoralarterie wurden den verwendeten atymischen Nacktmäusen 1×10^6 EPCs, die zuvor mit ITGB5-DsRed-Plasmid bzw. dem pDsRed-Kontrollvektor transfiziert wurden, injiziert. 11 Tage nach Induktion der Hinterlaufischämie wurde das Gewebe des *M. gastrocnemius* entnommen, eingebettet und histologisch untersucht. Die injizierten, rot fluoreszierenden EPCs im ischämischen Gewebe wurden detektiert und quantifiziert. Zur Differenzierung zwischen unspezifischen roten

Fluoreszenzsignalen und Identifikation eines Signals als Zelle erfolgte eine Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI. Wie in **Abbildung 14A** dargestellt, ließ sich im ischämischen Gewebe der Mäuse, die mit ITGB5-DsRed-Plasmid-transfizierten EPCs behandelt wurden, eine signifikant höhere Anzahl transmigrierter DsRed/DAPI-doppelt positiver EPCs/mm² Muskelgewebe nachweisen (50,1±8,8 [pDsRed-Kontrollvektor] vs. 91,8±12,7 [ITGB5-DsRed-Plasmid] Ds-Red/DAPI-doppelt immunpositive Zellen/mm² Muskelfaser). Außerdem ließ sich eine vermehrte Kolokalisation der injizierten humanen EPCs mit CD31-positiven endothelialen Maus-Zellen ausmachen, was auf eine verstärkte Migration der injizierten EPCs in die Neovaskularisationszone des ischämischen Muskelgewebe hindeutet (**Abbildung 14A**). Die Daten zeigten, dass die Integrin β 5-Überexpression die Rekrutierung von EPCs in ischämisches Gewebe fördert. Darüber hinaus deutete die gesteigerte Kolokalisation auf eine vermehrte Interaktion zwischen EPCs und reifen Mausendothelzellen hin, was wiederum Grundvoraussetzung für die Bildung neuer Gefäße vom bestehenden Kapillarsystem ausgehend, ist. Die quantitative Zusammenfassung der Daten ist in **Abbildung 14B** dargestellt.

A

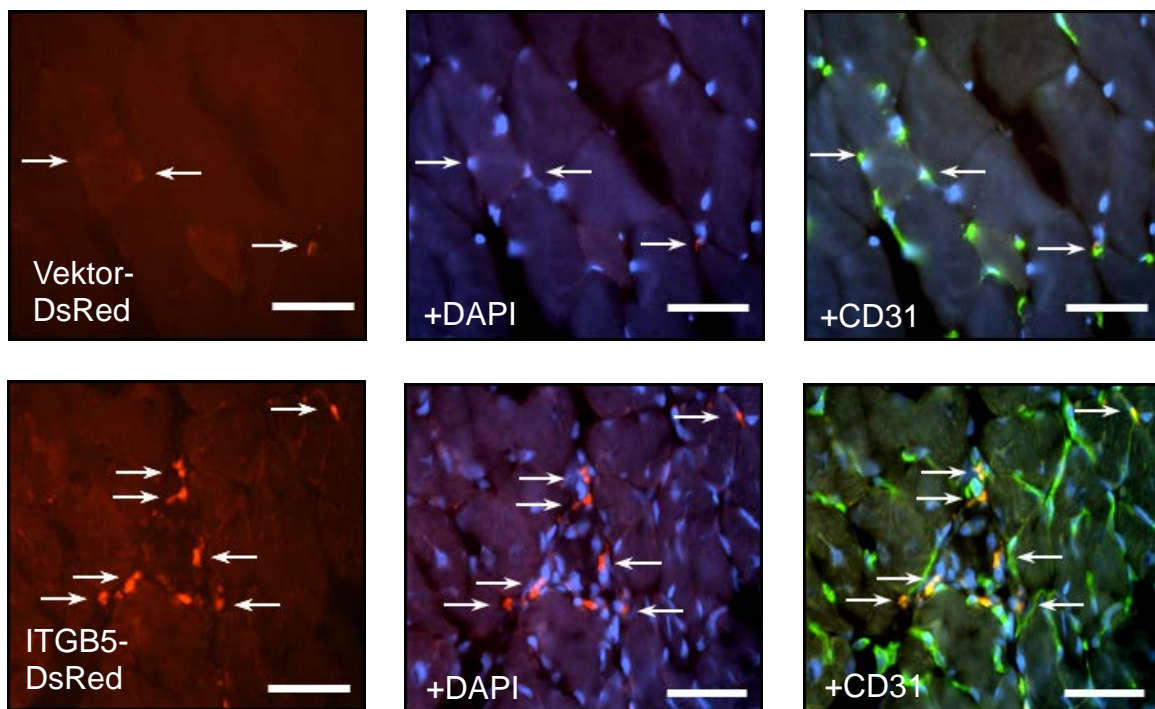


Abb. 14: Akkumulation von EPCs im ischämischen Maushinterlauf nach ITGB5-Transfektion.

A) Repräsentative immunhistochemische Abbildungen: Akkumulation der ITGB5-DsRed-transfizierten EPCs im ischämischen Gewebe des *M. gastrocnemius* im Vergleich zu pDsRed-Kontrollvektor-transfizierten EPCs. Im Gewebe der Mäuse, die mit ITGB5-DsRed-transfizierten EPCs behandelt wurden, zeigt sich eine erhöhte Anzahl doppelpositiver Zellen (DsRed + DAPI) pro mm², die gehäuft mit CD31-positiven endothelialen Mauszellen (grün) kolokalisiert waren. Messbalken: 25 μ m.

B

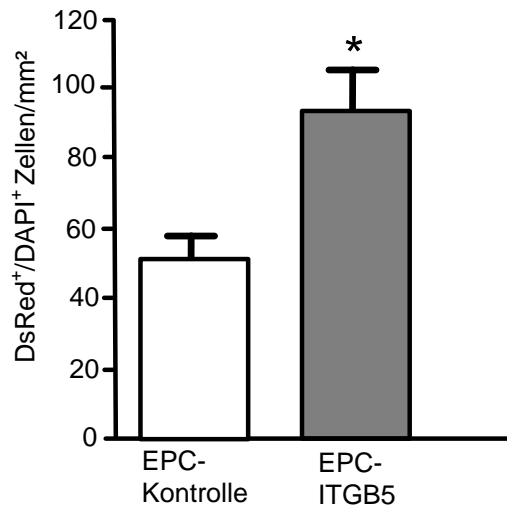
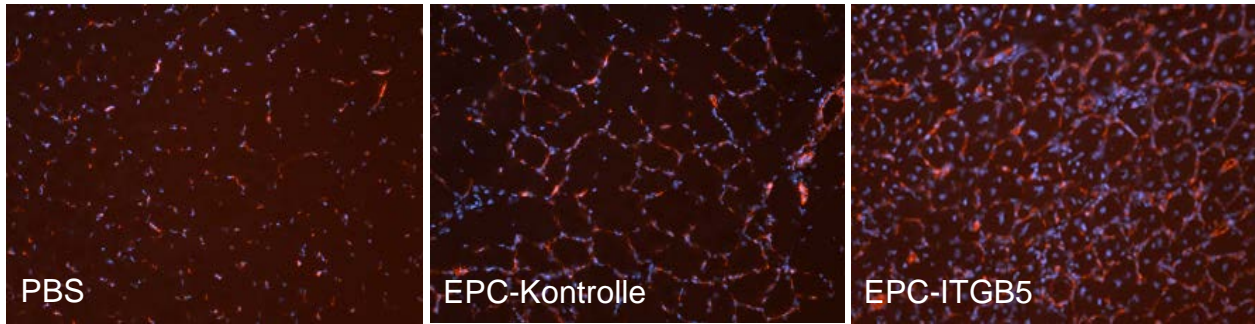


Abb. 14: B) Quantitative Analyse: Zusammenfassung der Daten aus n=6 unabhängigen Experimenten. *p<0,05.

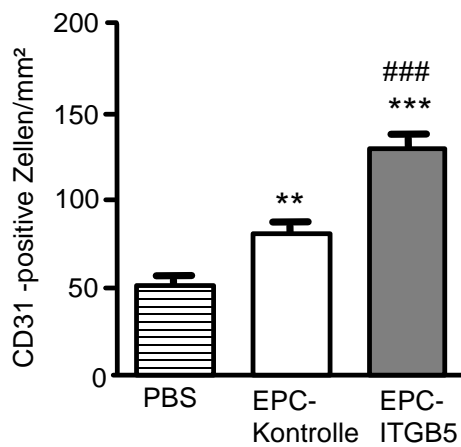
3.4.2 Mit Integrin β 5-überexprimierenden EPCs behandelte Mäuse wiesen eine erhöhten Kapillardichte im ischämischen Gewebe des *M. gastrocnemius* auf

Um zu ermitteln, ob die Injektion von EPCs einen Einfluss auf die Kapillardichte im ischämischen Muskelgewebe hat, wurde das Gewebe des *M. gastrocnemius* 10 Tage nach Behandlung der Mäuse mit ITGB5- oder Vektor-transfizierten EPCs bzw. PBS als Negativkontrolle immunhistochemisch analysiert. Als Maß für die Kapillardichte und damit für die Neovaskularisation wurde die Anzahl CD31⁺/DAPI-doppelt immunpositiver kapillärer Endothelzellen/mm² Muskelfaser bestimmt. Nach der Injektion von ITGB5-transfizierten EPCs ließen sich signifikant mehr endotheliale Zellen im ischämischen Muskelgewebe nachweisen als bei Mäusen, denen PBS (52,5±6,1 vs. 80,1±7,7 CD31⁺/DAPI Zellen/mm² Muskelfaser, p<0,01) oder Vektor-transfizierte EPCs (80,1±7,7 vs. 130±7,0 CD31⁺/DAPI Zellen/mm² Muskelfaser, p<0,001) injiziert worden waren. Ergänzend ließ sich eine signifikant gesteigerte Anzahl von Gefäßstrukturen pro mikroskopischem Gesichtsfeld detektieren (52,5±6,1 [PBS-behandelte Mäuse] vs. 80,1±7,7 [EPC-Kontrolle] vs. 130±7,0 [EPC-ITGB5] Gefäßstrukturen/Gesichtsfeld). Diese Daten belegen, dass die Injektion ITGB5-transfizierter EPCs die Neovaskularisation im ischämischen Gewebe des Maushinterlaufs fördert. Repräsentative immunhistochemische Bilder sind in **Abbildung 15A** dargestellt. Die Zusammenfassung der quantitativen Analyse wird in **Abbildung 15B** (CD31/DAPI-doppelt immunpositive Zellen pro mm²) und **Abbildung 15C** (Arteriolen/Gesichtsfeld) gezeigt.

A



B



C

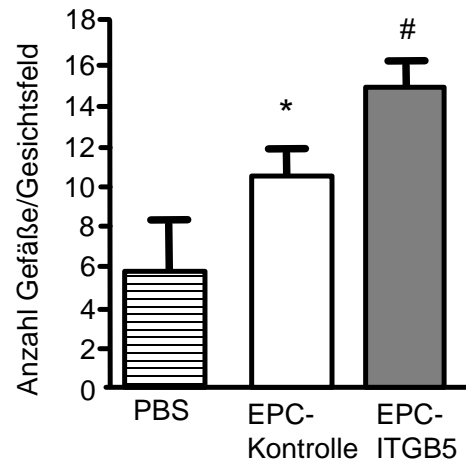


Abb. 15: Immunhistochemischer Nachweis der Kapillardichte im ischämischen Maushinterlauf nach Injektion von EPCs. A) Die Injektion von ITGB5-transfizierten EPCs führte zu einer gesteigerten Kapillardichte im ischämischen Muskelgewebe des Maushinterlaufs im Vergleich zur Injektion von PBS oder Kontroll-EPCs. 400fache Vergrößerung. B) Quantitative Analyse der CD31⁺/DAPI doppelt immunpositiven Zellen/mm² Muskelgewebe. C) Quantitative Analyse der Kapillardichte/Gesichtsfeld; n=6 Tiere pro Versuchsgruppe. * vs. PBS, # vs. EPC-Kontrolle. *p<0,05, ***p<0,001, #p<0,05 und ###p<0,001.

3.4.3 Die Behandlung der Mäuse mit Integrin $\beta 5$ -überexprimierenden EPCs fördert die Reperfusion im ischämischen Maushinterlauf

Um zu untersuchen, ob es durch die Injektion Integrin $\beta 5$ -überexprimierender EPCs zu einer verbesserten Reperfusion im ischämischen Gewebe des *M. gastrocnemius* kommt, wurde der Blutfluss im Maushinterlauf mittels Laserdopplersonographie gemessen. Die Messungen erfolgten präoperativ zur Demonstration der gleichen Perfusionsverhältnisse in beiden Hinterläufen, postoperativ um zu zeigen, dass durch die Operation ähnliche funktionelle Ergebnisse bei allen Mäusen erreicht werden konnten und 3, 7 und 14 Tage nach Induktion der Ischämie, um die Effekte

der Behandlung mit EPCs bzw. ITGB5-transfizierten EPCs zu analysieren. Dabei wurde jeweils die Perfusion im ischämischen mit der im nicht-operierten Hinterlauf desselben Tieres verglichen. Die Untersuchungen bestätigten, dass es nach der Injektion von ITGB5-transfizierten EPCs an Tag 14 im Vergleich zu Mäusen, die mit PBS oder mit Kontroll-EPCs behandelt wurden, zu einem signifikanten Anstieg der Reperfusion im ischämischen Maushinterlauf kam (Reduktion der Perfusion auf $59,3\pm 4,6\%$ bei Mäusen, die mit PBS behandelt wurden vs. $37,7\pm 5,5\%$, bei Mäusen, denen Vektor-transfizierte EPCs injiziert bzw. $11,5\pm 5,3\%$ nach Injektion von ITGB5-EPCs). **Abbildung 16A** zeigt repräsentative Bilder der Laserdopplermessungen. In **Abbildung 16B** ist die Reduktion der Perfusion vom Tag der Operation (präoperativ) bis 14 Tage nach Induktion der Ischämie quantifiziert.

A

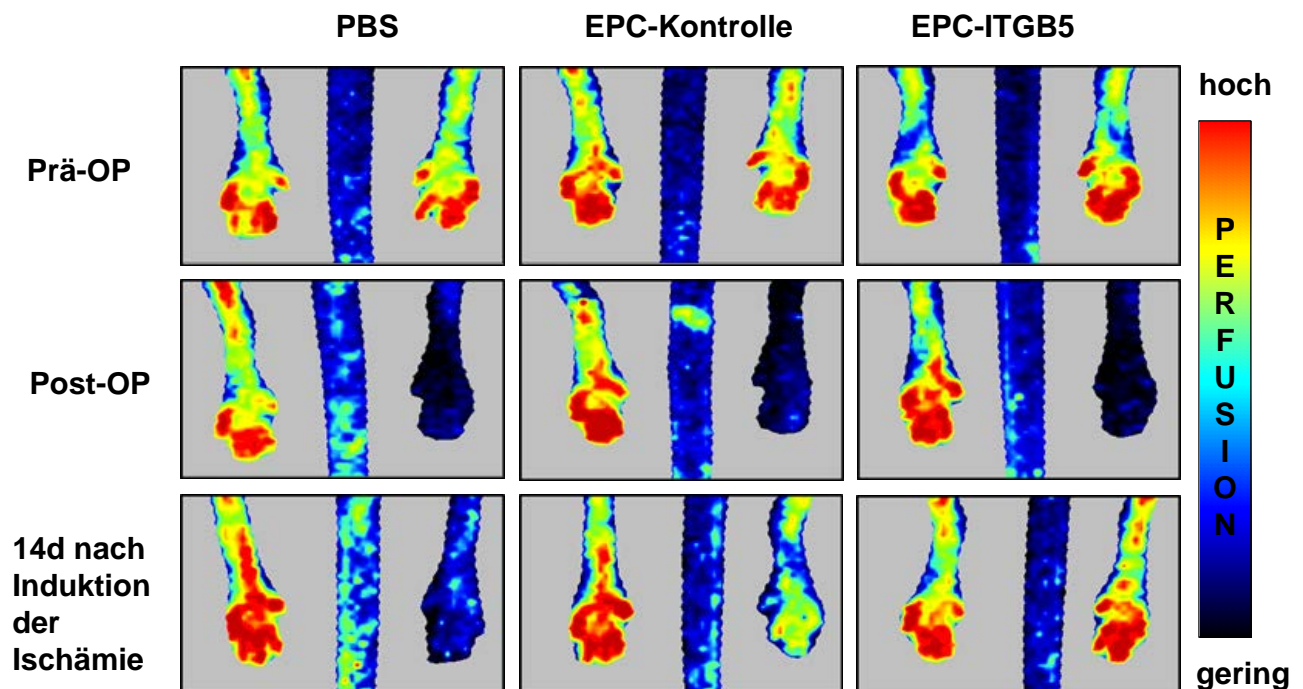


Abb. 16: Effekte der Injektion ITGB5-transfizierter EPCs auf die Reperfusion nach unilateraler Hinterlaufischämie. A) Repräsentative Laserdopplermessungen der Perfusion im Maushinterlauf: Die Injektion von ITGB5-transfizierten EPC verbesserte die Reperfusion im ischämischen Maushinterlauf im Vergleich zu Mäusen, die mit PBS oder Vektor-transfizierten EPCs behandelt worden waren.

B

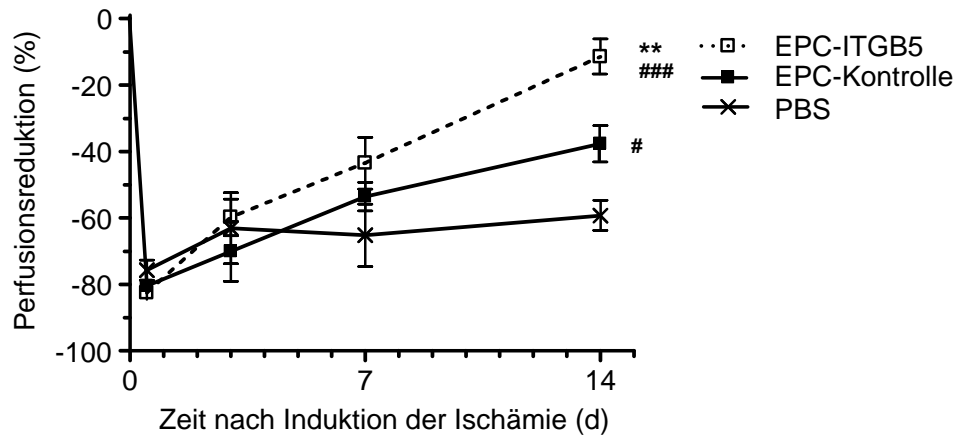


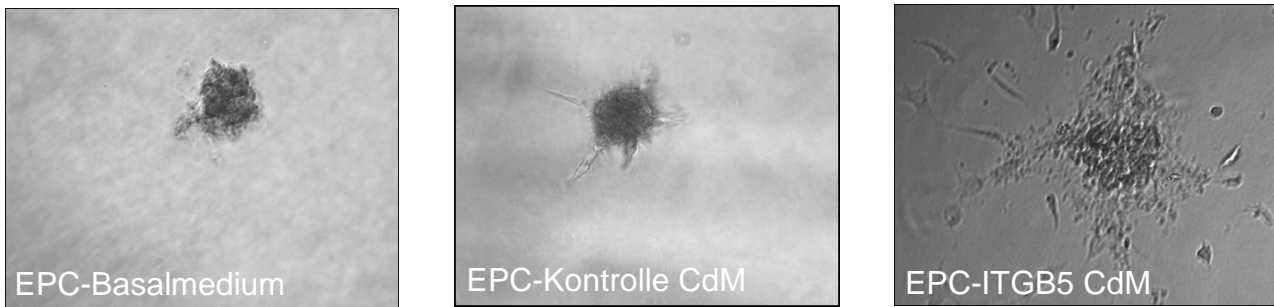
Abb. 16: B) Quantitative Analyse: Darstellung der Reduktion der Perfusion im operierten Maushinterlauf verglichen mit der nicht-operierten kontralateralen Seite (als 100% definiert), n=3 (PBS), n=5 (EPC-Kontrolle), n=7 (EPC-ITGB5). # vs. PBS, * vs. EPC-Kontrolle. #p<0,05, ###<0,001 und **p<0,01.

3.5 Die proangiogenetischen Effekte der Integrin $\beta 5$ -Überexpression in EPCs beinhalten parakrine Mechanismen

3.5.1 Die Inkubation mit CdM von ITGB5-transfizierten EPCs führt zu einer vermehrten Endothelzellaussprossung im 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay

Die Tatsache, dass die Sphäroide, die mit ITGB5-transfizierten EPCs im 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay inkubiert wurden, längere und vermehrt Aussprossungen bildeten, als Sphäroide, die mit Vektor-transfizierten EPCs inkubiert wurden, legte die Vermutung nah, dass parakrine Mechanismen an der Steigerung der proangiogenetischen Fähigkeiten Integrin $\beta 5$ -überexprimierender EPCs beteiligt sind. Um diesen Verdacht zu erhärten, wurden die aus HUVECs gebildeten Sphäroide mit CdM von ITGB5- bzw. Vektor-transfizierten EPCs inkubiert. Nach 24 Std. Inkubation wiesen die Sphäroide, die mit CdM Integrin $\beta 5$ -überexprimierender EPCs inkubiert wurden, eine signifikant höhere kumulative Sprosslänge ($3556 \pm 345,7 \mu\text{m}$) auf verglichen mit Sphäroiden, die mit CdM von Vektor-transfizierten EPCs ($1140 \pm 71,2 \mu\text{m}$) oder EBM ($987 \pm 98,6 \mu\text{m}$), das als Negativkontrolle verwendet wurde, auf. Repräsentative Bilder sind in **Abbildung 17A** gezeigt, die quantitative Analyse ist in **Abbildung 17B** dargestellt.

A



B

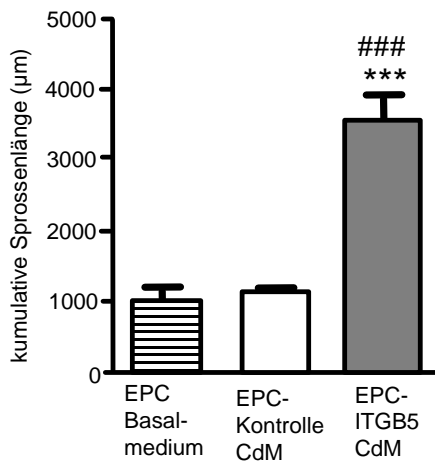


Abb. 17: Effekte des CdM ITGB5-transfizierter EPCs auf die Aussprossungsaktivität der Sphäroide im Sphäroid-Angiogenese-Assay. A) HUVEC-Sphäroiden, die mit CdM von ITGB5-transfizierten EPCs inkubiert wurden, wiesen eine höhere Aussprossungsaktivität auf im Vergleich zu Sphäroiden, die mit EBM oder CdM von Vektor-transfizierten EPCs inkubiert wurden. 20fache Vergrößerung **B)** Quantitative Zusammenfassung der kumulativen Sprossenlänge in µm. n=6 unabhängige Experimente. * vs Negativkontrolle, ### vs CdM der EPC-Kontrolle. ***p<0,001 und ###p<0,001.

3.5.2 Die ITGB5-Transfektion von EPCs führt zu einer gesteigerten Sekretion der angiogenischen Zytokine IL-8 und MCP-1

Die Ergebnisse des 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assays ließen darauf schließen, dass von ITGB5-transfizierten EPCs vermehrt Zytokine oder Wachstumsfaktoren sezerniert werden, die an der Vermittlung der parakrinen Effekte zur Förderung der Angiogenese beteiligt sind. Um diese zu detektieren, wurden Screenig-Zytokin-Antikörper-Arrays durchgeführt. Wie in **Abbildung 18A** dargestellt, ließen sich auf den Membranspots, die mit dem CdM von ITGB5-transfizierten Zellen inkubiert wurden, eine vermehrte Bindung an die AG IL-8, sowie MCP-1, nachweisen. Die Konzentrationen der detektierten Zytokine wurde mittels ELISA quantifiziert (**Abbildung 18B**), wobei die Konzentration sowohl von IL-8 ($162,5 \pm 44,5$ pg/ml bei CdM der EPC-Kontrolle vs. $433,6 \pm 87,9$ pg/ml bei CdM der EPC-ITGB5), als auch von MCP-1 ($421,5 \pm 41,9$ pg/ml bei CdM der EPC-Kontrolle vs. $1235 \pm 43,9$ pg/ml bei CdM der EPC-ITGB5) im CdM von Integrin $\beta 5$ -überexprimierender EPCs signifikant erhöht war (IL-8: $p < 0,05$ und MCP-1: $p < 0,001$).

