

Aus der Medizinischen Poliklinik Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Komm. Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Molekulare Regulation der SDF-1 α Expression bei der Neointimabildung

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ela Karshovska

aus
Pleven, Bulgarien

2009

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: 1. Prof. Dr. med. Andreas Schober
2. Prof. Dr. Barbara Walzog

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Karl-Georg Kanz
Priv. Doz. Dr. Hans-Joachim Anders

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR,
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2009

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. EINLEITUNG | 5 |
| 1. 1. Native Atherosklerose | 5 |
| 1. 2. Akzelerierte Arteriosklerose | 6 |
| 1. 2. 1. Restenose und Neointimabildung..... | 7 |
| 1. 2. 2. Herkunft der neointimalen SMCs | 9 |
| 1. 2. 3. Rolle der SDF-1 α /CXCR4 Achse bei der Neointimabildung | 11 |
| 1. 2. 3. 1. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α | 13 |
| 1. 2. 4. Lysophosphatidsäuren (LPAs) als neuer Mediator der Neointimabildung..... | 14 |
| 1. 2. 5. Therapeutische Optionen zur gezielten Hemmung der Neointimabildung über die SDF-1 α /CXCR4 Achse | 14 |
| 1. 3. Fragestellung | 15 |
| | |
| 2. MATERIAL UND METHODEN | 17 |
| 2. 1. Chemikalien | 17 |
| 2. 2. Antikörper | 19 |
| 2. 3. Geräte | 20 |
| 2. 4. Verbrauchsmaterial | 21 |
| 2. 5. Verwendete Kits | 22 |
| 2. 6. Lösungen | 22 |
| 2. 7. Mäusestämme | 28 |
| 2. 8. Tierhaltung und Mäusezucht | 28 |
| 2. 9. Endoluminale Verletzung der A. carotis communis (CCA) | 29 |
| 2. 10. Intraluminale Applikation von Lysophosphatidsäure (LPA) | 31 |
| 2. 11. Small interfering RNA (siRNA) Gentransfer | 31 |
| 2. 11. 1. Pluronic F-127 und in vivo siRNA Gentransfer..... | 32 |
| 2. 12. Blutentnahme über die Schwanzvene | 33 |
| 2. 13. Probengewinnung | 34 |
| 2. 14. Histomorphometrie, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz | 34 |
| 2. 14. 1. Probenvorbereitung | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 2. 14. 2. Immunfluoreszenz | 35 |
| 2. 14. 2. 1. Quantitative Immunfluoreszenz | 38 |
| 2. 14. 3. Immunhistochemie | 38 |
| 2. 14. 3. 1. Quantitative Immunhistochemie | 39 |
| 2. 14. 4. Histomorphometrie (Movat´s-Pentachrom-Färbung) | 40 |
| 2. 15. Western Blot Analyse | 42 |
| 2. 15. 1. Proteinextraktion aus Paraffinschnitten und Paraffinblöcken | 43 |
| 2. 15. 2. Quantitative Proteinbestimmung | 44 |
| 2. 15. 3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 44 |
| 2. 15. 4. Western Blot | 46 |
| 2. 16. Quantitative real-time Reverse Transkription–Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) | 48 |
| 2. 16. 1. RNA-Isolierung | 48 |
| 2. 16. 2. Reverse Transkription (cDNA-Synthese) | 49 |
| 2. 16. 3. Real time RT-PCR (TaqMan [®] -PCR) | 50 |
| 2. 16. 4. Relative Quantifizierung und $\Delta\Delta$ Cp Methode | 52 |
| 2. 17. Durchflußzytometrie (Flourescence Activated Cell Sorting-FACS) | 52 |
| 2. 18. Statistische Analyse | 55 |
| | |
| 3. ERGEBNISSE | 56 |
| 3. 1. HIF-1α Expression in der Gefäßwand nach endothelialer Denudation im ApoE-/- Mausmodell | 56 |
| 3. 1. 1. Bestimmung der HIF-1 α mRNA Expression in der verletzten Gefäßwand | 56 |
| 3. 1. 2. Bestimmung der HIF-1 α Proteinexpression in der verletzten Gefäßwand | 57 |
| 3. 2. Lokalisation von HIF-1α Expression in der verletzten Gefäßwand | 58 |
| 3. 3. Zelluläre HIF-1α Lokalisation in der verletzten Gefäßwand | 59 |
| 3. 4. Nukleäre HIF-1α Translokation | 60 |
| 3. 5. Kolokalisation von HIF-1α und SDF-1α | 62 |
| 3. 6. Effekt eines HIF-1α siRNA Gentransfers in vivo | 63 |
| 3. 6. 1. Untersuchung der Effizienz eines Gentransfers durch lokal applizierte siRNA in vivo | 63 |
| 3. 6. 2 Effekt von HIF-1 α siRNA Gentransfer auf die HIF-1 α Expression | 64 |
| 3. 6. 2. 1. Western Blot Analyse | 64 |
| 3. 6. 2. 2. Quantitative Immunfluoreszenz | 65 |

