

**Endotheliale Mikropartikel und Endothelzellregeneration:  
Neue Erkenntnisse zur Interaktion von Membranbestandteilen apoptotischer  
Zellen mit endothelregenerierenden Zellen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Nadine Heiermann  
aus Dinslaken

2012

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr.med. Nikos S. Werner
2. Gutachter: Prof. Dr.med. dent. James Deschner

Tag der Mündlichen Prüfung: 17.09.2012

Aus der Klinik für Innere Medizin II,  
Universitätsklinikum der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
Direktor: Prof. Dr. med. G. Nickenig

***Meiner kleinen Familie***



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Atherosklerose.....</b>	<b>11</b>
1.1.1 Bedeutung und Ätiologie der Atherosklerose.....	11
1.1.2 Pathogenese der Atherosklerose .....	12
1.1.3 Von der endothelialen Dysfunktion zur atherosklerotischen Plaque .....	13
1.1.4 Therapieansätze.....	13
<b>1.2 Die Bedeutung endothelialer Mikropartikel (EMP).....</b>	<b>14</b>
1.2.1 Charakterisierung der endothelialen Mikropartikel.....	14
1.2.2 Endotheliale Mikropartikel als Marker für Zellschädigung.....	19
1.2.3 Endotheliale Mikropartikel als biologischer Vektor.....	19
<b>1.3 Die Bedeutung endothelialer Progenitorzellen (EPC).....</b>	<b>21</b>
<b>1.4 Ziel dieser Arbeit.....</b>	<b>22</b>

<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>23</b>
2.1.1 Substanzen.....	23
2.1.2 Antikörper .....	25
2.1.3 Puffer und Lösungen .....	27
2.1.4 Geräte und Materialien .....	29
2.1.5 Versuchstiere.....	30
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>31</b>
2.2.1 Zellkultur Endothelzellen.....	31
2.2.2 Gewinnung und Isolierung endothelialer Mikropartikel (EMP) .....	31
2.2.2.1 Markierung endothelialer Mikropartikel .....	32
2.2.2.2 Aufnahme von EMP in Endothelzellen.....	32
2.2.3 Zellkultur endothelialer early outgrowth Progenitorzellen (EO-EPC) .....	33
2.2.3.1 Isolierung und Kultur von humanen EO-EPC.....	33
2.2.3.2 Isolierung und Kultur von EO-EPC aus der Maus.....	34
2.2.4 Probengewinnung aus Versuchstieren .....	34
2.2.5 Migrationsexperimente .....	35

2.2.6	In vitro Identifizierung von EO-EPC .....	36
2.2.6.1	Färbeprotokoll EO-EPC .....	37
2.2.6.2	Färbeprotokoll EO-EPC nach Migration.....	38
2.2.7	Fluoreszenzmikroskopie .....	39
2.2.8	Apoptose Assay.....	39
2.2.9	Durchflusszytometrie (FACS - Analysen) .....	41
2.2.9.1	FACS - Analyse EMP .....	41
2.2.9.2	FACS - Analyse Progenitorzellen - Blut.....	43
2.2.9.3	FACS - Analyse Progenitorzellen - Knochenmark.....	43
2.2.9.4	FACS - Analyse Immunzellen - Blut und KM .....	44
2.2.10	Statistische Analyse.....	45
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>46</b>
3.1	HCAEC setzen bei Serumentzug vermehrt EMP frei.....	46
3.2	EMP werden in Endothelzellen aufgenommen.....	48
3.3	EMP bewirken eine vermehrte Differenzierung humaner MNC in EO - EPC.	50
3.4	EMP erhöhen die Migration von EPC verglichen mit SDF-1 .....	53

3.5 EMP inhibieren die TNF - alpha induzierte Apoptose von EPC .....	55
3.6 EMP erhöhen die Anzahl von zirkulierenden und ortsständigen EO-EPC im Mausmodell .....	57
3.7 FACS - Analyse von Immunzellen in Blut und KM .....	62
4. Diskussion .....	64
4.1 EMP als Bindeglied zwischen apoptotischen und regenerierenden Endothelzellen.....	64
4.2 EMP als Teil interzellulärer Kommunikationswege.....	66
4.3 Offene Fragen .....	70
5. Zusammenfassung.....	72
6. Literaturverzeichnis .....	73
Danksagung.....	86



## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ac	Acetyliert
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
Dil	1,1.-Dioctadecyl-3,3,3.,3.-tetramethylindo-carbocyanin perchlorat
EBM	Endothelzell Basalmedium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGM	Endothelzell Wachstumsmedium
EMP	Endotheliale Mikropartikel
EO-EPC	Frühe (early outgrowth) endotheliale Progenitorzellen
EPC	Endotheliale Progenitorzellen
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortieranalyse
FITC	Fluoreszin Isothiozyanat
FKS	Fetales Kälberserum
HCAEC	Humane koronare Endothelzellen
hEMP	Humane endotheliale Mikropartikel
Ig	Immunglobulin
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
KHK	Koronare Herzkrankheit
KM	Knochenmark
LDL	Low density lipoprotein
MNC	Mononukleäre Zellen
MP	Mikropartikel
mRNA	Boten - Ribonukleinsäure
NO	Stickstoff
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDGF	Platelet derived growth factor

PE	Phycoerythrin
PS	Phosphatidylserin
PSR	Phosphatidylserin-Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
SDF	Stromal Cell Derived Factor
SHH	Sonic Hedgehog
TF	Tissue factor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
VCAM	Gefäßzell - Adhäsionsprotein
VEGFR	Gefäßendothelialer Wachstumsfaktor
VSMC	Glatte Gefäßmuskelzelle
vWF	von Willebrand Faktor

## 1. Einleitung

### 1.1 Atherosklerose

#### 1.1.1 Bedeutung und Ätiologie der Atherosklerose

Die koronare Herzkrankheit (KHK) als Folge der ihr zugrundeliegenden Atherosklerose ist die häufigste Todesursache in der industrialisierten Welt. Neben der KHK ist die Atherosklerose außerdem Ursache weiterer schwerwiegender Erkrankungen wie beispielsweise Myokardinfarkt, periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und Schlaganfall (Giannotti und Landmesser, 2007; Kannel, 1998).

Die Atherosklerose ist eine Erkrankung der arteriellen Gefäße, die im gesamten Organismus auftreten kann. Prädilektionsorte für die Entstehung der Atherosklerose sind jedoch vor allem Gefäßbifurkationen und alle anderen Stellen des Gefäßsystems, an denen es zu Veränderungen des Blutflusses kommt.

Grundlage für die Atherogenese ist eine zunehmende Einschränkung der Gefäßfunktion, die ihre Ursache vor allem in einer fortschreitenden Schädigung und pathologischen Veränderung der Endothelzellen hat.

Bei Progredienz der Erkrankung können neben einer chronischen Ischämie des nachfolgenden Gewebes aufgrund einer dauerhaften Minderperfusion auch akute thromboembolische Ereignisse resultieren (Libby, 2000, 2002; Lusis, 2000; Ross, 1999).

Ursächlich für die Schädigung des Endothels und somit für die Entstehung der Atherosklerose ist vor allem das Zusammenspiel verschiedener genetischer und umweltbedingter Risikofaktoren, wobei hier dem Diabetes mellitus, der arteriellen Hypertonie, der familiären Disposition, dem Übergewicht, der cholesterinreichen Ernährung, dem Rauchen und dem Bewegungsmangel besondere Bedeutung zukommen. Das Vorliegen mehrerer dieser genannten Risikofaktoren kann zur Potenzierung der einzelnen Faktoren und somit zu einer deutlichen Erhöhung des Gesamtrisikos führen (Martin et al., 1986; Lusis, 2000).

### 1.1.2 Pathogenese der Atherosklerose

Eine lange Zeit wurde angenommen, dass die Atherosklerose hauptsächlich durch eine Lipidspeicherstörung mit einer vermehrten Ablagerung von Lipiden und Lipoproteinen in der Gefäßwand charakterisiert ist. Mittlerweile hat sich das Verständnis der Pathogenese der Atherosklerose dahingehend geändert, dass es sich hierbei um das komplexe Zusammenspiel verschiedener Faktoren handelt. Zu diesen Faktoren zählen neben der Lipidspeicherstörung vor allem die initiale Schädigung der Endothelzellen und die daraus resultierenden inflammatorischen und proliferativen Prozesse (Libby et al., 2002; Ross, 1995).

Das intakte Endothel bildet eine dynamische und schützende Schicht zwischen der Arterienwand und den zirkulierenden Zellen des Blutes und hat wichtige Funktionen bei der Erhaltung der vaskulären Homöostase. Die Endothelzellen wirken als endokrines und parakrines Organ indem sie eine Vielzahl von Substanzen sezernieren, die Blutgerinnung, Gefäßtonus und verschiedene Wachstumsprozesse beeinflussen. Hierzu gehören neben unterschiedlichen Adhäsionsmolekülen unter anderen auch Stickstoffmonoxid (NO), Endothelin-1, Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Tumornekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Interleukin-1 (Chatterjee et al., 2008; Gimbrone, 1999; Moncada und Higgs, 2006; Ross, 1986).

Die unter 1.1.1 aufgeführten Risikofaktoren begünstigen die Atherogenese durch ihre schädigenden Einflüsse auf die Endothelzellen (Ross, 1999).

Die endotheliale Dysfunktion geht einher mit einer zunehmenden Apoptose und Permeabilität der Endothelzellschicht. Darüber hinaus befinden sich die Endothelzellen in diesem Stadium im Zustand der gesteigerten Aktivierung.

Aufgrund der Oberflächenveränderungen der Endothelzellen kommt es zu einer erhöhten Thrombozytenadhäsion, zur Invasion von Entzündungszellen, zur Migration und zur Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und somit letztendlich zur Bildung atherosklerotischer Plaques (Lusis, 2000; Wassmann und Nickenig, 2003).

Im Stadium der endothelialen Dysfunktion ist das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse bereits deutlich erhöht, auch wenn in der Angiografie noch keine Gefäßläsionen sichtbar sind. Daher hat die endotheliale Dysfunktion bereits prognostische Bedeutung für die Patienten (Heitzer et al., 2001; Schächinger et al., 2000).

### **1.1.3 Von der endothelialen Dysfunktion zur atherosklerotischen Plaque**

Bei Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion finden sich neben der Endothelzellapoptose und der Erhöhten Permeabilität der Endothelzellschicht außerdem vermehrt membranständige Zelladhäsionsmoleküle und es kommt zur Störung der lokalen Thrombolyse (Cybulsky und Gimbrone, 1991; De Caterina et al., 1995; Henn et al., 1998; Libby et al., 2002; Pueyo et al., 2000).

In Folge dessen können Lipide und zirkulierende Zellen wie Monozyten und T - Lymphozyten in den subintimalen Raum vordringen und sich dort ablagern. Die in Makrophagen differenzierten eingewanderten Zellen bilden sich durch die Aufnahme der Lipide in sogenannte Schaumzellen um (Botham et al., 2007; Libby, 2002; Nakashima et al., 2007). Die entstandenen Schaumzellen setzen ebenso wie die T - Lymphozyten Interleukine, proinflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren und Chemokine wie beispielsweise Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF alpha) frei. In der Folge wandern vermehrt glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) aus der Media in die Region ein und bilden zusammen mit der von ihnen sezernierten Matrix eine fibröse Kappe über den Lipidablagerungen in der Gefäßwand (Libby, 2002; Ross, 1999).

Die auf diese Weise entstehenden Strukturen werden als Plaque bezeichnet und können bei zunehmender Größe die Blutzufuhr im Gefäß langsam einschränken oder bei Ruptur der fibrösen Hülle und darauffolgender Aktivierung der Gerinnungskaskade mit Bildung eines Thrombus zu einem akuten Gefäßverschluss führen (Libby, 2002; Lusis, 2000).

### **1.1.4 Therapieansätze**

Eine kausale Therapie der Atherosklerose existiert zurzeit nicht. Die effektivste Maßnahme zur Verhinderung oder Progression atherosklerotischer Läsionen ist die Optimierung von kardiovaskulären Risikofaktoren im Sinne einer Primär- und Sekundärprävention.

Ein kausaler Therapieansatz zur Behandlung der Atherosklerose wäre möglicherweise die Regeneration der geschädigten Endothelzellschicht zu forcieren und gleichzeitig die Endothelzellapoptose zu reduzieren.

Anhand der unter 1.1.2 aufgeführten Pathogenese der Atherosklerose wird deutlich, dass die Endothelzellschädigung der entscheidende Schritt im Ablauf der Atherogenese ist. Die Regeneration des zerstörten Endothels wäre folglich eine interessante Option zur Therapie einer fortschreitenden Atherosklerose.

## **1.2 Die Bedeutung endothelialer Mikropartikel (EMP)**

### **1.2.1 Charakterisierung der endothelialen Mikropartikel**

EMP sind 0,1 bis 1,5  $\mu\text{m}$  kleine Vesikel, die auf Grund ihres Ursprungs insbesondere endothelzellspezifische Antigene exprimieren und daher mittels verschiedener Endothelzellmarker identifiziert werden können.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann die Anzahl der zirkulierenden EMP bestimmt werden. Hierzu kann ein Endothelzellmarker wie CD 31 in Kombination mit Annexin V, welches an Phosphatidylserin bindet, verwendet werden (Jimenez et al., 2003; Werner et al., 2006). Ein weiterer spezifischer Marker für EMP ist VE Cadherin (CD144), der ebenfalls im Rahmen der Durchflusszytometrie genutzt werden kann (Berckmans et al., 2001; Horstman et al., 2004; Koga et al., 2005). Neben den bereits genannten Markern für endotheliale Mikropartikel existieren noch weitere charakteristische Marker wie CD 40, CD 105 (ICAM-1) und CD 146 (Horstman et al., 2004; Leroyer et al., 2008).

Mikropartikel zirkulieren in geringen Konzentrationen physiologischerweise frei im peripheren Blut. Im Rahmen verschiedener pathologischer Zustände wie beispielsweise auch bei Vorliegen einer kardiovaskulären Erkrankung lassen sich erhöhte EMP Zahlen im Blut nachweisen (Bernal-Mizrachi et al., 2003; Horstman et al. 2004; Mallat et al., 2000; Werner et al., 2006).

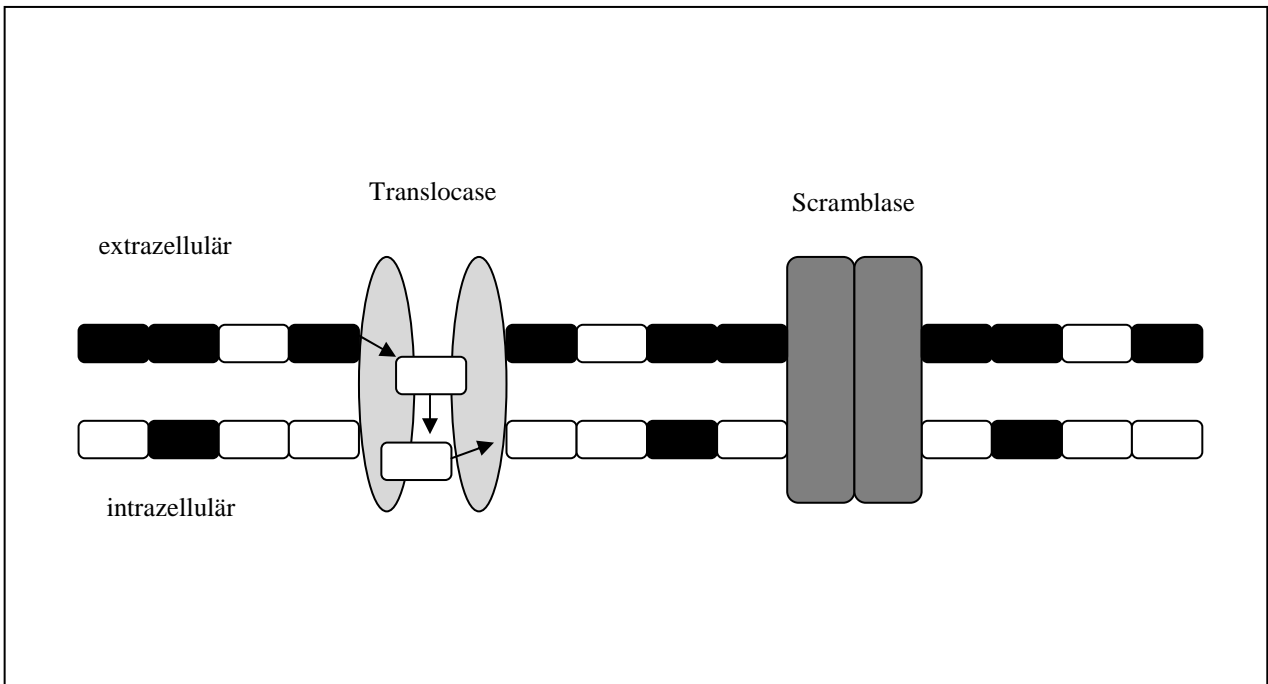
Für die Freisetzung der Mikropartikel sind grundlegende Veränderungen der Zellmembran verantwortlich, wie sie im Zustand der Zellaktivierung, der Zellalterung, der Zellapoptose und bei verschiedenen weiteren pathologischen Zuständen eintreten (Barry et al., 1998; Beaudin und Grondin, 1991; Fevrier und Raposo, 2004; Greenwalt, 2006; Hugel et al., 2005; Van Wijk et al., 2003).

Die äußere Schicht der Zellmembran besteht physiologischerweise hauptsächlich aus Cholinphospholipiden, während die innere Schicht der Zellmembran zum größten Teil durch Aminophospholipide, wie beispielsweise Phosphatidylserin (PS), gebildet wird.

Diese Asymmetrie im Phospholipidverhältnis der Zellemembran wird durch das Enzym Translocase aufrechterhalten. Die Translocase transportiert aktiv PS von der äußeren zur inneren Schicht der Zellmembran. Im Falle der Zellaktivierung oder der Apoptose kommt es zur Inhibition der Translocase und gleichzeitig zur Aktivierung eines weiteren Enzyms, der nicht spezifischen Scramblase. Die nicht spezifische Scramblase ermöglicht sowohl Aminophospholipiden wie auch Cholinphospholipiden die freie Beweglichkeit zwischen innerer und äußerer Zellmembran, was schließlich zu einer vermehrten Präsenz von PS an der äußeren Zellemembran führt.