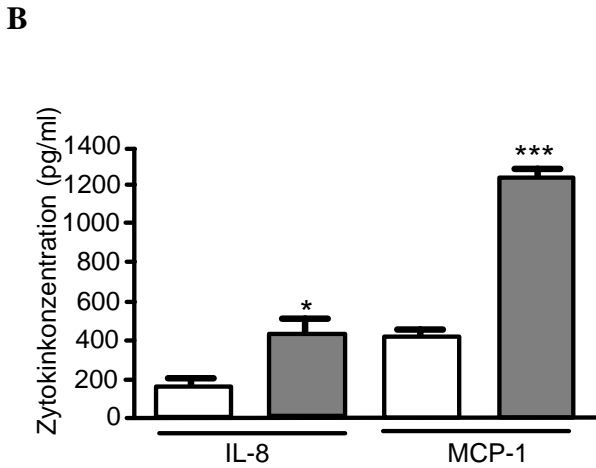
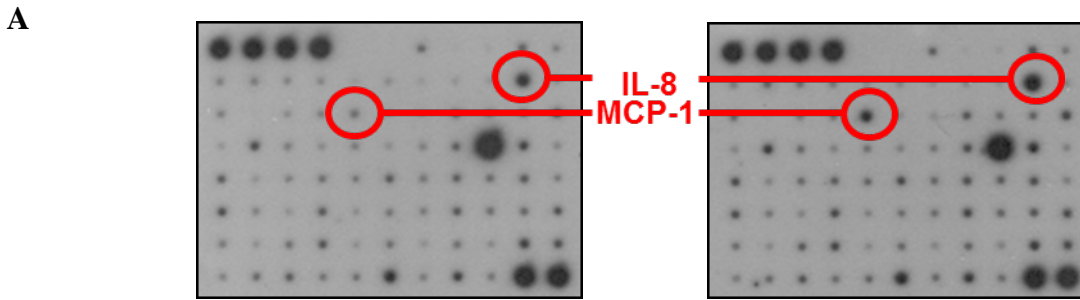


Abb. 18: Nachweis der gesteigerten Sekretion der Zytokine MCP-1 und IL-8 im Zytokin-Array.

A) Darstellung repräsentativer Zytokin-Array-Membranspots nach der Analyse des CdM von Vektor- (links) bzw. ITGB5-transfizierten EPCs (rechts). B) ELISA-basierte Quantifizierung der Konzentration in pg/ml von IL-8 und MCP-1 im CdM, n=4 unabhängige Experimente. Weißer Balken: EPC-Kontrolle, grauer Balken: EPC-ITGB5. *p<0,05, ***p<0,001.

Wie in **Abbildung 19** dargestellt, konnte auch direkt im Gewebe des *M. gastrocnemius* 10 Tage nach Induktion der Hinterlaufschämie eine erhöhte Proteinexpression von MCP-1 bei Mäusen, die mit ITGB5-DsRed-transfizierten EPCs behandelt wurden, immunhistochemisch nachgewiesen werden. Das Gewebe der Mäuse, denen pDsRed-Kontrollvektor-transfizierte EPCs injiziert wurden, zeigte im Vergleich eine deutlich geringere Anreicherung von MCP-1.

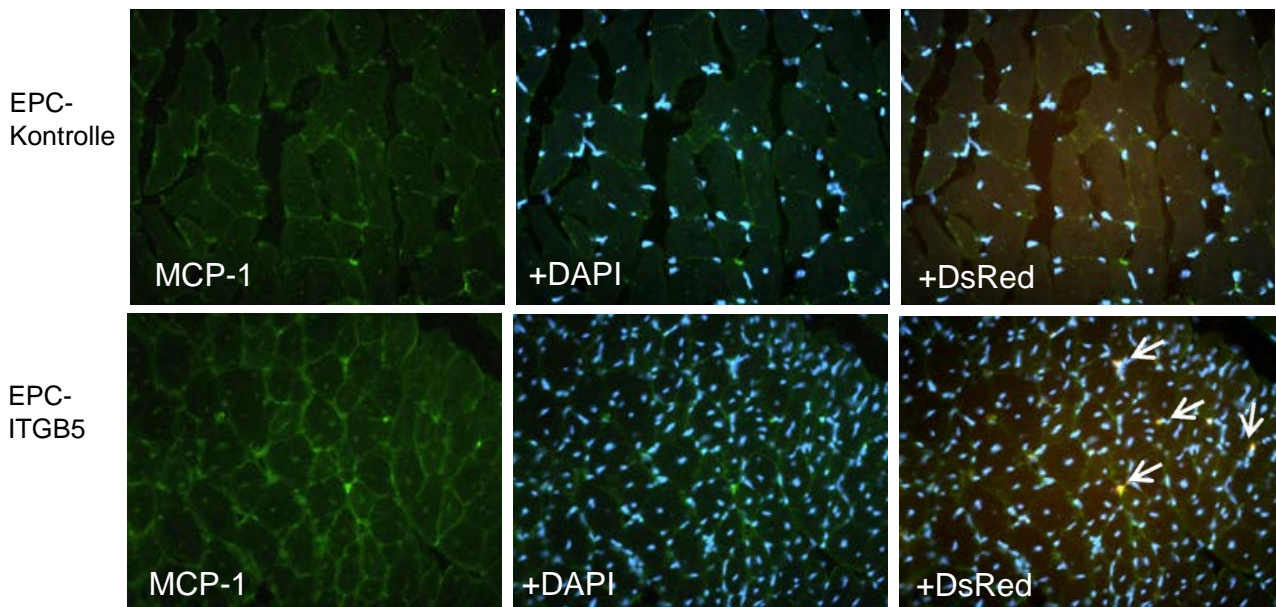


Abb. 19: Immunhistochemischer Nachweis der Proteinexpression des Zytokins MCP-1 im ischämischen Maushinterlauf. Nach der Injektion von ITGB5-DsRed-transfizierten EPCs ließ sich eine erhöhte Proteinexpression des angiogenetischen Zytokins MCP-1 (grün) immunhistochemisch nachweisen. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) angefärbt. Pfeile zeigen DsRed-/MCP-1-doppelt positive EPCs (gelb). 400fache Vergrößerung.

Weitere RT-PCR-Analysen untermauerten die erhöhte Genexpression der genannten Zytokine. Es konnte eine gesteigerte Transkription der Gene, die für IL-8 und MCP-1 kodieren, bei ITGB5-transfizierten EPCs anhand signifikant erhöhter mRNA-Expression (relative Induktion von IL-8 bei EPC-ITGB5 $1,58 \pm 0,28$, $p < 0,05$; sowie $1,45 \pm 0,16$ für MCP-1 bei EPC-ITGB5) nachgewiesen werden. Repräsentative Bilder der PCR-Analysen sind in **Abbildung 20A** gezeigt, die quantitativen Analysen sind in **Abbildung 20B und C** zusammengefasst.

A

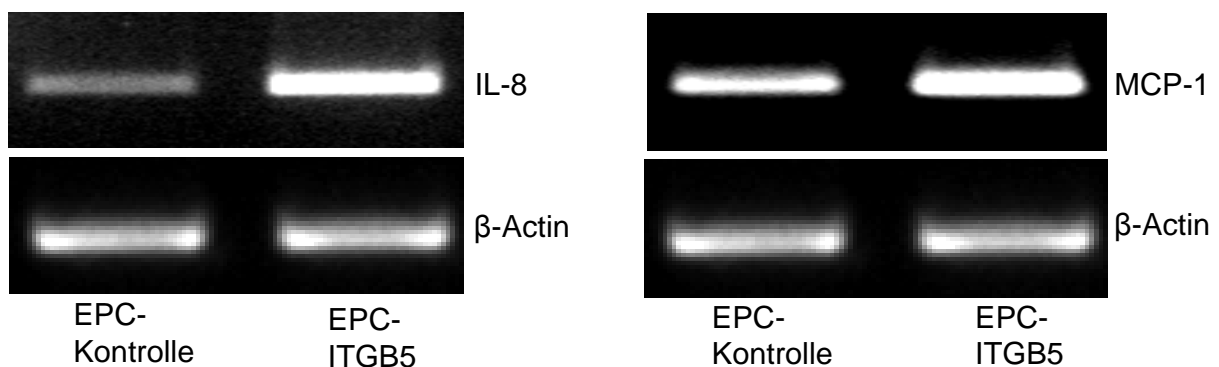


Abb. 20: RT-PCR-Analyse zum Nachweis der gesteigerten mRNA-Expression von MCP-1 und IL-8 nach ITGB5-Transfektion. A) Repräsentative Bilder der RT-PCR: Analyse der Genexpression der Zytokine IL-8 und MCP-1.

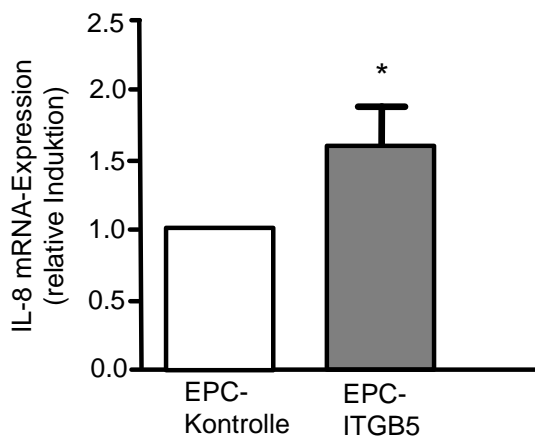
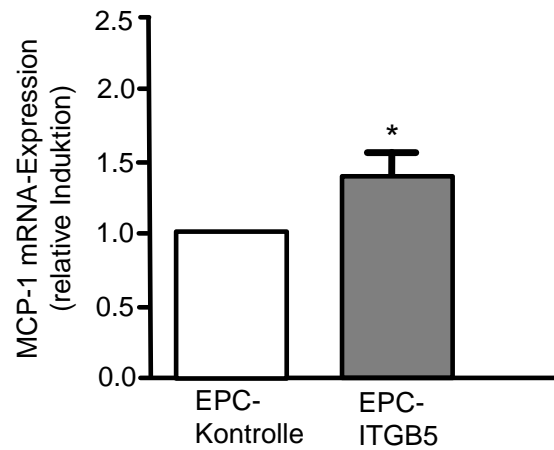
B**C**

Abb. 20B und C: Quantitative Auswertung: B) Die Zusammenfassung der quantitativen Analyse zeigt, dass Integrin $\beta 5$ -überexprimierende EPCs eine signifikant erhöhte Gentranskription von IL-8 aufweisen. $n=6$. **C)** Quantitative Analyse der mRNA-Expression von MCP-1. $n=4$. Die Ergebnisse werden als relative Induktion angegeben, wobei die EPC-Kontrolle als 1,0 definiert ist. * $p<0,05$.

3.5.3 Die vermehrte Sprossung im 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay beruht auf einer vermehrten Sekretion von IL-8 und MCP-1 in ITGB5-transfizierten EPCs

Nachdem in unseren Studien eine erhöhte Sekretion der angiogenetischen Zytokine IL-8 und MCP-1 bei ITGB5-transfizierten EPCs nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob die oben genannten Zytokine an der Vermittlung der parakrinen, proangiogenetischen Effekte Integrin $\beta 5$ -überexprimierender EPCs beteiligt sind. Um zu überprüfen, ob die im 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay beobachteten Effekt spezifisch durch die Zytokine IL-8 und MCP-1 hervorgerufen werden, wurden die EPCs vor Separierung des CdM für 48 Std. mit IL8- oder/und MCP-1-neutralisierenden AK inkubiert. Wie in **Abbildung 21** quantitativ analysiert, kam es durch die Präinkubation der Vektor-transfizierten EPCs mit IL-8 bzw. MCP-1-neutralisierenden AK zu einer signifikanten Reduktion der kumulativen Sprosslänge ($664,1 \pm 73,1 \mu\text{m}$ bei CdM der EPC-Kontrolle+IgG vs. $252,8 \pm 24,0 \mu\text{m}$ bei CdM der EPC-Kontrolle + anti-IL-8 bzw. $213 \pm 16,6 \mu\text{m}$ bei CdM der EPC-Kontrolle + anti-MCP-1; $p<0,001$). Das gleiche Resultat wurde durch die Inkubation der Sphäride mit CdM von EPCs, die sowohl mit anti-IL-8, als auch mit anti-MCP-1 inkubiert wurden, erreicht ($664,1 \pm 73,1 \mu\text{m}$ bei CdM der EPC-Kontrolle + IgG vs. $110,1 \pm 19,3 \mu\text{m}$ des CdM der EPC-Kontrolle + anti-IL-8 + anti-MCP-1, $p<0,001$). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass den

Zytokinen IL-8 und MCP-1 eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der parakrinen proangiogenetischen Effekte von EPCs zukommt. Zudem konnten wir zeigen, dass der Effekt, der durch die Inkubation mit CdM von ITGB5-transfizierten EPCs hervorgerufen wurde, durch die Anwesenheit neutralisierender IL-8- oder/und MCP-1-AK komplett aufgehoben werden konnte ($1947,0 \pm 132,8 \mu\text{m}$ bei CdM der EPC-ITGB5 + IgG vs. $460 \pm 115,2 \mu\text{m}$ für CdM der EPC-ITGB5 + anti-IL-8 und $393,1 \pm 46,2 \mu\text{m}$ für CdM bei EPC-ITGB5 + anti-MCP-1 und $446 \pm 59,3 \mu\text{m}$ bei CdM der EPC-ITGB5 + anti-IL-8 + anti-MCP-1; $p < 0,001$). Diese Daten belegen, dass die proangiogenetischen Effekte von ITGB5-transfizierten EPCs in diesem Assay spezifisch über die Zytokine IL-8 und MCP-1 vermittelt werden.

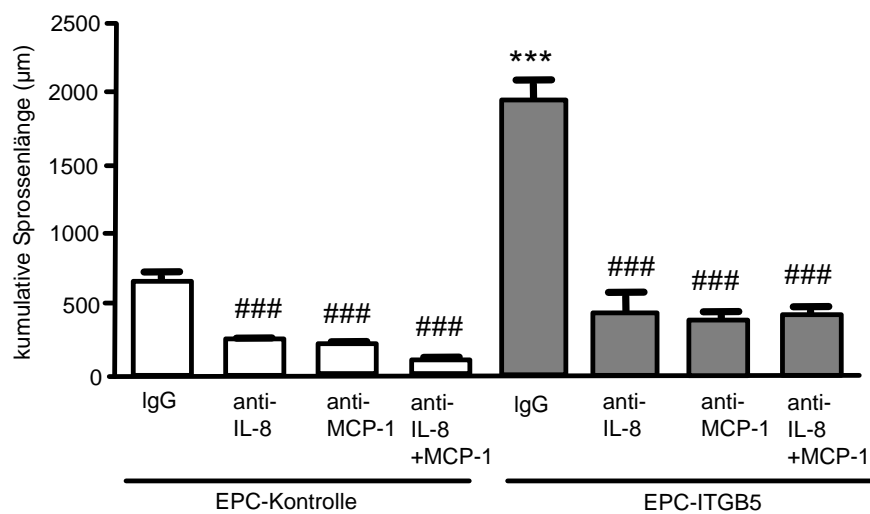


Abb. 21: Proangiogenetische Eigenschaften von MCP-1 und IL-8 im 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay. Quantitative Analyse der kumulativen Sprosslänge der Sphäroide im 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay nach Inkubation mit CdM von ITGB5-transfizierten EPCs im Vergleich zu Vektor-transfizierten EPCs und Präinkubation mit anti-IL-8 und/oder anti-MCP-1. $n=3$. * vs. CdM von EPC-Kontrolle + IgG, # vs. CdM von IgG-behandelten EPCs (Vektor- bzw. ITGB5-transfiziert). *** $p < 0,001$, ### $p < 0,001$.

3.6 Die proangiogenetischen Fähigkeiten ITGB5–transfizierter EPCs werden über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 vermittelt

3.6.1 Die Integrin $\beta 5$ -Überexpression führt zu einer vermehrten Aktivierung von STAT3

Nachdem unsere Studien zeigen konnten, dass parakrine Mechanismen an der Vermittlung proangiogenetischer Effekte Integrin $\beta 5$ -überexprimierender EPCs beteiligt sind, war zu vermuten, dass die Aktivierung des Integrins $\alpha \beta 5$ regulatorisch auf die Expression der Zytokine IL-8 und

MCP-1 Einfluss nimmt. Wir begannen den Signaltransduktionsweg zu untersuchen, der nach der Aktivierung des Integrin $\alpha\beta5$ in der erhöhten Expression und Sekretion der Zytokine IL-8 und MCP-1 mündet. Da die Expression der genannten Zytokine durch den Transkriptionsfaktor STAT3 kontrolliert wird, untersuchten wir, ob die Überexpression der Integrin $\beta5$ -Kette die Aktivierung von STAT3 beeinflusst. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 erfolgt über die Tyrosinphosphorylierung (Cao et al.1995). In FACS-Analysen ließ sich ein signifikanter Anstieg des tyrosinphosphorylierten STAT3 in ITGB5-transfizierten EPCs im Vergleich zu Vektor-transfizierten EPCs (Anstieg von $50,3\pm3,3\%$ bei Kontroll-EPCs auf $79\pm5,5\%$ bei ITGB5-transfizierten EPCs; $p<0,01$; **Abbildung 22A und B**) nachweisen. Wie in **Abbildung 23A** dargestellt und in **Abbildung 23B** quantitativ zusammengefasst, erhielten wir vergleichbare Ergebnisse in der Western Blot-Analyse (Anstieg der Tyrosinphosphorylierung auf $194,1\pm19\%$ im Vergleich zu Vektor-transfizierten EPCs, welche als 100% definiert wurden; $p<0,001$). Um zu belegen, dass die Aktivierung von STAT3 spezifisch über das $\alpha\beta5$ -Integrin vermittelt wird, wurde die STAT3-Phosphorylierung in ITGB5-transfizierten EPCs nach der Inkubation der EPCs mit dem $\alpha\beta5$ -neutralisierenden AK in der Western Blot-Analyse quantifiziert. Hier zeigte sich, dass die funktionelle Blockade des $\alpha\beta5$ -Integrins zu einer signifikant reduzierten STAT3-Phosphorylierung ($99\pm1,9\%$, $p<0,05$) führte (**Abbildung 23A und B**).

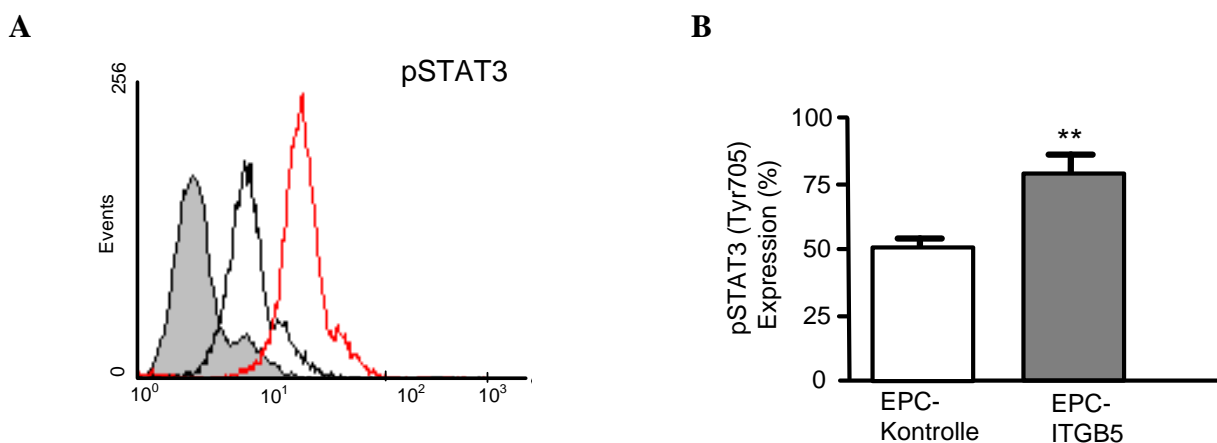


Abb. 22: Durchflusszytometrischer Nachweis der gesteigerten STAT3-Phosphorylierung bei ITGB5-transfizierten EPCs. **A)** Durchflusszytometrische Untersuchung der intrazellulären STAT3-Phosphorylierung (an Tyrosin 705). Darstellung eines repräsentativen Histogramms der IgG-behandelten Isotypkontrolle (grau), der Vektor-transfizierten EPCs (schwarz) und der ITGB5-transfizierten EPCs (rot) **B)** Zusammenfassung der quantitative Analyse von $n = 6$ unabhängigen Experimenten. $**p<0,01$.

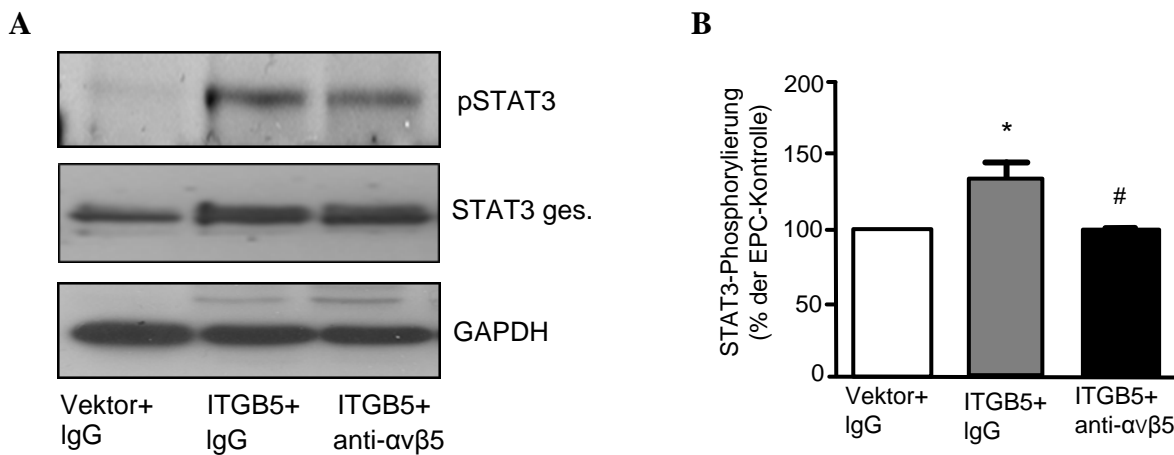


Abb. 23: Verminderte Aktivierung von STAT3 in ITGB5-transfizierten EPCs durch den Einsatz neutralisierender $\alpha\beta 5$ -AK. **A)** Analyse der Tyrosinphosphorylierung (an Position Tyr705) bei Vektor- bzw. ITGB5-transfizierten EPCs nach Präinkubation der EPCs mit IgG bzw. $\alpha\beta 5$ -neutralisierendem AK. Darstellung repräsentativer Western Blot-Analysen **B)** Zusammenfassung der densitometrischen, quantitativen Analyse von $n = 9$ unabhängigen Experimenten. Ergebnisse sind als % der Vektor-transfizierten EPCs angegeben (=100%). * vs. EPC-Kontrolle + IgG, # vs. EPC-ITGB5 + IgG. * $p < 0,05$ und # $p < 0,05$.

Nach der Aktivierung von STAT3 durch Tyrosinphosphorylierung kommt es zur Ausbildung von STAT3-Dimeren, gefolgt von einer Translokation in den Nukleus, wo die Bindung des STAT3-Dimers an die Promotorregionen der Gene, die durch STAT3 kontrolliert werden, erfolgt und es damit zur Beeinflussung der Gentranskription kommt. Wie in **Abbildung 24** dargestellt, konnte mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen gezeigt werden, dass in Vektor-transfizierten EPCs pSTAT3 vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert war, während in ITGB5-transfizierten EPCs eine überwiegend nukleäre Lokalisation des Transkriptionsfaktors gefunden wurde. Übereinstimmend konnte in der Western Blot-Analyse, die nach Zellfraktionierung der Vektor- bzw. ITGB5-transfizierten EPCs erfolgte, eine signifikant gesteigerte nukleäre Lokalisation von pSTAT3 in ITGB5-transfizierten EPCs im Vergleich zur Vektor-transfizierten Kontrollgruppe nachgewiesen werden ($135,2 \pm 10\%$ der EPC-Kontrolle; $p < 0,01$) Demgegenüber liess sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des zytoplasmatisch lokalisiertem pSTAT3 zwischen den ITGB5-transfizierten EPCs und der EPC-Kontrolle ausmachen (EPC-Kontrolle als 100% vs. $74,2 \pm 16,3\%$ bei EPC-ITGB5; $p = 0,09$) (**Abbildung 25A und B**).