| | |
|--|-----------|
| 3. 6. 3. Effekt von HIF-1 α siRNA Gentransfer auf die SDF-1 α Expression..... | 66 |
| 3. 6. 4. Effekt von HIF-1 α siRNA Gentransfer auf die SPCs Mobilisierung..... | 66 |
| 3. 6. 5. Effekt von HIF-1 α siRNA Gentransfer auf die Neointimabildung..... | 67 |
| 3. 6. 6. Effekt von HIF-1 α siRNA Gentransfer auf die zelluläre Zusammensetzung der Neointima..... | 69 |
| 3. 7. Beteiligung der SDF-1α/CXCR4 Achse bei der Neointimabildung durch Lysophosphatidsäure..... | 71 |
| 3. 8. Einfluss von CXCR4 auf die Mobilisierung von SPCs durch Lysophosphatidsäure | 73 |
| 3. 9. CXCR4 ist beteiligt an der Akkumulation von CXCR4-positiven SMCs nach LPA 20:4 Applikation..... | 74 |
| 3. 10. Blockade von LPA-Rezeptoren reduziert die Neointimabildung nach Gefäßverletzung..... | 76 |
| 3. 11. LPA Rezeptoren regulieren die SDF-1α und HIF-1α Expression nach Gefäßverletzung..... | 77 |
| 3. 12. LPA Rezeptoren regulieren die SPCs Mobilisierung nach Gefäßverletzung..... | 79 |
| | |
| 4. DISKUSSION..... | 81 |
| 4. 1. Hypoxia-inducible factor (HIF-)1α..... | 82 |
| 4. 1. 1. Vaskuläre HIF-1 α Expression und Lokalisation nach Gefäßverletzung..... | 82 |
| 4. 1. 2. HIF-1 α und vaskuläres Remodeling durch SPCs..... | 88 |
| 4. 1. 2. 1 Die SDF-1 α /CXCR4 Achse reguliert die Neointimabildung durch SPCs..... | 89 |
| 4. 1. 2. 1. 1. Das CXC Chemokin SDF-1 α und der Rezeptor CXCR4..... | 89 |
| 4. 1. 2. 1. 2. Die SDF-1 α /CXCR4 Achse bei der Reparatur von Gewebeschädigung durch Stammzellen..... | 91 |
| 4. 1. 2. 2. HIF-1 α reguliert die SDF-1 α Expression nach Gefäßverletzung..... | 94 |
| 4. 1. 2. 2. 1. Zelluläre Koloaliation von HIF-1 α und SDF-1 α | 94 |
| 4. 1. 2. 2. 2. HIF-1 α siRNA Gentransfer inhibiert die SDF-1 α Expression..... | 95 |
| 4. 1. 2. 2. 3. HIF-1 α siRNA Gentransfer inhibiert die SPC Mobilisierung..... | 96 |
| 4. 1. 2. 2. 4. HIF-1 α siRNA Gentransfer reduziert die Neointimabildung..... | 96 |
| 4. 2. Lysophosphatidsäuren (LPAs) und SDF-1α beim vaskulären Remodeling..... | 97 |
| 4. 2. 1. LPA induziert eine neointimale Hyperplasie durch die SDF-1 α /CXCR4 Achse..... | 99 |
| 4. 2. 2. LPA 20:4 induziert die SPC Mobilisierung durch SDF-1 α /CXCR4..... | 101 |

| | |
|---|------------|
| 4. 2. 3. Die Hemmung von CXCR4 reduziert die CXCR4-positiven SMCs in der Neointima nach 20:4 LPA Applikation..... | 102 |
| 4. 2. 4. Die Neointimabildung nach Gefäßverletzung wird durch LPA-Rezeptoren reguliert. ... | 102 |
| 4. 2. 5. LPA Rezeptoren regulieren die SDF-1 α und HIF-1 α Expression nach Gefäßverletzung | 104 |
| 4. 2. 6. LPA Rezeptoren regulieren die SPCs Mobilisierung nach Gefäßverletzung..... | 107 |
| 5. ZUSAMMENFASSUNG | 108 |
| 6. LITERATURVERZEICHNIS | 112 |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 133 |
| DANKSAGUNG | 137 |
| PUBLIKATIONEN..... | 138 |
| LEBENS LAUF | 141 |