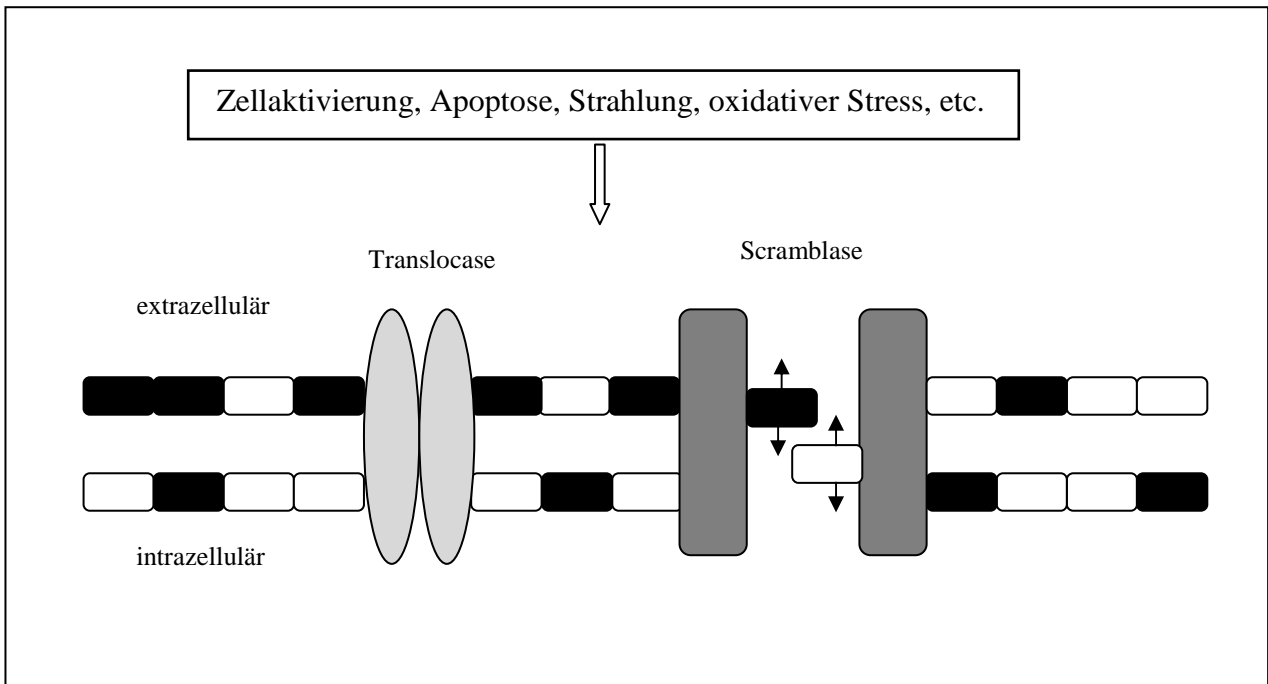
Das veränderte Phospholipidverhältnis bewirkt eine vermehrte Freisetzung von PS-exprimierenden Mikropartikeln (MP), welche als Abschnürungen der Zellmembran der Ursprungszelle entstehen (Zwaal und Schroit, 1997).

Eine schematische Darstellung der Vorgänge an der Zellmembran ist den Abbildungen 1 a - c zu entnehmen.

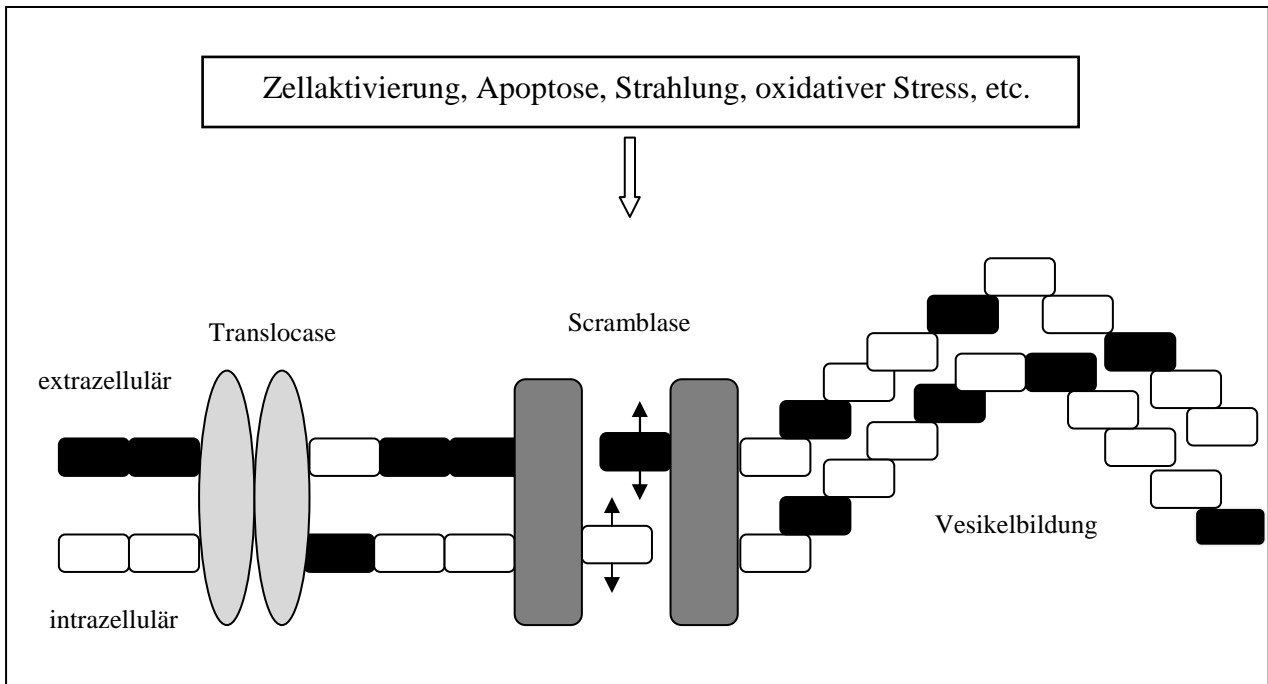


**Abb. 1 a:** Vereinfachte schematische Darstellung der Zellmembran. Physiologischerweise besteht an der Zellmembran eine Asymmetrie im Phospholipidverhältnis. Zum extrazellulären Raum hin überwiegen die Cholinphospholipide (hier schwarz dargestellt), während zum Zellinneren hin die Aminophospholipide (hier weiß dargestellt) dominieren. Aufrechterhalten wird dieses Ungleichgewicht durch die Translocase, die Aminophospholipide wie Phosphatidylserin von außen nach innen transportiert.





**Abb. 1 b:** Vereinfachte schematische Darstellung der Zellmembran im aktivierten Zustand. Die Translocase ist inaktiviert. Die nicht spezifische Scramblase sorgt dafür, dass sich Amino- und Cholinphospholipide frei zwischen innerer und äußerer Membran bewegen können.



**Abb. 1 c:** Vereinfachte schematische Darstellung der ausgelösten Vesikelbildung. Durch den veränderten Zustand im Phospholipidverhältnis kommt es zu einer Vesikelbildung bei der vermehrt Phosphatidylserin (hier weiß dargestellt) exprimiert wird.

Mikropartikel können neben dem bereits genannten Phosphatidylserin auch mRNA, microRNA, Membranteile, Zytoplasmabestandteile und andere Antigene der Ursprungszellen exprimieren. Die Freisetzung von Mikropartikeln konnte neben Endothelzellen ebenfalls für Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten nachgewiesen werden (Horstman und Ahn, 1999; Horstman et al., 2004).

### **1.2.2 Endotheliale Mikropartikel als Marker für Zellschädigung**

Eine erhöhte Anzahl an EMP lässt sich in vivo bei allen Zuständen nachweisen, die mit einer erhöhten Endothelzellschädigung einhergehen, wie beispielsweise bei der KHK und dem akuten Koronarsyndrom (Bernal-Mizrachi et al., 2003; Boulanger et al., 2001; Chironi et al., 2009; Horstman et al., 2004; Leroyer et al., 2008). Darüber hinaus finden sich erhöhte EMP-Level auch bei einer Vielzahl anderer Erkrankungen, die letztlich jedoch gleichfalls zu einer Endothelzellschädigung führen. Dazu zählen unter anderen der Diabetes mellitus, die Multiple Sklerose, die thrombotisch - thrombozytopenische Purpura, die Sepsis und die Präeklampsie (Gonzalez-Quintero et al., 2003; Jimenez et al., 2001; Koga et al., 2005; Minagar et al., 2001; Sabatier et al., 2002; Soriano et al. 2005). Aus diesem Grund wird in verschiedenen Arbeitsgruppen schon seit längerer Zeit die Möglichkeit der EMP-Quantifizierung zur Überprüfung des Endothelzellstatus untersucht, um das Ausmaß einer vorliegenden Endothelzellschädigung im Rahmen von kardiovaskulären, immunologischen und entzündlichen Erkrankungen genauer zu definieren und um den Krankheitsverlauf zu überwachen (Boulanger et al., 2006; Horstman et al., 2004; Piccin et al., 2007; Werner et al., 2006).

### **1.2.3 Endotheliale Mikropartikel als biologischer Vektor**

Neben ihrer Bedeutung als Marker für die Zellschädigung im Rahmen der unterschiedlichsten Krankheitsbilder verursachen Mikropartikel vielfältige parakrine und autokrine Aktionen, unter anderem auch mit Wirkung auf die verschiedenen Zellen des kardiovaskulären Systems.

Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Mikropartikel, die SHH (Sonic Hedgehog) Proteine tragen die Angiogenese und die Proliferation von Endothelzellen fördern (Soleti et al., 2009). Ähnliche Ergebnisse wurden für CD40 positive Mikropartikel gefunden (Leroyer et al., 2008).

Auch die Beteiligung von Mikropartikeln bei der Gerinnungsaktivierung und der Thrombose wurde bereits untersucht (Combes et al., 1999; George, 2008; Mallat et al., 2000). Das hohe prokoagulatorische Potenzial von Mikropartikeln wird insbesondere dadurch gefördert, dass sie verschiedene an der Gerinnung beteiligte Faktoren wie von Willebrand Faktor (vWF), Faktor V/Va oder Tissue Factor (TF) exprimieren können (Colman, 1999; Jimenez et al., 2003; Jy et al., 2005).

Bei Tumorerkrankungen gibt es offenbar einen Zusammenhang zwischen Tumorwachstum, Progress, Metastasenbildung und der Anzahl zirkulierender Mikropartikel (Al-Nedawi et al., 2009; Janowska-Wieczorek et al., 2005; Kim et al., 2003). Mikropartikel, die von den Tumorzellen freigesetzt werden können VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor), Interleukin-11 und ähnliche Moleküle exprimieren und so die Proliferation von Endothelzellen und die Neoangiogenese begünstigen (Janowska-Wieczorek et al., 2005).

Inzwischen gibt es Hinweise dafür, dass Mikropartikel sogar in der Lage sind RNA, Proteine oder ganze Zellorganellen zu übertragen und so Informationen an ihre Zielzellen weiter zu leiten.

Es konnte gezeigt werden, dass RNA tragende Mikropartikel in Endothelzellen aufgenommen werden können und in der Folge das Überleben und die Proliferation der Endothelzellen sowie die Angiogenese begünstigt sind (Deregibus et al., 2007). Durch den Transfer von mRNA übernehmen die Mikropartikel darüber hinaus eine Schutzfunktion gegenüber der enzymatischen Zersetzung der biologischen Informationen (Anker und Stroun, 2002; Enders et al., 2002).

Mikropartikel sind somit zum einen wichtige Biomarker im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen, zum anderen erfüllen sie mannigfaltige Funktionen im Rahmen der Zellkommunikation.

### 1.3 Die Bedeutung endothelialer Progenitorzellen (EPC)

Ein vitales und intaktes Gefäßendothel sowie die Regeneration und Proliferation endothelialer Zellen nach Schädigung sind für die Prävention der Atherosklerose von entscheidender Bedeutung (Gimbrone, 1999; Libby et al., 1992; Libby, 2002; Luscis, 2000). Lange Zeit wurde angenommen, dass die Reendothelialisierung lediglich durch ortsständige Endothelzellen der Gefäßwand kontrolliert würde (Carmeliet et al., 1997). Mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass neben den ortsständigen Endothelzellen zirkulierende endotheliale Progenitorzellen möglicherweise zu dieser Reparatur des Endothelzellschadens beitragen (Chaudhury et al., 2012; Gill et al., 2001; Hill et al., 2003; Hirschi, 2010; Iacobas et al., 2010; Ikenaga et al., 2001; Kalka et al., 2000; Kawamoto et al., 2003; Walter et al., 2002; Werner et al., 2003; Werner und Nickenig, 2007).

Endotheliale Progenitorzellen stammen aus dem Knochenmark und lassen sich durch die Expression verschiedener Oberflächenmarker wie beispielsweise CD34, CD133 und VEGFR-2 (KDR oder FLK-1) charakterisieren. In vitro ist die Identifikation von EPC durch die Aufnahme von Dil-Ac-LDL und die Bindung von endothelspezifischen Lektinen wie *Ulex europaeus* möglich (Gehling et al., 2000; Handgretinger et al., 2003; Hirschi et al., 2008; Peichev et al., 2000; Shmelkov et al., 2005; Yoder, 2009).

EPC besitzen die Fähigkeit sich innerhalb der Zirkulation frei bewegen zu können und in unterschiedliche Organe migrieren zu können. Dort haben sie das Potenzial sich in organspezifische Zellen wie beispielsweise Endothelzellen weiter zu differenzieren (Blau et al., 2001, Hirschi, 2010, Iacobas et al., 2010; Kawamoto und Asahara, 2007).

Die Beteiligung endothelialer Progenitorzellen an einer beschleunigten Reendothelialisierung und Regeneration der betroffenen Gefäßregion konnte bereits in einigen Untersuchungen tierexperimentell und klinisch nachgewiesen werden (Walter et al., 2002; Werner et al., 2002, 2003, 2007; Xu et al., 2003). Ein Missverhältnis zwischen Endothelzellschaden und Endothelzellregeneration durch endotheliale Progenitorzellen führte darüber hinaus in weiteren Untersuchungen zum Fortschreiten der endothelialen Dys-

funktion und schließlich zur Ausbildung atherosklerotischer Plaques (Pirro et al., 2006; Werner et al., 2006; Werner und Nickenig, 2006).

Neben dieser wichtigen Funktion bei der Reendothelialisierung und Gefäßregeneration tragen EPC im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen offensichtlich auch zur Neoangiogenese bei (Alev et al., 2011; Asahara et al., 1997; Critser und Yoder, 2010; Crosby et al., 2000; Gill et al., 2001; Jujo et al., 2008; Kalka et al., 2000; Kawamoto und Asahara, 2007; Roncalli et al. 2008, Zampetaki et al., 2008).

#### **1.4 Ziel dieser Arbeit**

Die Rolle und die Funktion von endothelialen Mikropartikeln im Zusammenhang mit der KHK, ihr Beitrag zur Pathogenese der Atherosklerose und ihre mögliche Interaktion mit endothelregenerierenden Zellen ist bislang noch unbekannt.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die mögliche Mediatorfunktion der EMP beim Transfer biologischer Informationen zwischen den geschädigten und den regenerierenden Endothelzellen zu untersuchen.

Unsere Hypothese war, dass endotheliale Mikropartikel mit ihren Zielzellen (Endothelzellen, EPC) über spezifische Rezeptoren interagieren. Diese Interaktion führt zur Aussendung von Regenerationssignalen, die die Endothelzellregeneration nach Schädigung beschleunigt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

Sämtliche Materialien wurden nach Herstellerangaben eingesetzt. Bei der Verarbeitung von Chemikalien oder Substanzen wurden sterilisierte oder autoklavierte Materialien und Gefäße verwendet.

#### 2.1.1 Substanzen

**Ampuwa**, Fresenius - Kabi, Friedberg

**Annexin V**, FITC, BD Biosciences, Heidelberg

**Biocoll** separating solution, (Dichtegradientenlösung), Biochrom AG, Berlin

**Bovines Serumalbumin (BSA)**, Serra, Heidelberg

**Boviner Gehirnextrakt**, Clonetics Corp., Walkersville MD, USA

**Kalziumchlorid** ( $\text{CaCl}_2$ ), AppliChem, Darmstadt

**Cell Death Detection Elisa plus**, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

**Dil - Ac - LDL**, Harbor Bio-Products, Norwood, USA

**Di - Natriumhydrogenphosphat** ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), AppliChem, Darmstadt

**EDTA** (Ethylendiamintetraessigsäure), Sigma Aldrich, Steinheim

**Endothelzell Basalmedium (EBM)**, Clonetics Corp., Walkersville, MD, USA

**Endothelial Growth Medium MV**, Promocell, Heidelberg

**Ethanol 99%**, Merck, Darmstadt

**Fibronektin** aus humanem Plasma, Sigma Aldrich, Steinheim

**Fluoreszierendes Eindeckmedium DAKO®**, Dako Corporation, Carpinteria, USA

**Fetales Kälberserum (FKS)**, Invitrogen, Karlsruhe

**GA-1000** (Gentamicin Sulfat), Clonetics Corp., Walkersville, MD, USA

**Gentamicin SF 40**, Hexal, Holzkirchen

**HEGF** (humaner epidermaler Wachstumsfaktor), Clonetics Corp., Walkersville, MD, USA

**HEPES** (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), AppliChem, Darmstadt

**Hydrocortison**, 1,0 MG/ML Hydrocortisone, Clonetics Corp., Walkersville, MD, USA

**Kaliumchlorid** (KCl), AppliChem, Darmstadt

**Ketanest**, Ketaminhydrochlorid 100mg/ml), Pharmacia GmbH, Karlsruhe

**Kaliumdihydrogenphosphat** (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), AppliChem, Darmstadt

**Lektin** (10µg/ml), Ulex europaeus, FITC markiert, Sigma Aldrich, Steinheim

**Natriumchlorid** (NaCl), AppliChem, Darmstadt

**NaCl 0,9 %** (Kochsalzlösung), B. Braun, Melsungen

**Paraformaldehyd** (PFA), Merck, Darmstadt

**Pharmlyse**, BD Becton Dickinson, Heidelberg

**PKH26 Red Fluorescent Linker Kit**, Sigma Aldrich, Steinheim

**Rampun 2%**, Xylazin, Bayer AG, Leverkusen

**SDF-1** (Stromal Cell Derived Factor 1), Sigma Aldrich, Steinheim

**Supplement Mix MV**, Promocell, Heidelberg

**TNS** (Trypsin neutralizing solution), Promocell, Heidelberg

**Trypsin EDTA**, Promocell, Heidelberg

**VECTASHIELD® Eindeckmedium mit DAPI**, Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA

**TNF α**, Bachem Distribution Services GmbH, Weil am Rhein



## 2.1.2 Antikörper

Tabelle 1: Verwendete Antikörper

Antikörperbezeichnung	Fluoreszenz	hergestellt in	Ig-Fraktion	Herstellerfirma
<b>Anti - Mouse IgG</b>	PE	Ziege	IgG2a, κ	Sigma Aldrich Steinheim
<b>CD 3</b> monoklonaler anti-Maus Antikörper, Klon 17A2	FITC	Ratte	IgG2b, κ	BD Biosciences Pharmingen Heidelberg
<b>CD 4</b> monoklonaler anti-Maus Antikörper, Klon RM4-5	PE	Ratte	IgG2a, κ	BD Biosciences Pharmingen Heidelberg
<b>CD 11a</b> monoklonaler anti-Maus Antikörper, Klon 2D7	FITC	Ratte	IgG2a, κ	BD Biosciences Pharmingen Heidelberg
<b>CD 11b</b> monoklonaler anti-Maus Antikörper, Klon M1/70	PE	Ratte	IgG2b, κ	BD Biosciences Pharmingen Heidelberg
<b>CD 14</b> monoklonaler anti-Maus Antikörper, Klon rmC5-3	FITC	Ratte	IgG1, κ	BD Biosciences Pharmingen Heidelberg
<b>CD 19</b> monoklonaler anti-Maus Antikörper, Klon 1D3	PE	Ratte	IgG2a, κ	BD Biosciences Pharmingen Heidelberg