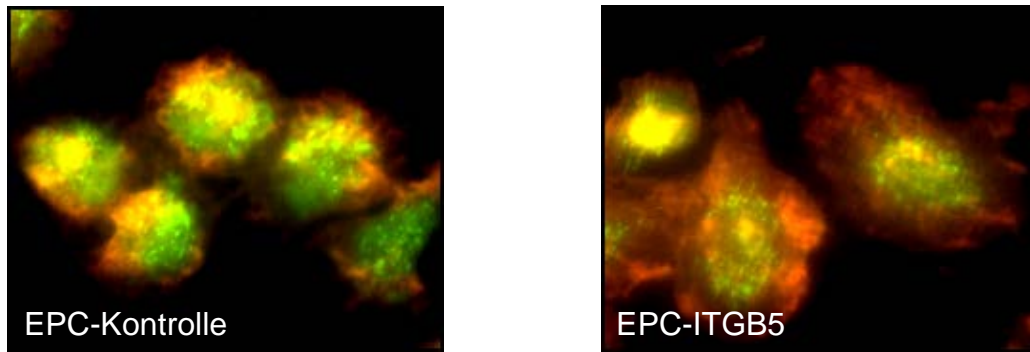


Abb. 24: Immunfluoreszenzfärbung zur Detektion von pSTAT3. pSTAT3 (grün), Gegenfärbung des Zytoskeletts mit Rhodamin-Phalloidin (rot). In ITGB5-transfizierten EPCs lässt sich eine vorwiegend nukleäre Lokalisation von pSTAT3 detektieren, wohingegen pSTAT3 in den Vektor-transfizierten EPCs überwiegend im Zytoplasma lokalisiert ist.

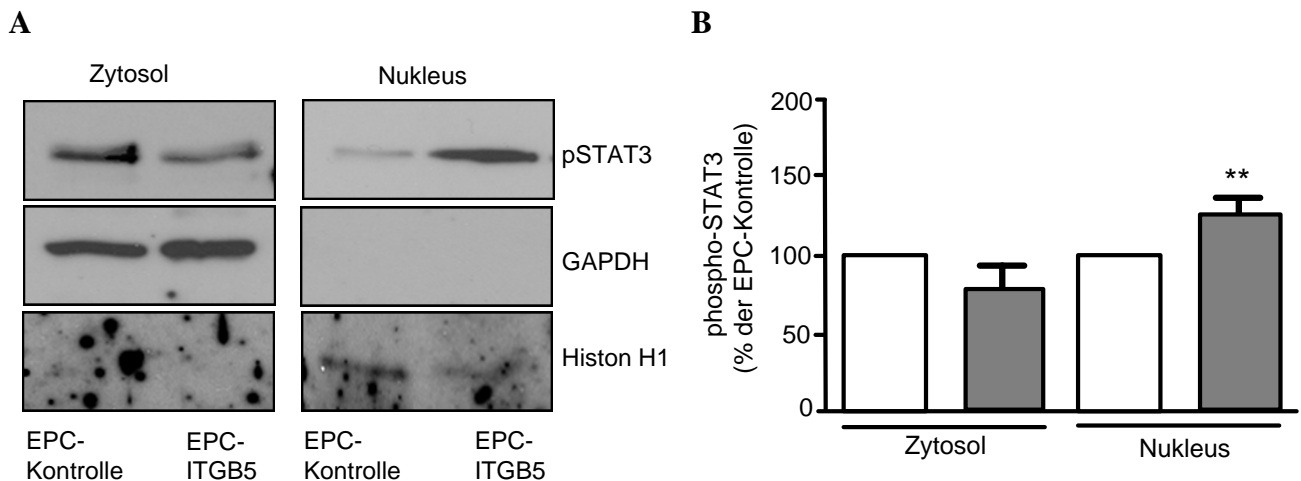


Abb. 25: Western Blot-Analyse zum Nachweis der Lokalisation von pSTAT3. A) Western Blot-Analyse gegen pSTAT3 nach Zellfraktionierung von ITGB5- bzw. Vektor-transfizierten EPCs. Der Nachweis des Zellkompartiments, in dem pSTAT3 detektiert wurde, erfolgte über GAPDH als Marker für das Zytosol und Histone H1 für den Nukleus. B) Zusammenfassung der densitometrischen Messungen von n = 5-7 unabhängigen Experimenten, dargestellt als % von der EPC-Kontrolle (=100%). Weißer Balken: EPC-Kontrolle, grauer Balken: EPC-ITGB5. **p<0,01.

3.6.2 Die angiogenetischen Effekte der Integrin $\beta 5$ -Überexpression konnten durch Hemmung von STAT3 aufgehoben werden

3.6.2.1 Nachweis der verminderten Aktivierung von STAT3

Um die Rolle der STAT3-Aktivierung bei der Vermittlung der proangiogenetischen Fähigkeiten Integrin $\beta 5$ -überexprimierender EPCs zu bekräftigen, wurden Experimente in Anwesenheit eines Zellmembran-permeablen STAT3-Inhibitors, der spezifisch auf die STAT3-Sulfhydryl-2-Domäne abzielt und so die STAT3-abhängige Gentranskription blockiert, durchgeführt. Wie in **Abbildung 26** anhand von Immunfluoreszenzfärbungen optisch dargestellt, führt die Präinkubation der ITGB5-transfizierten EPCs mit dem STAT3-Inhibitor zu einer Reduktion der STAT3-Phosphorylierung. Zudem lassen die Immunfluoreszenzfärbungen eine verminderte nukleäre Translokation von pSTAT3 in ITGB5-transfizierten EPCs, die mit dem STAT3-Inhibitor vorbehandelt wurden, vermuten.

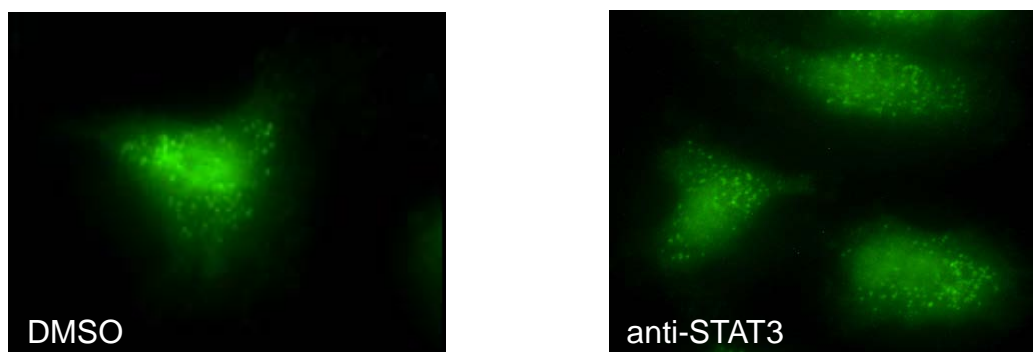


Abb. 26: Immunfluoreszenzfärbung von STAT3 in EPCs. Immunfluoreszenzfärbung von pSTAT (grün) nach Präinkubation der ITGB5-transfizierten EPCs mit dem STAT3-Inhibitor bzw. DMSO als Negativkontrolle. Optisch imponiert die grüne Fluoreszenz in der Negativkontrolle zentral lokalisiert, während eine Reduktion der nukleären Translokation von pSTAT3 in den anti-STAT3 behandelten EPCs gefunden wurde.

3.6.2.2 Die Integrin $\alpha \beta 5$ -vermittelte Aktivierung von STAT3 erhöht spezifisch die angiogenetische Kapazität von EPCs

Dass der Aktivierung von STAT3 eine entscheidende Funktion bei der Vermittlung der proangiogenetischen Fähigkeiten ITGB5-transfizierter EPCs im Rahmen der Angiogenese zukommt, wurde dadurch bestätigt, dass die Effekte der Integrin $\beta 5$ -Überexpression durch die Präinkubation der ITGB5-transfizierten EPCs mit dem STAT3-Inhibitor in den funktionellen Assays *in vitro* aufgehoben werden konnten.

Wie in **Abbildung 27A** optisch dargestellt und in **Abbildung 27B** quantitativ zusammengefasst, zeigte sich zum einen eine signifikant reduzierte Migration zu dem Integrin $\alpha\beta 5$ -Liganden VN im *Boyden-chamber*-Assay nach Inkubation der ITGB5-transfizierten EPCs mit dem STAT3-Inhibitor ($51,4 \pm 2,31$ EPCs/Gesichtsfeld bei EPC-ITGB5 + DMSO im Vergleich zu $6,9 \pm 1,4$ Zellen/Gesichtsfeld bei EPC-ITGB5 + anti-STAT3; $p < 0,001$). Darüber hinaus führte die Anwesenheit von anti-STAT3 zu einer Reduktion der Adhäsion ITGB5-transfizierter EPCs an das endotheliale Netzwerk im Matrigel-Angiogenese-Assay ($2,86 \pm 0,26$ EPCs/mm Netzwerk bei EPC-ITGB5 + DMSO im Vergleich zu $0,75 \pm 0,1$ EPCs/mm Netzwerk bei EPC-ITGB5 + anti-STAT3; $p < 0,001$) (**Abbildung 27A und 27C**).

Demgegenüber hatte die Anwesenheit von anti-STAT3 kein Einfluss auf die Adhäsion der ITGB5-transfizierten EPCs an VN im Zell-Adhäsions-Assay ($18,7 \pm 1,6$ adhärenzte EPCs/Gesichtsfeld bei EPC-ITGB5 + DMSO im Vergleich zu $18,2 \pm 2,1$ EPCs/Gesichtsfeld bei EPC-ITGB5+anti-STAT3; $p = 0,87$ (**Abbildung 27A und D**).

A

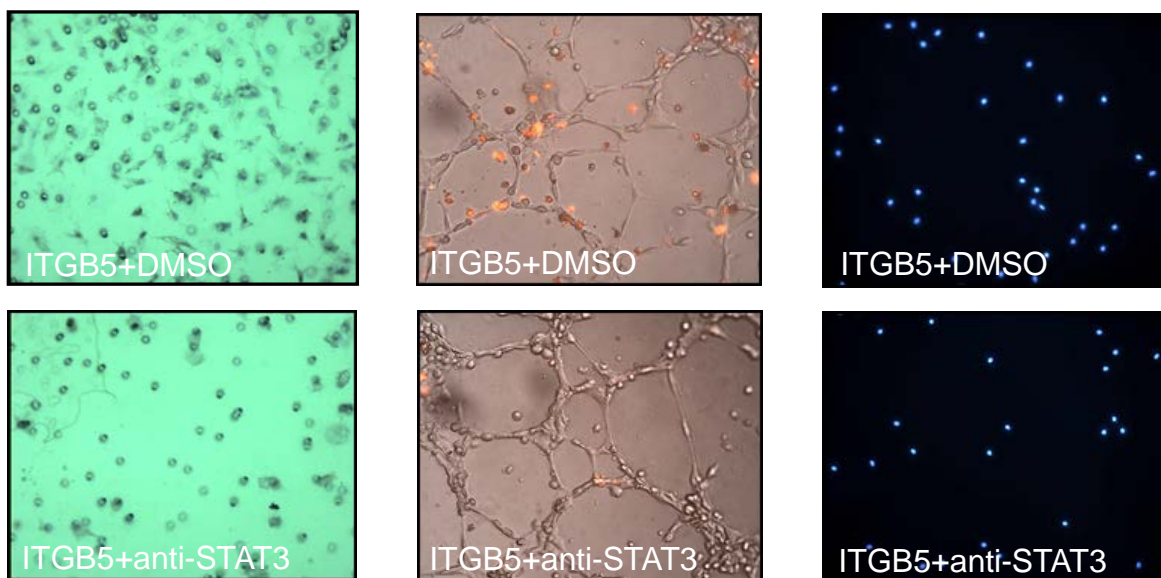


Abb. 27: Effekte der Hemmung von STAT3 auf die proangiogenetischen Fähigkeiten von ITGB5-transfizierten EPCs in *In-vitro*-Assays. A) **Repräsentative mikroskopische Bilder:** Reduktion der Migration im Transmigrations-Assay (links) und der Adhäsion an endotheliale Netzwerke im Matrigel-Angiogenese-Assay (Mitte) nach Inkubation mit STAT3-neutralisierenden AK. Es zeigt sich kein Effekt auf die Adhäsion an VN im Adhäsionsassay (rechts). Als Negativkontrolle erfolgte die Präinkubation mit DMSO.

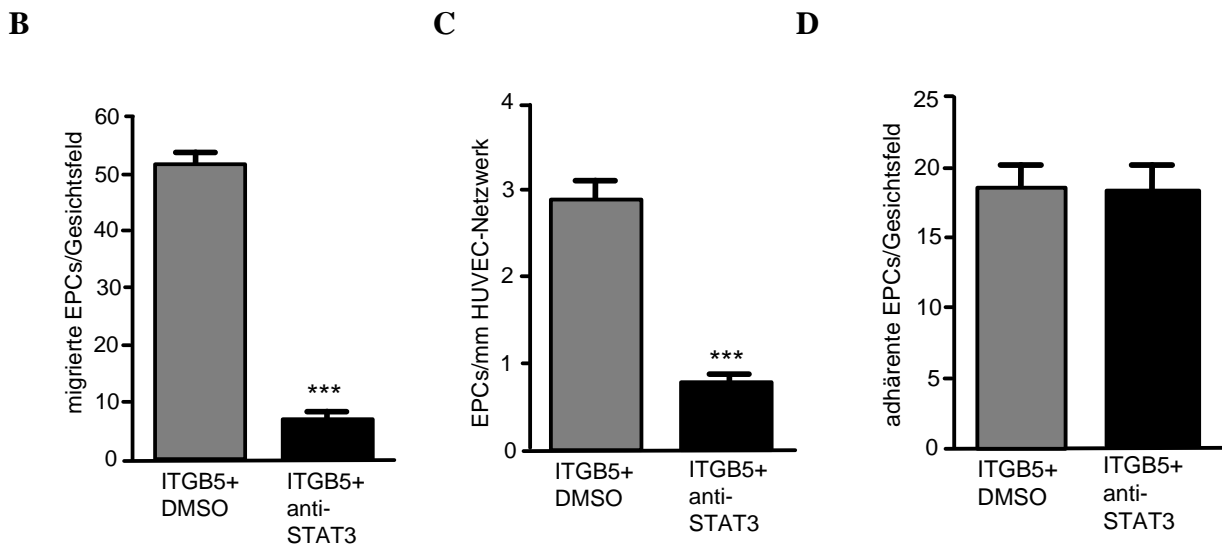


Abb. 27B, C und D: Quantitative Analyse: **B)** Quantitative Zusammenfassung der migrierten EPCs/Gesichtsfeld. n=3. ###p<0,001. **C)** Quantitative Auswertung adhärrierter EPCs/mm Netzwerk von n = 3 unabhängigen Experimenten. ###p<0,001. **D)** Quantitative Auswertung adhärenter EPCs/Gesichtsfeld von n = 3 unabhängigen Experimenten. p= 0,87.

3.6.2.3 STAT3 ist Teil des Signaltransduktionsweges zwischen dem Integrin $\alpha v \beta 5$ und dem IL-8 und MCP-1-kodierenden Gen

Nachdem wir zeigen konnten, dass sowohl STAT3 als auch die Zytokine IL-8 und MCP-1 in die Integrin $\alpha v \beta 5$ -vermittelte Förderung der proangiogenetischen Fähigkeiten von EPCs involviert sind, kam die Frage auf, ob die Expression der oben genannten Zytokine STAT3-abhängig reguliert wird. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die ITGB5-transfizierten EPCs vor Entnahme des CdM mit anti-STAT3 präinkubiert. Im 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay konnte, wie in **Abbildung 28A und B** dargestellt, gezeigt werden, dass der Effekt des CdM ITGB5-transfizierter EPCs auf das Aussprossungsverhalten der HUVECs komplett aufgehoben werden konnte ($2902 \pm 695,6 \mu\text{m}$ bei der EPC-Kontrolle, $6338 \pm 163,3 \mu\text{m}$ bei EPC-ITGB5 + DMSO und $2940 \pm 171,2 \mu\text{m}$ bei EPC-ITGB5 + anti-STAT3; p<0,001).

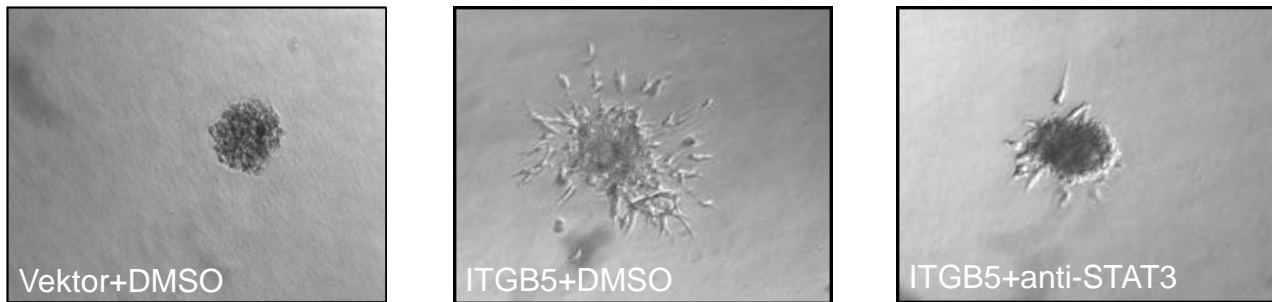
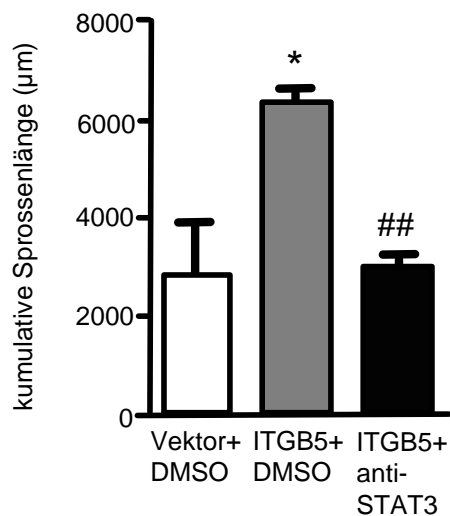
A**B**

Abb. 28: Effekte der Hemmung von STAT3 auf das Aussprossungsverhalten von HUVECs im 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay. **A)** Repräsentative Bilder zur Darstellung der Wirkung des CdM auf das Aussprossungsverhalten von HUVECs nach Präinkubation ITGB5-transfizierter EPCs mit anti-STAT3 bzw. DMSO als Negativkontrolle. 40fache Vergrößerung. **B)** Die quantitative Analyse demonstriert eine hochsignifikante Reduktion der kumulativen Sprosslänge bei HUVECs, die mit CdM von ITGB5-transfizierten EPCs behandelt wurden, nachdem diese zuvor mit anti-STAT3 präinkubiert waren. * vs. Vektor-transfizierte EPC, # vs. EPC-ITGB5. n=3. *p<0,05 und ###p<0,001.

Die Hypothese, dass die STAT3-Aktivierung die Expression der Zytokine IL-8 und MCP-1 reguliert, konnte mit Hilfe des Zytokin-Arrays erhärtet werden. Im CdM ITGB5-transfizierter EPCs, die mit anti-STAT3 AK präinkubiert worden waren, ließ sich eine reduzierte Menge von IL-8 und MCP-1 nachweisen, im Vergleich zu ITGB5-transfizierten EPCs, die mit DMSO behandelt wurden (**Abbildung 29**). RT-PCR-Analysen bestätigten, dass die Hemmung von STAT3 in ITGB5-transfizierten EPCs zu einer Aufhebung der erhöhten mRNA-Expression des Zytokins MCP-1 (Werte werden als relative Induktion angegeben, wobei die EPC-Kontrolle als 1 definiert ist; $1,45 \pm 0,18$ bei EPC-ITGB5 + DMSO vs. $0,41 \pm 0,15$ bei EPC-ITGB5 + anti-STAT3; $p < 0,05$) führt. Bei IL-8 konnte dieser Effekt nicht bestätigt werden ($p = 0,21$). Allerdings konnte in den untersuchten EPCs auch kein ITGB5-Effekt detektiert werden. (**Abbildung 30A und B**). Diese Ergebnisse belegten, dass STAT3 Teil des Signaltransduktionsweges zwischen dem $\alpha\beta 5$ -Integrin und dem IL-8 bzw. MCP-1 kodierenden Gen ist.

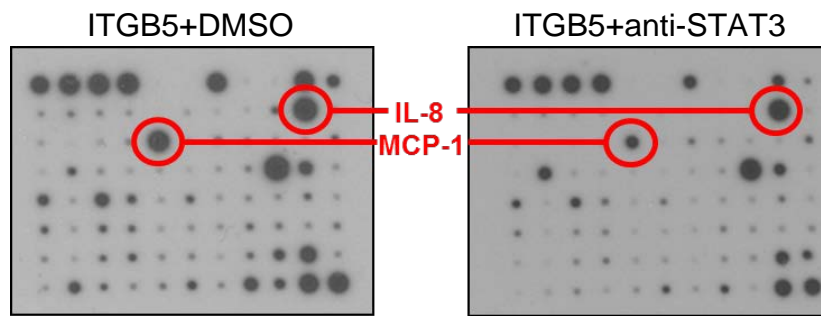


Abb. 29: Effekte der Hemmung von STAT3 auf die Sekretion von MCP-1 und IL-8. Die Präinkubation der ITGB5-transfizierten EPCs mit anti-STAT3 AK führt zu einer reduzierten Sekretion der Zytokine IL-8 und MCP-1 im CdM. Gezeigt sind repräsentative Bilder des Zytokin-Arrays.

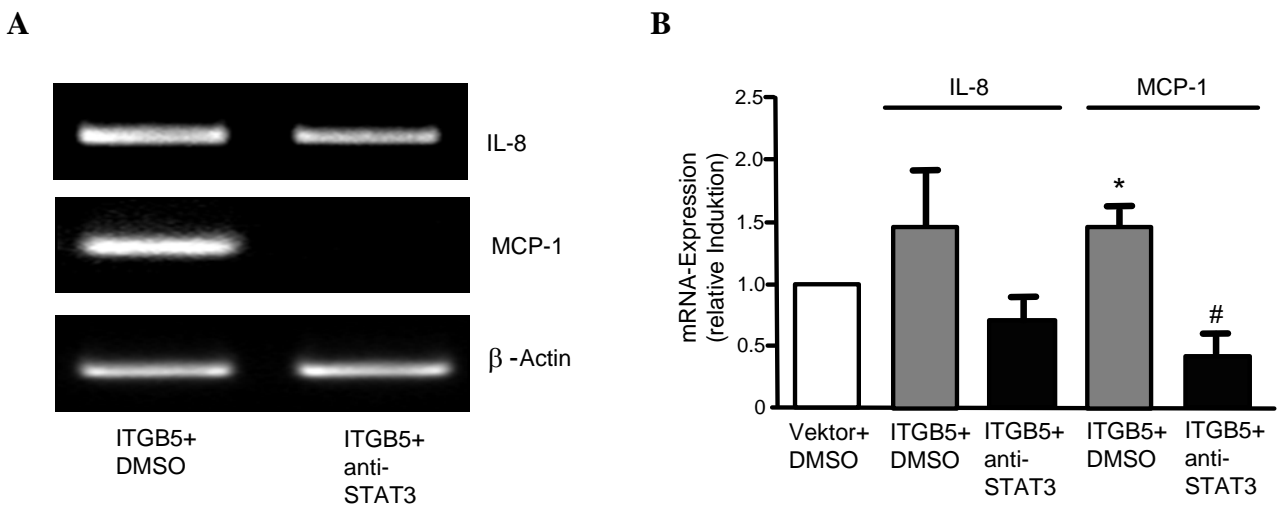


Abb. 30: Nachweis der reduzierten Genexpression von MCP-1 durch die Hemmung von STAT3 in der RT-PCR-Untersuchung. A) Repräsentative Bilder von Agarose-Gelen der RT-PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression der Zytokine IL-8 und MCP-1 in CdM von ITGB5-transfizierten EPCs, die mit anti-STAT3 bzw. DMSO präinkubiert wurden. B) Zusammenfassung der densitometrischen Messungen von n = 3 unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse sind als relative Induktion angegeben, wobei die EPC-Kontrolle als 1 definiert ist. * vs. EPC-Kontrolle, # vs. EPC-ITGB5. #p<0,05 bei MCP-1 und p=0,21 bei IL-8.