1. Einleitung

1. 1. Native Atherosklerose

Die kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere die koronare Herzerkrankung, stellen mit Abstand die häufigsten Todesursachen, häufiger als maligne Tumore, dar. Die größte Krankheitsgruppe wird durch atherosklerotische Gefäßveränderungen in der Koronar-, Zerebral-, und peripheren Zirkulation verursacht.¹ Die klinischen Erkrankungen, die daraus entstehen sind Angina pectoris, Myokardinfarkt, Hirnschlag, Niereninsuffizienz und periphere arterielle Verschlusskrankheit.² Die Pathophysiologie der Atherosklerose ist komplex und noch nicht vollständig geklärt. Jedoch wird die Atherosklerose im Rahmen der „response to injury“-Hypothese als chronischer Entzündungsprozess angesehen, der je nach Stadium zur Ausbildung der charakteristischen Plaquetypen führt.²⁻⁴

Allerdings unterscheiden sich die native und akzelerierte Atherosklerose in wesentlichen Punkten (siehe Tabelle 1). Die Endothelfunktionsstörung (ohne endotheliale Denudation)⁵ wird als initiales Ereignis in der Pathogenese der nativen Atherosklerose angesehen. Mögliche Ursachen der Endotheldysfunktion sind chronische Schädigungen wie erhöhter LDL (low-densitylipoprotein)-Spiegel und modifiziertes LDL, sowie freie Radikale.² Andere Auslöser der Ausbildung atherosklerotischen Plaques können morphologische Schädigungen durch Trauma, biochemische Schädigungen durch bakterielle Toxine, Angriff durch Viren oder Antigen-Antikörper-Reaktionen, sowie biophysikalische Verletzungen auf molekularer Ebene darstellen.² Durch die Endotheldysfunktion kommt es zu einem Einstrom von Lipoproteinen v. a. von LDL durch die Endothelschicht, die sich dann lokal in der Intima ansammeln, wo das LDL chemisch modifiziert wird.^{6,7} Der zweite Schritt in der Entwicklung der Atherosklerose ist die Bildung der so genannten Fettstriche „fatty streaks“- ein Prozess, der durch die Leukozytenrekrutierung v. a. die von Monozyten und Lymphozyten gekennzeichnet ist und auch in jungen Leuten zu beobachten ist. Dies geschieht über eine Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der Endothelzellen, wie z. B. P-Selektin, intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) und vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). Eingewandert in die Intimaregion differenzieren sich die Monozyten zu Makrophagen und werden von Lipoproteinpartikeln schließlich in lipidbeladene Schaumzellen umgewandelt.

Die Phagozyten setzen Zytokine frei, die die Proliferation von glatten Muskelzellen (smooth muscle cells, SMCs) und die Produktion von extrazellulärer Matrix stimulieren.⁷ Bei der weiteren Entwicklung der Läsion kommt es zum Absterben von Schaumzellen, wodurch der lipidreiche nekrotische Kern entsteht.⁷

Diese Erscheinungen führen über einen längeren Zeitraum von Jahrzehnten zur Bildung von atherosklerotischen Plaques.

1. 2. Akzelerierte Arteriosklerose

Die akzelerierte Arteriosklerose wird durch eine akute oder subakute Gefäßverletzung verursacht, die durch eine endotheliale Denudation mit oder ohne Mediaverletzung charakterisiert ist (siehe Tabelle 1).⁵ Durch die intimale Ansammlung von SMCs und Leukozyten kommt es zur Ausbildung einer Neointima, die zu einer vaskulären Stenosierung führen kann.