<b>Antikörperbezeichnung</b>	<b>Fluoreszenz</b>	<b>hergestellt in</b>	<b>Ig-Fraktion</b>	<b>Herstellerfirma</b>
<b>CD 31</b> Monoklonaler anti-human Antikörper, Klon WM59	PE	Maus	IgG1, κ	BD Biosciences Pharmingen Heidelberg
<b>CD 43</b> monoklonaler anti-Maus Antikörper, Klon S7	FITC	Ratte	IgG2a, κ	BD Biosciences Pharmingen Heidelberg
<b>CD 45</b> monoklonaler anti-Maus Antikörper, Klon 30-F11	PE	Ratte	IgG2b, κ	BD Biosciences Pharmingen Heidelberg
<b>Fc - Block:</b> <b>CD16/CD32 Mouse</b> <b>(Fcγ III/II Rezeptor)</b> Klon 2.4G2	-	Ratte	IgG2b, κ	BD Biosciences Pharmingen Heidelberg
<b>Flk - 1 (VEGF - R2)</b> monoklonaler anti-Maus Antikörper, Klon Avas 12α1	PE	Ratte	IgG2a, κ	BD Biosciences Pharmingen Heidelberg
<b>Isotypenkontrolle</b> Klon R35-95	FITC	Ratte	IgG2a, κ	BD Biosciences Pharmingen Heidelberg
<b>Isotypenkontrolle</b> Klon R35-95	PE	Ratte	IgG2a, κ	BD Biosciences Pharmingen Heidelberg

Antikörperbezeichnung	Fluoreszenz	hergestellt in	Ig-Fraktion	Herstellerfirma
<b>NK 1.1</b> monoklonaler anti-Maus Antikörper, Klon PK136	PE	Ratte	IgG2a, κ	BD Biosciences Pharmingen Heidelberg
<b>Sca - 1 (Ly-6A/E)</b> monoklonaler anti-Maus Antikörper, Klon E13-161.7	FITC	Ratte	IgG2a, κ	BD Biosciences Pharmingen Heidelberg
<b>VE Cadherin (CD 144)</b> monokl. anti-human AK, Klon 55-7H1	über sekundär Antikörper	Maus	IgG1, κ	BD Biosciences Pharmingen Heidelberg

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

Sämtliche Lösungen und Puffer wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt und teilweise anschließend zusätzlich autoklaviert oder steril filtriert.

#### Binding - Puffer - EMP:

10 mM HEPES      0,4766 g

140 mM NaCl      1,636 g

2,5 mM CaCl<sub>2</sub>      0,0555 g

gelöst in 200 ml Aqua dest.

FACS - Puffer - Maus:

500 ml 1x PBS

25 ml FKS (leukozytenfiltriert)

2,5 g BSA

Milz - EDTA - Puffer:

100 ml 10x PBS

10 ml FKS (leukozytenfiltriert)

40 µl 0,5 M EDTA

auf 1000 ml mit Aqua dest., steril Filtrierung

PBS (Phosphate buffered saline):

Die Lösung wird 10 - fach konzentriert angesetzt und kann nach Bedarf verdünnt werden

NaCl            80 g

KCL            2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>    14,4 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>     2,4 g

auf 1 Liter Aqua dest., pH 7,4

Pharmlyse:

Pharmlyse    5 ml

Ampuwa      45 ml

Sca - 1 FITC AK - Lösung:

Sca - 1 AK 10 µl

FACS - Puffer-Maus 500 µl

**2.1.4 Geräte und Materialien****Absorbance Reader**, Apollo LB 912, Berthold, Bad Wildbad**Axio Vision LE Rel. 4.5**, Zeiss, Göttingen**Cell strainer** 70 µm Nylon, BD Falcon, Becton Dickinson, USA**Deckgläser**, Paul Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen**EDTA Röhrchen** (Monovette), Sarstedt, Nümbrecht**FACS Calibur**, BD Becton Dickinson, Heidelberg**FACS Röhrchen**, BD Becton Dickinson, Heidelberg**HTS Fluoroblock/Boyden chamber** for 24-well, BD Becton Dickinson, Heidelberg**Microsoft® Excel** Software 2002, Microsoft, Redmond, Washington, USA**Natrium - Citrat Röhrchen** (S-Monovette), Sarstedt, Nümbrecht**Mikroskop**, Axiovert 200 M, Zeiss, Göttingen**Mikroskop**, Axiovert 40 CFL, Zeiss, Göttingen**Objektträger**, Engelbrecht Medizin & Labortechnik GmbH, Edemünde**Trucount Tubes**, BD Becton Dickinson, Heidelberg**Zellkulturplättchen**, Nunc, Wiesbaden**Zellkulturschalen**, Biochrom AG, Berlin**Zellkulturtestplatten**, (6, 24 bzw. 96 well), Greiner, Frickenhausen**Zentrifuge**, Biofuge pico, Heraeus, Düsseldorf**Zentrifuge** Labofuge 400R, Heraeus, Düsseldorf**Zentrifuge** Megafuge 1.0, Heraeus, Düsseldorf**Zentrifuge** Sorvall SS 34, mit Rotor SS 34, Sorvall, Newtown, CT, USA

### **2.1.5 Versuchstiere**

Für sämtliche in vivo Versuche wurden männliche C57 black 6 N Mäuse der Firma Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland, der gleichen Altersgruppe (12 Wochen) verwendet.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur Endothelzellen**

Zur Gewinnung endothelialer Mikropartikel wurden humane koronare Endothelzellen (HCAEC) der Firma Promocell, Heidelberg verwendet.

Die HCAEC wurden standardisiert in einer Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub>-Anteil bei 37 °C in Gewebekulturschalen (10 cm Durchmesser) mit 10 ml Nährmedium in Kultur gebracht.

Als Nährmedium für die HCAEC wurde ausschließlich Endothelial Growth Medium MV von Promocell versetzt mit 40 mg Gentamicin und Supplement Mix MV von Promocell (2 % FKS, 10 ng/ml EGF, 1,0 µg/ml Hydrocortison, 0,4 % ECGS/H) verwendet. Der Mediumwechsel erfolgte unter sterilen Bedingungen alle zwei Tage.

Die Zelllinien wurden kultiviert, bis sie einen zu circa 90 % konfluenten Zellrasen bildeten. Darauf wurden sie zur Induktion der Apoptose entweder für weitere drei Tage mit 5 ml reinem Endothelial Growth Medium MV, ohne Versatz mit Supplement Mix MV (Hungermedium) in Kultur gehalten oder es erfolgte die Subkultivierung durch Trypsinierung.

Sämtliche Experimente wurden mit Zellen der 5. bis 9. Passage durchgeführt.

### **2.2.2 Gewinnung und Isolierung endothelialer Mikropartikel (EMP)**

Die EMP wurden aus HCAEC gewonnen, nachdem diese über drei Tage mit reinem Endothelial Growth Medium MV ohne Zusatz von Supplement Mix MV (Hungermedium) kultiviert worden waren. Hierdurch kommt es zur Apoptoseinduktion mit Freisetzung von EMP in den Überstand.

Zur Isolierung der EMP wurde dieser Überstand aus den Gewebekulturschalen zunächst für 3 Minuten bei Raumtemperatur mit 1000 U/min zentrifugiert (Megafuge 1.0), um die Lösung von größeren Zellpartikeln und Debris zu befreien. Anschließend wurde der so

gewonnene, aufgereinigte Überstand bei 40.000 g bei 4 °C für 40 Minuten zentrifugiert (Sorvall SS 34). Das Pellet wurde für die *in vitro* Versuchsreihen in 1 ml EGM MV, und für die *in vivo* Versuchsreihen in 1 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung resuspendiert. Die Anzahl der enthaltenen Mikropartikel wurde durch Fluorescence - activated - cell - sorting Analyse (FACS/FACS - Calibur) nach Inkubation mit Annexin V, CD31 und CD144 unter Verwendung von Trucount Tubes (BD) gemessen.

### **2.2.2.1 Markierung endothelialer Mikropartikel**

Die EMP wurden zunächst wie oben bereits beschrieben aus den HCAEC gewonnen. Zur Farbmarkierung wurde der PKH-26 Red Fluorescent Linker Kit von Sigma Aldrich benutzt. Es wurde nun das gewonnenen Pellet in 1 ml Diluent C resuspendiert.

Ebenfalls wurde ein 2 ml Eppendorf Gefäß mit 4 µl PKH-26 und 1 ml Diluent C vorbereitet. Diese Lösung wurde zu den gewonnen EMP hinzugegeben und vorsichtig vermischt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation für 5 Minuten bei 37 °C.

Der Färbevorgang wurde nach der Inkubation durch Zugabe von 2 ml Serum gestoppt. Es erfolgte ein Waschvorgang bei dem zunächst 4 ml EGM MV zu den farbmarkierten EMP hinzugegeben wurden. Anschließend Zentrifugieren für 10 Minuten bei 400 g bei 25 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 4 ml EGM MV resuspendiert. Hiernach wurde der Waschvorgang nochmals wiederholt.

Abschließend wurde das Pellet in 4 ml EGM MV resuspendiert.

### **2.2.2.2 Aufnahme von EMP in Endothelzellen**

Zum Nachweis der Aufnahme von EMP in Endothelzellen wurden die farbmarkierten EMP mit den HCAEC ko-kultiviert. Hierzu wurden die wie oben beschrieben kultivierten HCAEC mit den farbmarkierten und in insgesamt 10 ml EGM MV resuspendierten EMP für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde der Überstand abpipettiert und es



erfolgte die dreimalige Waschung mit jeweils 10 ml EGM MV. Abschließend konnte die EMP Aufnahme mit dem Zeiss Apotom Mikroskop evaluiert werden. Zur Kontrolle wurden die HCAEC mit hitzeinaktivierten EMP inkubiert. Hierzu wurden die EMP zunächst für 10 Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend wie beschrieben mit den HCAEC inkubiert.

### **2.2.3 Zellkultur endothelialer early outgrowth Progenitorzellen (EO-EPC)**

Humane und aus Maus - Milz gewonnene EO-EPC wurden in einer Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub>-Anteil bei 37 °C in Zellkulturtestplatten (6, 24 oder 96 Well) in Kultur gebracht. Als Nährmedium für die EO-EPC wurde Endothelial Basal Medium (EBM) von Clonetics versetzt mit 0,5 ml heGF, 0,5 ml Hydrocortison, 0,5 ml GA-1000, 2,0 ml BBE sowie 10,0 ml FBS verwendet. Der Mediumwechsel erfolgte unter sterilen Bedingungen alle zwei Tage.

#### **2.2.3.1 Isolierung und Kultur von humanen EO-EPC**

Die mononukleären Zellen wurden aus peripherem Blut gesunder, freiwilliger Probanden oder aus Buffy Coats durch Dichtegradiententrennung mittels Ficoll isoliert. Hierzu wurden die entnommenen Proben zunächst 1:2 mit einfachem PBS verdünnt und anschließend in einen bereits mit 15 ml Ficoll versehenen Falcon überführt. Es folgte die Zentrifugation für 20 Minuten bei 2400 U/min ohne Bremse (Megafuge 1.0). Anschließend konnten die mononukleären Zellen aus der Interphase abpipettiert werden.

Nach zweimaligem Waschen mit einfach PBS und zweimaliger Zentrifugation bei 2400 U/min für jeweils 10 Minuten mit Bremse erfolgte die Resuspension des Pellets in 1 ml EBM.

Die Zellzählung wurde anschließend in einer 1:100 Verdünnung in einer Neubauerzählkammer durchgeführt.

Die Aussaat von  $1 \times 10^6$  Zellen pro Well erfolgte in mit Fibronectin beschichteten Zellkulturplättchen versehenen 24 - Well - Zellkulturtestplatten. Die Zellen wurden unter Zugabe von 1000  $\mu$ l Endothelzell Basalmedium (EBM)/Well für sieben Tage kultiviert. Zur Untersuchung der Wirkung von EMP auf die ausgesäten Zellen wurden bei jedem Versuchsansatz nach drei Tagen zusätzlich zum Medium  $10^4$  bis  $10^5$  in 500  $\mu$ l Medium gelöste EMP/Well hinzugegeben. Die Kontrollgruppe erhielt stattdessen 500  $\mu$ l reines Medium/Well zusätzlich.

### **2.2.3.2 Isolierung und Kultur von EO-EPC aus der Maus**

Die Milzkapsel wurde nach Entnahme zunächst in 15 ml Milz - EDTA - Puffer steril aufgetrennt und das gewonnene Zellmaterial sorgfältig resuspendiert.

Zur Aufreinigung des Zellmaterials wurde diese Zellsuspension über einen 70  $\mu$ m Nylon Zellfilter filtriert und anschließend auf 35 ml mit einfach PBS aufgefüllt.

Die mononukleären Zellen wurden mit Hilfe der Ficoll - Dichtegradiententrennung isoliert und nach Resuspension in 1000  $\mu$ l EBM in einer 1:100 Verdünnung in einer Neubauerzählkammer quantifiziert.

Schließlich erfolgte die Aussaat von jeweils  $4 \times 10^6$  Zellen pro Well in 24 - Well - Zellkulturtestplatten, die im Vorfeld mit Fibronectin beschichteten Zellkulturplättchen versehen worden waren. Für jedes Versuchstier wurden sechs Wells genutzt.

Die Zellen wurden für sieben Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Anteil kultiviert.

### **2.2.4 Probengewinnung aus Versuchstieren**

Die Mäuse wurden unter identischen Bedingungen in Gruppen zu jeweils maximal sechs Tieren je Käfig gehalten. Die Zusammenstellung der Versuchsgruppen erfolgte randomisiert 14 Tage vor der Durchführung der Versuchsreihe.

Den Tieren der Positivgruppe wurden am Tag 1 jeweils  $2 \times 10^5$  in 300  $\mu\text{l}$  isotoner Natriumchloridlösung resuspendierte EMP in die Schwanzvene injiziert. Die Kontrollgruppe erhielt 300  $\mu\text{l}$  reine isotope Natriumchloridlösung per Injektionem.

Am vierten Tag nach der Injektion erfolgte die Probengewinnung nach Einschläfern der Versuchstiere mit einer Lösung aus 0,2 ml Ketanest und 0,1 ml Rampun 2 %.

Nach Eröffnung des Abdomens wurden zunächst 0,5 bis 0,8 ml Blut zur späteren Quantifizierung der zirkulierenden EPC mittels FACS - Analyse aus der Vena cava inferior entnommen und in EDTA - Röhren überführt.

Darauf erfolgte die Splenektomie für die spätere Isolierung und Kultivierung der darin enthaltenen EPC. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Milzen in isotoner Natriumchloridlösung auf Eis gelagert.

Abschließend wurde das Knochenmark aus Femur und Tibia zur späteren Quantifizierung der im Maus - KM enthaltenen EPC gewonnen und jeweils in 5 ml FACS - Puffer - Maus resuspendiert. Die anschließende Lagerung der Proben bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte nach Filtrierung der Suspension durch einen 70  $\mu\text{m}$  Zellfilter zur Aufreinigung der Probe ebenfalls auf Eis.

### **2.2.5 Migrationsexperimente**

Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut gesunder, freiwilliger Probanden oder aus Buffy Coats wurden standardisiert durch Dichtegradiententrennung mittels Ficoll isoliert. Die anschließende Aussaat von jeweils  $4 \times 10^6$  Zellen pro Well erfolgte in einer 6 - Well - Zelltestkulturplatte. Die Zellen wurden mit 4 ml EBM/Well für vier Tage inkubiert.

Am vierten Tag erfolgte zunächst ein Waschschrift mit einfachem PBS. Im Anschluss daran wurden in jedes Well 500  $\mu\text{l}$  1 mM EDTA und 500  $\mu\text{l}$  Trypsin gegeben. Die Zellen wurden darauf für 5-10 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde die Zellsuspension in bereits mit jeweils 500  $\mu\text{l}$  EBM vorbereitete 2 ml Eppendorf Gefäße überführt. Nach Zentrifugation bei 1800 U/min für 10 Minuten (Biofuge pico) wurden die Pellets in jeweils 300  $\mu\text{l}$  EBM resuspendiert.

Die Aussaat von  $1 \times 10^5$  Zellen pro Kammer erfolgte nach Zellzählung in eine 24 - Boydenkammer - Testplatte, die in eine 24 - Well - Zellkulturtestplatte eingelegt wurde.

Die 24 - Well - Zellkulturtestplatten waren vor Einlage der Boydenkammer für jeden Versuchsansatz wie folgt vorbereitet worden:

- 12 Wells mit 750  $\mu$ l EBM und  $1 \times 10^5$  EMP
- 6 Wells mit 750  $\mu$ l EBM (Kontrollgruppe 1)
- 1 Well mit 750  $\mu$ l EBM und 7,5 ng SDF-1 (Kontrollgruppe 2)

Zusätzlich wurden in jede Boydenkammer 500  $\mu$ l EBM auf die Zellen pipettiert.

Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden unter standardisierten Bedingungen.

Nach 24 Stunden konnten die Zellen mit Dil -Ac - LDL gefärbt werden.

Die Auswertung erfolgte schließlich mittels Fluoreszenzmikroskopie.

### **2.2.6 In vitro Identifizierung von EO-EPC**

Fluoreszenzmarkierte Färbungen ermöglichen die Identifizierung und Unterscheidung spezifischer Zellsubpopulationen wie beispielsweise EPC innerhalb einer Zellkultur oder eines Zellverbandes.

Hierzu werden fluoreszenzmarkierte Farbstoffe/Substanzen oder spezifische Antikörper verwendet, die in die Zelle aufgenommen werden oder an Antigene im Innern der Zelle, oder auf der Zellmembran binden. Eine Identifizierung der Zellsubpopulationen ist mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie möglich.