4 Diskussion

In der Vergangenheit wurde beschrieben, dass dem Integrin $\alpha\beta 5$ eine entscheidende Rolle in der Regulation der Angiogenese zukommt (Friedlander et al. 1995, Eliceiri et al. 2002, Mahabeleshwar et al. 2007). Neben reifen Endothelzellen sind im peripheren Blut zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen an der postnatalen Angiogenese beteiligt (Asahara et al. 1997 und 1999). Studien unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die Stimulation endothelialer Vorläuferzellen mit humanem rekombinanten Leptin die Expression des Integrins $\alpha\beta 5$ erhöht, und zu einer $\alpha\beta 5$ -spezifischen Steigerung der proangiogenetischen Fähigkeiten von *early-outgrowth* EPCs *in vitro* und *in vivo* führt (Schroeter et al. 2008, Heida et al. 2010). Während bislang mehrfach eine zytokinvermittelte Aktivierung von Integrin $\alpha\beta 5$ mit konsekutiver Steigerung der Angiogenese belegt werden konnte (Friedlander et al. 1995, Eliceiri et al. 1998 und 2002, Mahabeleshwar et al. 2007), bleiben die molekularen Mechanismen und intrazelluläre Signaltransduktionswege, die an der Vermittlung des $\alpha\beta 5$ -Effektes beteiligt sind, weitestgehend unbekannt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass die Überexpression des Integrins $\alpha\beta 5$ sowohl *in vitro* als auch *in vivo* spezifisch zu einer signifikanten Steigerung der Fähigkeit von EPCs führt, in verschiedene Abschnitte des angiogenetischen Prozesses einzugreifen und diese zu fördern. Der Effekt scheint dabei von der spezifischen Aktivierung des $\alpha\beta 5$ -Integrins sowie der Aktivierung und nukleären Translokation von STAT3 abhängig zu sein, welche zu einer Steigerung der mRNA- und Protein-Expression und Sekretion der proangiogenetischen Zytokine IL-8 und MCP-1 führte. Die angiogenetischen Effekte ließen sich durch die Inkubation der EPCs mit neutralisierenden AK gegen Integrin $\alpha\beta 5$, STAT3-Inhibitoren sowie neutralisierende AK gegen die Zytokine MCP-1 und IL-8 aufheben. Diese Resultate legten die Vermutung nahe, dass der $\alpha\beta 5$ -Effekt parakrin durch die angiogenetischen Zytokine IL-8 und MCP-1 vermittelt wird, deren Expression auf Genebene durch den Transkriptionsfaktor STAT3 gesteuert wird.

4.1 Charakterisierung endothelialer Progenitorzellen und Definition als *early-outgrowth* EPCs

EPCs rückten das erste Mal 1997 in den Fokus der Wissenschaft, als Ashara et al. eine im humanen Blut zirkulierende Zellpopulation beschrieben, die sowohl CD34 als auch VEGFR-2 als Oberflächenmarker für hämatopoetische Stammzellen bzw. reife Endothelzellen exprimiert, und die Fähigkeit besitzt, sich unter endothelialen Kultivierungsbedingungen zu Zellen mit endotheliale Charakter zu differenzieren. Die Zellen wurden als endotheliale Progenitorzellen bezeichnet. Die

Tatsache, dass in den folgenden Jahren eine Inkorporation der aus dem Knochenmark stammenden EPCs in die Neovaskularisationszone verschiedener Gewebe beschrieben werden konnte (Asahara et al. 1997 und 1999), führte zu einer Änderung des Verständnisses der postnatalen Angiogenese, die nun nicht mehr lediglich als Aussprossung präexistierender Gefäße durch Proliferation ortsständiger Endothelzellen verstanden wurde, sondern als multifaktorieller Prozess, bei dem EPCs sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen involviert sind.

Zur Aufrechterhaltung eines bedarfsadaptierten Gefäßsystems, das ständigen Umbauprozessen im Rahmen von Gewebsregeneration und vaskulären Heilungsprozessen unterliegt, sind für die postnatale Angiogenese eine Vielzahl differenter Zellen essentiell (Schmeisser et al. 2001, Urbich et al. 2003, Deindl und Schaper 2005, Wassmann et al. 2006), die initial alle der Gruppe der EPCs zugeordnet wurden. Während einige der aus dem peripheren Blut in die Neovaskularisationszone rekrutierten Zellen in die Endothelschicht neu aussprossender Gefäße inkorporieren und das Gefäß nach luminal auskleiden (Zhang et al. 2002, Werner et al. 2003), scheinen andere Zellen die Formation neuer Blutgefäße durch die Sekretion von Zytokinen und parakrine Stimulation benachbarter Zellen sowie durch den Umbau der ECM durch die Aktivierung von Metalloperoxidasen zu unterstützen (Urbich et al. 2005, Zentilin et al. 2006).

Auch für die Isolation der EPCs aus dem peripheren Blut wurden verschiedene Protokolle etabliert (Asahara et al. 1997, Ito et al. 1999, Vasa et al. 2001, Hill et al. 2003), so dass immer mehr kontroverse Daten bezüglich der Phänotypisierung, des Verhaltens der Zellen unter Kultivierungsbedingungen und ihrer Funktion im Rahmen der Angiogenese erhoben wurden. Letztendlich wurden von Hirschi et al. 2008 der erste Versuch unternommen, die heterogene Zellpopulation der EPCs anhand ihres Oberflächenmarkerprofils, ihres Isolationsprotokolls und ihres Potentials, in die postnatale Angiogenese einzugreifen, in verschiedene Subtypen zu untergliedern, um ein besseres Verständnis der Zellen zu erlangen.

Die in dieser Arbeit verwendeten EPCs wurden durch die Kultivierung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut gesunder menschlicher Spender gewonnen. Die an Tag 4-7 auf den mit FN beschichteten Zellkulturplatten adhären, unter endothelialen Wachstumsbedingungen in Anwesenheit von FCS und endothelialen Wachstumsfaktoren kultivierten Zellen wurden selektiert. Gemäß dem von Vasa et al. 2001 etablierten Isolationsprotokoll wiesen die Zellen an Tag 7 in Kultur eine typische spindelförmige Morphologie auf und lagen entweder als einzelne Zelle oder in Zellverbänden mit zentral gelegenen runden und peripher angeordneten spindelförmigen Zellen vor. Das gleiche Verhalten wurde schon von Asahara et al. 1997 beschrieben und erinnert an die

Formation von Blutinseln (Riseau und Flamme 1995). Die Zellen exprimierten endothelspezifische Oberflächenmarker wie VEGFR-2, vWF und CD31 und besaßen die Fähigkeit der Aufnahme von acLDL durch den Scavenger-Phagozytoseweg (Voyta et al. 1984, Ashara et al. 1997) und die Bindung von Lectin (Holthofer et al. 1982). Die Kombination aus der Expression endothelialer Oberflächenmarker und der Aufnahme von acLDL und Bindung von Lectin wird als Definition für EPCs verwendet (Asahara et al. 1997, Kalka et al. 2000, Vasa et al. 2001). Dieser Phänotyp konnte bei den in dieser Arbeit verwendeten EPCs nachgewiesen werden, wobei sich keine signifikante Änderung des Expressionsmusters endothelialer Oberflächenmarkern bei den Integrin $\beta 5$ -überexprimierenden EPCs zeigte, so dass auch hier von einem endothelialen Phänotyp auszugehen war.

Jedoch weisen die in der Literatur als EPCs definierten Zellen auch monozytäre Oberflächenantigene wie CD11b und CD14 auf, wobei für Monozyten ebenfalls die Fähigkeit der Aufnahme von acLDL (Voyta et al. 1984) und Bindung von Lectin (Rohde et al. 2006) nachgewiesen werden konnte. Auf Grund der engen Korrelation von Phänotyp und Charakteristik, der Isolationsmethode und der Kultivierungsbedingungen wurde von einigen Arbeitsgruppen die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei den vaskulären endothelialen Zellen um Zellen monozytären Ursprungs handelt, die sich unter spezifischen Bedingungen zu Endothel-ähnlichen Zellen differenzieren und nicht um endotheliale Vorläuferzellen im eigentliche Sinne (Schmeisser et al. 2001 und 2003, Urbich et al. 2003, Rohde et al. 2006, Zhang et al. 2006). Von anderen Autoren hingegen wird propagiert, dass eine Untergruppe der Monozyten selbst als potente zirkulierende angiogenetische Zellen ohne vorangegangene Transdifferenzierung zu endothelialen Zellen an der vaskulären Regeneration beteiligt sind (O'Neill et al. 2005). Diese Tatsache führte zu einer Änderung der Nomenklatur von EPCs, die in zwei große Subtypen untergliedert wurden, den *early-outgrowth* EPCs oder in Anbetracht des unklaren Ursprungs und Heterogenität dieser Zellen besser als *circulating angiogenic cells* (CAC) bezeichnet, und den *late-outgrowth* EPCs, gelegentlich auch als *endothelial colony unit-forming cells* (ECUF) deklariert. Im Gegensatz zu CACs weisen die erstmals von Lin et al. 2000 beschriebenen ECUFs ein hohes Proliferationspotential auf und besitzen die Fähigkeit *in vitro* kapillarähnliche Strukturen und somit funktionsfähige reife Endothelzellen zu bilden und erfüllen so die Definition echter Progenitorzellen. Auf Grund der fehlenden Expression hämatopoetischer Oberflächenantigene können sie als Zellen endothelialen Ursprungs deklariert werden. (Ingram et al. 2005, Hirschi et al. 2008).

CACs stellen eine heterogene Gruppe angiogenetischer Zellen mit geringem Proliferationspotential dar, die nicht die Fähigkeit besitzen, eigenständig *in vitro* Gefäßstrukturen auszubilden (Hirschi et al. 2008). Während es sich bei dem Großteil der CACs um monozytäre Zellen handelt, stellt ein geringer Anteil der CACs Zellen endothelialen Ursprunges dar (Rehmann et al. 2003). Die Identifikation und Differenzierung zwischen diese Untergruppen scheint wie in der Studie von Urbich et al. 2003 gezeigt, schwierig, da von derselben mononukleären Zellfraktion isolierte CD14-positive und CD14-negative Zellen nach 7 Tagen Kultivierung das identische endotheliale Expressionsmuster aufwiesen und beiden Zellgruppen die Fähigkeit der strukturellen Inkorporation in die Neovaskularisationszone im Modell der Hinterlaufischämie mit konsekutiver Verbesserung der Vaskularisation zeigten. Im Gegensatz dazu konnten sowohl die frisch isolierten CD14-negativen als auch die CD14-positiven Zellen zu keiner Verbesserung der Neovaskularisation beitragen, was zeigt, dass die Differenzierung von Zellpopulationen allein anhand von Oberflächenmarkerprofilen nicht zielführend ist. In der gleichen Studie konnte gezeigt werden, dass zu Monozyten oder Makrophagen differenzierte Zellen keine Adhäsion an gefäßähnlichen Strukturen und eine geringere angiogenetische Kapazität aufwiesen, so dass die Klassifizierung von *early-outgrowth* EPCs anhand des einzigartigen funktionellen Verhaltens getroffen werden muss.

Übereinstimmend konnte für die in dieser Arbeit als EPCs bezeichneten Zellen kein Proliferationspotential, jedoch eine strukturelle Inkorporation der EPCs ohne direkte Bildung von Gefäßstrukturen im Matrigel-Angiogenese-Assay und im *In-vivo*-Modell der Hinterlaufischämie gezeigt werden, so dass sie als *early-outgrowth* EPCs zu definieren sind.

Ob es sich bei den in dieser Arbeit verwendeten CACs um EPCs monozytären Ursprunges handelt, die unter endothelialen Kultivierungsbedingungen auf Grund der von Monozyten bekannte große Adaptationsfähigkeit an sich ändernde Umgebungsbedingungen (Stout und Suttles 2004) Endothelzellcharakter entwickeln oder Zellen primär endothelialen Ursprunges, konnte nicht geklärt werden. Die Frage der Differenzierungsmöglichkeit zwischen diesen beiden Zellpopulationen bleibt auch in der Studie von Urbich et al. 2003 auf Grund der identischen proangiogenetische Fähigkeiten offen. Sicher ist jedoch, dass es sich bei den EPCs dieser Arbeit nicht um differenzierte Monozyten im eigentlichen Sinne handelt, da diese primär durch die Sekretion angiogenetischer Faktoren die Neovaskularisation fördern (Arras et al. 1998), nicht aber die Fähigkeit der strukturellen Inkorporation in das Gefäßnetzwerk besitzen (Urbich et al. 2003).

4.2 Effizienz der ITGB5-Transfektion: gesteigerte Ko-Expression von der α -Kette und deren Bindungspartnern

Das Integrin $\alpha\beta 5$ wird auf vielen verschiedenen Zelltypen, wie Keratinozyten und Fibroblasten, hämatopoetischen Zellen wie Monozyten (Huang et al. 2000), reifen Endothelzellen (Brooks et al. 1994, Eliceiri und Cheresh 1998), aber auch auf im peripheren Blut zirkulierenden *early-outgrowth* EPCs exprimiert (Heida et al. 2010, Schroeter et al. 2008). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Leptin-induzierte Steigerung der Oberflächenexpression des Integrin $\alpha\beta 5$ auf EPCs zu einer spezifischen Steigerung der Transmigration, Adhäsion und Inkorporation von EPCs in experimentell induzierte, arterielle Gefäßläsionen (Schroeter et al. 2008) sowie der angiogenetischen Kapazität von EPCs in *In-vitro*-Angiogenese-Assays und im *In-vivo*-Mausmodell der unilateralen Hinterlaufischämie führt (Heida et al. 2010). Basierend auf diesen Ergebnissen analysierten wir ITGB5-transfizierte EPCs in Bezug auf eine mögliche Steigerung der proangiogenetischen Fähigkeiten durch eine Integrin $\alpha\beta 5$ -Überexpression verglichen mit Vektor-transfizierten EPCs. Wie in PCR- und Western Blot-Analysen gezeigt, führte die ITGB5-Transfektion zu einer signifikanten Steigerung der Gentranskription und Proteinexpression der Integrin $\beta 5$ -Kette. Um einen bidirektionalen Kommunikationsaustausch zwischen Extra- und Intrazellulärraum zu ermöglichen, handelt es sich bei funktionsfähigen Integrinen um transmembrane Heterodimere (Hynes 2000a). Wie in immunhistochemischen und durchflusszytometrischen Analysen belegt werden konnte, zeigte sich nach der ITGB5-Transfektion eine signifikant gesteigerte Oberflächenexpression des $\alpha\beta 5$ -Integrins im Vergleich zu Vektor-transfizierten EPCs, dessen Aktivierung durch den Nachweis einer gesteigerten Tyrosinphosphorylierung im Western Blot belegt wurde. Neben der gesteigerten Oberflächenexpression des Integrins $\alpha\beta 5$ führte die ITGB5-Transfektion ebenfalls zu einer signifikanten Steigerung der Oberflächenexpression der α - und der $\beta 1$ -Kette und des Integrins $\alpha\beta 3$. Da es sich bei der α -Kette um den einzigen bekannten Bindungspartner der $\beta 5$ -Kette handelt (Hynes 2000a), ist ein vermehrtes Vorhandensein der α -Kette für die Bildung von funktionsfähigen Integrin $\alpha\beta 5$ -Heterodimeren bei gesteigerter Expression der $\beta 5$ -Kette obligat. Die vermehrte Bereitstellung der α -Kette könnte durch eine kompensatorisch gesteigerte Synthese dieser erfolgen. Eine andere Hypothese beinhaltet die Bereitstellung der α -Kette durch Trennung anderer Integrin-Heterodimere, bei denen die α -Untereinheit durch die α -Kette gebildet wird. Vermutlich wird durch die gesteigerte Expression der α -Kette über intrazelluläre Signaltransduktionswege die Synthese anderer Bindungspartner der α -Untereinheit vermittelt, wie der $\beta 1$ -Kette und der $\beta 3$ -Kette (Hynes 2000a), so dass auch eine gesteigerte Expression dieser Integri-

in den ITGB5-transfizierten EPCs nachgewiesen werden konnte. Um zu belegen, dass durch die ITGB5-Transfektion kein Einfluss auf die Expression anderer Integrine als auf die αv -Integrine genommen wird, wurde exemplarisch die $\beta 2$ -Kette durchflusszytometrisch analysiert, deren Expression sich unverändert zeigte. Um sicher zu gehen, dass die Expression anderer Integrine nicht beeinflusst wird, wären weitere umfassendere Analysen erforderlich gewesen, aber auf Grund des Verständnisses der bekannten Bindungspartner wurde in diese Arbeit auf weitere Untersuchungen verzichtet. Für einige der Integrine die durch die ITGB5-Transfektion vermehrt exprimiert werden, insbesondere für das Integrin $\alpha \beta 3$, konnten in vorangegangenen Studien proangiogenetische Eigenschaften belegt werden (Eiliceiri et al. 2002, Mahabelshwar et al. 2007). Um den Effekt dieser Integrine auf die Ergebnisse unserer Studien zu minimieren, wurden alle Ergebnisse dieser Arbeit durch die Verwendung neutralisierender, monoklonaler AK verifiziert. So konnte gezeigt werden, dass die beobachteten Effekt auf einer spezifischen Wirkung des $\alpha \beta 5$ -Integrins basierten.

Obwohl, wie oben dargelegt, die ITGB5-transfizierten EPCs als *early-outgrowth* EPCs definiert werden können, konnte nach 7 Tagen Kultivierung unter endothelialen Wachstumsbedingungen eine signifikante Zunahme des Zelldurchmessers und der Zelllänge bei ITGB5-transfizierten EPCs im Vergleich zu Vektor-transfizierten EPCs beobachtet werden. Möglicherweise führt die vermehrte Expression des Integrins $\alpha \beta 5$ über seine Funktion als Adhäsionsrezeptor für Moleküle der ECM über die Kommunikation mit und Umorganisation des Zytoskelettes zu einer gesteigerten Adhäsion auf der Zellkulturplatte und zur Ausbildung verlängerter Pseudopodien. Interessanterweise handelt es sich beim $\alpha \beta 5$ -Integrin primär um einen Vitronektinrezeptor (Smith et al. 1990, Hynes 1992). Die differente Morphologie ITGB5-überexprimierender EPCs konnte allerdings auf mit FN beschichteten Zellkulturplatten beobachtet werden. Grund hierfür kann zum einen in einer für Integrine bekannten, spezifischen Bindungsaffinität zu mehreren Liganden liegen, wobei in der Literatur bislang nur eine spezifische Bindung des $\alpha \beta 5$ -Integrins an VN beschrieben wurde (Hynes 1992). Eine Steigerung der Adhäsion auf FN $\alpha \beta 5$ -überexprimierender Zellen nach Stimulation mit Leptin konnte schon von Schroeter et al. dargelegt werden (Schroeter et al. 2008). Andererseits ist auch eine Kreuzreaktion durch die ebenfalls gesteigerte Expression des $\alpha \beta 3$ -Integrins als bekannter VN- und Fibronektinrezeptor (Smith und Cheresch 1988, Smith et al. 1990, Hynes 1992) nicht auszuschließen. Ebenso fungiert die hochexprimierte Integrin $\beta 1$ -Kette als Heterodimer mit der αv -Kette, aber auch mit anderen möglichen Bindungspartnern wie der αF - oder der αIIb -Kette, als potenter Fibronektinrezeptor (Hynes 1992), wobei eine kompensatorische Hochregulation der Expression dieser Bindungspartner der Integrin $\beta 1$ -Kette in dieser Arbeit nicht

untersucht wurde. Genauere Analysen bezüglich der Adhäsion Integrin ITGB5-überexprimierender EPCs wurden mittels des Adhäsionsassays (s.u.) untersucht.

4.3 Die Überexpression der Integrin β 5-Kette steigert die angiogenetische Kapazität endothelialer Vorläuferzellen *in vitro*

α v Integrine rückten in den Fokus wissenschaftlicher Analysen, um ihre exakte Funktion in vaskulären Prozessen zu untersuchen, nachdem Brooks (Brooks et al. 1994a) und Friedlander (Friedlander et al. 1995) eine gesteigerte Expression dieser Integrine im Rahmen vaskulärer Umbauprozesse und der Angiogenese nachweisen konnten.

Während in Untersuchungen unter Verwendung α v-, α v β 3- und/oder α v β 5-neutralisierender Antikörper, *small interfering-RNA* (si-RNA) oder niedermolekularer Inhibitoren der o.g. Integrine sowohl *in vitro* als auch *in vivo* übereinstimmend eine Hemmung der physiologischen (Drake et al. 1995, Kroon et al. 2000, Kumar et al. 2001, Nisato et al. 2003) und der pathologischen Angiogenese bei Gewebischämie (Friedlander et al. 1996, Hammes et al. 1996), Inflammation (Storgard et al. 1999) und Tumorwachstum (Brooks et al. 1994a, 1994b und 1995, Kumar et al. 2001, Pisano et al. 2013) beschrieben werden konnte, ergaben Analysen mit *knockout*-Mäusen diskrepante Ergebnisse. So konnte in Studien mit α v-defizienten Mäusen initial eine normale intrauterine Entwicklung der Organe und Gewebe, inklusive des Gefäßsystems beschrieben werden (Bader et al. 1998, Mc Carty et al. 2002). Die Mäuse mit kompletter α v-Defizienz waren jedoch nicht überlebensfähig, wobei die Letalität bei 80% der Mäuse auf einem intrauterinen Fruchttod auf Grund einer plazentaren Entwicklungsstörung basierte. Die lebend geborenen Mäuse verstarben trotz der Entwicklung eines regulären zerebralen Gefäßnetzwerkes mit erhaltener Perizyt-Endothelzellinteraktion und ohne Defekte in der interendothelialen Interaktion (Endothel-Endothel-Zelljunctions) wenige Tage nach der Geburt an intrazerebralen oder interstitiellen Blutungen (Bader et al. 1998; McCarty et al. 2002). Ursächlich konnten McCarty et al. 2002 ultrastrukturelle Defekte der Assoziation der zerebralen Mikrogefäße mit den Zellen des umgebenden Hirnparenchyms detektieren. Befunde in β 8-defizienten Mäusen, die einen ähnlichen Phänotyp wie Integrin- α v-*knockout*-Mäuse mit Verlust der Adhärenz des Hirnparenchyms mit der Perivaskularscheide ausbilden, legen die Vermutung nahe, dass dieser Effekt im Zusammenhang mit der α v β 8-Defizienz zu sehen ist (Zhu et al. 2002). Diese Hypothese wird dadurch bekräftigt, dass Mäuse mit isolierter α v β 3- und/oder α v β 5-Defizienz überlebensfähig sind und keine intrazerebralen Hämorrhagien entwickeln (Hodivala-Dilke et al. 1999, Huang et al. 2000, McCarty et al. 2002).