Tabelle 1: Unterschiede zwischen der nativen Atherosklerose und der akzelerierten Arteriosklerose

| | native Atherosklerose | akzelerierte Arteriosklerose |
|--------------|---|--|
| Verletzung | Endotheliale Dysfunktion | Endotheliale Denudation ± Mediaverletzung |
| Thrombozyten | + | +++ |
| Monozyten | +++ | + |
| SMCs | + | +++ |
| Frühphase | Lipidablagerung, Monozyteninfiltration | Thrombozytenadhäsion, neointimale SMCs |
| Verlauf | Jahrzehnte | Monate bis wenige Jahre |

Die akzelerierte Arteriosklerose findet man am häufigsten bei der erneuten Verengung nach einer perkutanen Intervention und bei der Vaskulopathie nach Herztransplantation. Die perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA) oder Stentimplantation sind die Methoden zur Behandlung von chronisch stenosierte Koronargefäßen und akuten thrombotischen Verschlüssen.^{5,8} Hierbei wird unter Röntgenkontrolle ein Katheter an die betroffene Stelle vorgeschoben. Der verwendete Katheter besitzt an der Spitze einen länglichen Ballon, der mit Überdruck aufgeblasen werden kann. Anschließend wird eine Gefäßstütze aus Metall (Stent) implantiert. Die häufigste Komplikation dieses Verfahrens stellt die erneute Verengung (Rezidiv- oder Restenose) der aufgedehnten Arterie nach einer perkutanen Intervention dar.^{9,10} Die Restenose wird als überschießender Wundheilungsprozess der Arterienwand und als Reaktion auf die mechanische Verletzung aufgefasst.¹¹ Zwei wesentliche Faktoren führen bei der Restenose zur Lumenreduktion: die Neointimabildung und das negative Gefäßremodeling.^{4,12} Im Durchschnitt beträgt die Rate an angiographisch nachweisbaren Restenosen nach Angioplastie ca. 50%. Etwa die Hälfte der Patienten mit angiographisch gesicherter Restenose entwickeln auch klinische Zeichen der Minderperfusion, wodurch eine erneute Revaskularisation des entsprechenden Blutgefäßes notwendig wird.⁹

Während das negative Remodeling der arteriellen Gefäßwand nach PTCA für einen Großteil des Lumenverlustes verantwortlich ist, sind über 90% des Lumenverlustes nach Stentimplantation auf die Neointimabildung zurückzuführen.^{13,14} Histologisch besteht die humane Neointima überwiegend aus SMCs, Makrophagen und extrazellulärer Matrix.¹⁵

1. 2. 1. Restenose und Neointimabildung

Die zelluläre Reaktion auf eine mechanische Gefäßschädigung, die zur Neointimabildung führt, lässt sich in vier Phasen unterteilen:¹⁶

1. Die mechanische Phase, die durch frühes elastisches Zurückspringen als Folge der mechanischen Ausdehnung des Gefäßes gekennzeichnet ist.
2. Die thrombotische Phase, während der es zu Thromben infolge lokaler Blutungen und Thrombose kommt.

3. Die proliferative Phase, bei der die neointimale Hyperplasie stattfindet, aufgrund der Proliferation und Migration der medialen und intimalen vaskulären SMCs (VSMCs) nach der Verletzung.

4. Die Phase des Remodelings, eine pathologische Anpassung, die eine chronische und schrittweise Umwandlung des Zell- und Proteingehalts in der Media und Adventitia beinhaltet. Zusätzlich kommt es zu einem erhöhten Umsatz an extrazellulären Matrixproteinen und zu einer Veränderung des Phänotyps der VSMCs zu einem mehr synthetisierenden Typ.

Durch das Aufdehnen und die Stentimplantation kommt es an der Stelle der Stenose einerseits zu einer Kompression der atherosklerotischen Plaque und zur Dehnung der Gefäßwand, aber auch zu Einrissen der Plaque und der inneren Gefäßwand. Diese Verletzung und die Anwesenheit eines metallischen Fremdkörpers im Gefäß führen zur Auslösung verschiedener Prozesse. An erster Stelle ist die Exposition thrombogener Faktoren wie Kollagen oder Gewebefaktoren, welche in der frühen Phase zur Thrombozytenaggregation und einer Ansammlung von Fibrin und Erythrozyten führen.^{15,17} Charakteristisch für die akute Frühphase nach Gefäßverletzung ist außerdem eine sehr hohe Rate der Apoptose von medialen SMCs.¹⁸ Danach folgt eine massive Infiltration von Entzündungszellen (neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten) und eine Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen wie fibroblast growth factor (FGF), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor- β (TGF- β) aus Makrophagen, Thrombozyten, Endothelzellen, SMCs und Fibroblasten, die zur Aktivierung und Proliferation von SMCs führen.^{19,20} PDGF wird in den Thrombozyten gespeichert und bei deren Aktivierung freigesetzt. PDGF stimuliert die Zellteilung und die Migration SMCs *in vitro*.²¹ Ferner führte die Inhibierung von PDGF durch einen blockierenden Antikörper zu einer Reduktion der Neointimabildung.²² Neben PDGF setzen aktivierte Thrombozyten noch andere Wachstumsfaktoren frei, wie den epidermal growth factor (EGF) und Thrombin, welche auf SMCs mitogen wirken.¹⁶ Zur Antwort einer Verletzung durch Stent oder PTCA gehört auch eine Hyperproliferation von SMCs⁵ und die gesteigerte Produktion von Matrixmetalloproteinasen (MMPs), die zur Reorganisation der extrazellulären Matrix beitragen.