### 2.2.6.1 Färbeprotokoll EO-EPC

Durch Färbungen mittels fluoreszenzmarkiertem Dil - Ac - LDL, Lektin und DAPI können Endothelzellen innerhalb einer Zellkultur identifiziert werden. Hierzu wurde neben PE markiertem Dil - Ac - LDL, das von den Endothelzellen aufgenommen wird, FITC markiertes Ulex europaeus Lektin verwendet, das an Endothelzellen bindet. Mit Hilfe von DAPI kann komplette DNA innerhalb einer Zelle sichtbar gemacht, und somit der Zellkern innerhalb der Zelle identifiziert werden.

Nach sieben Tagen in Kultur wurden sowohl die Versuchsreihen und die dazugehörigen Kontrollgruppen der humanen EPC als auch der Maus - Milz EPC mit den oben genannten fluoreszenzmarkierten Substanzen angefärbt, und auf das Vorhandensein von Endothelzellen untersucht.

Hierzu wurden die Wells der Zellkulturtestplatten zunächst abpipettiert und mit PBS gewaschen. Anschließend wurde jedes Well mit 300 µl EBM-Medium und 5 µl Dil - Ac - LDL versehen und die Zellkulturtestplatten für 75 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Anteil inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte eine Fixierung mit 2 % - igem PFA für 10 Minuten bei 37 °C.

Es wurde eine Ulex europaeus Lektin (FITC) Lösung mit PBS angesetzt (10 µl/1000 µl), wovon, nach erneutem Waschen der Zellkulturtestplatten, 300 µl in jedes Well gegeben wurden. Anschließend wurden die Zellen erneut für zwei Stunden inkubiert.

Abschließend erfolgte nach viermaligem Waschen mit PBS und Entnahme der beschichteten Zellkulturplättchen aus den Wells, die Fixierung der Plättchen auf Objektträgern nach Zugabe von DAPI und fluoreszierendem Eindeckmedium DAKO.

Die Auswertung erfolgte schließlich mittels Fluoreszenzmikroskopie, zwischenzeitlich wurden die Objektträger bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

### 2.2.6.2 Färbeprotokoll EO-EPC nach Migration

Zur Untersuchung des Migrationsreizes von EMP auf EPC erfolgte die Färbung mit PE markiertem Dil - Ac - LDL. Auch hierbei war grundlegend, dass Dil - Ac - LDL von endothelialen Zellen aufgenommen wird.

Die Färbung der Zellen mit Dil - Ac - LDL wurde nach 24 Stunden Inkubation in der Migrationskammer (Boydenkammer) in folgenden Schritten durchgeführt:

- Waschen der Boydenkammer mit einfach PBS
- 300 µl EBM und 5 µl Dil - Ac - LDL pro Well einer 24er Zellkulturtestplatte
- Einlegen der Boydenkammer
- Inkubation für 1 ¼ Stunden bei 37 °C im Dunkeln
- Waschen der Boydenkammer mit einfach PBS
- Lösung des Migrationsfilters aus der Boydenkammer
- Fixierung des Migrationsfilters auf einem Objektträger nach Zugabe von fluoreszierendem Eindeckmedium DAKO®
- Lagerung bei 4 °C im Dunkeln.

Die Auswertung erfolgte schließlich durch Fluoreszenzmikroskopie.

### 2.2.7 Fluoreszenzmikroskopie

Sämtliche Färbungen wurden unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops (Axiovert 40 CFL, Zeiss) untersucht. Eingesetzt wurden Filter mit Durchlässigkeit für abstrahlendes Licht von DAPI (blau), FITC (grün) und PE (rot). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Axio Vision LE Rel. 4.5 (Zeiss). Hierbei konnten die einzelnen Fluoreszenzen übereinander projiziert, und somit die dreifach positiven Zellen quantifiziert werden. Bei den durchgeführten Färbungen von EPC mittels Dil - Ac - LDL, Lektin und DAPI wurden sämtliche Objektträger beider Versuchsgruppen ausgewertet. Hierbei wurden auf jedem auf dem Objektträger fixiertem Zellkulturplättchen drei unterschiedliche repräsentative hochauflösende Gesichtsfelder untersucht und ausgezählt.

Die einzelnen Gesichtsfelder wurden zunächst einzeln mit dem jeweiligen Filter für DAPI (blau), FITC (grün/Lektin) und PE (rot/Dil - Ac - LDL) in 10 facher Vergrößerung aufgenommen. Im Anschluss wurden die Fluoreszenzen übereinander projiziert. Dreifach positive Zellen (Dil - Ac - LDL/Lektin/DAPI) wurden als EPC definiert und ausgezählt.

Bei den Versuchsansätzen zur Migration von EPC wurden nach Dil - Ac - LDL Färbung sämtliche Objektträger aller drei Versuchsgruppen (EMP+, EMP-, SDF-1+) ausgewertet. Für jeden auf dem Objektträger fixierten Migrationsfilter wurden drei hochauflösende Gesichtsfelder ausgezählt. Positive Zellen wurden bei 10 facher Vergrößerung aufgenommen. Es wurden alle positiven Zellen in den einzelnen Gesichtsfeldern ausgezählt.

### 2.2.8 Apoptose Assay

Die Gewinnung der mononukleären Zellen gelang standardisiert mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Probandenblut oder Buffy Coats.

Es wurden auf einer 96 - Well - Zellkulturtestplatte jeweils  $1 \times 10^4$  Zellen je Well ausgesät. Nach Zugabe von 200  $\mu$ l EBM in jedes Well wurden die Zellen über fünf Tage unter standardisierten Bedingungen kultiviert.

Bei der Versuchsgruppe wurden am dritten Tag  $1 \times 10^4$  EMP hinzugegeben, während die Kontrollgruppe reines EBM erhielt.

Am fünften Tag erfolgte die Apoptoseinduktion über die Zugabe von  $1 \mu\text{l}$  TNF $\alpha$  (entsprechend 100 ng) in einem Teil der Wells beider Gruppen. Nach 14 stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO $_2$  Anteil erfolgte die Durchführung folgender Versuchsschritte unter Gebrauch des Kits „Cell Death Detection Elisa Plus“:

- Zentrifugation der Zellkulturtestplatte für 10 Minuten bei 1500 U/min
- Nach Absaugen des Überstandes Inkubation mit Lysepuffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur; Resuspension mit 200 $\mu\text{l}$  Lysepuffer/Well
- Zentrifugation für 10 Minuten bei 1500 U/min bei Raumtemperatur
- Überführung von jeweils 20  $\mu\text{l}$  des Überstandes in die Streptavidin beschichtete Platte des Kits
  - Negativkontrolle: 20  $\mu\text{l}$  Inkubationspuffer
  - Positivkontrolle: 20  $\mu\text{l}$  positive control (aus dem Kit)
- in jedes Well 80  $\mu\text{l}$  Immunoreagenz
- Verschluss mit Adhäsiv-Folie und Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur
- Dreimaliges Waschen mit 250-300  $\mu\text{l}$  Inkubationspuffer
- 100  $\mu\text{l}$  ABTS - Lösung in jedes Well und lichtgeschützte Inkubation für 10-20 Minuten bei Raumtemperatur.



Die Messungen erfolgten anschließend bei 405 nm, bzw. die Referenzmessung bei 490 nm mittels Absorbance Reader Apollo LB 912.

### **2.2.9 Durchflusszytometrie (FACS - Analysen)**

Durch fluoreszenzaktivierte Zellsortieranalyse ist die Messung von reflektiertem Licht und spezifischen Fluoreszenzen großer Zellzahlen in kurzer Zeit möglich.

Die Zellen fließen hierbei durch eine Messkammer und werden mittels Laser mit spezifischer Wellenlänge bestrahlt. Über Photodetektoren wird das von der Zelle reflektierte Streulicht gemessen. Es wird zwischen Vorwärtsstreulicht (forward scatter), das vor allem durch die Zellgröße bestimmt ist, und Seitwärtsstreulicht (side scatter), das durch den Zellinhalt bestimmt ist, unterschieden. Einzelne Zellen können so registriert und quantifiziert werden.

Werden die Zellen zusätzlich mit fluoreszierenden, an die Wellenlänge des Lasers angepasste Farbstoffe markiert, kann das von diesen Zellen emittierte Licht von wellenlängenspezifischen Lichtfiltern resorbiert und in elektrische Signale umgewandelt werden. Die so übermittelten Daten werden graphisch in ein Punkteschema (Dot - Plot) übertragen. So können bei Verwendung verschiedener Fluoreszenzen für unterschiedliche Zellpopulationen diese unterschieden und quantifiziert werden.

#### **2.2.9.1 FACS - Analyse EMP**

Nach Isolierung der EMP aus über drei Tagen serumdepletierten HCAEC erfolgte zur Quantifizierung der mit dieser Methode gewinnbaren EMP - Zahl üblicherweise die Inkubation des resuspendierten Pellets mit verschiedenen Antikörpern.

Hierzu wurden fünf Trucount Tubes (BD) mit jeweils 100 µl des gelösten Pellets versehen.

Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte für jedes der fünf Tubes in spezifischem Ansatz:

1. mit 5µl CD 31 PE für 45 Minuten bei Raumtemperatur
2. mit 5µl Annexin FITC für 15 Minuten bei Raumtemperatur
3. mit 5µl CD31 PE für 30 Minuten und anschließender Zugabe von 5µl Annexin FITC für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur
4. mit 5µl CD144 für 30 Minuten und anschließender Zugabe von 5µl Anti - Mouse IgG für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur.

Nach Zugabe von 300µl Binding - Puffer - EMP in jedes Tube konnten die Ansätze im FACS - Calibur gemessen werden. Es wurden insgesamt jeweils 10.000 Ereignisse registriert. Die Auswertung erfolgte über CellQuest pro.

Bei Verwendung von Trucount Tubes (BD) war die genaue Quantifizierung der in der Probe enthaltenen EMP mittels folgender Formel möglich:

$$\frac{\text{Zahl der Ereignisse im Gate}}{\text{Zahl der Ereignisse im Bead-Gate}} \times \frac{\text{Zahl der Beads im Test}}{\text{Testvolumen}} = \text{Absolute EMP - Zahl}$$

### **2.2.9.2 FACS - Analyse Progenitorzellen - Blut**

Zur Quantifizierung der im peripheren Blut zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen der Versuchsgruppe sowie der Kontrollgruppe wurde das entnommene Vollblut nach Inkubation mit spezifischen Antikörpern mittels FACS - Analyse untersucht.

Hierzu wurden pro Versuchstier jeweils zwei FACS Röhrchen mit 100 µl des entnommenen EDTA - Vollblutes vorbereitet. Nach Zugabe von 3 ml 1:10 verdünnter Pharmlyse und sorgfältiger Vermischung folgte die Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Ansätze bei 1000 U/min für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert (Labofuge 400R/Megafuge 1.0).

Das Pellet wurde nach Absaugen des Überstandes in 100 µl FACS - Puffer - Maus resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl Fc - Block in jedes Teströhrchen erfolgte die erneute Inkubation für 10 Minuten bei 4 °C im Dunkeln. Daraufhin wurde in eines der Röhrchen des jeweiligen Versuchstieres 10 µl Sca - 1 - Lösung und 10 µl Flk - 1 hinzugegeben und in das andere 10 µl Isotypenkontrolle FITC und 10 µl Isotypenkontrolle PE. Die Ansätze wurden nun erneut bei 4 °C für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert.

Nach Zugabe von 2 ml FACS - Puffer - Maus je Röhrchen erfolgte die erneute Zentrifugation für 10 Minuten bei 1800 U/min bei 4 °C (Labofuge 400R/Megafuge 1.0).

Anschließend wurden die Pellets jeweils in 0,2 ml einfach PBS resuspendiert und die enthaltenen antikörpermarkierten EPC am FACS - Calibur quantifiziert. Hierbei wurde die Registrierung von insgesamt jeweils 10.000 Ereignissen angestrebt. Die Auswertung erfolgte mittels CellQuest Pro.

### **2.2.9.3 FACS - Analyse Progenitorzellen - Knochenmark**

Zur Quantifizierung der im Knochenmark vorhandenen EPC wurde die gewonnene Zellsuspension beider Versuchsgruppen zunächst bei 4 °C und 1000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert (Labofuge 400R/Megafuge 1.0). Anschließend wurden jeweils 1 ml 1:10 verdünnte Pharmlyse hinzugegeben und die Proben für 5 Minuten auf Eis inkubiert.

Hierauf erfolgte die Zugabe von 2 ml FACS - Puffer - Maus und die erneute Zentrifugation bei 1000 U/min für 10 Minuten bei 4 °C (Labofuge 400R/Megafuge 1.0).

Das Pellet wurde nach Absaugen des Überstandes in 1 ml FACS - Puffer - Maus resuspendiert.

Jeweils 50 µl der gewonnenen Zellsuspension wurden pro Versuchstier in zwei FACS Röhren pipettiert.

Die weiteren Versuchsschritte entsprechen dem Protokoll der Analyse von EPC aus Maus - Blut, wobei die zweimalige Zentrifugation nur bei 1000 U/min erfolgen sollte.

Die Resuspension der nach der Antikörperinkubation und den verschiedenen Waschschritten gewonnenen Pellets erfolgte in 0,5 ml einfach PBS.

Die abschließende Messung wurde ebenfalls am FACS - Calibur mit Auswertung mittels CellQuest Pro durchgeführt.

#### **2.2.9.4 FACS - Analyse Immunzellen - Blut und KM**

Im Rahmen der Fragestellung einer möglichen Immunantwort durch Verwendung humaner endothelialer Mikropartikel im Mausmodell wurde Maus - Vollblut und Maus - Knochenmark mittels FACS - Analyse auf eine gesteigerte Anzahl von Immunzellen untersucht.

Die Versuchsvorbereitungen und die Durchführung entsprachen hierbei den bereits beschriebenen Abläufen für FACS - Analysen von Vollblut und Knochenmark.

Zusätzlich zu den Antikörpern Sca 1 und Flk - 1 wurden hierbei weitere spezifische Antikörper, die Antigene auf Immunzellen binden und somit eine Quantifizierung dieser Zellen ermöglichen, verwendet.

Es wurden pro Versuchstier jeweils fünf weitere Teströhren mit 100 µl Vollblut und fünf weitere Teströhren mit 50 µl Zellsuspension aus dem Knochenmark vorbereitet.

Für die Ansätze der Vollblutproben und der Knochenmarksproben galt folgendes gleiches Ansatzschema:

1. Röhrrchen: 10  $\mu$ l CD 3 FITC und 10  $\mu$ l CD 19 PE
2. Röhrrchen: 10  $\mu$ l CD 3 FITC und 10  $\mu$ l CD 4 PE
3. Röhrrchen: 10  $\mu$ l CD 14 FITC und 10  $\mu$ l NK 1.1 PE
4. Röhrrchen: 10  $\mu$ l CD 11a FITC und 10  $\mu$ l CD 11b PE
5. Röhrrchen: 10  $\mu$ l CD 43 FITC und 10  $\mu$ l CD 45 PE.

Die Resuspension der nach der Antikörperinkubation und den verschiedenen Waschschritten gewonnenen Pellets erfolgte ebenfalls in 0,2 ml einfach PBS für die Proben aus Vollblut bzw. 0,5 ml einfach PBS für die Proben aus Knochenmark.

Auch hier erfolgte die abschließende Messung am FACS - Calibur und die Auswertung mit Hilfe von CellQuest Pro.

### **2.2.10 Statistische Analyse**

Die angegebenen Daten wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test für verbundene und unverbundene Stichproben und dem Newmann-Keuls-Test als multipler Mittelwertvergleichstest, bei Erhalt signifikanter Ergebnisse, untersucht.

Die Nullhypothese wurde für  $p < 0,05$  verworfen und das Ergebnis als signifikant angenommen.

### 3. Ergebnisse

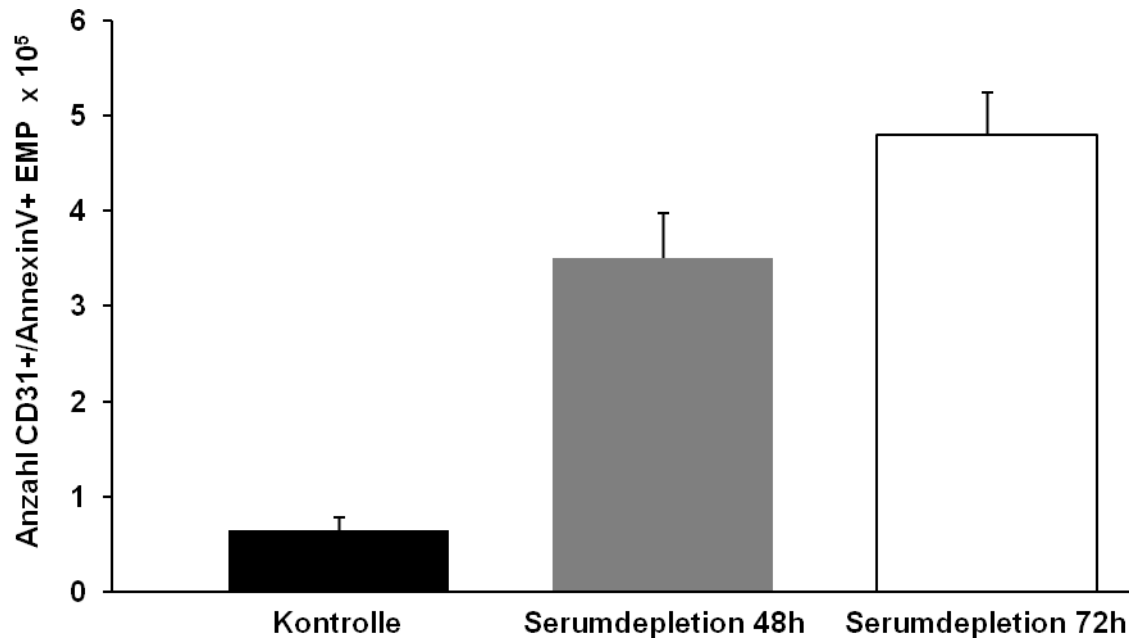
#### 3.1 HCAEC setzen bei Serumentzug vermehrt EMP frei

Viele Zellen setzen im Zustand der Aktivierung oder Apoptose Mikropartikel frei.

Humane koronararterielle Endothelzellen (HCAEC) wurde bis zum Status der Konfluenz kultiviert. Nachfolgend wurden die Zellen über unterschiedliche Zeiträume mit serumfreiem Hungermedium kultiviert. Die Kontrollgruppe erhielt im Gegensatz dazu die vollständige Nährlösung. Die von den Zellen freigesetzten EMP Zahlen wurden im Anschluss daran durch Fluorescence - activated - cell - sorting Analyse (FACS/FACS - Calibur) nach Inkubation mit Annexin V und CD31 unter Verwendung von Trucount Tubes (BD) gemessen und miteinander verglichen.