Lediglich Mäusen mit isolierter null-Mutation der Integrin $\beta 3$ -Untereinheit zeigten eine erhöhte fetale Sterblichkeit, zum einen durch thromboembolische Ereignisse, zum anderen durch akute interstitielle und kutane Blutungen (Hodivala-Dilke et al. 1999). Während bei αv -*knockout*-Mäusen in der zweiten Schwangerschaftshälfte die Ausbildung von Dysmorphien wie nasale Deformitäten, Lippen-kiefergaumenspalten und ein Mikrocephalus beobachtet werden konnten (Bader et al. 1998), wiesen $\beta 5$ -defiziente Mäuse eine normale Entwicklung, Wundheilung, Wachstum und Reproduktion auf (Huang et al. 2000), so dass die von Bader (Bader et al. 1998) beschriebenen Phänomene am ehesten auf der αv -Defizienz basieren. Vielmehr konnte bei $\beta 3$ - bzw. $\beta 3$ - und $\beta 5$ -defizienten Mäusen eine gesteigerte Hypoxie- und VEGF-induzierte Angiogenese und eine vermehrte Tumorangiogenese mit konsekutiv gesteigertem Tumorwachstum gezeigt werden (Reynolds et al. 2002). Die Hypothese, dass αv -Integrinen eine essentielle Rolle in der Entwicklung eines normalen Gefäßsystems zukommt, muss auf Grund dieser Daten in Frage gestellt werden. Eine mögliche Ursachen für die widersprüchlichen Ergebnisse bisheriger Studien könnte darin liegen, dass in den Experimenten mit *knockout*-Mäusen die Mitwirkung der αv -Integrine an dem angiogenetischen Prozess durch überlappende Funktionen verschiedener Integrine, Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle und kompensatorisch gesteigerte Expression, unterschätzt wird (Hynes et al. 2002b). So konnten Reynolds et al. 2002 eine gesteigerte Expression von VEGFR-2 in Endothelzellen $\beta 3$ -defizienter Mäuse nachweisen. Andererseits besteht bei der Verwendung neutralisierender AK die Gefahr, dass die Bedeutung der αv -Integrine durch fehlende Spezifität der AK überschätzt wird. Durch den Integrinrezeptor „*cross talk*“ sind Integrine in der Lage, den Aktivierungszustand anderer Integrine derselben Zelle zu beeinflussen (Kim et al. 2000a und 2000b). Über den Mechanismus der transdominanten Inhibition (Diaz-Gonzalez et al. 1996, Hynes 2002b, Gonzales et al. 2010) kann es durch den Einsatz von neutralisierenden AK nicht nur zur Hemmung des spezifischen Integrins, sondern auch zur konkordanten Hemmung anderer Integrine kommen (Gonzalez et al. 2002). Andererseits ist auch eine gesteigerte Aktivierung eines Integrins bei reduzierter Aktivierung des anderen Integrins möglich (Ly et al. 2003). Die gleiche Wirkung auf den Aktivitätszustand von Integrinen wurde auch für Wachstumsfaktoren wie VEGF beschrieben (Byzova et al. 2000). Eine andere Hypothese, die einen Erklärungsansatz für die diskrepanten Ergebnisse zwischen den genetischen Studien und den Versuchen mit Inhibitoren bietet, ist, dass Integrine möglicherweise die Fähigkeit besitzen, sowohl angiogenetische als auch antiangiogenetische Signale zu vermitteln. Ob ein Integrin durch positive oder negative angiogenetische Signale die Angiogenese reguliert, könnte von der Bindung an den spezifischen Liganden abhängig sein. Würden Integrine im gebundenen Zustand proangiogenetisch,

und im nicht-gebundenen Zustand antiangiogenetisch wirken, käme es bei fehlender Expression eines Integrins zum Übergewicht der proangiogenetischen Signale, was zu einer Steigerung der Angiogenese (Reynolds et al. 2002) führen kann. Wenn neutralisierende AK oder niedermolekulare Inhibitoren hingegen den ungebundenen Zustand der Integrine imitieren, würde daraus durch den Verlust des angiogenetischen Signals in der Summe einer Hemmung der Angiogenese resultieren. Möglicherweise besteht zudem ein positiver *feedback*-Mechanismus zwischen ligandengebundenen und nicht-gebundenen Integrinen, so dass die Gefäßneubildung nur in Anwesenheit eines spezifischen Liganden gefördert wird. Liegt der ungebundene Zustand durch die Verwendung von Inhibitoren vor, wird die Angiogenese gehemmt. In der Abwesenheit von Integrinen bei *knockout*-Mäusen entfällt der positive *feedback*-Mechanismus und die Angiogenese wird nicht beeinträchtigt oder sogar gefördert.

Neben der unvollständig verstandenen Bedeutung des Integrins $\alpha\beta 5$ im angiogenetischen Prozess ist unklar, welche Teilschritte der Angiogenese, als komplexer Prozess aus Degradation der ECM, Migration und Proliferation von Endothelzellen, Ausbildung von Gefäßstrukturen und Konstruktion der komplexen Gefäßwand durch die Überexpression des Integrins $\alpha\beta 5$ beeinflusst werden. Zum anderen war es ein Ziel dieser Studie zu untersuchen, ob die Überexpression des Integrins $\alpha\beta 5$ die Angiogenese durch eine direkte Steigerung der proangiogenetischen Fähigkeiten von EPCs moduliert. Dazu wurden EPCs nach 4 Tagen Kultivierung unter endothelialen Wachstumsbedingungen mit dem ITGB5-Vektor bzw. einem Kontrollvektor transfiziert, bevor ihre angiogenetischen Fähigkeiten in spezifischen Assays analysiert wurden. Die Initiierung des angiogenetischen Prozesses besteht aus dem *homing* der EPCs in die Neovaskularisationszone, z.B. nach Gewebischämie (Chavakis et al. 2008). Voraussetzung hierfür ist zum einen die Adhäsion der EPCs an Proteine der ECM, zum anderen die Transmigration in die Neovaskularisationszone. Um gezielt den Effekt der Integrin $\alpha\beta 5$ -Überexpression auf diese Teilschritte zu untersuchen, wurden zwei verschiedene *In-vitro*-Assays, der Zell-Adhäsions-Assay und der Transmigrations-Assay, durchgeführt.

Zell-Adhäsions-Assay

Im Zell-Adhäsions-Assay wurde die Wirkung der Integrin $\alpha\beta 5$ -Überexpression in Hinsicht auf die Fähigkeit der EPCs, an Proteine der ECM zu adhären, untersucht und eine signifikante und spezifische Steigerung der Adhäsion $\alpha\beta 5$ -überexprimierender EPCs an dem $\alpha\beta 5$ -Liganden VN dokumentiert. Diese Ergebnisse bestätigen, dass es sich bei dem Integrin $\alpha\beta 5$ primär um einen Vitronektinrezeptor handelt (Smith und Cheresch 1988, Smith et al. 1990).

Transmigrations-Assay

Wie in der Literatur beschrieben, scheinen αv Integrine, insbesondere das Integrin $\alpha v \beta 5$ eine Schlüsselrolle in der Zellmigration einzunehmen (Caiado und Dias 2012; Kim et al. 1994, Klemke et al. 1994). Um den Einfluss der $\alpha v \beta 5$ -Überexpression auf die migratorischen Fähigkeiten von EPCs in Richtung des $\alpha v \beta 5$ -Liganden VN zu analysieren, wurde der von Boyden 1962 etablierte und in den vergangenen Jahren modifizierte *Boyden-chamber*-Migrations-Assay verwendet.

Bei der Migration der EPCs in die Neovaskularisationszone spielen verschiedene synergistisch wirkende Aktivierungskomponenten, die Mechanotaxis, Chemotaxis und Haptotaxis zusammen. Während die Mechanotaxis die gerichtete Migration durch mechanische Wirkung beschreibt, wird unter dem Begriff der Chemotaxis die gerichtete Migration in Richtung eines Konzentrationsgradienten stimulierender Faktoren subsumiert. Bei der Haptotaxis handelt es sich um die Migration entlang eines Gradienten mobilisierter Liganden (Lamallice et al. 2007). Im *Boyden-chamber*-Assay ist eine Untersuchung der Chemotaxis und Haptotaxis möglich. Da es bei der Analyse der Chemotaxis unter Verwendung löslicher Wachstumsfaktoren wie VEGF und SDF-1 α zu einem raschen Konzentrationsausgleich zwischen der oberen und unteren Kammer des Transwellfiltersystems kommt und die beobachteten Effekte eher auf der Chemokinese (willkürliche, ungerichtete Migration), als auf eine gerichtete Migration zurückzuführen sind (Goodwin 2007), wurden keine löslichen Wachstumsfaktoren untersucht, sondern die unteren Seiten der Transwellfiltermembran mit VN beschichtet. Nach der Inkubationszeit zeigte sich eine signifikant vermehrte und spezifische Adhäsion ITGB5-transfizierter EPCs an der unteren Seite der Filtermembran. Neben Wachstumsfaktoren und Zytokinen besitzt VN die Fähigkeit, die gerichtete Lokomotion $\alpha v \beta 5$ -exprimierender Zellen, zu fördern (Kim et al. 1994, Klemke et al. 1994). Zur Induktion der Migration ist, auf Grund unterschiedlicher Signalkaskaden, eine vorherige Adhäsion an Proteine der ECM nicht essentiell (Klemke et al. 1994). Zudem führt die vermehrte Bindung des Integrins an den ECM-Liganden VN zu einer gesteigerten Zellmigration im Rahmen der Haptotaxis (Klemke et al. 1997), was hier durch die $\alpha v \beta 5$ -Überexpression weiter begünstigt wird. Die Ergebnisse unserer Studie belegen zum einen die Wirkung des Integrins $\alpha v \beta 5$ auf die Steigerung der migratorischen Kapazität von EPCs, zum anderen konnte eine chemotaktische Wirkung für VN auf $\alpha v \beta 5$ -exprimierenden EPCs nachgewiesen werden.

Proliferationsassay

Die Proliferation von Endothelzellen und die Hemmung der Apoptose sind Voraussetzung für die Bildung neuer Gefäße und somit Bestandteil des angiogenetischen Prozesses. Durch die Interaktion mit der ECM sind Integrine über verschiedene Signaltransduktionswege in den Zellzyklus zur Regulation von Proliferation und Apoptose involviert (Hynes 1992). Da Zellen in Lösung in die Apoptose übergehen (Meredith et al. 1993), und dieser Prozess auch durch die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren nicht unterbunden wird, ist eine Bindung endothelialer Zellen an die ECM oder die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten mit ortsständigen Endothelzellen via Integrine ist für das Überleben der Zellen essentiell. Die Bindung führt zu einem Ansprechen der Endothelzellen auf Wachstumsfaktoren, und der Prozess der Apoptose wird verhindert (Korff and Augustin 1998, Harrington et al. 2007). α v-Integrine scheinen in die Regulation des Zellzyklus involviert zu sein, da eine Hemmung des Integrins α v β 3 durch neutralisierende AK zur Induktion der Apoptose bei proliferierenden Endothelzellen im Rahmen der Angiogenese führt (Brooks et al. 1994b).

Im MTS-Assays wurde das proliferative Potential der EPCs analysiert. Hier ließ sich keine Zunahme der mitochondrialen Aktivität als Maß für die Zellvitalität über die Inkubationszeit von 4 Stunden messen, es zeigte sich keine signifikante Steigerung der Proliferation der EPCs durch ITGB5-Überexpression. Diese Ergebnisse decken sich mit dem in der Literatur beschriebenen, geringen Proliferationspotential der in unserer Studie verwendeten CACs (Hirschi et al. 2008).

Morphogenese-Assays

Die Angiogenese beinhaltet die Morphogenese von Endothelzellen in kapillarähnliche Gefäßstrukturen. Zum einen besteht die Möglichkeit der direkten Inkorporation von zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen an das ortsständige, reife Endothel der Elterngefäße um dort selbst Gefäßstrukturen auszubilden, zum anderen können zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen durch parakrine Stimulation reifer Endothelzellen die Ausbildung von Tochterkapillaren anregen. Um die Wirkung der α v β 5-Überexpression auf die Interaktionsfähigkeit der EPCs mit reifen Endothelzellen zu analysieren, wurden die 7 Tage kultivierten EPCs in zwei verschiedene *In-vitro*-Assays analysiert.

Matrigel-Angiogenese-Assay

Im Matrigel-Angiogenese-Assay wurden dafür die transfizierten EPCs mit HUVECs, die repräsentativ für die reifen Endothelzellen der Elterngefäße stehen, in Matrigel koinkubiert. Bei Matrigel handelt es sich um eine Gerüstmatrix, bestehend aus einem Gemisch von Proteinen der

ECM und der Basalmembran sowie Wachstumsfaktoren, die endotheliale Zellen zu einer raschen Ausbildung von Gefäßstrukturen durch Zellelongation anregen. Nach 8 Stunden Inkubationszeit zeigte sich ein 2-dimensionales, von HUVECs gebildetes Gefäßnetzwerk mit adhären, rundlich imponierenden, fluoreszenzmarkierten EPCs. Im Vergleich dazu wiesen HUVEC-Netzwerke, die mit $\alpha\beta 5$ -überexprimierenden EPCs koinkubiert worden waren, eine signifikante und spezifische Erhöhung der Anzahl inkorporierter EPCs auf. Die Wirkung der ITGB5-Überexpression kann mit den im Vorfeld beschriebenen Leptin-induzierten $\alpha\beta 5$ -Effekten verglichen werden (Heida et al. 2010). Die Tatsache, dass die EPCs im Rahmen der Angiogenese selbst keine Morphogenese durchlaufen und weiter im Vergleich zu den spindelförmig elongierten, reifen Endothelzellen als runde Zellen imponieren, deckt sich mit der Charakterisierung von *early-outgrowth* EPCs, die nicht die Fähigkeit der Gefäßstrukturbildung *in vitro* besitzen (Hirschi et al. 2008). Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die $\alpha\beta 5$ -Überexpression die Kapazität von EPCs mit reifen Endothelzellen zu interagieren, steigert, so dass übereinstimmend mit den Resultaten des Adhäsions- und Transmigrations-Assays von einer fördernden Wirkung des Integrins $\alpha\beta 5$ auf das EPC-*homing* auszugehen ist. Die Aussagekraft des Matrigel-Angiogenese-Assays ist jedoch begrenzt. Zum einen lässt sich lediglich die Anzahl der adhären EPCs als Maß für die Interaktionsfähigkeit der EPCs bestimmen. Mögliche parakrine Effekte, die gegebenenfalls Einfluss auf die Ausbildung des HUVEC-Gefäßnetzwerkes haben, lassen sich nicht beurteilen. Zum anderen bleibt der Aspekt, dass es sich bei der postnatalen Angiogenese um eine sprossende Angiogenese, von einem schon bestehenden Gefäßnetz ausgehend, handelt, unberücksichtigt, da in diesem Assay die Gefäßstrukturbildung innerhalb der ECM-Komponente ohne vorher bestehendes Endothelzellnetzwerk analysiert wird. Die Bildung des Endothelzellnetzwerkes findet erst während der Koinkubation von HUVECs und EPCs statt.

3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay

Der zweite in unserer Studie durchgeführte Morphogeneseassay war der 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay, dessen Vorteile darin zu sehen sind, dass eine komplexere Interaktion zwischen reifen Endothelzellen, hier ebenfalls durch HUVECs repräsentiert, und EPCs analysiert werden kann. Im Gegensatz zum Matrigel-Angiogenese-Assay werden 2 Parameter als Maß für die Interaktionsfähigkeit der mit den HUVECs koinkubierten EPCs herangezogen: 1) die kumulative Länge der von den HUVECs gebildeten Aussprossungen und 2) die Anzahl der migrierten EPCs entlang dieser Sprossen. Zudem imitiert der 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay die postpartale Angiogenese, die von einem bestehenden Endothelzellnetzwerk ausgeht. In der Absicht, die

Wirkung der Integrin $\alpha\beta 5$ -Überexpression auf die Interaktion der EPCs mit den HUVECs zu untersuchen, wurden zunächst die aus EPCs und HUVECs bestehenden Sphäroide für 24 Stunden in einer Matrix aus Kollagen Typ I und Methylzellulose inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationszeit zeigten sich 2 Effekte der $\alpha\beta 5$ -Überexpression:

Zum einen ließ sich bei den ITGB5-transfizierten EPCs eine signifikante Steigerung der migratorischen Kapazität im Vergleich zu Vektor-transfizierten EPCs verzeichnen. Diese Ergebnisse decken sich mit dem im Rahmen dieser Studie erhobenen Befund des Transmigrations-Assays. Zum anderen zeigten HUVECs, die mit Vektor-transfizierten EPCs koinkubiert wurden, eine mäßige Aussprossungsaktivität, die durch Inkubation mit $\alpha\beta 5$ -überexprimierenden EPCs signifikant gesteigert wurde. Für Sphäroide, die lediglich aus differenzierten Endothelzellen (z.B. HUVECs) bestehen, konnte gezeigt werden, dass sie aus Endothelzellen in zwei verschiedenen Aktivitätszuständen bestehen. Während sich im Zentrum der Sphäroide unorganisierte Endothelzellen befinden, die im zeitlichen Verlauf in die Apoptose übergehen, wird die Oberfläche der Sphäroide von ruhenden Endothelzellen gebildet, die die Fähigkeit besitzen, Zell-Zell-Kontakte auszubilden und durch die anschließende Exposition mit Wachstumsfaktoren wie VEGF und bFGF zur weiteren Differenzierung befähigt sind (Korff und Augustin 1998). Die Tatsache, dass auch die HUVECs mit EPCs der Kontrollgruppe Aussprossungen bilden, lässt darauf schließen, dass die Aussprossungsaktivität der HUVECs durch die Wirkung der koinkubierten EPCs beeinflusst wird. Das Ergebnis, dass die Aussprossung der HUVECs durch die Koinkubation mit ITGB5-transfizierten EPCs weiter gesteigert werden konnte, ließ die Hypothese aufkommen, dass die $\alpha\beta 5$ -Überexpression zu einer Zunahme der Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren führt. Interessanterweise konnte für Bindung von Integrinen mit Proteinen der ECM eine regulatorische Funktion für die Sekretion von Zytokinen durch EPCs beschrieben werden (Barsotti et al. 2011).

Um diese Hypothese zu bekräftigen, erfolgte die Inkubation der lediglich aus HUVEC bestehenden Sphäroide mit CdM, welches entweder von Vektor- oder ITGB5-transfizierten EPCs gewonnen worden war, oder EBM als Negativkontrolle. Nach 24 Stunden Inkubationszeit in der Kollagenmatrix zeigten die mit EBM inkubierten HUVECs keinerlei Aussprossungsaktivität, was mit den Ergebnissen von Korff und Augustin (1998) beschriebenen Ergebnissen in Einklang zu bringen ist. Die Inkubation mit CdM der EPC-Kontrollgruppe führte, wie schon bei der Inkubation mit den Vektor-transfizierten EPCs zu einer mäßigen Ausbildung von HUVEC-Sprossen. Die Tatsache belegt, dass die EPCs Wachstumsfaktoren oder Zytokine in das Medium sezernieren. Die

Aussprossungsaktivität zeigte sich durch die Inkubation der HUVECs mit CdM der $\alpha\beta5$ -überexprimierten EPCs signifikant gesteigert, so dass sich die Vermutung erhärtete, dass die Überexpression des Integrins $\alpha\beta5$ zu einer vermehrten Sekretion von Zytokinen führt.

Der stimulatorische Effekt auf die HUVECs durch die koinkubierten EPCs konnte im Matrigel-Angiogenese-Assay nicht beobachtet werden. Hier ließ sich kein signifikanter Unterschied der HUVEC-Netzwerklänge zwischen den beiden Versuchsgruppen messen. Die Ursache hierfür könnte in der unterschiedlichen Beschaffenheit der verwendeten Matrices in beiden Assays liegen. Während es sich bei der im Matrigel-Angiogenese-Assay verwendeten Matrix um eine Matrix handelt, die ursprünglich aus Sarkomzellen der Maus gewonnen wurde und selbst bei Verwendung einer wachstumsfaktorreduzierten Matrix multiple Wachstumsfaktoren enthält (Goodwin 2007), besteht die im Sphäroid-Angiogenese-Assay verwendete Matrix aus Kollagen und Methylzellulose und enthält keine Wachstumsfaktoren. Dadurch ist möglicherweise eine weitere Stimulation der HUVEC durch die von den EPCs sezernierten Wachstumsfaktoren im Matrigel-Angiogenese-Assay nicht mehr möglich. Dafür spricht, dass nach einer Inkubationszeit von 8 Stunden das gesamte Well von einem 2-dimensionalen HUVEC-Netzwerk durchzogen ist, wohingegen die Kollagenmatrix ein 3-dimensionales Aussprossen der Sphäroide ermöglicht.

4.4 Die Integrin $\alpha\beta5$ -Überexpression führt zu einer Verbesserung der EPC-induzierten Neovaskularisation nach Induktion einer Hinterlaufischämie im Mausmodell

Um die physiologische Relevanz der Integrin $\alpha\beta5$ -Überexpression im angiogenetischen Prozess zu untersuchen, wurde das Modell der unilateralen Hinterlaufischämie bei der Maus angewendet. Der Vorteil von *In-vivo*-Versuchen besteht darin, dass die physiologische Relevanz der Ergebnisse besser eingestuft werden kann als in *In-vitro*-Assays, da hier die Ergebnisse aus einem physiologischen Zusammenspiel verschiedener Zelltypen und Mediatoren resultieren.

Im Modell der unilateralen Hinterlaufischämie wird durch die Ligatur der *A. femoralis* in dem durch dieses Gefäß versorgten Maushinterlauf eine Ischämie induziert, welche einen Hauptfaktor für die postnatale Angiogenese darstellt. Schlüsselfaktor der Koppelung zwischen den metabolischen Bedürfnissen eines Gewebes und kompensatorischer Gefäßneubildung ist VEGF, dessen Expression auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene über den auf Endothelzellen exprimierten Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktor-1 (HIF-1) gesteuert wird (Liu et al. 1995, Dor et al. 1997, Carmeliet und Collen 2000). Auch für andere Faktoren, die an der

Initiierung der Angiogenese beteiligt sind, wie die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (*inducible nitric oxide synthase* [iNOS]) (Melillo et al. 1995), Angiopoietine und ihr Rezeptor Tie-2 (Currie et al. 2002), konnte eine Hypoxie-induzierte Genexpression nachgewiesen werden. Nach der Generierung proangiogenetischer Signale durch sich ändernde Stoffwechselbedürfnisse des Gewebes kommt es zu einem kaskadenartigen Ablauf des angiogenetischen Prozesses.

Die Extravasation zirkulierender EPCs in das ischämische Gewebe wird durch die Integrin-vermittelte Adhäsion an ortsständiges, reifes Endothel vermittelt (Chavakis et al. 2008), wobei dem Integrin $\alpha\beta5$ eine essentiell Rolle zukommt (Di Santo et al. 2008). Die Aktivierung der Integrine $\alpha\beta3$ und $\alpha\beta5$ erfolgt dabei über die Interaktion mit Wachstumsfaktoren wie bFGF und VEGF (Eliceiri et al. 2002, Mahabeleshwar et al. 2007), die aus der ECM der Neovaskularisationszone freigesetzt werden (Carmeliet und Jain 2011). Somit induziert die Gewebshypoxie im Modell der Hinterlaufischämie indirekt über VEGF auch eine Aktivierung von $\alpha\beta5$. Für Integrin $\alpha\beta5$ konnte in vorangegangenen Studien einerseits gezeigt werden, dass es das *homing* von EPCs nach Gefäßverletzung *in vivo* steigert (Schroeter et al. 2008), andererseits eine Hemmung von $\alpha\beta5$ zu einer Reduktion der Rekrutierung von EPCs in die Neovaskularisationszone führt (Heida et al. 2010).

Um den Einfluss der $\alpha\beta5$ -Überexpression auf die Invasion in die Neovaskularisationszone zu untersuchen, wurden den Mäusen 24 Stunden nach Induktion der unilateralen Hinterlaufischämie pITGB5-DsRed-transfizierte bzw. Vektor-transfizierte EPCs intravenös injiziert. 10 Tage nach Injektion der EPCs wurde das Gewebe des *M. gastrocnemius* immunhistochemisch analysiert. Es zeigte sich eine signifikant gesteigerte Akkumulation von EPCs in der Neovaskularisationszone von Mäusen, die Integrin $\alpha\beta5$ -überexprimierende EPCs erhalten hatten. Somit hat die Integrin $\alpha\beta5$ -Überexpression einen fördernden Effekt auf die Rekrutierung von EPCs im ischämischen Gewebe. Zudem ließ sich eine vermehrte Kolokalisation der EPCs mit CD31-positiven endothelialen Mauszellen ohne direkte strukturelle Inkorporation in das Mausendothel nachweisen, die mit pITGB5-DsRed-transfizierten EPCs behandelt wurden. Die Beobachtung deckt sich mit den Daten von Ziegelhoffer et al. 2004, der parakrine Mechanismen hinter den proangiogenetischen Fähigkeiten der aus dem Knochenmark stammenden, angiogenetischen Zellen vermutete.