Serumdepletion führte zu einer zeitabhängigen Zunahme der Annexin V/CD31 doppelt positiven EMP im Zellkulturüberstand ( $p < 0,05$ ).

Abb. 2 zeigt die quantitative Datenanalyse dieses Experiments.



**Abb. 2: Serumdepletion bewirkt eine gesteigerte EMP - Freisetzung aus HCAEC.**

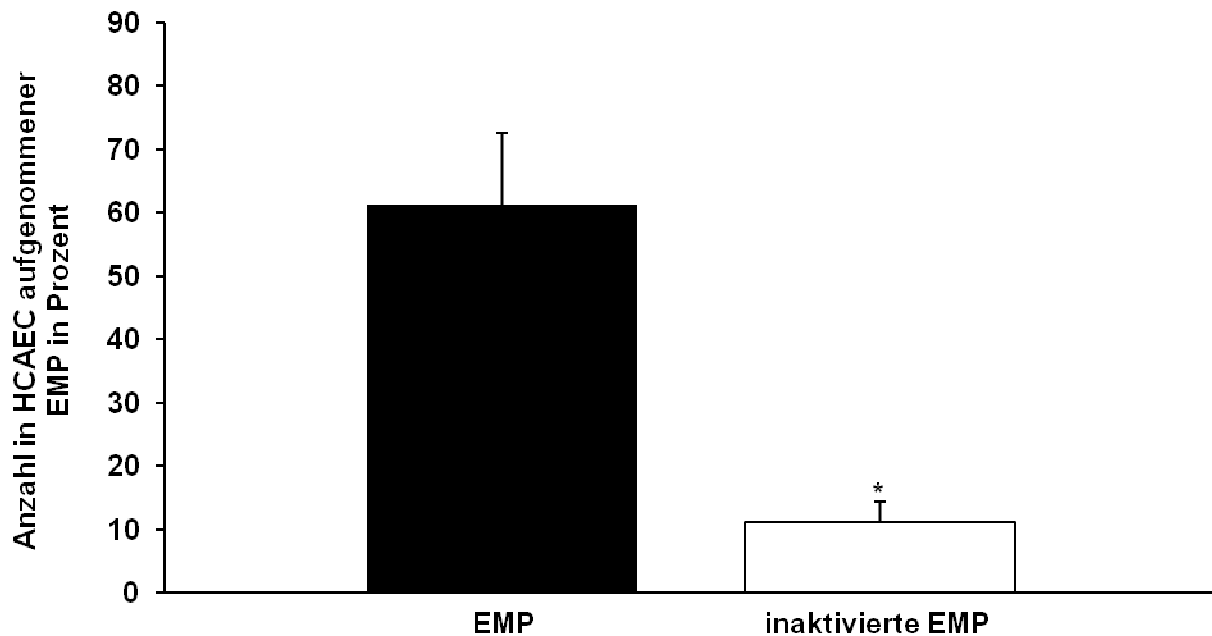
Gezeigt ist die quantitative Datenanalyse mehrerer Experimente, in denen HCAEC entweder mit serumhaltigem Nährmedium kultiviert wurden (Kontrolle) oder über einen Zeitraum von 48 bzw. 72 Stunden mit serumfreien Medium inkubiert wurden. Unter Serumdepletion setzen die Endothelzellen zeitabhängig eine signifikant erhöhte Anzahl an EMP frei (n=5; p < 0,05).

### 3.2 EMP werden in Endothelzellen aufgenommen

Unter der Annahme, dass den EMP eine bedeutende Rolle als Vermittler biologischer Informationen zwischen geschädigten und regenerierenden Zellen zukommt, haben wir die Interaktion zwischen EMP und den regenerierenden Endothelzellen genauer untersucht. Hierzu wurden HCAEC zunächst mittels Inkubation mit PKH-26 fluoreszenzmarkiert. Anschließend wurden die Zellen für 72 Stunden mit serumfreien Medium inkubiert. Nachfolgend wurden wie bereits beschrieben (siehe Material und Methoden) die freigesetzten EMP aus dem Überstand isoliert. Die so gewonnenen PKH-26 markierten EMP wurden für vier Stunden mit den Zielzellen (nicht PKH-26 markierte HCAEC) inkubiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte die Aufnahme der markierten EMP in die HCAEC nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurden hitzeinaktivierte EMP verwendet. Die hitzebedingte Inaktivierung der EMP in unseren Untersuchungen führte zu einer signifikant verminderten EMP-Aufnahme (\* $p < 0,05$ ; Abb. 3).

Abb. 3 zeigt die quantitative Datenanalyse dieses Experiments.





**Abb. 3: EMP werden zu einem großen Teil in HCAEC aufgenommen, durch Inaktivierung der EMP wird die Aufnahme vermindert.**

Abgebildet ist die Datenanalyse mehrerer Experimente in welchen die Aufnahme PKH-markierter EMP in humane Koronararterien - Endothelzellen (HCAEC) untersucht wurde. Nach hitzebedingter Inaktivierung der EMP ist deren Aufnahme in die HCAEC signifikant vermindert (n=5; \*p < 0,05).

### 3.3 EMP bewirken eine vermehrte Differenzierung humaner MNC in EO - EPC

Mit dem Ziel den Einfluss von endothelialen Mikropartikeln auf die Differenzierung mononukleärer Zellen in EO - EPC zu demonstrieren wurden Experimente mit humanen MNC und humanen EMP durchgeführt. Hierzu wurden aus dem Blut freiwilliger Probanden oder aus Buffy Coats mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnene MNC mit aus HCAEC gewonnenen EMP unter standardisierten Bedingungen inkubiert. Die auf diese Weise kultivierten Zellen wurden dann mittels Di - Ac - LDL, Lektin und DAPI gefärbt und schließlich am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt.

Die Abbildungen 4 a und 4 b zeigen zwei repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, die den Effekt von EMP auf die Differenzierung von MNC in frühe EPC verdeutlichen.

Hierbei zeigt Abb. 4 a ein fluoreszenzmikroskopisches Bild, das die Anzahl früher EPC ohne Zugabe von EMP darstellt. Abb. 4 b zeigt ein fluoreszenzmikroskopisches Bild, das die Anzahl früher EPC nach Inkubation von MNC mit EMP demonstriert.

Anhand der Bilder lässt sich erkennen, dass die Inkubation von humanen MNC mit humanen EMP einen positiven Einfluss auf die Differenzierung von MNC in frühe Di - Ac - LDL / Lektin positive EPC hat.

Abb. 5 zeigt die quantitative Auswertung der Experimente. Es zeigte sich, dass die Anzahl Di - Ac - LDL/Lektin/DAPI positiver früher EPC nach Stimulation von humanen MNC mit  $1 \times 10^4$  EMP signifikant höher ist im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0.05$ ;  $n = 6-12$ ) (Abb. 5).

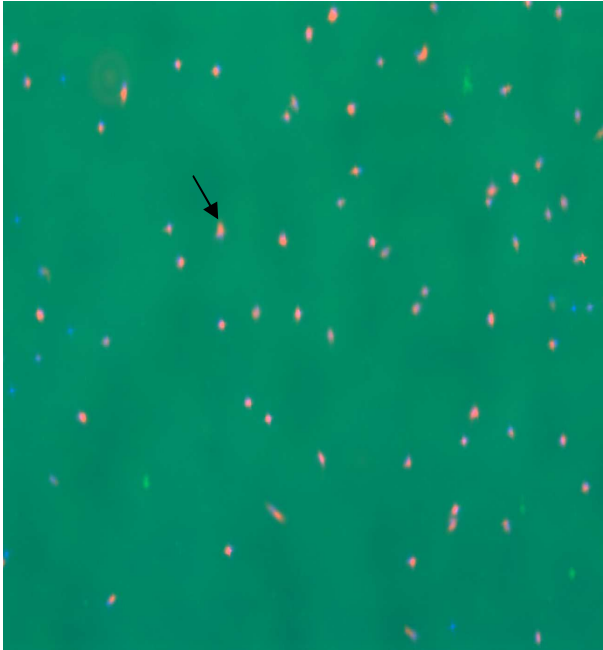


Abb. 4 a

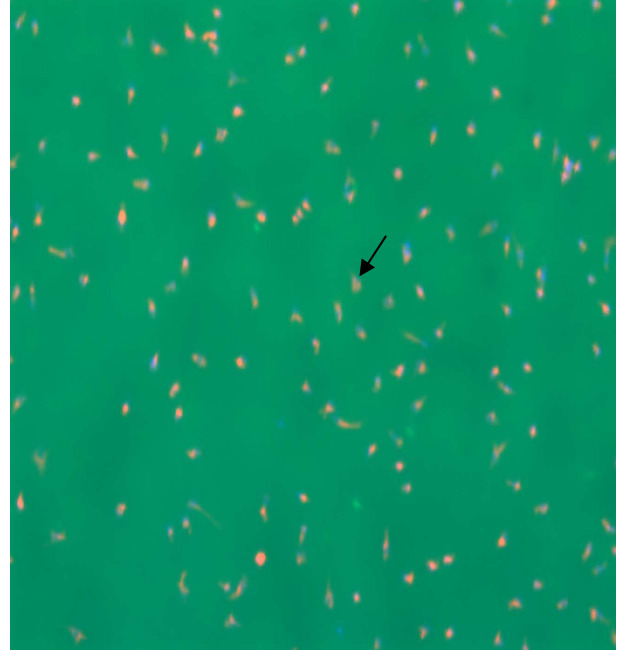
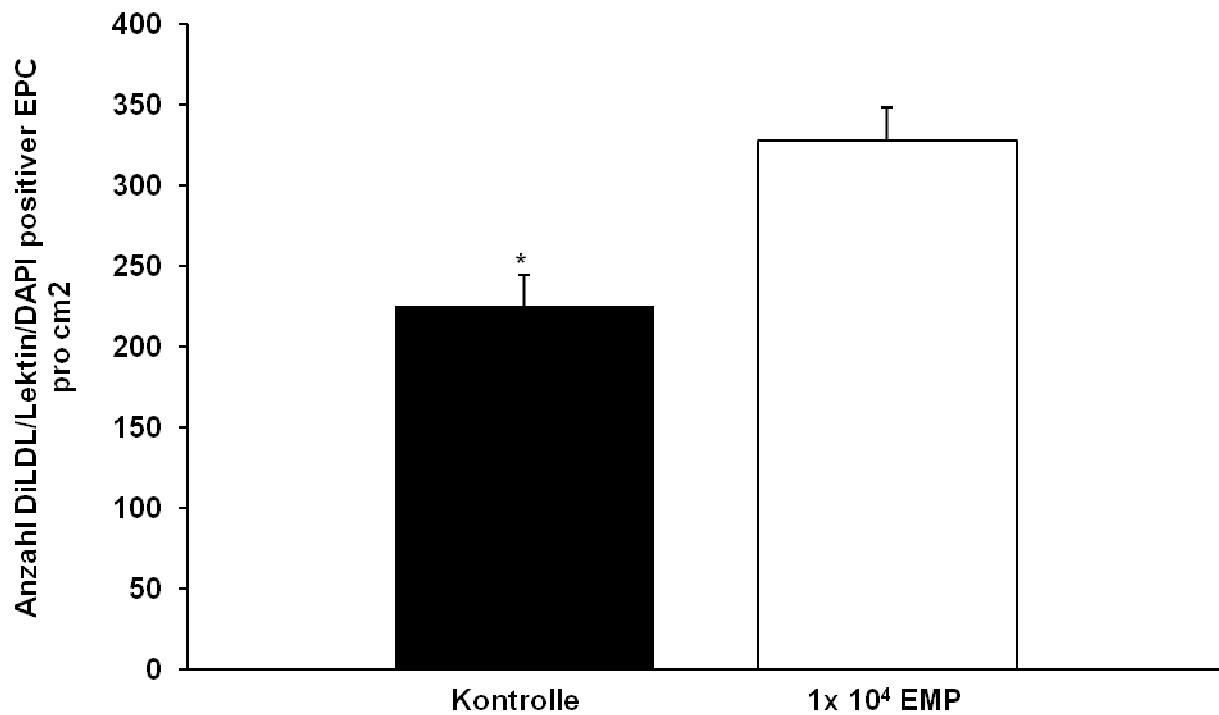


Abb. 4 b

**Abb. 4 a und b: Anzahl EO - EPC ohne Inkubation (Abb. 4 a) und mit Inkubation (Abb. 4 b) von MNC mit EMP.**

Die in den Abbildungen sichtbaren Zellen (Beispielzellen pfeilmarkiert) entsprechen den Di - Ac - LDL / Lektin / DAPI markierten frühen EPC, die aus MNC ohne Inkubation mit EMP (Abb. 4 a) bzw. nach Inkubation mit  $1 \times 10^4$  humanen EMP (Abb. 4 b) differenziert sind.



**Abb. 5: Endotheliale Mikropartikel erhöhen die Anzahl Di - Ac - LDL/Lektin/DAPI positiver endothelialer Progenitorzellen *in vitro*.**

Gezeigt ist die Datenanalyse von mehreren repräsentativen Experimenten, bei denen MNC aus humanem Blut mit  $1 \times 10^4$  EMP oder reiner Nährlösung (Kontrolle) inkubiert wurden. EMP erhöhen die Anzahl früher EPC pro cm<sup>2</sup> im Vergleich zur Kontrolle signifikant (n=6-12; \*p < 0.05).

### 3.4 EMP erhöhen die Migration von EPC verglichen mit SDF-1

Um einen möglichen Migrationsreiz von EMP auf EPC zu untersuchen wurden weitere Versuche mit humanen EPC mit Hilfe der Boydenkammer durchgeführt. EMP stellten einen wichtigen Migrationsreiz für early outgrowth EPC dar, der vergleichbar war mit dem chemotaktischen Zytokin SDF-1 ( $p < 0.001$ ,  $n = 12$ ) (Abb. 7).

Die Abbildungen 6 a bis c zeigen repräsentative fluoreszenzmikroskopische Bilder dieser Versuche, die einen Vergleich der jeweiligen Ergebnisse ermöglichen.

Abb. 7 zeigt die statistische Datenanalyse mehrerer dieser Experimente.

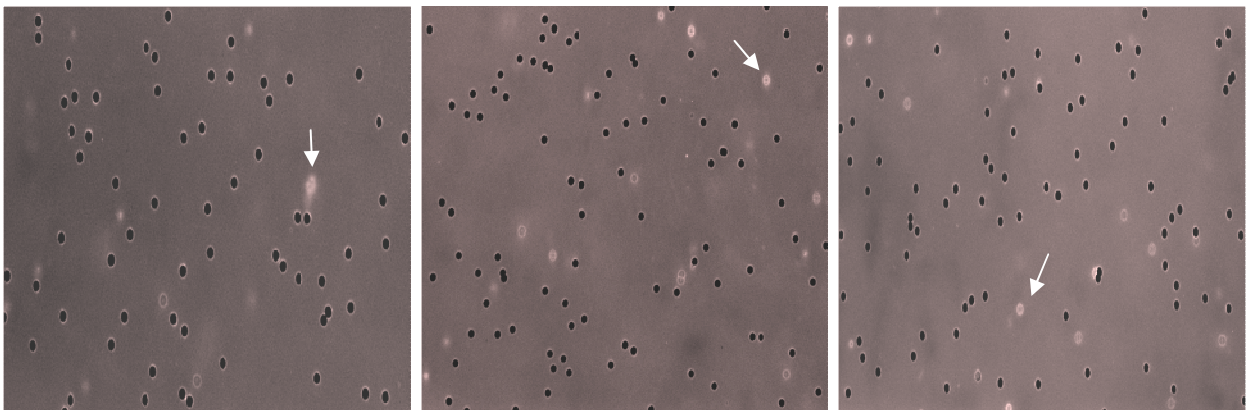


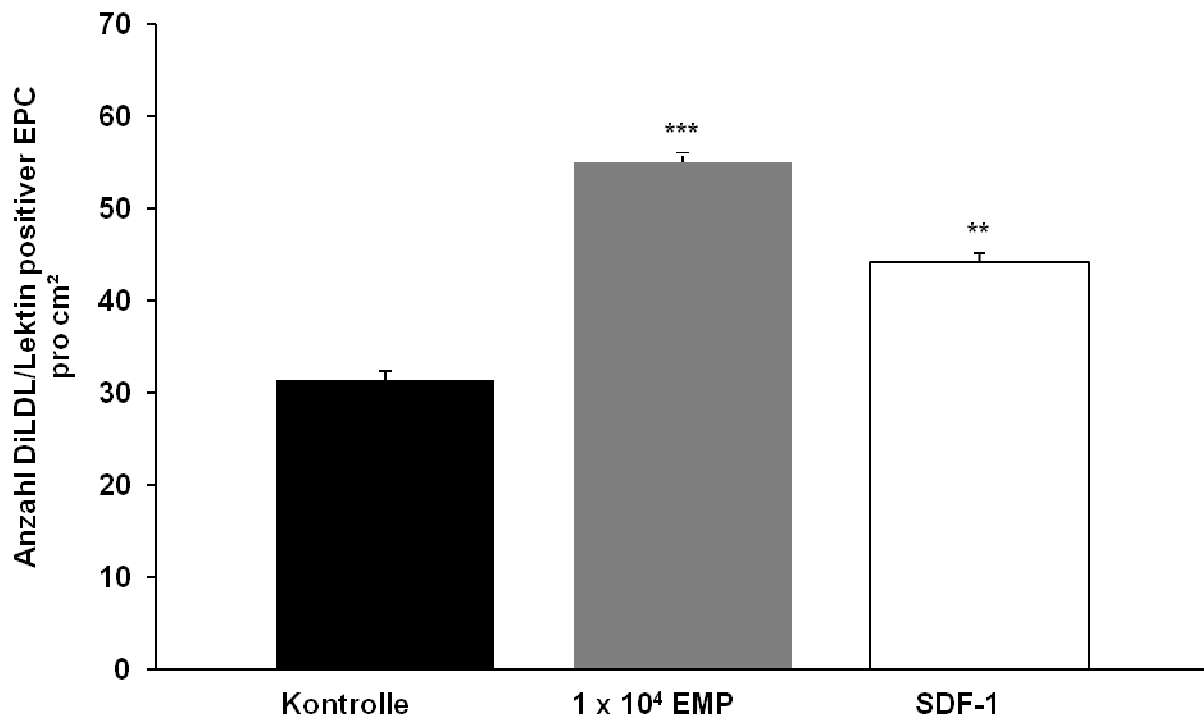
Abb. 6 a

Abb. 6 b

Abb. 6 c

**Abb. 6 a bis c: Migration von EPC ohne EMP Zugabe (Abb. 6 a), nach Inkubation mit  $1 \times 10^4$  EMP (Abb. 6 b) und nach Zugabe von SDF - 1 (Abb. 6 c).**

In den Abbildungen sieht man die Sicht auf die Unterseite des Migrationsfilters. Die dunklen Punkte entsprechen den Poren, durch die die Migration erfolgt. Ohne Zugabe von EMP oder einen anderen Migrationsreiz ist nur eine geringe Migration von EPC (als helle Zellen, pfeilmarkiert) erkennbar (Abb. 6 a).



**Abb. 7: EMP erhöhen die Migration von EPC verglichen mit SDF-1.**

Dargestellt ist die quantitative Datenanalyse mehrerer Vergleichsexperimente in denen der Migrationsreiz auf die EPC mit Hilfe der Boydenkammer untersucht wurde. Zum Vergleich des Migrationsreizes wurden  $1 \times 10^4$  EMP, SDF - 1 oder reines EBM Medium unter die Boydenkammer gegeben. Verglichen mit SDF - 1 und reinem EBM Medium konnte die Migration der EPC pro cm<sup>2</sup> mittels EMP signifikant erhöht werden (n=12; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

### 3.5 EMP inhibieren die TNF - alpha induzierte Apoptose von EPC

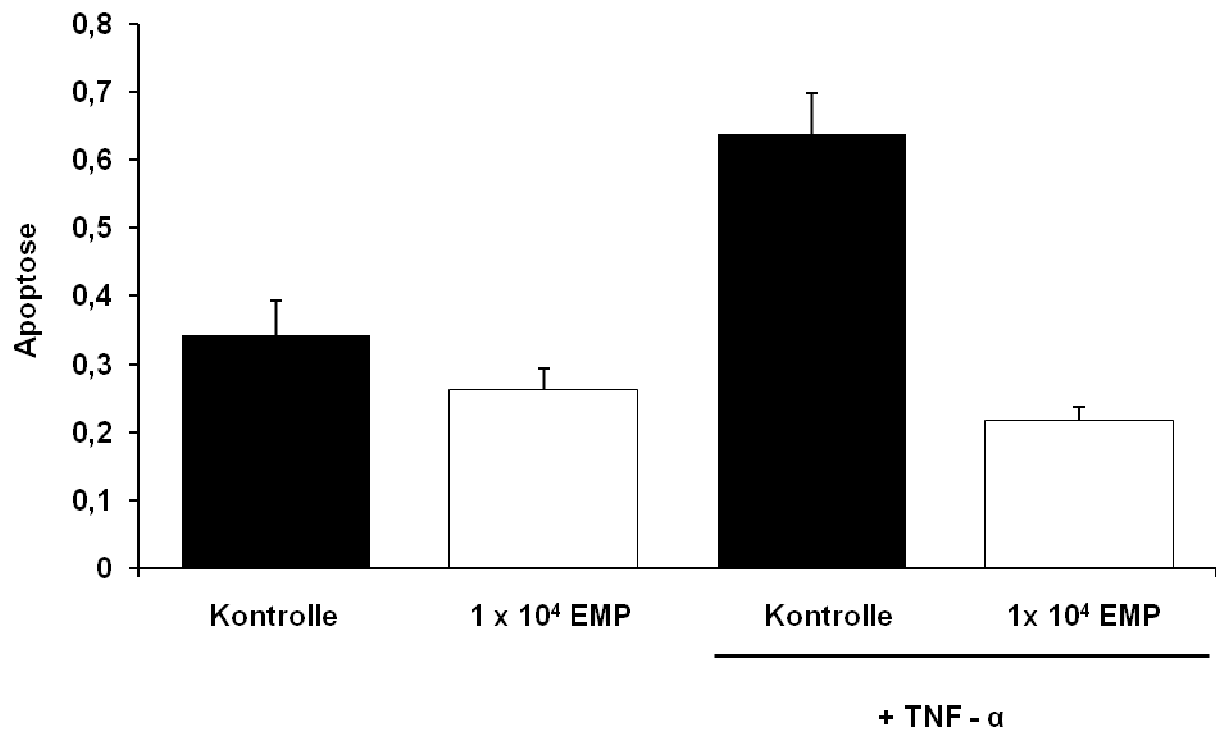
Um Hinweise über eine mögliche EMP bedingte Verbesserung funktioneller Eigenschaften von EPC zu erhalten wurden *in vitro* Untersuchungen zur induzierten und nicht induzierten Apoptose von EPC durchgeführt.

Hierbei wurden aus humanem Blut gewonnene frühe EPC verwendet, die mit  $1 \times 10^4$  EMP inkubiert wurden. Die Kontrollgruppe wurde mit reiner Nährlösung inkubiert. Es erfolgte die Induktion von Apoptose durch Zugabe von TNF - alpha.

Es konnte festgestellt werden, dass die Inkubation mit  $1 \times 10^4$  EMP zur Inhibition der TNF - alpha induzierten Apoptose von kultivierten EPC führt ( $p < 0,003$ ,  $n=4$ ).

Diese EMP vermittelte Verbesserung funktioneller Parameter *in vitro* geht möglicherweise mit einer funktionellen Verbesserung *in vivo* einher.

Abb. 8 zeigt die quantitative Datenanalyse dieser Versuche.



**Abb. 8: EMP inhibieren die TNF - alpha induzierte Apoptose von EPC.**

Gezeigt ist die quantitative Datenanalyse mehrerer Experimente, in denen der Einfluss von EMP auf die TNF - alpha vermittelte Apoptose von EO-EPC untersucht wurde. Die TNF - alpha induzierte Apoptose von kultivierten EPC wurde nach Inkubation mit  $1 \times 10^4$  EMP inhibiert ( $p < 0,003$ ;  $n=4$ ). EMP alleine hatten keinen Einfluss auf die Apoptoserate von EO-EPC.

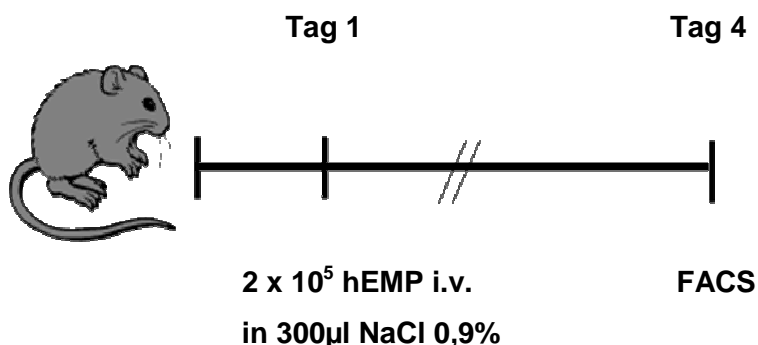


### 3.6 EMP erhöhen die Anzahl von zirkulierenden und ortsständigen EO-EPC im Mausmodell

In den folgenden Experimenten wurden C57bl6 - Mäuse intravenös mit  $2 \times 10^5$  aus HCAEC gewonnenen EMP oder reiner Trägerlösung behandelt (n=5 pro Gruppe). Nachfolgend wurde die Anzahl der zirkulierenden Sca1/flk1 positiven EO-EPC mittels FACS-Analyse aus dem Blut und dem Knochenmark bestimmt. Darüber hinaus erfolgte die Bestimmung der Anzahl der in der Milz befindlichen EO-EPC mittels Di - Ac - LDL/ Lektin -Färbung, da bei Nagetieren die Milz ebenfalls ein Reservoir für EPC ist.

Abb. 9 zeigt schematisch den Versuchsablauf.

#### 10 ♂ C57bl6 Mäuse, Alter: 6 Wochen



#### Abb. 9: Schematisch Darstellung des Versuchsablaufes bei intravenöser Behandlung der Versuchstiere mit humanen EMP.

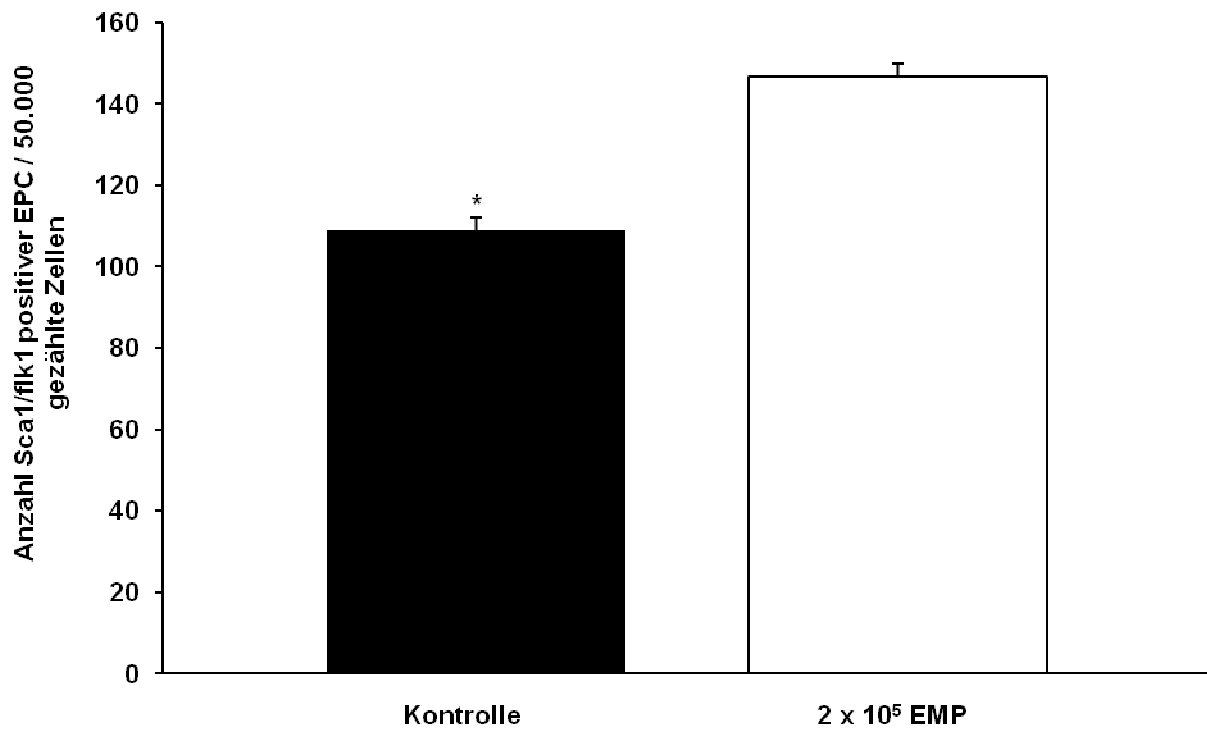
An Tag 1 erfolgte die Gabe von  $2 \times 10^5$  in 300µl NaCl 0,9% gelösten EMP in die Schwanzvene der Versuchstiere. Die Kontrollgruppe erhielt die reine Trägerlösung. An Tag 4 erfolgte die Evaluation mittels FACS Analyse aus Blut und Knochenmark sowie die Quantifizierung der EPC aus der Milz.

Die Behandlung der Versuchstiere mit humanen EMP war verbunden mit einer signifikanten Erhöhung der Anzahl Sca1/flk 1 positiver EO-EPC im Knochenmark verglichen mit der Kontrollgruppe ( $p < 0.01$ ). Diese Erhöhung der EO-EPC-Zahl konnte auch im peripheren Maus-Blut festgestellt werden ( $p < 0.01$ ).

Die Anzahl der Di - Ac - LDL/Lektin doppelt positiven Zellen war bei EMP behandelten Mäusen signifikant erhöht verglichen mit Mäusen, welche mit reiner Trägerlösung behandelt wurden ( $p < 0.001$ ).

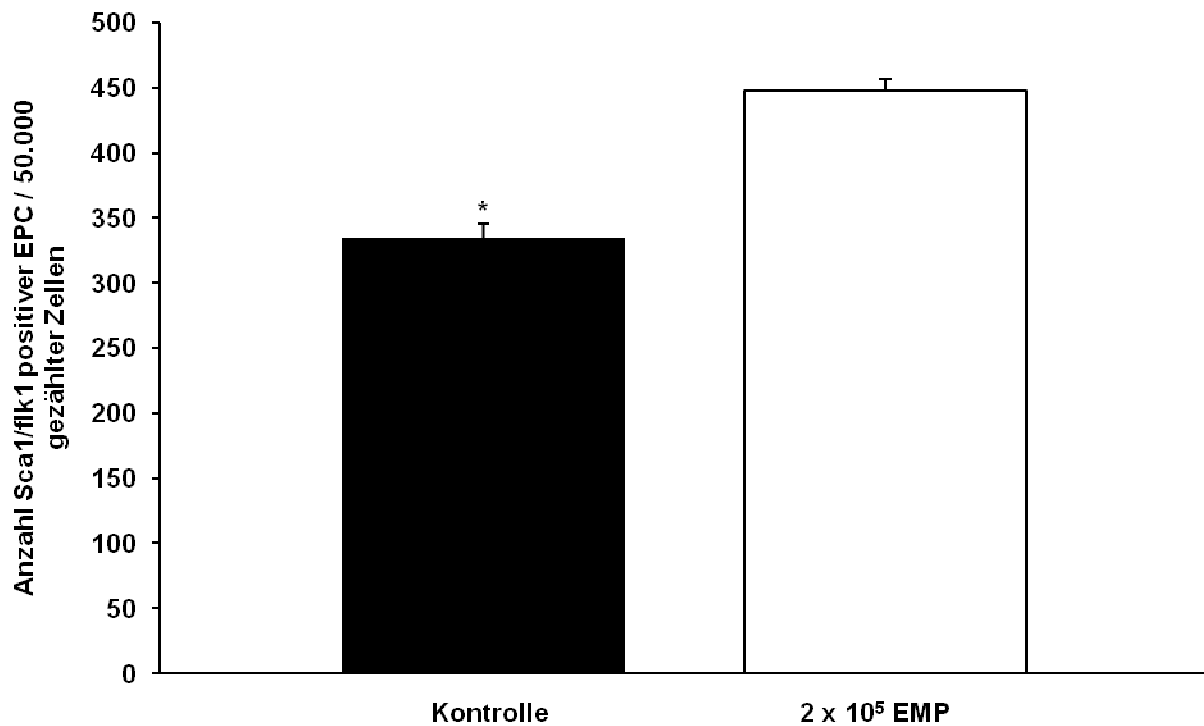
Diese Ergebnisse festigten unsere Vermutung, dass EMP einen Einfluss auf die EO-EPC Mobilisation haben.

Abb. 10 bis 12 zeigen die Datenanalysen einiger repräsentativer Versuchsreihen.



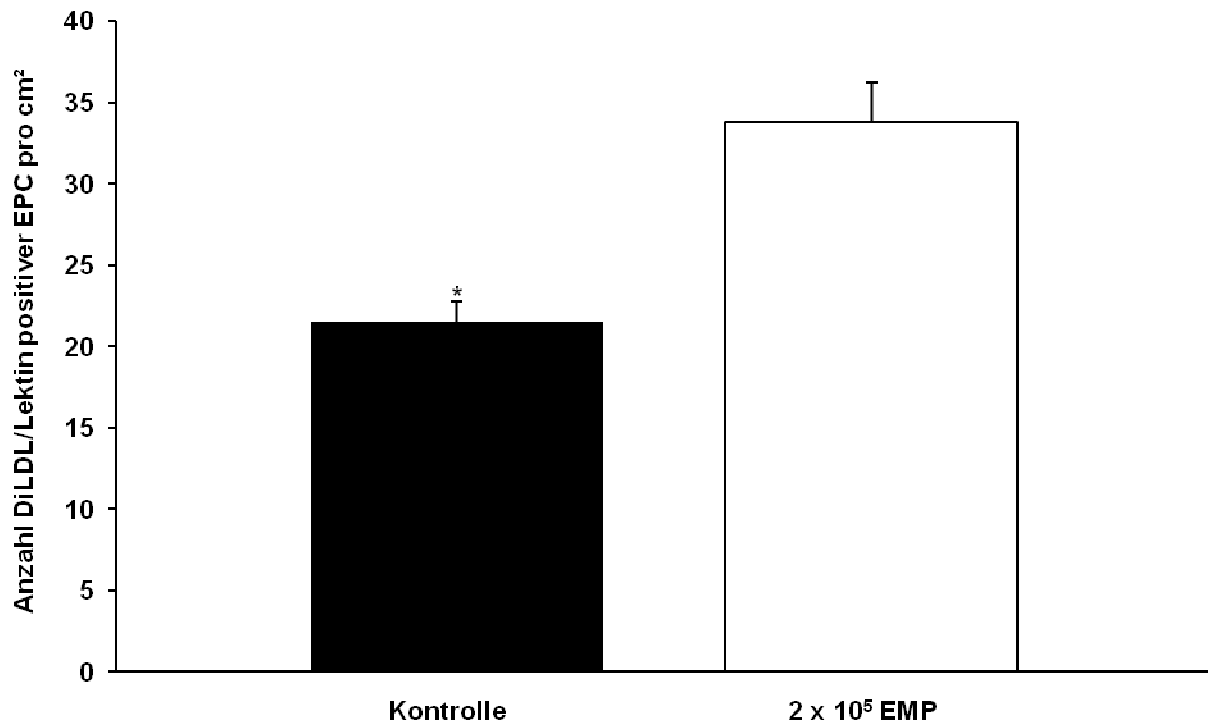
**Abb. 10: Anzahl der EO-EPC im Knochenmark der Versuchstiere.**

Gezeigt ist die Datenanalyse von mehreren repräsentativen Experimenten, bei denen die frühen EPC aus dem Knochenmark von mit  $2 \times 10^5$  EMP behandelten Mäusen quantifiziert wurden, verglichen mit den Zahlen der Kontrollgruppe. Die Behandlung mit EMP erhöht die Anzahl der frühen EPC im Knochenmark der Versuchstiere im Vergleich zur Kontrolle signifikant (\* $p < 0,002$ ;  $n=5$ ).



**Abb. 11: Anzahl der EO-EPC im peripheren Blut der Versuchstiere.**

Gezeigt ist die Datenanalyse von mehreren repräsentativen Experimenten, bei denen die frühen EPC aus dem peripheren Blut von mit  $2 \times 10^5$  EMP behandelten Mäusen quantifiziert wurden, verglichen mit den Zahlen der Kontrollgruppe. Die Behandlung mit EMP erhöht die Anzahl der frühen EPC im peripheren Blut der Versuchstiere im Vergleich zur Kontrolle signifikant (\* $p < 0,004$ ;  $n=5$ ).