Um zu beurteilen, ob die $\alpha\beta5$ -Überexpression die EPC-induzierte Neovaskularisation begünstigt, wurden die CD31/DAPI doppelt-immunpositiven Zellen/mm² Muskelfaser als Maß für die Kapillardichte und somit für die Neovaskularisation quantifiziert. Mäuse, die PBS als Negativkontrolle erhalten hatten, zeigten eine geringe Kapillardichte im ischämischen Gewebe des

M. gastrocnemius. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Studien von Asahara et al. 1997 und Kalka et al. 2000 konnte auch in unserer Studie durch die Injektion von EPCs eine signifikante Steigerung der Kapillardichte erzielt werden, was auf die Tatsache hindeutet, dass EPCs in vaskuläre Gefäßumbauprozesse und die Neovaskularisation nach Gewebeschämie involviert sind. Bei Mäusen, die $\alpha\beta 5$ -überexprimierende EPCs erhalten hatten, war die Kapillardichte auch im Vergleich zur Kapillardichte im ischämischen Hinterlauf der Mäuse gesteigert, denen Kontroll-EPCs injiziert wurden, so dass nicht nur die Rekrutierung von EPCs, sondern auch die Gefäßneubildung durch das Integrin $\alpha\beta 5$ begünstigt wurde.

Mit Hilfe von dopplersonographischen Messungen des Blutflusses 14 Tage nach Induktion der Hinterlaufischämie konnte belegt werden, dass sich die immunhistochemisch nachgewiesene verbesserte Neovaskularisation durch die Injektion von ITGB5-transfizierten EPCs auch in einer signifikanten, effizienten Verbesserung der Blutflusses im ischämischen Hinterlauf niederschlug. Zusammenfassen ließ sich die Hypothese aus den *In-vitro*-Versuchen, dass die $\alpha\beta 5$ -Überexpression die angiogenetische Kapazität von EPCs steigert, in dem *In-vivo*-Modell der unilateralen Hinterlaufischämie der Maus bestätigt.

4.5 Die proangiogenetischen Effekte der Integrin $\alpha\beta 5$ -Überexpression werden durch die Zytokine MCP-1 und IL-8 vermittelt

Die Ergebnisse der *In-vitro*- und *In-vivo*-Angiogenese-Assays zeigen, dass die proangiogenetischen Fähigkeiten durch die Überexpression des $\alpha\beta 5$ -Integrins gesteigert werden konnten. Diese Resultate stimmen mit den Ergebnissen vorangegangener Studien überein, in denen gezeigt werden konnte, dass oxidiertes *low density lipoprotein* (oxLDL), dessen erhöhter Serumspiegel zu den kardiovaskulären Risikofaktoren zählt, die EPC-Adhäsion an differenzierte Endothelzellen durch Reduktion der $\alpha\beta 5$ -Expression alteriert (Di Santo et al. 2008). Der positive Effekt von Statinen hingegen ist unter anderem auf eine Steigerung der Expression verschiedener Integrinuntereinheiten, wie der α - und $\beta 5$ -Kette mit konsekutiver Steigerung der Adhäsion in der Reendothelialisierungszone nach Gefäßverletzung der *A. carotis* im Rattenmodell zurückzuführen (Walter et al. 2002). Daraus resultierte, genauso wie in der Studie von Schroeter et al. (2008), in der eine erhöhte $\alpha\beta 5$ -Expression durch Stimulation von EPCs mit Leptin erzielt werden konnte, eine Reduktion der Neointimadicke. Die Ergebnisse dieser Studien ließen, ebenso wie die von uns erhobenen Daten, vermuten, dass die $\alpha\beta 5$ -Überexpression die *homing*-Kapazität von EPCs verbessert und stellt somit auch einen möglichen therapeutischen Ansatz da.

Über welche intrazellulären Signaltransduktionswege das Integrin $\alpha\beta 5$ die angiogenetischen Fähigkeiten von EPCs beeinflusst, ist bislang nicht analysiert. Zum einen wird eine enge Interaktion von Integrinen mit Wachstumsfaktorrezeptor postuliert (Friedlander et al. 1995, Mahabeleshwar et al. 2007), zum anderen deuteten die Resultate des 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assays auf die in der Literatur beschriebene Fähigkeit von EPCs zur parakrinen und autokrinen Stimulation durch die Sekretion angiogenetischen Mediatoren hin (Rehman et al. 2003, Urbich et al. 2005).

Wir konnten zeigen, dass ITGB5-transfizierte Zellen im Vergleich zur EPC-Kontrolle eine erhöhte mRNA- und Proteinexpression der Zytokine MCP-1 und IL-8 aufwiesen. Diese angiogenetischen Zytokine ließen sich signifikant vermehrt im CDM der $\alpha\beta 5$ -überexprimierenden EPCs als Zeichen der gesteigerten Sekretion nachweisen. Diese Daten deuteten auf eine spezifische Interaktion des Integrins $\alpha\beta 5$ mit den angiogenetischen Zytokinen MCP-1 und IL-8 hin.

Bei Zytokinen handelt es sich um kleine Polypeptide, die in verschiedene Subfamilien (C, CC, CXC und CX3C) untergliedert werden, und erstmalig als Regulatormolekül des Leukozyten-homings beschrieben wurden (Zlotnik and Yoshie 2000). Nicht alle Zytokine besitzen proangiogenetische Eigenschaften, die wie bei CXC-Zytokinen, zu denen IL-8 zählt, mit dem Vorhandensein der Glutamyl-Leucyl-Arginyl (ERG)- Aminosäuresequenz korrelieren (Bernardini et al. 2003). Das angiogenetische Potential von IL-8 wurde erstmalig von Koch et al. 1992 postuliert. IL-8 fördert die Angiogenese durch Steigerung der Proliferation und Hemmung der Apoptose von Endothelzellen. Außerdem fördert IL-8 die Formierung kapillärer Gefäßstrukturen (Li et al. 2003). IL-8 besitzt eine chemotaktische Wirkung auf Endothelzellen (Koch et al. 1992, Murdoch et al. 1999) und fördert die Mobilisierung CD34-positiver, endothelialer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in das ischämische Myokard nach Myokardinfarkt (Kocher et al. 2006). Aber auch für MCP-1, ein Zytokin das zur Subfamilie der CC-Zytokine gehört, konnte eine proangiogenetische Wirkung beschrieben werden (Szekanecz und Koch 2001). Wie IL-8, ist MCP-1 durch Steigerung der Synthese und Aktivität von MMPs an der Degradation der ECM im Rahmen der Angiogenese beteiligt (Gálvez et al. 2005) und lässt durch eine gesteigerte Expression nach Endothelverletzung eine Schlüsselrolle im Rahmen der Wundheilung vermuten (Engelhardt et al. 1998, Weber et al. 1999). Neben der chemotaktischen Wirkung auf Endothelzellen wird die Bildung von Gefäßstrukturen durch MCP-1 begünstigt (Salcedo et al. 2000). Während es nach einem Myokardinfarkt zu einer zeitabhängig gesteigerten mRNA-Expression von IL-8 im Herzmuskelgewebe kommt (Kocher et al. 2006), wird MCP-1 im ischämischen Gewebe des *M. gastrocnemius* nach Induktion der unilateralen Hinterlaufischämie vermehrt exprimiert und

verbessert die Bildung von Kollateralgefäßen und die inflammatorische Monozytenrekrutierung (Ito et al. 1997, Capoccia et al. 2008). Mäuse mit einer Defizienz des MCP-1-Rezeptors CCR2 oder funktioneller Blockade von CCR2 weisen eine schlechtere Reperfusion im Hinterlauf nach Okklusion der *A. femoralis* auf (Heil et al. 2004, Fujii et al. 2006). Übereinstimmend konnte in unserer Studie in immunhistochemischen Analysen des *M. gastrocnemius* von Mäusen nach intravenöser Injektion von ITGB5-transfizierten EPCs eine gesteigerte Expression des MCP-1-AG nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass die Aussprossungsaktivität der HUVECs im 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay mit CdM von Kontroll-EPCs durch den Einsatz von 1) anti-MCP-1-AK, 2) anti-IL-8-AK oder 3) anti-MCP-1 und anti-IL-8-AK reduziert werden konnte, bestätigt die in der Literatur beschriebene proangiogenetische Wirkung dieser Zytokine. Der ITGB5-Effekt konnte in diesem Assay durch die vorangegangene Inkubation der $\alpha\beta 5$ -überexprimierten EPCs mit 1) anti-MCP-1-AK, 2) anti-IL-8-AK oder 3) anti-MCP-1 und anti-IL-8-AK aufgehoben werden, was die Hypothese, dass die gesteigerte Sekretion von IL-8 und MCP-1 an der Vermittlung der proangiogenetischen Eigenschaften von ITGB5-transfizierten EPCs maßgeblich beteiligt ist, erhärtet. Endothelzellen exprimieren sowohl die IL-8-Rezeptoren CXCR-1 und CXCR-2 (Murdoch et al. 1999, Li et al. 2003) als auch den MCP-1-Rezeptor CCR2 (Weber et al. 1999, Salcedo et al. 2000), so dass eine autokrine und parakrine Stimulation von Endothelzellen durch MCP-1 und IL-8 erfolgen kann. Übereinstimmend mit unserer Annahme, schrieben Ziegelhoffer et al. 2004 die proangiogenetischen Fähigkeiten aus dem Knochenmark stammender, grün fluoreszierendes Protein (*green fluorescent protein* [GFP])-markierter Zellen nach Induktion der Hinterlaufischämie der Sekretion von Zytokinen wie MCP-1 zu. Über welche Mechanismen IL-8 und MCP-1 die Angiogenese fördern ist bislang nicht hinreichend verstanden und bedarf weiterer Studien.

4.6 Die Integrin $\alpha\beta 5$ -abhängige Sekretion von MCP-1 und IL-8 wird über STAT3 reguliert

Da Integrine keine intrinsische Aktivität besitzen, ist für die Initiierung von Signalkaskaden und somit auch für die Kommunikation mit Wachstumsfaktorrezeptoren oder Transkriptionsfaktoren die Interaktion mit Adaptermolekülen oder zytoplasmatischen Proteinkinasen essentiell (Ginsberg et al. 2005). Durch die regulatorische Funktion der Genexpression besitzen Integrine die Fähigkeit, parakrine Effekte durch die Steigerung der Expression von Wachstumsfaktoren und Zytokinen zu vermitteln (Miyake et al. 1993, Udagawa et al. 1996). Die Genexpression von MCP-1 und IL-8 wird über den Transkriptionsfaktor STAT3 reguliert (Lee et al. 2012, Cho et al. 2013). Bei STAT-Proteinen handelt es sich um zytoplasmatische Transkriptionsfaktoren, die zum einen als

Signaltransduktoren fungieren, zum anderen die Transkription ihrer Zielgene initiieren (Darnell et al. 1994). Obwohl die Zielgene von STAT3 Regulatoren der Zellproliferation, -apoptose und -migration sind (Leonard und O'Shea 1998), befassen sich die meisten Studien lediglich mit der Aktivierung von STAT3 durch Zytokine und Wachstumsfaktoren (Akira et al. 1994, Zhong et al. 1994). Interessanterweise lassen einige Studien auf eine Aktivierung von STAT-Proteinen im Rahmen des *outside-in-signalings* von Integrinen schließen. Beispiele hierfür ist die Integrin $\beta 1$ - bzw. αv -abhängige Aktivierung von STAT5 zur Transkription des c-fos-Protoonkogens in Endothelzellen (Brizzi et al. 1999) und die $\alpha 2\beta 1$ Integrin-getriggerte, Kollagen-induzierte Zellmigration durch die Aktivierung von STAT1 und STAT3 (Wang et al. 2006). Durch die Interaktion des $\alpha 5$ -Integrins mit dem Tetraspan TM4SF5 wird die Expression von VEGF gesteigert und verbessert so die Gefäßstrukturbildung von HUVECs und die Endothelaussprossung aus einem Aortasegment via STAT3 (Choi et al. 2009). Zu dem konnte durch die Hemmung der Komplexbildung des Integrins $\alpha 5\beta 1$ mit MMP2 eine reduzierte STAT3-Aktivierung und reduzierte IL-6-Sekretion sowie eine verminderte Tumorgroße beschrieben werden (Kesanakurti et al. 2013).

Ziel unserer Studie war es zu prüfen, ob STAT3 in den Integrin $\alpha v\beta 5$ -abhängigen Signaltransduktionsweg involviert ist, der in einer Steigerung der Sekretion von MCP-1 und IL-8 bei $\alpha v\beta 5$ -überexprimierenden EPCs mündet. Die Aktivierung von STAT3 erfolgt über die Phosphorylierung von Tyrosinresten mit anschließender Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren mit anderen Mitgliedern der STAT-Familie. Die Tyrosinphosphorylierung ist für die anschließende Translokation in den Nukleus essentiell, wo STAT3 an spezifische Elemente der Promotorregion des Zielgens bindet (Zhong et al. 1994, Cao et al. 1995). Wir konnten zeigen, dass die $\alpha v\beta 5$ -Überexpression zu einer gesteigerten STAT3-Tyrosinphosphorylierung an Position 705 (Tyr705) führt, verbunden mit einer gesteigerten nukleären Translokation von aktivierten STAT3 und Expression von MCP-1 und IL-8. Die Hemmung von STAT3 führte zu einer Abnahme der MCP-1 mRNA-Expression und der MCP-1 und IL-8 Sekretion. Die physiologische Relevanz der Daten wurde durch die Beobachtung belegt, dass die Hemmung von STAT3 zu einer Abnahme der Aussprossungsaktivität der HUVECs im 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay mit CdM führte. Außerdem konnten die Integrin $\alpha v\beta 5$ -Effekte im Matrigel-Angiogenese-Assay und Transmigrations-Assay aufgehoben werden. Kein Einfluss hingegen konnte auf die $\alpha v\beta 5$ -vermittelte Adhäsion auf VN beobachtet werden. Der Grund hierfür könnte in der Richtung des Signaltransduktionsweges des $\alpha v\beta 5$ -Integrins zu sehen sein, da in der Literatur eine Involvierung von STAT3 in Integrin-vermittelte Signaltransduktionswege bislang nur bei dem *outside-in-signaling*, also nach Adhäsion des Integrins an seinen Liganden, beschrieben wurde.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse unserer Studie darauf hin, dass die STAT3-induzierte gesteigerte Sekretion der Zytokine MCP-1 und IL-8 für die Steigerung der proangiogenetischen Fähigkeiten $\alpha v\beta 5$ -überexprimierender EPCs verantwortlich ist.

4.7 Nachtrag

Nach dem Abschluss meiner Arbeit an dieser Studie wurde ergänzend untersucht, welches Signalmolekül die Aktivierung von STAT3 in der $\alpha v\beta 5$ -abhängigen o.g. Signalkaskade initiiert.

Zu den wichtigsten Regulatoren des *outside-in-signalings* von Integrinen gehört die Gruppe der Src-Tyrosinkinasen (Thomas und Brugge 1997, Klinghoffer et al. 1999). Die Src-Kinasen steuern Prozesse wie die Organisation des Zytoskeletts, die Zellmigration und die Genexpression als Antwort auf die Adhäsion an der ECM oder einer benachbarten Zelle (Shattil 2005). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Src-Kinasen an der Regulation intrazellulärer Signaltransduktionswege zur Steuerung des Zellzyklus und der Angiogenese von αv Integrinen, wie dem $\alpha v\beta 3$ Integrin beteiligt sind (Courter et al. 2005). In der $\alpha v\beta 5$ -vermittelten Angiogenese beeinflussen die Src-Kinasen das Überleben endothelialer Zellen und deren angiogenetische Fähigkeiten (Eliceiri et al. 2002, Hood et al. 2003, Heida et al. 2010). Dabei bildet die Src-Kinase nach Bindung des Integrins an seinen Liganden häufig Komplexe mit der Fokalen Adhäsionskinase (*focal adhesion kinase* [FAK]) aus, der eine Autophosphorylierung von FAK am Tyrosinrest 397 (Tyr 397) vorausgeht. Dadurch wird eine Bindungsstelle für die Src-*homology 2* (SH2)-Domäne der Src-Kinasen bereitgestellt (Playford und Schaller 2004). Weitere Signaltransduktoren der Integrin-abhängigen, Src-vermittelten Signalkaskaden sind mitogenaktivierte Proteinkinasen (*mitogen-activated protein kinase* [MAP-Kinasen]), Rho-GTPasen und die Phosphatidylinositol (PtdIns)-3-Kinase (Lee und Juliano 2004). Entsprechend konnte eine gesteigerte basale Phosphorylierung der Src-Kinase in ITGB5-transfizierten Zellen nachgewiesen werden (Leifheit-Nestler et al. 2010). Die meisten publizierten Daten beschreiben eine Aktivierung der STAT-Proteine durch die Janus-Kinase-2 (JAK-2), insbesondere bei der Signaltransduktion von Zytokinrezeptoren, die wie Integrine keine intrinsische Aktivität besitzen (Shuai et al. 1993). Eine gesteigerte Aktivierung von JAK2 bei $\alpha v\beta 5$ -überexprimierenden Zellen konnte nicht nachgewiesen werden (Leifheit-Nestler et al. 2010). Dennoch konnte manchen Studien auch eine Aktivierung von STAT3 durch die Src-Kinase gezeigt werden (Yu et al. 1995, Cao et al. 1996), was durch Studien unserer Arbeitsgruppe (Koimmunpräzipitation der Src-Kinase mit STAT3) bestätigt werden konnte. Zudem ließ sich eine Reduktion der STAT3-Phosphorylierung und nukleären Translokation nach Verwendung von

spezifischen Src-Kinase-Inhibitoren nachweisen (Leifheit-Nestler et al. 2010), so dass eine Aktivierung von STAT3 über Src-Kinase in der untersuchten Signaltransduktionskaskade wahrscheinlich ist.

5 Zusammenfassung

EPCs spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der physiologischen und pathologischen Gefäßneubildung, z.B. nach Gewebeischämie, im Rahmen der Wundheilung und dem Tumorwachstum. In vorangegangenen Studien wurden dem Integrin $\alpha\beta 5$ proangiogenetische Fähigkeiten zugesprochen, die in der Literatur jedoch auf Grund diskrepanter Daten zwischen Studien mit neutralisierenden AK und Studien mit Integrin $\alpha\beta 5$ -*Knockout*-Mäusen kontrovers diskutiert werden. In der vorliegenden Untersuchung konnte eine Verstärkung der funktionellen, proangiogenetischen Eigenschaften von EPCs durch Transfektion mit der cDNA der Integrin $\beta 5$ -Kette gezeigt werden. Die ITGB5-Transfektion führte zu einer gesteigerten mRNA- und Proteinexpression der Integrin $\beta 5$ -Kette sowie zu einer gesteigerten Oberflächenexpression von Integrins $\alpha\beta 5$. Durch Immunnpräzipitation und anschließende Western Blot-Analyse wurde außerdem eine gesteigerte Integrin $\alpha\beta 5$ -Aktivierung in den ITGB5-transfizierten EPCs nachgewiesen. Die gesteigerte Expression und Aktivierung des $\alpha\beta 5$ -Integrins führte im *In-vitro*-Zell-Adhäsions-Assay zu einer gesteigerten Adhäsion der EPCs an und im *In-vitro*-Transmigrations-Assay zu einer vermehrten Migration zu dem $\alpha\beta 5$ -Liganden VN. In zwei verschiedenen *In-vitro*-Angiogenese-Assays konnte außerdem eine gesteigerte Interaktion ITGB5-transfizierter EPCs mit reifen Endothelzellen beschrieben werden. Diese Effekte waren spezifisch auf die Wirkung des Integrins $\alpha\beta 5$ zurückzuführen, denn sie ließen sich durch die Präinkubation der EPCs mit $\alpha\beta 5$ -neutralisierendem AK hemmen und waren vergleichbar mit der proangiogenetischen Wirkung des Adipozytenhormons Leptin. Die proangiogenetische Wirkung der Integrin $\alpha\beta 5$ -Überexpression konnte auch im *In-vivo*-Modell der unilateralen Hinterlaufischämie bei der Maus bestätigt werden. Hier zeigten sich eine vermehrte Akkumulation der EPCs im ischämischen Gewebe des Hinterlaufes, eine gesteigerte Kapillardichte und eine verbesserte Reperfusion bei Mäusen, die mit ITGB5-transfizierten EPCs behandelt wurden, im Vergleich zu Mäusen, die mit der Vektor-transfizierten Kontrollgruppe behandelt wurden.

Durch systematische Analysen des CdM der EPCs konnten wir nachweisen, dass die Steigerung der proangiogenetischen Eigenschaften ITGB5-transfizierter EPCs zumindest teilweise durch parakrine Mechanismen vermittelt wird. Im CdM ITGB5-transfizierter EPCs ließ sich eine signifikant gesteigerte Sekretion der proangiogenetischen Zytokine MCP-1 und IL-8 nachweisen, deren gesteigerte Genexpression im Vergleich zur Vektor-transfizierten Kontrollgruppe mittels RT-PCR-Analysen bestätigt werden konnte. Im *In-vitro*-3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay konnte eine spezifische Förderung der Aussprossungsaktivität reifer Endothelzellen durch die parakrine

MCP-1- und IL-8-Sekretion ITGB5-transfizierter EPCs belegt werden. Die Tatsache, dass im ischämischen Gewebe des Maushinterlaufs eine gesteigerte Expression vom MCP-1 detektiert werden konnte, erhärtet die Hypothese, dass MCP-1 an der Vermittlung der proangiogenetischen Effekte ITGB5-transfizierter EPCs *in vivo* beteiligt ist. Die Expression der Zytokine MCP-1 und IL-8 schien in EPCs durch den Transkriptionsfaktor STAT3 reguliert zu werden, da die ITGB5-Transfektion in EPCs mit einer gesteigerten Phosphorylierung und nukleären Translokation von STAT3 assoziiert war. Die Aktivierung von STAT3 wurde spezifisch über das Integrin $\alpha\beta 5$ vermittelt, denn der Effekt ließ sich durch die Präinkubation funktionsblockierender AK gegen Integrin $\alpha\beta 5$ aufheben. Eine spezifische STAT3- Inhibition führte zu einer signifikanten Reduktion der mRNA-Expression von MCP-1 in ITGB5-transfizierten EPCs und zur verminderten Sekretion der Zytokine MCP-1 und IL-8. Die Reduktion der parakrinen, proangiogenetischen Fähigkeiten ITGB5-transfizierter EPCs ließ sich durch eine Reduktion der Aussprossungsaktivität reifer Endothelzellen im *In-vitro*-3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay verifizieren. Gleiche Effekte konnten im Transmigrations-Assay und Matrigel-Angiogenese-Assay beobachtet werden, in denen die Präinkubation der transfizierten EPCs mit dem STAT3-Inhibitor zu einer reduzierten Transmigration Richtung VN und einer verminderten Interaktion mit den reifen Endothelzellen führte.

Fasst man zusammen, so demonstrieren die Ergebnisse der vorliegenden Studie die Bedeutung der proangiogenetischen Wirkung des Integrins $\alpha\beta 5$ durch spezifische Modulation der funktionellen Fähigkeiten von EPCs während angiogenetischer Prozesse. Die erhobenen Daten deuten auf eine zuvor nicht bekannte Induktion der Genexpression und Sekretion angiogenetischer Zytokine hin und belegen eine in der Literatur diskutierte parakrine Stimulation reifer Endothelzellen durch EPCs im Rahmen der Angiogenese, welche auch therapeutisch nutzbar sein könnte.

6 Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Arteria</i>
Abb.	Abbildung
acLDL	acetyliertes <i>low density lipoprotein</i>
AG	Antigen
Ang-1	Angiopoietin-1
Ang-2	Angiopoietin-2
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
bFGF	<i>basic fibroblastic growth factor</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CAC	zirkulierende angiogenetische Zelle (<i>circulating angiogenic cell</i>)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CdM	konditioniertes Medium (<i>conditionated medium</i>)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylinhydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dil	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	PCR-Nukleotidmix
EBM	Endothelzell-Basalmedium
ECM	extrazelluläre Matrix
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
ECUF	<i>endothelial colony unit-forming cell</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
ELISA	<i>enzym-linked immunsorbent-assay</i>

eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (<i>endothelial nitric oxide synthase</i>)
EPC	Endotheliale Progenitorzellen (<i>endothelial progenitor cells</i>)
EPC-Medium	EPC-Kultivierungsmedium
ETR	Elektronentransferreagenz
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FAK	Fokale Adhäsionskinase (<i>focal adhesion kinase</i>)
FBS	Fetales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Flk-1	fetale Leberkinase-1 (<i>fetal liver kinase-1</i>)
FN	Fibronektin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>)
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
HIF-1	Hypoxie-induzierbarer Transkriptionsfaktor-1
HMG-CoA-Reduktaseinhibitor	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A Reduktase-Inhibitor
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HUVEC	humane umbilikale Venenendothelzellen (<i>human umbilical vein endothelial cells</i>)
HUVEC-Medium	HUVEC-Kultivierungsmedium
IGF-1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1 (<i>insulin-like growth factor-1</i>)
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
JAK-2	Janus-Kinase-2
LB-Medium	<i>lysogeny broth-medium</i>
LCA	gemeinsames Leukozytenantigen (<i>leukocyte common antigen</i> , syn: CD45)
Lectin	<i>Ulex europaeus</i> Agglutinin-I
M.	<i>Musculus</i>

MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MCP-1	<i>monocyte-chemoattractant-protein-1</i>
MG	Molekulargewicht
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
Mm.	<i>Musculi</i>
MMP	Matrix Metalloproteinasen
MNC	mononukleäre Zellen (<i>mononuclear cells</i>)
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)</i>
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NaCl	Natriumchlorid
NADH	oxidierte Form des Nicotinamidadenindinukleotids
NADPH	oxidierte Form des Nicotinamidadenindinukleotidphosphats
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NO	Stickstoffmonoxid (<i>nitric oxide</i>)
ObR	Leptinrezeptor (<i>product of the obesity-gene receptor</i>)
oxLDL	oxidiertes <i>low density lipoprotein</i>
p-	phospho-
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	Plättchen-Endothelzell-Adhäsionsmolekül-1 (<i>platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PTB-Domäne	Phosphotyrosin-bindende Domäne (<i>phosphotyrosin-binding domain</i>)
ptdIns	Phosphatidylinositol
Ras	<i>rat sarcoma</i>
Rap-1	<i>Ras proximity-1</i>
RIAM	<i>Rap1-GTPase-interacting adaptor molecule</i>

RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
rT	reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
SDF-1	<i>stromal cell-derived factor-1</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>sodium dodecyl-sulfate polyacrylamid gel electrophoresis</i>)
sek	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>standard error of the mean</i>)
SH2	<i>Src-homology 2</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOC-Medium	<i>super optimal broth with catabolite repression-medium</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription-3</i>
syn	synonym
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris-buffered saline</i>)
TBS-T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung und Tween (<i>Tris-buffered saline and Tween</i>)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamid
Tie-2	<i>Angiopoietin/tyrosine kinase with immunoglobulin-like and epidermal growth factor-like domain-2</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin
Triton-X	Polyethylenglykoltert-octylphenyl Ether
Tyr	Tyrosine
V	Volt
UV	ultraviolett
VE-Cadherin	vaskulär-endotheliales Cadherin (<i>vascular endothelial-cadherin</i>)
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
VEGFR-2	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor-2 (<i>vascular endothelial growth factor receptor-2</i>)

VN

Vitronektin

vWF

von-Willebrand-Faktor

w/v

Masse pro Volumen

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Effizienz der ITGB5-Transfektion in der RT-PCR-Analyse	42
Abb. 2	Effizienz der ITGB5-Transfektion in der Western Blot-Analyse	43
Abb. 3	FACS-Analyse zum Nachweis der Integrin $\alpha\beta 5$ -Überexpression nach ITGB5-Transfektion	44
Abb. 4	Effekte der ITGB5-Transfektion auf die Oberflächenexpression verschiedener Integrine in der FACS-Analyse	44
Abb. 5	Nachweis der gesteigerten Integrin $\alpha\beta 5$ -Phosphorylierung nach ITGB5-Transfektion und Effizienz der Hemmung durch $\alpha\beta 5$ -neutralisierende AK	45
Abb. 6	Vergleichende Analyse der EPC-Morphologie	46
Abb. 7	Quantifizierung der Zellgröße und -länge im Vergleich zwischen Vektor- und ITGB5-transfizierten EPCs	47
Abb. 8	Immunfluoreszenzanalyse zur Darstellung des endothelialen Charakters	48
Abb. 9	Durchflusszytometrischer Nachweis der Oberflächenexpression etablierter Endothelzellmarker	49
Abb. 10	Effekt der ITGB5-Transfektion auf die Adhäsion von EPCs auf VN	
	Abb. 10A: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Bilder	50
	Abb. 10B: Quantitative Analyse	51
Abb. 11	Vergleich der transmigratorischen Fähigkeiten der EPCs im modifizierten <i>Boyden-chamber</i> -Assay	
	Abb. 11A: Repräsentative lichtmikroskopische Bilder	51
	Abb. 11B: Quantitative Auswertung	52
Abb. 12	Einfluss der ITGB5-Transfektion auf die angiogenetischen Fähigkeiten von EPCs im Matrigel-Angiogenese-Assay	53
Abb. 13	Angiogenese im 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay nach ITGB5-Transfektion	
	Abb. 13A: Repräsentative mikroskopische Bilder	54
	Abb. 13B und C: Quantitative Auswertung	55

Abb. 14	Akkumulation von EPCs im ischämischen Maushinterlauf nach ITGB5-Transfektion	
	Abb. 14A: Repräsentative immunhistochemische Abbildungen	56
	Abb. 14B: Quantitative Analyse	57
Abb. 15	Immunhistochemischer Nachweis der Kapillardichte im ischämischen Maushinterlauf nach Injektion von EPCs	58
Abb. 16	Effekte der Injektion ITGB5-transfizierter EPCs auf die Reperfusion nach unilateraler Hinterlaufischämie	
	Abb. 16A: Repräsentative Laserdopplermessungen der Perfusion im Maushinterlauf	59
	Abb. 16B: Quantitative Analyse	60
Abb. 17	Effekte des CdM ITGB5-transfizierter EPCs auf die Aussprossungsaktivität der Sphäroide im Sphäroid-Angiogenese-Assay	61
Abb. 18	Nachweis der gesteigerten Sekretion der Zytokine MCP-1 und IL-8 im Zytokin-Array	62
Abb. 19	Immunhistochemischer Nachweis der Proteinexpression des Zytokins MCP-1 im ischämischen Maushinterlauf	62
Abb. 20	RT-PCR-Analyse zum Nachweis der gesteigerten mRNA-Expression von MCP-1 und IL-8 nach ITGB5-Transfektion	
	Abb. 20A: Repräsentative Bilder der RT-PCR	63
	Abb. 20B und C: Quantitative Auswertung	64
Abb. 21	Proangiogenetische Eigenschaften von MCP-1 und IL-8 im 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay	65
Abb. 22	Durchflusszytometrischer Nachweis der gesteigerten STAT3-Phosphorylierung bei ITGB5-transfizierten EPCs	66
Abb. 23	Verminderte Aktivierung von STAT3 in ITGB5-transfizierten EPCs durch den Einsatz neutralisierender $\alpha v\beta 5$ -AK	67
Abb. 24	Immunfluoreszenzfärbung zur Detektion von pSTAT3	68
Abb. 25	Western Blot-Analyse zum Nachweis der Lokalisation von pSTAT3	68

Abb. 26	Immunfluoreszenzfärbung von STAT3 in EPCs	69
Abb. 27	Effekte der Hemmung von STAT3 auf die proangiogenetischen Fähigkeiten von ITGB5-transfizierten EPCs in <i>In-vitro</i> Assays	
	Abb. 27A: Repräsentative mikroskopische Bilder	70
	Abb. 27B, C und D: Quantitative Analyse	71
Abb. 28	Effekte der Hemmung von STAT3 auf das Aussprossungsverhalten von HUVECs im 3D-Sphäroid-Angiogenese-Assay	72
Abb. 29	Effekte der Hemmung von STAT3 auf die Sekretion von MCP-1 und IL-8	73
Abb. 30	Nachweis der reduzierten Genexpression von MCP-1 durch die Hemmung von STAT3 in der RT-PCR-Untersuchung	73

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	verwendete Plasmide	19
Tabelle 2	verwendete Antikörper für die FACS-Analyse	23
Tabelle 3	verwendete Antikörper für die Western Blot-Analyse	29
Tabelle 4	verwendete Primer bei der RT-PCR-Analyse	32

9 Literaturverzeichnis

- Aicher A**, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S (2003): Essential role of endothelial nitric oxide synthetase for mobilisation of stem and progenitor cells. *Nat Med* 9, 1370-1376
- Akira S**, Nishio Y, Inoue M, Wang XJ, Wei S, Matsusaka T, Yoshida K, Sudo T, Naruto M, Kishimoto T (1994): Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp 130-mediated signalling pathway. *Cell* 77, 63-71
- Alberts B**, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1995): *Molekularbiologie der Zelle* (3. Auflage) VCH-Verlag, Weinheim
- Alon T**, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E (1995): Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1, 1024-1028
- Aplin AE**, Howe A, Alahari SK, Juliano RL (1998): Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 50, 197-263
- Arras M**, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W (1998): Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hind limb. *J Clin Invest* 101, 40-50
- Asahara T**, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM (1997): Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964-967
- Asahara T**, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM (1999): Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularisation. *Circ Res* 85, 221-2287
- Assmus B**, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunewald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM (2002): Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TORCARE-AMI). *Circulation* 106, 3009-3017
- Bader BL**, Rayburn H, Crowley D, Hynes RO (1998): Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all αv integrins, *Cell* 95, 507-519

- Barsotti MC**, Magera A, Armani C, Chiellini F, Felice F, Dinucci D, Piras AM, Minnocci A, Solaro R, Soldani G, Balbarini A, Di Stefano R (2011): Fibrin acts as biometric niche inducing both differentiation and stem cell marker expression of early human endothelial progenitor cells. *Cell Prolif* 44, 33-48
- Beglova N**, Blacklow SC, Takagi J, Springer TA (2002): Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation. *Nat Struct Biol* 9, 282-287
- Beitnes JO**, Gjesdal O, Lunde K, Solheim S, Edvardsen T, Arnesen H, Forfang K, Aakhus S (2011): Left ventricular systolic and diastolic function improve after acute myocardial infarction treated with acute percutaneous coronary intervention, but are not influenced by intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells: a 3 year serial echocardiographic sub-study of the randomized-controlled ASTAMI study. *Eur J Echocardiogr* 12, 98-10
- Bernardini G**, Ribatti D, Spinetti G, Morbidelli L, Ziche M, Santoni A, Capogrossi MC, Napolitano M (2003): Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. *J Immunol Methods* 273, 83-101.
- Blystone SD**, William MP, Salter SE, Brown EJ (1997): Requirement of integrin beta3 tyrosine 747 for beta3 tyrosine phosphorylation and regulation of alpha v beta3 avidity. *J Biol Chem* 272, 28757-28761
- Boyden S** (1962): The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 115; 453-466
- Brazelton TR**, Blau HM (2005): Optimizing techniques for tracking transplanted stem cells in vivo. *Stem cells* 9; 1251-1265
- Brizzi MF**, Defilippi P, Rosso A, Venturino M, Garbarino G, Miyajima A, Silengo L, Tarone G, Pegoraro L (1999): Integrin-mediated adhesion of endothelial cells induces JAK2 and STAT5A activation: role in the control of c-fos gene expression. *Mol Biol Cell* 10, 3463-3471.
- Brooks PC**, Clark RA, Cheresh DA (1994a): Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 264, 569-571
- Brooks PC**, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresh DA (1994b): Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79, 1157-1164.

- Brooks PC**, Strömblad S, Klemke R, Visscher D, Sarkar FH, Cheresch DA (1995): Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J Clin Invest* 96, 1815-1822
- Byzova TV**, Goldman CK, Pampori N, Thomas KA, Bett A, Shattil SJ, Plow EF (2000): A mechanism for modulation of cellular response to VEGF: activation of the integrin. *Mol Cell* 6, 851-860
- Caiado F**, Dias S (2012): Endothelial progenitor cells and integrins: adhesive needs. *Fibrinogenesis Tissue Repair* 5:4. doi: 10.1186/1755-1536-5-4
- Calderwood DA**, Zent R, Grant R, Rees DJ, Hynes RO, Ginsberg MH (1999): The talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmatic tails and regulates integrin activation. *J Biol Chem* 274, 28071-28074
- Cao X**, Tay A, Guy GR, Tan YH (1995): Activation an association of Stat3 with Src in v-Src-transformed cell lines. *Mol Cell Biol* 16, 1595-1603
- Capoccia BJ**, Gregory AD, Link DC (2008): Recruitment of the inflammatory subset of monocytes to sites of monocytes to sites of ischemia induces angiogenesis in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent fashion. *J Leukoc Biol* 84; 760-768
- Carmeliet P** (2000): Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6, 389-395
- Carmeliet P**, Jain RK (2000): Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257
- Carmeliet P**, Collen D (2000): Molecular basis of angiogenesis: role of VEGF and VE-Cadherin. *Ann NY Acad Sci* 902, 249-262
- Carmeliet P**, Jain RK (2011): Molekular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nautre* 473, 298-307
- Celletti FL**, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, Dake MD (2001): Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med* 7, 425-429
- Chavakis E**, Urbich C, Dimmeler S (2008): Homing and engraftment of progenitor cells; A prerequisite for cell therapy. *J Mol Cell Cardiol* 45, 514-522
- Chazotte B** (2010): Labeling cytoskeletal F-actin with rhodamine phalloidin or fluorescein phalloidin for imaging. *Cold Spring Harb Protoc* 2010, pdb. prot4947

- Chen HC**, Appeddu PA, Parsons JT, Hildebrand JD, Schaller MD, Guan JL (1995): Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J Biol Chem* 270; 16995-16999
- Chen JZ**, Zhang FR, Tao QM, Wang XX, Zhu JH, Zhu JH (2004): Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)* 107, 273-280
- Cho SO**, Lim JW, Kim H (2013): Red ginseng extract inhibits the expression of MCP-1 and iNOS in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells by suppressing the activation of NADPH oxidase and Jak2/STAT3. *J Ethnopharmacol* 150, 761-764
- Choi S**, Lee SA, Kwak TK, Kim HJ, Ye SK, Kim SH, Kim S, Le JW (2009): Cooperation between integrin alpha5 and tetraspan TM4SF5 regulates VEGF-mediated angiogenic activity. *Blood* 113, 1845-1855
- Cines DB**, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM (1998): Endothelial cells in physiology and pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91, 3527-3561
- Colognato H**, Ramachandrapa S, Olsen IM, French-Constant C(2004): Integrins direct Src family kinases to regulate distinct phases of oligodendrocyte development. *J Cell Biol* 167; 365-375
- Conway EM**, Collen D, Carmeliet P (2001): Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 49, 507-521
- Courter DL**, Lomas L, Scatena M, Giachelli CM(2005): Src kinase activity is required for integrin alphaVbeta3-mediated activation of nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 280; 12145-12151
- Currie MJ**, Gunningham SP, Turner K, Han C, Scott PA, Robinson BA, Chong W, Harris AL, Fox SB (2002): Expression of the angiopoietins and their receptor Tie2 in human renal clear cell carcinomas; regulation by the von Hippel-Lindau gene and hypoxia. *J Pathol* 198, 502-510
- Darnell JE Jr**, Kerr IM, Stark GR (1994): Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFN and other extracellular signalling proteins. *Science* 264, 1415-1421
- Datta A**, Huber F, Boettinger D (2002): Phosphorylation of beta3 integrin controls ligand binding strength. *J Biol Chem* 277, 3943-3949
- Davignon J**, Ganz P (2004): Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 109, III27-32

- Deindl E**, Schaper W (2005): The art of angiogenesis. *Cell Biochem Biophys* 43, 1-15
- Denizot F**, Lang R (1986): Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol Methods* 89, 271-277
- Diaz-Gonzalez F**, Forsyth J, Steiner B, Ginsberg MH (1996): Transdominant inhibition of integrin function. *Mol Biol Cell* 7, 1939-1951
- Dimmeler S**, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rutten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM (2001): HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 108; 391-397
- Di Santo S**, Diehm N, Ortmann J, Völzmann J, Ynag Z, Keo HH, Baumgartner I, Kalka C (2008): Oxidized low density lipoprotein impairs endothelial progenitor cell function by downregulation of E-selectin and integrin alpha(v)beta5. *Biochem Biophys Res Commun* 373, 528-532
- Dor Y**, Keshet E (1997): Ischemia-driven angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 8, 289-294
- Drake CJ** (2003): Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69; 73-82
- Drake CJ**, Cheresh DA, Little CD (1995): An antagonist of integrin alpha v beta 3 prevents maturation of blood vessels during embryonic neovascularisation. *J Cell Sci* 108, 2655-2661
- Eliceiri BP**, Cheresh DA (1999): The role of αv integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of activation and clinical development. *J Clin Invest* 103, 1227-1230
- Eliceiri BP**, Puente XS, Hood JD, Stupack DG, Schlaepfer DD, Huang XZ, Sheppard D, Cheresh DA (2002): Src-mediated coupling of focal adhesion kinase to integrin alpha(v)beta5 in vascular endothelial growth factor signalling. *J Cell Biol* 157, 149-160
- Engelhardt E**, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Brocker EB, Gillitzer R (1998): Chemokines IL-8, GRO alpha, MCP-1, IP-10, and MIG are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leucocyte subset in human wound healing. *Am J Pathol* 153, 1849-1860
- Feldinger-Habermann B**, Cheresh DA (1993): Vitronectin and its receptors. *Curr. Opin. Cell Biol* 5, 864-868
- Ferrara N** (1999): Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int* 56, 794-814

- Flamme I, Risau W** (1992): Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development* 116, 435-439
- Folkman J** (1995): Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1, 27-31
- Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varnier JA, Cheresh DA** (1995): Definition of two angiogenetic pathways by distinct alpha v integrins. *Science* 270, 1500-1502.
- Friedlander M, Theesfeld CL, Sugita M, Fruttiger M, Thomas MA, Chang S, Cheresh DA** (1996): Involvement of integrin alpha v beta 3 and alpha v beta 5 in ocular neovascular disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 9764-9769
- Fujii T, Yonemitsu Y, Onimaru M, Tanii M, Nakano T, Egashira K, Takehara T, Inoue M, Hasegawa M, Kuwano H, Sueishi K** (2006): Nonendothelial mesenchymal cell-derived MCP-1 is required for FGF-2-mediated therapeutic neovascularisation: critical role of the inflammatory/arteriogenic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 2483-2489
- Gálvez BG, Genís L, Matías-Roman S, Oblander SA, Tryggvason K, Apte SS, Arroyo AG** (2005): Membrane type 1-matrix metalloproteinase is regulated by chemokines monocyte-chemoattractant protein-1/ccl2 and interleukin-8/CXCL8 in endothelial cells during angiogenesis. *J Biol Chem* 280, 1292-1298
- Giancotti FG, Ruoslahti E** (1999): Integrin signaling. *Science* 285: 1028-1032
- Ginsberg MH, Partridge A, Shattil SJ** (2005): Integrin regulation. *Curr Opin Cell Biol* 17, 509-516
- Gonzalez AM, Gonzales M, Herron GS, Nagavarapu U, Hopkinson SB, Tsuruta D, Jones JC** (2002): Complex interactions between the laminin alpha subunit and integrins regulate endothelial cell behaviour in vitro and angiogenesis in vivo. *Proc Nat Acad USA* 99, 16075-16080
- Gonzales AM, Bhattacharya R, deHart GW, Jones JC** (2010): Transdominant regulation of integrin function: mechanisms of crosstalk. *Cell Signal* 22, 578-583
- Goodwin AM** (2007): In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvasc Res* 74, 172-183
- Hammes HP, Brownlee M, Jonzyk A, Sutter A, Preissner KT** (1996): Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularisation. *Nat Med* 2, 529-533

- Han J**, Lim CJ, Watanabe N, Soriani A, Ratnikov B, Calderwood DA, Puzon-McLaughlin W, Lafuente EM, Boussiotis VA, Shattil SJ, Ginsberg MH (2006): Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin α IIb β 3. *Curr Biol* 6, 796-806
- Harrington EO**, Lu Q, Rounds S (2007): Endothelial Cell Apoptosis. *Endothelial Biomedicine*, Aird WC, Cambridge University Press, New York, NY, USA, 1081-1097
- Heida NM**, Müller JP, Cheng IF, Hasenfuss G, Konstantinides S, Schäfer K (2008): Auswirkung von Adipositas und Gewichtsreduktion auf die funktionellen Eigenschaften endothelialer Progenitorzellen. *Clin Res Cardiol* 97, I, YIA687 (74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Herz- und Kreislaufforschung), 27.-29. März 2008, Mannheim, Deutschland
- Heida NM**, Leifheit-Nestler M, Schroeter MR, Müller JP, Cheng IF, Henkel S, Limbourg A, Limbourg FP, Alves F, Quigley JP, Ruggeri ZM, Hasenfuss G, Konstantinides S, Schäfer K (2010): Leptin enhances the potency of circulating angiogenic cells via Src kinase and integrin α v β 5. Implication of angiogenesis in human obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 200-206
- Heil M**, Ziegelhoeffer T, Wagner S, Fernández B, Helisch A, Martin S, Tribulova S, Kuziel WA, Bachmann G, Schaper W (2004): Collateral artery growth (arteriogenesis) after experimental arterial occlusion is impaired in mice lacking CC-chemokine receptor-2. *Circ Res* 94, 671-677
- Heissig B**, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S (2002): Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109, 625-637
- Hill JM**, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T (2003): Circulating endothelial progenitor cells, vascular function and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348, 593-600.
- Hirschi KK**, Ingram DA, Yoder MC (2008): Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1584-1595
- Hodivala-Dilke KM**, Mc Hugh KP, Tsakiris DA, Rayburn H, Crowley D, Ullman-Culleré M, Ross FP, Collier BS, Teitelbaum S, Hynes RO (1999): β 3-Integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *J Clin Invest* 103, 229-238
- Holthofer H**, Virtanen I, Kariniemi AL, Horima M, Linder E, Miettinen A (1982): Ulex europaeus I lectin as marker for vascular endothelium in human tissues. *Lab Investigation* 47, 60-66

- Hood JD**, Frausto R, Kiosses WB, Schwartz MA, Cheresh DA (2003): Differential alphav integrin-mediated Ras-EKK signalling during two pathways of angiogenesis. *J Cell Biol* 162, 933-943
- Hormia M**, Lehto VP, Virtanen I (1983): Identification of UEA I-binding surface glycoproteins of cultured human endothelial cells. *Cell Biol* 162, 933-943
- Hristov M**, Erl W, Weber PC (2003): Endothelial progenitor cells: mobilisation, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 1185-1189
- Hu P**, Luo BH (2013): Integrin bi-directional signalling across the plasma membrane. *Journal of Cellular Physiology* 228, 306-312
- Huang X**, Griffiths M, Wu J, Farese RV Jr, Sheppard D (2000): Normal development, wound healing, and adenovirus susceptibility in beta5-deficient mice. *Mol Cell Biol* 20, 755-759
- Hynes RO** (1992): Integrins: Versatility, Modulation, and signalling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25
- Hynes RO** (2002a): Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687
- Hynes RO** (2002b): A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med* 8; 918-921
- Hynes RO**, Landers AD (1992): Contact and adhesive specificities in the associations, migration, and targeting of cells and axons. *Cell* 68, 303-322
- Ingarm DA**, Caplice NM, Yoder MC (2005): Unresolved Questions, changing definitions, and a novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* 106, 1525-1531
- Ito H**, Rovira II, Bloom ML, Takeda K, Ferrans VJ, Quyyumi AA, Finkel T (1999): Endothelial progenitor cells as putative targets for angiostatin. *Cancer Res* 59, 5875-5877
- Ito WD**, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W (1997): Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res* 80, 829-837.
- Kalka C**, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T (2000): Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularisation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 3422-3427
- Kang HJ**, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, Kim YJ, Soo Lee D, Sohn DW, Han KS, Oh BH, Lee MM, Park YB (2004): Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on the left ventricular systolic function

and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 363, 751-756

Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T (2001): Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 103, 634-637

Kesanakurti D, Chetty C, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS (2013): Role of MMP-2 in the regulation of IL-6/STAT3 survival signaling via interaction with $\alpha 5\beta 1$ integrin in glioma. *Oncogene* 32, 327-349