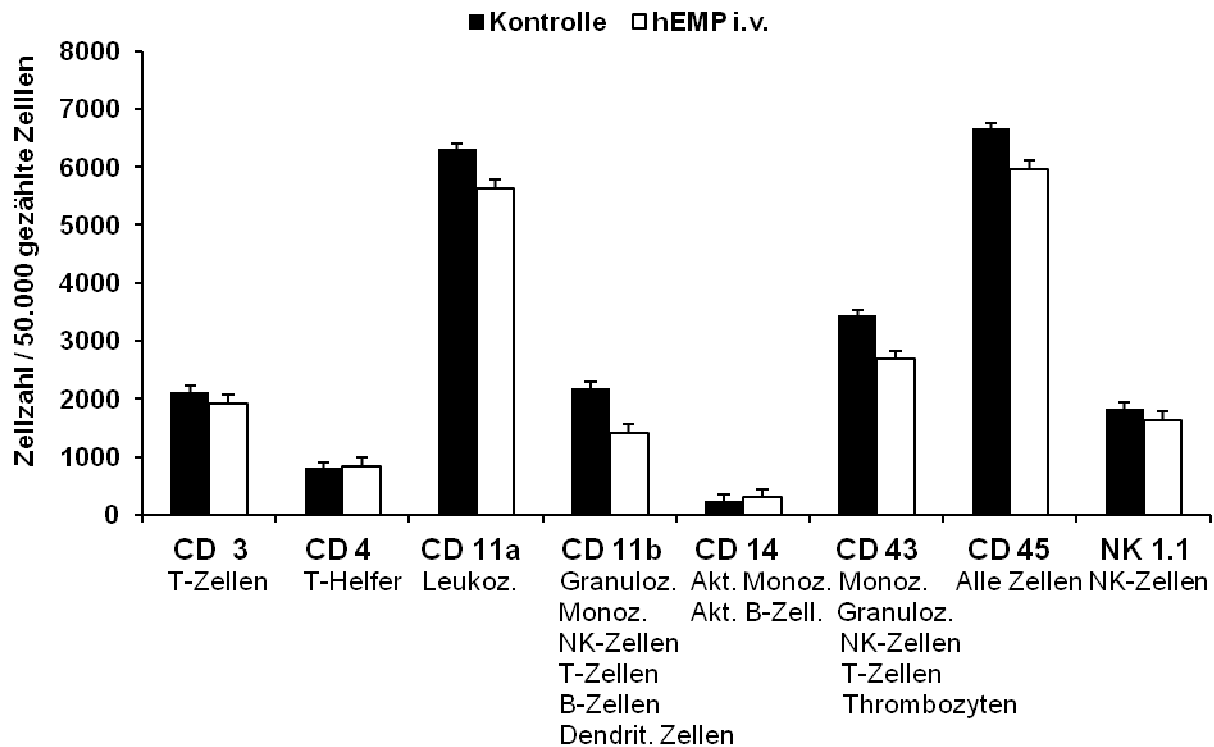
**Abb. 12: Anzahl der EO-EPC in der Milz der Versuchstiere.**

Gezeigt ist die Datenanalyse von mehreren repräsentativen Experimenten, bei denen die EO - EPC aus der Milz von mit  $2 \times 10^5$  EMP behandelten Mäusen quantifiziert wurden, verglichen mit den Zahlen der Kontrollgruppe. Die Behandlung mit EMP erhöht die Anzahl der ortsständigen EO - EPC in der Milz der Versuchstiere im Vergleich zur Kontrolle signifikant (\* $p < 0,001$ ;  $n=5$ ).

### 3.7 FACS - Analyse von Immunzellen in Blut und KM

Bei Behandlung von Mäusen mit humanen EMP stellte sich die Frage nach einer möglichen inflammatorischen oder immunogenen Antwort der Tiere. Diesbezüglich wurden weitere *in vivo* Versuche zur Ermittlung einer möglichen immunogenen Reaktion in den behandelten Mäusen durchgeführt. Hierzu wurden Mäuse mit  $2 \times 10^5$  EMP oder reiner Trägersubstanz behandelt (n=5 pro Gruppe). Im Anschluss wurde das Maus Blut und das Maus Knochenmark mit Hilfe entsprechender Zellmarker auf eine gesteigerte Anzahl von Immunzellen untersucht.

Die FACS - Analysen zeigten bei Verwendung humaner EMP im Mausmodell keine verstärkte Immunantwort in den untersuchten Tieren (Abb. 13).



**Abb. 13: Bei Behandlung mit humanen EMP erfolgt keine gesteigerte Immunreaktion in den Versuchstieren.**

Gezeigt ist eine Datenanalyse mehrerer Versuche, bei denen die Versuchstiere mit  $2 \times 10^5$  humanen EMP behandelt wurden. Die Kontrollgruppe erhielt reine Trägerlösung. Unterhalb der auf der horizontalen Achse gezeigten Zellmarker sind die jeweiligen entsprechenden Zellen aufgeführt.

Es kam zu keiner gesteigerten Zellzahl bei Verwendung von humanen EMP.

## 4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle der endothelialen Mikropartikel (EMP) als möglicher Mediator beim Transfer biologischer Informationen zwischen den geschädigten Endothelzellen und den regenerierenden Zellen im Rahmen der Atherosklerose.

Wir konnten zeigen, dass Endothelzellen (HCAEC) unter apoptotischen Bedingungen Annexin V-positive endotheliale Mikropartikel freisetzen und dass diese Mikropartikel in Endothelzellen und in endotheliale Progenitorzellen aufgenommen werden. Durch die Aufnahme von Mikropartikeln in EPC kommt es zu einer Vermittlung und Weitergabe biologischer Informationen zwischen apoptotischen und regenerierenden Zellen. Dies resultiert unter anderem in einer vermehrten Differenzierung, erhöhten Migration und verminderten Apoptoserate der untersuchten Zielzellen.

Die systemische Gabe von EMP im Mausmodell führte zu einer erhöhten Anzahl an EPC im Knochenmark und in der Milz sowie zu einer erhöhten Anzahl an zirkulierenden EPC im peripheren Blut.

### 4.1 EMP als Bindeglied zwischen apoptotischen und regenerierenden Endothelzellen

Ein intaktes Gefäßendothel ist die grundlegende Voraussetzung für die Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen. Chronisch entzündliche Erkrankungen wie die Atherosklerose führen zur Aktivierung und zur Apoptose von Endothelzellen. Diese sind wichtige Faktoren in der weiteren Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion und der fortschreitenden Bildung atherosklerotischer Schädigungen (Giannotti und Landmesser, 2007; Libby et al., 1997; Lusis, 2000; Wassmann und Nickenig, 2003). Endotheliale Progenitorzellen aber auch reife Endothelzellen sind die wesentlichen Zellen im Rahmen der Gefäßwandreparatur. So hat eine erhöhte Anzahl zirkulierender endothelialer Pro-



genitorzellen (EPC) gefäßregenerierende Effekte auf die Gefäßwand (Hill et al., 2003; Hirschi, 2010; Ikenaga et al., 2001; Kalka et al., 2000; Kawamoto et al., 2003; Werner und Nickenig, 2007).

Die in unseren Untersuchungen vorgenommene systemische Applikation von EMP hat demnach über die Erhöhung der Anzahl zirkulierender EPC möglicherweise direkten Einfluss auf die Gefäßregeneration. Darüber hinaus trägt auch die von uns beobachtete vermehrte Differenzierung der EPC in Endothelzellen zu dieser Regeneration bei.

Unklar ist bislang welche molekularen und zellulären Signalwege notwendig sind, damit die notwendigen Reparaturprozesse im Bereich der geschädigten Gefäßwand ablaufen können.

Ergebnisse, die einen Zusammenhang zwischen vermehrter Mikropartikelfreisetzung und verbesserter Geweberegeneration belegen, konnten bereits in verschiedenen in vivo und in vitro Studien gefunden werden.

So konnten Leroyer und Mitarbeiter zeigen, dass CD 40 exprimierende Mikropartikel aus atherosklerotischen Plaques die Proliferation von Endothelzellen und die Angiogenese stimulieren, was die Neovaskularisation innerhalb der atherosklerotischen Plaques begünstigt (Leroyer et al., 2008). Eine andere Untersuchung zeigte, dass thrombozytäre Mikropartikel angiogene Fähigkeiten besitzen, die die Revaskularisation nach ischämischen Zuständen in vitro und in vivo unterstützen können (Brill et al., 2005). Ergebnis einer weiteren Untersuchung von Leroyer und Mitarbeitern war, dass Mikropartikel aus ischämischen Muskelzellen die Differenzierung aus dem Knochenmark stammender mononukleärer Zellen in Endothelzellen unterstützen und darüber hinaus ebenfalls die Neovaskularisation begünstigen (Leroyer et al., 2009).

Weitere Hinweise für eine enge Interaktion zwischen Mikropartikeln, Endothelzellen und EPC finden sich in der Feststellung, dass die angiogenen Eigenschaften von EPC durch die an der Oberfläche endothelialer Mikropartikel stattfindende Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin reguliert werden können (Lacroix et al., 2007).

Die vorliegenden Daten deuten insgesamt auf eine zentrale, vermittelnde Rolle der EMP bei der Gefäßregeneration und der Neoangiogenese hin. Da diese wichtige regenerative

Prozesse im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen sind, kommt hierbei auch den EMP eine besondere Bedeutung zu.

#### **4.2 EMP als Teil interzellulärer Kommunikationswege**

Es ist bekannt, dass Zellen auf unterschiedlichste Weisen miteinander kommunizieren und Informationen austauschen können. Hierbei ist eine Möglichkeit die Kommunikation über Signalmoleküle wie beispielsweise Zytokine, Interleukine oder Chemokine. Diese können unter anderem an die Zielzellen binden und auf diesem Weg eine Reaktionskette auslösen oder zur Ausschüttung weiterer Faktoren führen.

Ein Beispiel hierfür wäre die Freisetzung von Zytokinen und Interleukinen im Rahmen von Endothelzellschädigungen, die zusammen mit einer vermehrten Expression von membranständigen Zelladhäsionsmoleküle wie beispielsweise ICAM 1 (Intercellular adhesion molecule 1), VCAM 1 (Vascular cell adhesion molecule 1) und E - Selektin zu einem prothrombotischen Zustand des Endothels führt (Cybulsky et al. 2001; Libby et al. 2002; Pueyo et al., 2000).

Darüber hinaus sind Zellen in der Lage über den Austausch oder die Aufnahme von Proteinen Informationen weiterzugeben. So spielt beispielsweise die Freisetzung, Expression und Weitergabe von Tissue Factor (TF) oder von von Willebrand Faktor (vWF) im Rahmen von Entzündungen, Hämostase oder Thrombose eine entscheidende Rolle (Andre et al., 2000; Jimenez et al., 2003; Sabatier et al., 2002).

Mikropartikel können auch über ihre Oberflächenantigene als Signalvermittler fungieren und ihre Zielzellen stimulieren. So wurde bereits in experimentellen Untersuchungen gezeigt, dass Mikropartikel Endothelzellen und Leukozyten aktivieren können (Barry et al., 1998; Miyamoto et al., 1998). Darüber hinaus sind sie in der Lage die Sekretion verschiedener Zytokine in Endothelzellen auszulösen (Mesri und Altieri, 1999).

Wir konnten in unseren Versuchen zeigen, dass die Ko-Kultivierung von EPC und EMP die induzierte Apoptose von endothelialen Progenitorzellen inhibieren kann. Diese von

uns gesehene Unterbindung der Zellapoptose repräsentiert möglicherweise einen Schutzmechanismus der Zellen. Um das Absterben weiterer Zellen zu verhindern werden von der apoptotischen Zelle EMP freigesetzt, die wiederum in der Lage sind die benachbarten Zellen zu aktivieren und auf diesem Weg einen weiteren Zelluntergang zu unterbinden.

Der genaue Ablauf des hierfür zugrunde liegenden Signalwegs ist zum momentanen Zeitpunkt noch nicht abschließend geklärt. Die Annexin-I-PSR Achse scheint allerdings eine wichtige Rolle bei der interzellulären Kommunikation zu spielen. Eigene Daten zeigen, dass die Inhibition von Annexin I auf EMP mittels siRNA beziehungsweise die Herabregulation des korrespondierenden Rezeptors PSR auf Endothelzellen zu einer verminderten EMP Aufnahme in der Zielzelle führen und biologische Effekte wie die Inhibition der Apoptose aufheben können.

Annexin und Phosphatidylserin werden auf der Oberfläche von EMP exprimiert und sind vermutlich auch an der Aufnahme der Mikropartikel in die HCAEC und die EPC beteiligt. Interessanterweise haben Henson et al. den Phosphatidylserinrezeptor (PSR) als Schlüsselement in der Regulation des inflammatorischen Status eines Organismus identifiziert. Die Präsenz von PS auf der Oberfläche apoptotischer Zellen oder auf Mikropartikeln aktiviert den PSR was in einer Reihe von Signalen zur Angiogenese und zur Inhibition proinflammatorischer Parameter resultiert. Im Gegensatz dazu werden durch Zelldebris TLR (Toll-like-Rezeptor) und Kollektine exprimiert, und hierüber Makrophagen und verschiedene proinflammatorische Mediatoren aktiviert. Dem PSR kommt demnach eine Rolle als wichtiger molekularer Schalter zwischen pro- und antiinflammatorischem Status des Gewebes zu (Henson et al., 2001).

Es ist wahrscheinlich, dass die apoptotischen Zellen auf diese Weise mittels EMP Signale zu regenerierenden Zellen senden, um eine schnelle Reparatur eines vorhandenen Schadens zu ermöglichen. Es wurde bereits beschrieben, dass die Phagozytose von apoptotischen Zellen durch benachbarte Zellen oder durch Phagozyten für die Gewebshomöostase von größter Bedeutung ist. Hierdurch wird offenbar die sonst auftretende postapoptotische Nekrose verhindert, die üblicherweise mit einer weiteren

vermehrten Freisetzung von zytotoxischen und antigenen Membranbestandteilen an das umliegende Gewebe einhergeht (Cohen et al., 2002; Savill et al., 2002).

Zirkulierende EMP können offensichtlich als Signalvermittler weiteren fortschreitenden Zellschaden verhindern und die Zellmobilisation, Zelldifferenzierung und Zellmigration beeinflussen, indem sie über die Aktivierung des PSR eine antiinflammatorische und proangiogene Umgebung erzeugen.

Der genaue Weg der Inkorporation und der Weiterverarbeitung von EMP nach einer Aktivierung des PSR sind zum jetzigen Zeitpunkt unbekannt. Es ist wahrscheinlich, dass die Aktivierung des PSR nach Mikropartikel-Kontakt zur Aufnahme der apoptotischen Partikel führt (eigene Daten; Lauber et al., 2004).

In anderem Zusammenhang ist über diese Beobachtungen hinaus bereits eine zusätzliche unterstützende Einflussnahme von Mikropartikeln auf die Chemotaxis, das Anwachsen und das Überleben von Stammzellen beschrieben worden (Baj-Krzyworzeka et al., 2002; Janowska-Wieczorek et al., 2001).

Zum jetzigen Zeitpunkt haben wir allerdings noch keine sicheren Beweise für eine solche Rolle von endothelialen Mikropartikeln bei der Einwanderung von endothelialen Progenitorzellen in den Ort der Gewebsschädigung („Homing“) und bei der endothelialen Regeneration.

EMP können auch auf andere Weise als biologische Vektoren der Informationsweitergabe in der Zellkommunikation dienen. Mikropartikel sind zum Beispiel in der Lage Chemokinrezeptoren zu anderen Zellen zu transferieren, die diesen Rezeptor normalerweise nicht exprimieren. Dies wurde für den CCR5 Rezeptor bei der HIV (human immunodeficiency Virus) -Infektion und für CXCR4 bei der AML (akute myeloische Leukämie) nachgewiesen.

Das HI Virus muss an CD4 und einen Ko-Rezeptor binden um eine Zelle infizieren zu können. Der hauptsächliche Ko-Rezeptor hierbei ist der Chemokinrezeptor CCR5. Zellen, die CCR5 nicht exprimieren sind üblicherweise nicht empfänglich für das HI Virus. In experimentellen Untersuchungen konnte belegt werden, dass CCR5 aus CCR5 tragenden Zellen in Mikropartikeln freigesetzt werden kann und dann über die Aufnahme

der MP in mononukleäre Zellen im peripheren Blut transferiert werden kann, die eine nachgewiesene, homozygote Deletion im Gen für CCR5 haben und diesen Rezeptor daher normalerweise nicht exprimieren. Diese Zellen exprimieren anschließend CCR5 und sind empfänglich für das HI Virus. Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass ein weiterer Transfer des CCR5 von den mononukleären Blutzellen in Endothelzellen während der transendothelialen Migration möglich ist (Mack et al., 2000).

Der Mikropartikel vermittelte Transfer von CXCR4 zu H60 Zellen im Rahmen der AML verbesserte die Migration und erhöhte das Einwandern der Zellen in das Knochenmark in bestrahlten NOD/SCID Mäusen (Kalinkovich et al., 2006).

Die hier beschriebene Weitergabe von Proteinen an andere Zellen durch Mikropartikel kann ebenso wie die Weitergabe auch anderer Faktoren wie beispielsweise mRNA die Zielzellen nicht nur beeinflussen sondern eventuell sogar das genetische Programm dieser Zellen verändern (Ratajczak et al., 2006).

Im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen könnte man aufgrund dieser Erkenntnisse vermuten, dass apoptotische Zellen wichtige Informationen für benachbarte und entfernte Zellen mittels EMP freisetzen und diese dann so weitergeleitet werden.

Interessanterweise deutet eine weitere Veröffentlichung darauf hin, dass aus EPC stammende Mikrovesikel die Neoangiogenese in Endothelzellen über einen Transfer von mRNA aktivieren und fördern (Deregibus et al., 2007). Daneben wurde auch beschrieben, dass Mikropartikel, die SHH (Sonic hedgehog) Proteine exprimieren eine NO-Freisetzung aus Endothelzellen induzieren und somit die endotheliale Dysfunktion verbessern (Agouni et al., 2007). Dies unterstützt unsere Beobachtungen und die daraus resultierenden Vermutungen bezüglich der positiven Wirkungen von endothelialen Mikropartikeln in der Funktion als Vektoren biologischer Informationen im Rahmen der kardiovaskulären Erkrankungen ebenfalls.

### 4.3 Offene Fragen

Das Konzept der EMP vermittelten Interaktion zwischen apoptotischen Endothelzellen und den regenerierenden Zielzellen ist neu und beinhaltet daher eine Reihe ungelöster Fragen.

Es ist noch nicht bekannt, ob es Unterschiede im biologischen Profil und im Proteingehalt der Mikropartikel gibt, je nachdem ob sie aus gesunden oder kranken Zellen hervorgegangen sind. Unterschiede dieser Art könnten auch in unterschiedlichen Folgereaktionen resultieren, so dass die bisherigen Ergebnisse nicht übertragbar wären.

Darüber hinaus ist noch nicht ausreichend geklärt in welchem räumlichen Radius die EMP die beschriebene Signalfunktion übernehmen können.

Es ist zum einen vorstellbar, dass EMP nur innerhalb des lokalen Mikromilieus agieren können und daher nur in der Lage wären die direkt benachbarten Zellen zu beeinflussen ohne zusätzliche Effekte in der ferneren Umgebung zu vermitteln. In diesem Fall wären sie an der Gefäßregeneration nur durch die Unterdrückung der lokalen Entzündungsreaktion und die Aktivierung lokaler Endothelzellen und EPC beteiligt. Sie könnten jedoch nicht direkt zur Mobilisation entfernter, knochenmarkständiger EPC beitragen.

Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass EMP für eine bestimmte Zeit im peripheren Blut zirkulieren können und daher kurz- und weitreichende Signalfähigkeit besitzen. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass Patienten eine signifikante Anzahl von zirkulierenden Mikropartikeln im peripheren Blut zeigen (Boulanger et al., 2001; Koga et al., 2005; Werner et al., 2006) und die Mobilisation von Progenitorzellen mit der EMP Gabe in unseren Untersuchungen assoziiert war.

Schlussendlich gilt es zu klären welche mechanischen Abläufe notwendig sind damit aufgenommene Mikropartikel in der jeweiligen Zielzelle das biologische Verhalten beeinflussen. Erste publizierte Studien und eigene Daten deuten daraufhin, dass der Transfer von microRNA eine große Bedeutung bei der Signalvermittlung von Mikropar-

tikeln auf die Zielzelle hat (Mause und Weber, 2010; Weber et al., 2010; Zerneck et al., 2009).

Zusammenfassend stellt die durch EMP Freisetzung vermittelte Interaktion zwischen apoptotischen Endothelzellen und regenerierenden endothelialen Progenitorzellen einen neuen regulatorischen Signalweg im kardiovaskulären System dar. Diese neugewonnenen Erkenntnisse haben möglicherweise Auswirkungen auf die regenerative Medizin im Hinblick auf eine mögliche Nutzung von Mikropartikeln im Rahmen der Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen sowie bei der Prävention der Atherosklerose.

## 5. Zusammenfassung

Die Atherosklerose ist eine der häufigsten Todesursachen in der industrialisierten Welt. Der entscheidende Schritt bei der Entstehung der Atherosklerose ist die zunehmende Endothelzellschädigung und Endothelzellapoptose, die das Stadium der endothelialen Dysfunktion charakterisieren. Die Reendothelialisierung und die Gefäßregeneration sind daher zur Therapie und zur Prävention einer fortschreitenden Atherosklerose von zentraler Bedeutung. Endothelzellen und endotheliale Progenitorzellen tragen maßgeblich zu diesen Reparaturvorgängen an der Gefäßwand bei.

Ziel dieser Arbeit war es, zu zeigen, dass apoptotische endotheliale Mikropartikel mit endothelregenerierenden Zellen interagieren und eine Mediatorfunktion beim Transfer biologischer Informationen zwischen den geschädigten Zellen und den endothelregenerierenden Zellen besitzen.

Wir konnten zeigen, dass die aus geschädigten Endothelzellen freigesetzten, endothelialen Mikropartikel in die regenerierende Endothelzellen aufgenommen werden und auf diesem Wege biologische Informationen weitertragen können. Darüber hinaus konnten wir nachweisen, dass endotheliale Mikropartikel die Apoptose, Differenzierung und Migration von Endothelzellen und endothelialen Progenitorzellen *in vitro* positiv beeinflussen.

Im Mausmodell konnten wir zeigen, dass die Anzahl an endothelialen Progenitorzellen im Knochenmark, im peripheren Blut und in der Milz durch die Gabe von endothelialen Mikropartikeln signifikant erhöht wird.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse offenbaren eine enge mikropartikelvermittelte Interaktion zwischen apoptotischen Endothelzellen und regenerierenden Zellen und lassen einen engen Zusammenhang zwischen apoptotischen endothelialen Mikropartikeln und Endothelzellregeneration vermuten.

Die von uns beschriebene Interaktion zwischen endothelialen Mikropartikeln und den endothelregenerierenden Zellen eröffnet einen neuen vaskulären Regulationsmechanismus mit einer möglicherweise großen Bedeutung für die regenerative Medizin und ist Anlass und Grundlage für weitere Untersuchungen, die den genauen Ablauf der mikropartikelvermittelten Signalweitergabe offenlegen sollen, um hier mögliche präventive oder therapeutische Ansätze im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen zu finden.



## 6. Literaturverzeichnis

Alev C, Li M, Asahara T. Endothelial progenitor cells: a novel tool for the therapy of ischemic diseases. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15: 949-965

Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J. Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression. *Cell Cycle* 2009; 8: 2014-2018

Agouni A, Mostefai HA, Porro C, Carusio N, Favre J, Richard V, Henrion D, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release. *Faseb J* 2007; 21: 2735-2741

Andre P, Denis CV, Ware J, Saffaripour S, Hynes RO, Ruggeri ZM, Wagner DD. Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins. *Blood* 2000; 96: 3322-3328

Anker P, Stroun M. Progress in the knowledge of circulating nucleic acids: plasma RNA is particle-associated. Can it become a general detection marker for a cancer blood test? *Clin Chem* 2002; 48: 1210-1211

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-967

Barry OP, Practico D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest* 1998; 102: 136-144

Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Practico D, Ratajczak J, Vilaire G, Kijowski J, Reza R, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol* 2002; 30: 450-459

Beaudin AR, Grondin G. Shedding of vesicular material from the cell surface of eukariotic cells: different cellular phenomena. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1071: 203-219

Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing AN, Sturk A. Cell derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost* 2001; 85: 639-646

Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, Pastor J, Mauro LM, Horstman LL, de Marchena E, Ahn YS. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2003; 145: 962-970

Blau HM, Brazelton TR, Weinmann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 2001; 105: 829-841

Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A, Mallat Z. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* 2001; 104: 2649-2652

Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating Microparticles: a potential prognostic marker for arteriosclerotic vascular disease. *Hypertension* 2006; 48: 1-7

Botham KM, Moore EH, De Pascale C, Bejta F. The induction of macrophage foam cell formation by chylomicron remnants. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 454-458

Brill A, Dashevsky O, Rivo J, Gozal Y, Varon D. Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization. *Cardiovasc Res* 2005; 67: 30-38

Carmeliet P, Moons L, Stassen JM, De Mol M, Bouche A, van den Oord JJ, Kock M, Collen D. Vascular wound healing and neointima formation induced by perivascular electric injury in mice. *Am J Pathol* 1997; 150: 761-776

Chaudhury H, Raborn E, Goldie LC, Hirschi KK. Stem cell-derived vascular endothelial cells and their potential application in regenerative medicine. *Cells Tissues Organs* 2012; 195: 41-47

Chatterjee A, Black SM, Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its patho-physiologic regulation. *Vascul Pharmacol* 2008; 49: 134-140

Chironi G, Boulanger CM, Simon A, Dignat-George F, Freyssinet JM, Tedgui A. Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res* 2009; 335: 143-151

Cohen PL, Caricchio R, Abraham V, Camenisch TD, Jennette JC, Roubey RA, Earp HS, Matsushima G, Reap EA. Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase. *J Exp Med* 2002; 196: 135-140

Colman RW. Biologic activities of the contact factors in vivo-potential of hypotension, inflammation, and fibrinolysis, and inhibition of cell adhesion, angiogenesis and thrombosis. *Thromb Hamost* 1999; 82: 1568-1577

Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, Mutin M, Sanmarco M, Sampol J, Dignat-George F. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1999; 104: 93-102

Critser PJ, Yoder MC. Endothelial colony-forming cell role in neoangiogenesis and tissue repair. *Curr Opin Organ Transplant* 2010; 15: 68-72

Crosby JR, Kaminski WE, Schatteman G, Martin PJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope CF. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res* 2000; 87: 728-730

Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991; 251: 788-791

Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. A major role for VCAM - 1 but not ICAM - 1 in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 107: 1255-1262

De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995; 96: 60-68

Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo IM, Tetta C, Biancone L, Bruno S, Bussolati B, Camussi G. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* 2007; 110: 2440-2448

Enders KO, Tsui NBY, Lam NYL, Chiu RWK, Yu SCH, Wong SCC, Lo ESF, Rainer TH, Johnson PJ, Lo YMD. Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals. *Clin Chem* 2002; 48: 1212-1217

Fevrier B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 415-421

Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schäfer B, Hossfeld DK, Fiedler W. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000; 95: 3106-3112

George FD. Microparticles in vascular disease *Thromb Res* 2008; 122: 55-59

Giannotti G, Landmesser U. Endothelial dysfunction as an early sign of atherosclerosis. *Herz* 2007; 32: 568-572

Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res* 2001; 88: 167-174

Gimbrone Ma Jr. Vascular endothelium, hemodynamic forces and atherogenesis, *Am J Pathol* 1999; 155: 1-5

Gonzalez-Quintero VH, Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, O'Sullivan MJ, Ahn Y. Elevated plasma endothelial microparticles in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: 589-593

Greenwalt TJ. The how and why of exocytic vesicles. *Transfusion* 2006; 46: 143-152

Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T, Chen X, Bühring HJ, Niethammer D, Kuci S. Biology and plasticity of CD133+ haematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 996: 141-151

Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. Endothelial Dysfunction, oxidative stress and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; 104: 2673-2678

Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD 40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391: 591-594

Henson PM, Bratton DL, Fadok VA. The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 627-633

Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; 348: 593-600

Hirschi KK. Vascular Precursors: Origin, Regulation and Function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 1078-1079

Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 1584-1595

Horstman LL, Ahn YS. Platelet microparticles: A wide-angle perspective. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999; 30: 111-142

Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Ahn YS. Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction. *Front Biosc* 2004; 9: 1118-1135

Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology* 2005; 20: 22-27

Iacobas I, Vats A, Hirschi KK. Vascular potential of human pluripotent stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 1110-1117

Ikenaga S, Hamano K, Nishida M, Kobayashi T, Li TS, Kobayashi S, Matsuzaki M, Zempo N, Esato K. Autologous bone marrow implantation induced angiogenesis and improved deteriorated exercise capacity in a rat ischemic hindlimb model. *J Surg Res* 2001; 96: 277-283

Janowska-Wieczorek A, Majka M, Kijowski J, Baj-Krzyworzeka M, Reza R, Turner AR, Ratajczak J, Emerson SG, Kowalska MA, Ratajczak MZ. Platelet derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood* 2001; 98: 3143-3149

Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Ahn YS. Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura: findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease. *Br J Haematol* 2001; 112: 81-90

Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL, Ahn YS. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res* 2003; 109: 175-180

Jujo K, Li M, Losordo DW. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 45: 530-545

Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, Horstman LL, Cheng P, Ahn ER, Bidot CJ, Ahn YS. Endothelial microparticles induce formation of platelet aggregates via von Willebrand factor/ristocetin dependent pathway, rendering them resistant to dissociation. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1301-1308

Kalinkovich A, Tavor S, Avigdor A, Kahn J, Brill A, Petit I, Goichberg P, Tesio M, Netzer N, Naparstek E, Hardan I, Nagler A, Resnick I, Tsimanis A, Lapidot T. Functional CXCR4-expressing microparticles and SDF-1 correlate with circulating acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Res* 2006; 66: 11013-11020

Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3422-3427

Kannel WB. Overview of atherosclerosis. *Clin Ther* 1998; 20: 2-17

Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, Nishimura H, Yoon YS, Milliken C, Uchida S, Masuo O, Iwaguro H, Ma H, Hanley A, Silver M, Kearney M, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 2003; 107: 461-468

Kawamoto A, Asahara T. Role of progenitor endothelial cells in cardiovascular disease and upcoming therapies. *Catheter Cardiovasc Interv* 2007; 70: 477-484

Kim HK, Song KS, Park YS, Kang YH, Lee YJ, Lee KR, Kim HK, Ryu KW, Bae JM, Kim S. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *Eur J Cancer* 2003; 39: 184-191

Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K, Watanabe K, Fukushima H, Tanaka T, Sakamoto T, Yoshimura M, Yamashita Y, Ogawa H. Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1622-1630

Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, Wesselborg S. Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell* 2004; 14: 277-287

Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, Basire A, Pannell R, Borghi H, Robert S, Lamy E, Plawinski L, Camoin Jau L, Gurewich V, Angles-Cano E, Dignat-George F. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 2007; 110: 2432-2439

Leroyer AS, Rautou PE, Silvestre JS, Castier Y, Leseche G, Devue C, Duriez M, Brandes RP, Lutgens E, Tedgui A, Boulanger CM. CD 40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 1302-1311

Leroyer AS, Ebrahimian TG, Cochain C, Recalde A, Blanc-Brude O, Mees B, Vilar J, Tedgui A, Levy BI, Chimini G, Boulanger CM, Silvestre JS. Microparticles from ischemic muscle promotes postnatal vasculogenesis. *Circulation* 2009; 119: 2808-2817

Libby P, Schwartz D, Brogi E, Tanaka H, Clinton SK. A cascade model for restenosis. A special case of atherosclerosis progression. *Circulation* 1992; 86: 47-52



Libby P, Sukhova G, Lee RT, Liao JK. Molecular biology of atherosclerosis. *Int J Cardiol* 1997, 62: 23-29

Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Int Med* 2000, 247: 349-358

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002, 420: 868-874

Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407: 233-241

Mack M, Kleinschmidt A, Bruhl H, Klier C, Nelson PJ, Cihak J, Plachy J, Stangassinger M, Erfle V, Schlondorff D. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med* 2000; 6: 769-775

Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary symptoms, *Circulation* 2000; 101: 841-843

Martin MJ, Hulley SB, Browner WS, Kuller LH, Wentworth D. Serum cholesterol, blood pressure, and mortality: implications from a cohort of 361,662 men. *Lancet* 1986; 2: 933-936

Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 2010; 107: 1047-1057

Mesri M, Altieri DC. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem* 1999; 274: 23111-23118

Minagar A, Jy W, Jimenez JJ, Sheremata WA, Mauro LM, Mao WW, Horstman LL, Ahn YS. Elevated plasma endothelial microparticles in multiple sclerosis. *Neurology* 2001; 56: 1319-1324

Miyamoto S, Kowalska MA, Marcinkiewicz C, Marcinkiewicz MM, Mosser D, Edmunds LH jr, Niewiarowski S. Interaction of leukocytes with platelet microparticles derived from outdated platelet concentrates. *Thromb Haemost* 1998; 80: 982-988

Moncada S, Higgs EA. Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 176: 213-254

Nakashima Y, Fujii H, Sumiyoshi S, Wight TN, Sueishi K. Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1159-1165

Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95: 952-958

Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 2007; 21: 157-171

Pirro M, Schillaci G, Paltriccia R, Bagaglia F, Menecali C, Mannarino MR, Capanni M, Velardi A, Mannarino E. Increased ratio of CD31+/CD42- microparticles to endothelial progenitors as novel marker of atherosclerosis in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2530-2535

Pueyo ME, Gonzales W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappa B activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 645-651

Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, Ratajczak MZ. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 2006; 20: 847-856

Roncalli JG, Tongers J, Renault MA, Losordo DW. Endothelial progenitor cells in regenerative medicine and cancer: a decade of research. *Trends Biotechnol* 2008; 26: 276-283

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis - an update. *N Engl J Med* 1986; 488-500

Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 791-804

Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999, 340: 115-126

Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut JG, Arnoux D, Charpiot P, Freyssinet JM, Oliver C, Sampol J, Dignat-George F. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 2002; 51: 2840 - 2845

Sabatier F, Roux V, Anfosso L, Camoin L, Sampol J, Dignat-George F. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells *in vitro* induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood* 2002; 99: 3962-3970

Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 965-975

Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000, 101: 1899-1906

Shmelkov SV, St. Clair R, Lyden D, Rafii S. AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 715-719

Soriano AO, Jy W, Chirinos JA, Valdivia MA, Velasquez HS, Jimenez JJ, Horstman LL, Kett DH, Schein RM, Ahn YS. Increased circulating platelet derived microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. *Crit Care Med* 2005; 33: 2540-2546

Soleti R, Benameur T, Porro C, Panaro MA; Andriantsitohaina R, Martinez MC. Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors. *Carcinogenesis* 2009; 30: 580-588

Van Wijk MJ, Van Bavel E, Sturk A, Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 277-287

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

Wassmann S, Nickenig G. Interrelationship of free oxygen radicals and endothelial dysfunction - modulation by statins. *Endothelium* 2003; 10: 23-33

Weber C, Schober A, Zerneck A. MicroRNAs in arterial remodelling, inflammation and atherosclerosis. *Curr Drug Targets* 2010; 11: 950-956

Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Böhm M, Dirnagl U, Nickenig G. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointima formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Art Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1567-1572

Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Böhm M, Nickenig G. Intravenous trans- fusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res* 2003; 93: 17-24

Werner N, Nickenig G. Clinical and therapeutical implications of EPC biology in atherosclerosis. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 318-332

Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G. Circulating CD31+/Annexin V+ apoptotic microparticles correlate with endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 112-116

Werner N, Nickenig G. Endothelial progenitor cells in health and atherosclerotic disease. *Ann Med* 2007; 39: 82-90

Xu Q, Zhang Z, Davison F, Hu Y. Circulating Progenitor Cells Regenerate Endothelium of Vein Graft Atherosclerosis, Which Is Diminished in ApoE-Deficient Mice. *Circ Res* 2003; 93: 76-86

Yoder MC. Defining human endothelial progenitor cells. *J Thromb Haemost* 2009; 7 : 49-52

Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, Hristov M, Köppel T, Jahantigh MN, Lutgens E, Wang S, Olson EN, Schober A, Weber C. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL 12-dependent vascular protection. *Sci Signal* 2009; 2: 81

Zampetaki A, Kirton JP, Xu Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res* 2008; 78: 413-421

Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997; 89: 1121-1132

## Danksagung

Herrn Professor Dr. N. Werner danke ich für die Überlassung des Themas, seine wissenschaftliche Unterstützung und seine hervorragende persönliche Unterstützung und Betreuung in allen Abschnitten der Arbeit.

Herrn Professor Dr. G. Nickenig danke ich für die Möglichkeit, die vorgelegte Dissertation in seinem Labor für Molekulare Kardiologie der Medizinischen Klinik II der Universität Bonn erstellen zu können.

Besonders danken möchte ich Frau Kathrin Paul, die mir bei der Durchführung der Experimente stets mit ihrem Rat zur Seite stand.

Weiterhin danke ich meiner Mitdotorandin Frau Caroline M. Galon für die freundschaftliche Zusammenarbeit sowie dem gesamten Laborteam.