Kim JP, Zhang K, Chen JD, Kramer RH, Woodley DT (1994): Vitronectin-driven human keratinocyte locomotion is mediated by the alpha v beta 5 integrin receptor. *J Biol Chem* 269, 26926-26932

Kim S, Harris M, Varner JA (2000a): Regulation of integrin $\alpha v\beta 3$ -mediated endothelial cell migration and angiogenesis by integrin $\alpha 5\beta 1$ and protein kinase A. *J Biol Chem* 275, 33920-33928

Kim S, Bell K, Mouse SA, Varner JA (2000b): Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin $\alpha 5\beta 1$ with the central cell-binding domain of fibronectin. *Am J Pathol* 156, 1345-1362

Kim SH, Turnbull J, Guimond S (2011): Extracellular matrix and cell signaling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol* 209, 139-151

Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, Hashimoto K, Ogura T, D'Acquisto F, Addeo R, Makuuchi M, Esumi H (2000): Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* 95, 189-197

Kinbara K, Goldfinger LE, Hansen M, Chou FL, Ginsberg MH (2003): Ras GTPases: Integrins' friends or foes? *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 767-776

Klemke RL, Yebra M, Bayna EM, Cheresh DA (1994): receptor tyrosin kinase signaling required for integrin alpha v beta 5-directed cell motility but not adhesion to vitronectin. *J. Cell Biol* 127, 859-866

Klemke RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, de Lanerolle P, Cheresh DA (1997): Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* 137, 481-492

Klinghoffer RA, Sachsenmaier C, Cooper JA, Soriano P (1999): Src family kinases are required

for integrin but not PDGFR signal transduction. *EMBO J* 18, 2459-2471

Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA; DiPietro LA, Elner VM; Elner SG, Strieter RM (1992): Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258, 1798-1801

Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S (2001): Neovascularisation of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevent cardiomyocyte apoptosis, reduces remodelling and improves cardiac function. *Nat Med.* 7, 430-436

Kocher AA, Schuster MD, Bonaros N, Lietz K, Xiang G, Martens TP, Kurlansky PA, Sondermeijer H, Witkowski P, Boyle A, Homma S, Wang SF, Itescu S (2006): Myocardial homing and neovascularisation by human bone marrow angioblasts is regulated by IL-8/Gro CXC chemokines. *J Mol Cell Cardio* 40, 455-464

Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, Inden Y, Murohara T (2004): Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 698-703

Korff T, Augustin HG (1998): Interaktion of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol* 143, 1341-1352

Kroon ME, Koolwijk P, van der Vecht B, van Hinsbergh VWM (2000): Urokinase receptor expression on human microvascular endothelial cells is increased by hypoxia: Implications for capillary-like tube formation in a fibrin matrix. *Blood* 96, 2775-2783

Kumar CC, Malkowski M, Yin Z, Tanghetti E, Yaremko B, Nechuta T, Varner J, Liu M, Smith EM, Neustadt B, Presta M, Armstrong L (2001): Inhibition of angiogenesis in tumor growth by SCH221153, a dual $\alpha(v)\beta3$ and $\alpha(v)\beta5$ integrin receptor antagonist. *Cancer Res* 61, 2232-2238

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227; 680-685

Lamallice L, Le Boeuf F, Huot J (2007): Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res* 100, 782-794

Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, Miche E, Bohm M, Nickening G (2004): Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and

enhances angiogenesis. *Circulation* 109; 220-226

Lee JW, Juliano R (2004): Mitogenic signal transduction by integrin- and growthfactor receptor-mediated pathways. *Mol Cells* 17, 188-202

Lee MM, CHui RK, Tam IY, LAu AH, Wong YH (2012): CCR1-mediated STAT3 tyrosine phosphorylation and CXCL8 expression in THP-1 macrophage-like cells involve pertussis toxin-insensitive G α (14/16) signaling and IL-6 release. *J Immunol* 189, 5266-5276

Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA (2000): Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med* 342, 626-637

Lee YW, Hennig B, Toborek M (2003): Redox-regulated mechanism of IL-4 induced MCP-1 expression in human vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284, H185-92

LeGat L, Bonnel S, Gogat K, Brizard M, Van Den BL, Kobetz A, Gadin S, Dureau P, Dufier JL, Abitbol M (2001): Prominent beta-5 gene expression in the cardiovascular system and in the cartilaginous primordiae of the skeleton during mouse development. *Cell Commun Adhes* 8, 99-102

Leifheit-Nestler M, Conrad G, Heida NM, Limbourg A, Limbourg FP, Seidler T, Schroeter MR, Hasenfuss G, Konstantinides S, Schäfer K (2010): Overexpression of integrin β 5 enhances the paracrine properties of circulating angiogenic cells via Src kinase-mediated activation of STAT3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 1398-1406

Leistner DM, Fischer-Rasokat U, Honold J, Seeger FH, Schächinger V, Lehmann R, Martin H, Burck I, Urbich C, Dimmeler S, Zeiher AM, Assmus B (2011): Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy. *Clin Res Cardiol.* 100, 925-93

Leonard WJ, O'Shea (1998): Jaks and Stats- biological implications. *Annu Rev Immunol* 16, 293-322

Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK (2003): IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 170, 3369-3376

Limbourg A, Ploom M, Elligsen D, Sorensen I, Ziegelhoeffer T, Gossler A, Drexler H, Limbourg

- FP (2007): Notch ligand Delta-like 1 is essential for postnatal angiogenesis. *Circ Res* 100, 363-371
- Lin TH**, Yurochko A, Kornberg L, Morris J, Walker JJ, Haskill S, Juliano RL (1994): The role of tyrosine phosphorylation in integrin-mediated gene induction in monocytes. *J Cell Biol* 126, 1585-1593
- Lin Y**, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP (2000): Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 105, 71-77
- Liotta L**, Kleinerman J, Saidel F (1974): Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* 34, 997-1004
- Liu S**, Calderwood DA, Ginsberger MH (2000): Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci* 113, 3563-3571
- Liu Y**, Cox SR, Morita T, Kourembanas S (1995): Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* 77, 638-643
- Loomans CJ**, de Koning EF, Staal FJ, Rookmaaker MB, Verseyden C, de Boer HC, Verhaar MC, Braam B, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ (2004): Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes* 53, 195-199
- Lu C**, Takagi S, Springer TA (2001): Association of the membrane proximal regions of the alpha and beta subunit cytoplasmic domains constrains an integrin inactive state. *J Biol Chem* 276, 14642-14648
- Lunde K**, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebekk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Grøgaard HK, Bjørnerheim R, Brekke M, Müller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang K (2006): Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 355, 1199-1209
- Luo BH**, Carman CV, Springer TA (2007): Structural basis of integrin regulation and signalling. *Annu Rev Immunol* 25; 619-647
- Ly DP**, Zazzali KM, Corbett SA (2003): De novo expression of the integrin alpha5beta1 regulates alpha5beta3-mediated adhesion and migration on fibrinogen. *J Biol Chem* 278, 21878-21885
- Mahabeleshwar GH**, Feng W, Phillips DR, Byzova TV (2006): Integrin signalling is critical for pathological angiogenesis. *J Exp Med* 203, 2495-2507
- Mahabeleshwar GH**, Feng W, Reddy K, Plow EF, Byzova TV (2007): Mechanisms of integrin-

vascular endothelial growth factor receptor cross-activation in angiogenesis. *Circ Res* 101, 570-580

Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD (1997): Angiopoetin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277, 55-80

Marinelli L, Gottschalk KE, Meyer A, Novellino E, Kessler H (2004): Human integrin $\alpha v\beta 5$: Homology modeling and ligand binding. *J Med Chem* 47, 4166-4177

McCarty, Monahan-Earley RA, Brown LF, Keller M, Gerhardt H, Rubin K, Shani M, Dvorak HF, Wolburg H, Bader BL, Dvorak AM, Hynes RO (2002): Defective associations between blood vessels and brain parenchyma lead to cerebral hemorrhage in mice lacking αv integrins. *Mol Cell Biol* 22, 7667-7677

Melillo G, Musso T, Sica A, Taylor LS, Cox GW, Varesio L (1995): A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of inducible nitric oxide synthetase promoter. *J Exp Med* 182, 1683-1693

Meredith J, Fazeli B, Schwartz M (1993): The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell* 4, 953-961

Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Pirr J, Rager U, Lippolt P, Hahn A, Fichtner S, Schaefer A, Arseniev L, Ganser A, Drexler H (2009): Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: 5-year follow-up from the randomized-controlled BOOST trial. *Eur Heart J* 30, 2978-2984

Miyake S, Yagita H, Maruyama T, Hashimoto H, Miyasaka N, Okumura K (1993): Beta 1 integrin-mediated interaction with extracellular matrix proteins regulates cytokine gene expression in synovial fluid cells of rheumatoid arthritis patients. *J Exp Med* 177; 863-868

Miyamoto S, Teramoto H, Coso OA, Gutkind JS, Burbelo PD, Akiyama SK, Yamada KM (1995): Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol* 131; 791-805

Murdoch C, Monk PN, Finn A (1999): CXC chemokine receptor expression on human endothelial cells. *Cytokine* 11, 704-712.

Nermut MV, Green NM, Eason P, Yamada SS, Yamada KM (1988): Electron microscopy and structural model of human fibrinogen receptor. *EMBO J* 7, 4093-4099

- Nisato RE**, Tille JC, Jonczyk A, Goodman SL, Pepper MS (2003): α v β 3 and α v β 5 integrin antagonists inhibit angiogenesis in vitro. *Angiogenesis* 6, 105-119
- O'Neill TJ**, Wamhoff BR, Owens GK, Skalak TC (2005): Mobilization of bone marrow-derived cells enhances the angiogenic response to hypoxia without transdifferentiation into endothelial cells. *Circ Res* 97, 1027-1035
- O'Reilly MS**, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Cao Y, Moses M, Lane WS, Sage EH, Folkman J (1994): Angiostatin: a circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59, 471-482
- O'Reilly MS**, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J (1997): Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88, 277-287
- Pierschbacher MD**, Ruoslahti E (1984): The cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small fragments of the molecule. *Nature* 309, 30-33
- Pisano M**, DE Paola I, Nieddu V, Sassu I, Cossu S, Galleri G, Del Gatto A, Budroni M, Cossu A, Saviano M, Palmieri G, Zaccaro L, Rozzo C (2013): In vitro activity of the α v β 3 integrin antagonist RGDchi-hCit on malignant melanoma cells. *Anticancer Res* 33, 871-879
- Pistrosch F**, Herbrig K, Oelschlaegel U, Richter S, Passauer J, Fischer S, Gross P (2005): PPAR γ -agonist rosiglitazone increases number and migratory activity of cultured endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis* 183; 163-167
- Playford MP**, Schaller MD (2004): The interplay between Src-Kinase and Integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* 23, 7928-7946
- Reardon DA**, Neyns B, Weller M, Tonn JC, Nabors LB, Stupp R (2011): An RGD pentapeptide α v β 3 and α v β 5 integrin inhibitor in development for glioblastoma and other malignancies. *Future Oncol* 7, 339-354
- Rehman J**, Li J, Orschell CM, March KL (2003): Peripheral blood „endothelial progenitor cells“ are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 107, 1164-1169
- Reyes M**, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM (2001): Purification and ex vivo expansion of postnatal human mesodermal progenitor cells. *Blood* 98, 2615-25

- Reyes M**, Dudek A, Jahagirda B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM (2002): Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 109, 337-46
- Reynolds LE**, Wyder L, Lively JC, Taverna D, Robinson SD, Huang X, Sheppard D, Hynes RO, Hodivala-Dilke KM (2002): Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nat Med* 8, 27-34
- Risau W** (1997): Mechanism of angiogenesis. *Nature* 368, 671-674
- Risau W**, Flamme I (1995): Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev Biol* 11, 73-91
- Risau W**, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Ekblom P, Kemler R, Doetschman T (1988): Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* 102, 471-478
- Rohde E**, Malischnik C, Thaler D, Maierhofer T, Linkesch W, Lanzer G, Guelly C, Strunk D (2006): Blood monocytes mimic endothelial progenitor cells. *Stem Cell* 24, 357-367
- Ruoslahti E** (1996): RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 697-715
- Salcedo R**, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ (2000): Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 96, 34-40
- Schächinger V**, Assmus B, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW et al. REPAIR-AMI investigators (2009): Intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells abrogates adverse left ventricular remodelling post-acute myocardial infarction: insights from the reinfusion of enriched progenitor cells and infarct remodelling in acute myocardial infarction (REPAIR-AMI) trial. *Eur. J. Heart. Fail.* 11, 973-979
- Schmeisser A**, Garlich CD, Zhang H, Eskafi S, Graffy C, Ludwig J, Strasser RH, Daniel WG (2001): Monocytes coexpress endothelial and macrophagic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res* 49, 671-680
- Schmeisser A**, Graffy C, Daniel WG, Strasser RH (2003): Phenotypic overlap between monocytes and vascular endothelial cells. *Adv Exp Med Biol* 522, 59-74
- Schroeter MR**, Leifheit M, Sudholt P, Heida NM, Dellas C, Rohm I, Alves F, Zientkowska M, Rafail S, Puls M, Hasenfuss G, Konstantinides S, Schäfer K (2008): Leptin enhances the

recruitment of endothelial progenitor cells into neointima lesions after vascular injury by promoting integrin-mediated adhesion. *Circ Res* 103, 536-544

Shattil SJ (2005): Integrins and Src: dynamic duo of adhesion signaling. *Trends Cell Biol* 15; 399-403

Shuai K, Ziemiecki A, Wilks AF, Harpur AG, Sadowski HB, Gilman MZ, Darnell JE (1993): Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of JAK and STAT proteins. *Nature* 366, 580-583

Smith JW, Cheresch DA (1988): The arg-gly-asp binding domain of the vitronectin receptor: photoaffinity crosslinking implicates amino acid residues 61-203 of the β subunit. *J Biol Chem* 263, 18726-18731

Smith JW, Vestal DJ, Irwin SV, Burke TA, Cheresch DA (1990): Purification and functional characterisation of integrin alpha v beta 5. A vitronectin receptor. *J Biol Chem* 265, 11008-11013

Springer TA, Wang JH (2004): The three dimensional structure of integrins and their ligands and conformational regulation of cell adhesion. *Adv Protein Chem* 68, 29-63

Storgard CM, Stupack DG, Jonczyk A, Goodman SL, Fox RI, Cheresch DA (1999): Decreased angiogenesis and arthritic disease in rabbits treated with an alphavbeta3 antagonist. *J Clin Invest* 103,47-54

Stout RD, Shuttles (2004): Functional plasticity of macrophages: reversible adaption to changing microenvironments. *J Leukoc Biol* 76, 509-513

Swift MR, Weinstein BM (2009): Arterial-Venous Specification during development. *Circ Res* 104, 576-588

Szekanecz Z, Koch AE (2001): Chemokines and angiogenesis. *Curr Opin Rheumatol* 13, 202-208.

Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC (2002): Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 106, 2781-2786

Thomas SM, Brugge JS (1997): Cellular function regulated by Src family kinase. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13; 513-609

Udagawa T, Woodside DG, McIntyre BW (1996): Alpha 4 beta 1 (CD49d/CD29) integrin costimulation of human T cells enhances transcription factor and cytokine induction in the absence

of altered sensitivity to anti-CD3 stimulation. *J Immunol* 157; 1965-1972

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

Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S (2003): Relevance of monocytic features for neovascularisation capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation* 108, 2511-2516

Urbich C, Aicher A, Heeschen C, Dernbach E, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S (2005): Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *L Mol Cell Cardiol* 39, 733-742

Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Urbich C, Martin H, M, Dimmeler S (2001): Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 89, E1-E7

Vogeli KM, Jin SW, Martin GR, Stainier DY (2006): A common progenitor for haematopoietic and endothelial lineages in the zebrafish gastrula. *Nature* 443, 337-339

Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, Zetter BR (1984): Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol* 99, 2034-2040

Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM (2002): Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 105, 3017-3024

Wang CZ, Su HW, Hsu YC, Shen MR, Tang MJ (2006): A discoidin domain receptor 1/SHP-2 signaling complex inhibits alpha2beta1- integrin- mediated signal transducer and activator of transcription 1/3 activation and cell migration. *Mol Cell Biol* 17, 2839-2852

Wassmann S, Werner N, Czech T, Nickenig G (2006): Improvement of endothelial function by systemic transfusion of vascular progenitor cells. *Circ Res* 99, e74-e83

Weber KSC, Nelson PJ, Gröne HL, Weber C (1999): Expression of CCR2 by endothelial cells: implication for MCP-1 mediated wound injury repair and in vivo inflammatory activation of endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 2085-2093

- Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Böhm M, Nickenig G (2003):** Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res* 93, e13-e17.
- Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G (2005):** Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl. J Med.* 353, 999-1000
- Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Horning B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H (2004):** Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 364, 141-148
- Woodside DG, Liu S, Ginsberg MH (2001):** Integrin activation. *Thromb Haemost* 86, 316-323
- Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T (2003):** Stroma cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularisation. *Circulation* 107: 1322-1328
- Yao XH, Ping YF, Chen JH, Chen DL, Xu CP, Zheng J, Wang JM, Bian XW (2008):** Production of angiogenic factors by human glioblastoma cells following activation of G-protein coupled formylpeptide receptor FPR. *J Neurooncol* 86, 47-53
- Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, Krasich R, Temm CJ, Prchal JT, Ingram DA (2007):** Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principal. *Blood* 109, 1801-1809
- Yu CL, Meyer DJ, Campbell GS, Lerner AC, Carter-Su C, Schwartz J, Jove R (1995):** Enhanced DNA-binding activity of a STAT3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science* 269, 81-83
- Zentilin L, Tafuro S, Zacchigna S, Arsic N, Pattarini L, Sinigaglia M, Giacca M (2006):** Bone marrow mononuclear cells are required to the side of VEGF-induced neovascularisation but are not incorporated into the newly formed vessels. *Blood* 107, 3546-3554
- Zhang SJ, Zhang H, Wei YJ, Su WJ, Liao ZK, Hou M, Zhou JY, Hu SS (2006):** Adult endothelial progenitor cells from human peripheral blood maintain monocyte/macrophage function throughout in vitro culture. *Cell Res* 16, 577-584

- Zhang ZG**, Zhang L, Jiang Q, Chopp M (2002): Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularisation after focal cerebral ischemia in the adult mouse model. *Circ Res* 90, 284-288
- Zhong Z**, Wen Z, Darnell JE Jr. (1994): Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 264, 95-98.
- Zhu J**, Motejlek K, Wang D, Schmidt A, Reichardt LF (2002): β 8 integrins are required for vascular morphogenesis in mouse embryos. *Development* 129, 2891-2903
- Zhu J**, Luo Bh, Xiao T, Zhang C, Nishida N, Springer TA (2008): Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces. *Mol Cell* 32, 849-886
- Zhu J**, Luo BH, Barth P, Schonbrun J, Baker D, Springer TA (2009): The structure of a receptor with two associating transmembrane domains on the cell surface: integrin α IIb β 3. *Mol Cell* 34, 234-249
- Ziegelhoeffer T**, Fernandez B, Kostin S, Heil M, Voswinckel R, Helisch A, Schaper W (2004): Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res* 94, 230-238.
- Zlotnik A**, Yoshie O (2000): Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12; 121-127

Danksagung

Mein größter Dank gilt meiner Doktormutter, **Frau Prof. Dr. med. Katrin Schäfer**, die es mir durch ihre intensive Unterstützung, Betreuung und Hilfestellungen ermöglicht hat, im Rahmen der Dissertation die Grundlagen wissenschaftlichen Arbeitens und ein großes Spektrum wissenschaftlicher Methoden kennenzulernen. Ich danke ihr besonders für die Geduld, die sie aufgebracht hat, und dafür, dass sie es mir auch trotz der weiten Entfernung über die Jahre hinweg ermöglicht hat, die Arbeit fertigzustellen. Sie war zu jedem Zeitpunkt Ansprechpartner.

Darüber hinaus danke ich ganz herzlich **Frau Dr. rer. nat. Maren Leifheit-Nestler** für die fortwährende exzellente Betreuung während der gesamten Doktorarbeit, auch über die gemeinsame Zeit in Göttingen hinaus. Ich danke für die umfassenden Hilfestellungen, Anregungen und Aufmunterungen, die mir die Arbeit an diesem Projekt angenehmer gestaltet haben und nicht unerheblich am Abschluss der Dissertation beteiligt waren.

Mein weiterer Dank gilt **Frau Sarah Henkel** für ihre engagierte technische Assistenz.

Zudem möchte ich mich bei **Herrn Prof. Dr. med. Gerd Hasenfuß** für die Möglichkeit der Durchführung der Forschungsarbeit im Rahmen der Dissertation in der von ihm geleiteten Klinik für Kardiologie und Pneumologie im Universitätsklinikum Göttingen danken.

Lebenslauf

Am 04. September 1982 wurde ich, Gaby Neumann, geborene Conrad, als erstes Kind des Groß- und Einzelhandelskaufmanns Klaus-Werner-Conrad und der Industriekauffrau Beate Conrad, geborene Helbing, in Oberhausen geboren.

Dort besuchte ich von 1988 bis 1992 die Falkenstein-Grundschule und anschließend das Berthavon-Suttner-Gymnasium, an dem ich 2001 mit dem Abitur mit der Note „sehr gut“ die allgemeine Hochschulreife erlangte.

Im Wintersemester 2001 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen, was durch ein zweisemestriges Studium der Rechtswissenschaften an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn von 2003 bis 2004 unterbrochen wurde. Anschließend setzte ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen fort. Im Sommer 2005 absolvierte ich den 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

Im Frühjahr 2007 begann ich mit der Forschungstätigkeit im Rahmen der Dissertation in der Arbeitsgruppe Vaskuläre Biologie und Artheroskleroseforschung in der Klinik für Kardiologie und Pneumologie des Zentrums Innere Medizin bei Frau Prof. Dr. med. Katrin Schäfer und Herrn Prof. Dr. med. Stavros Konstantinides.

Den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestand ich im Mai 2010 mit der Note „gut“.

Seit Juli 2010 arbeite ich als Assistenzärztin in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums in Essen unter der Leitung von Prof. Dr. med. Hans-Christoph Diener. 2016 werde ich voraussichtlich die Facharztprüfung ablegen.

Im November 2011 heiratete ich meinen Mann, Herrn Tim Neumann, und im April 2012 wurde unsere erste Tochter Emma Neumann geboren. Im März 2015 erwarten wir unser zweites Kind.

Publikationen in Bezug auf die Dissertation

- 1) Leifheit-Nestler M, **Conrad G**, Heida NM, Limbourg A, Limbourg FP, Seidler T, Schroeter MR, Hasenfuss G, Konstantinides S, Schäfer K (2010): Overexpression of integrin beta 5 enhances the paracrine properties of circulating angiogenic cells via Src kinase-mediated activation of STAT3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30; 1398-1406

Präsentationen auf nationalen und internationalen Kongressen

- 1) Leifheit M, **Conrad G**, Heida NM, Cheng IF, Konstantinides S, Schäfer K (2008): Überexpression der Integrin beta 5-Kette fördert die proangiogenetischen Eigenschaften humaner Endothelvorläuferzellen. *Clin Res Cardiol* 97, I, V74; 74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Herz-und Kreislaufforschung, Mannheim, April 2008
- 2) Leifheit M, **Conrad G**, Heida NM, Cheng IF, Schäfer K, Konstantinides S (2009): Mechanismen der proangiogenetischen Wirkung der Überexpression von Integrin $\alpha v \beta 5$ in endothelialen Vorläuferzellen. *Clin Res Cardiol* 98, I, V1547; 75. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Herz-und Kreislaufforschung, Mannheim, April 2009
- 3) Leifheit M, **Conrad G**, Heida NM, Cheng IF, Hasenfuss G, Konstantinides S, Schäfer K (2008): Overexpression of integrin $\beta 5$ enhances the proangiogenic properties of human endothelial progenitor cells. *Circulation* 118, S_461; American Heart Association, Scientific Session 2008, New Orleans, LA, USA
- 4) Leifheit M, **Conrad G**, Heida NM, Schroeter MR, Hasenfuss G, Konstantinides S, Schäfer K (2009): Overexpression of integrin beta 5 enhances the paracrine angiogenic properties of early outgrowth endothelial progenitor cells via Src kinase-mediated activation of STAT3. *Circulation* 120, S_1151; American Heart Association, Scientific Session 2009, New Orleans, LA, USA