Verschiedene Studien ergaben Hinweise dafür, dass eine intimale Entzündungsreaktion in der Pathophysiologie der Restenose nach Stentimplantation eine Rolle spielt. Auch an menschlicher Neointima konnte die Infiltration mit inflammatorischen Zellen nachgewiesen

werden. So wird eine frühe Infiltration mit neutrophilen Granulozyten beschrieben, die sich aber innerhalb der ersten Tage nach dem Eingriff zurückbildet.²³ Im Gegensatz dazu lässt sich eine Infiltration mit chronisch inflammatorischen Zellen, wie Lymphozyten und Makrophagen, sowohl in der Frühphase als auch nach mehr als 6 Monaten nach Stentimplantation beobachten.²⁴ Die Intensität der Gefäßverletzung und die dadurch induzierten Entzündungsreaktion korreliert mit der Dicke der Neointima.²⁴ Es wurde gezeigt, dass die Verletzung der Media durch die Stentimplantation und das Durchdringen des Lipidkerns des atherosklerotischen Plaques eine chronische Entzündungsreaktion (eine starke Infiltration mit Entzündungszellen) auslöst, die mit einer gesteigerten Neointimabildung und einer höheren Restenoserate assoziiert ist.²⁵ Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass die durch die Gefäßverletzung induzierte Entzündungsreaktion eine entscheidende Rolle bei der Neointimabildung spielt.

1. 2. 2. Herkunft der neointimalen SMCs

Bisher ging man von der Hypothese aus, dass die neointimalen SMCs, sowohl bei der nativen Atherosklerose als auch bei der akzelerierten Arteriosklerose, ausschließlich lokal aus der Media der Arterienwand einwandern und in der Intima proliferieren.²⁶ Inzwischen haben mehrere Studien an Tiermodellen und am Menschen gezeigt, dass ein großer Teil der intimalen SMCs aus einem adulten Stammzellpool des Knochenmarks stammt und diese permanent als Vorläuferzellen von SMCs (smooth muscle progenitor cells, SPCs) im peripheren Blut zirkulieren.²⁷⁻³⁰ Durch eine Herz- bzw. Aortentransplantation in Empfängertiere, die auch eine Knochenmarkstransplantation mit β -Galactosidase oder grün fluoreszierendem Protein- (GFP)-exprimierenden Zellen bekommen haben, gelang der Nachweis, dass die vom Empfängertier-stammenden neointimalen SMCs aus dem Knochenmark kommen.^{27,31}

In einer weiteren Studie wurden Wildtyp-Mäuse mit β -Galactosidase exprimierenden Knochenmarkszellen transplantiert und eine Drahtverletzung der A. femoralis durchgeführt. Die Neointima bestand zu 63% und die Media zu 45% aus β -Galactosidase-positiven Zellen, von denen ein Teil den Marker für SMCs α -smooth muscle actin (α -SMA) und ein Teil den

Endothelzellmarker CD31 exprimierten.²⁷ Um den genauen Ursprung der SPCs zu bestimmen wurden aus dem heterogenen Knochenmark β -Galactosidase-positive spezifisch hämatopoetische Stammzellen ($c\text{-Kit}^+\text{Sca-1}^+/\text{lin}^-$, $c\text{-Kit}$ -Rezeptor für den Stammzelleffektor; Sca-1-Stammzellenmarker; lineage-hämatopoetischer Marker) isoliert und nur diese Zellen den bestrahlten Mäusen transplantiert. Nach Drahtverletzung der A. femoralis bestand die Neointima zu 43% aus β -Galactosidase-exprimierenden Zellen, von denen wiederum 73% auch α -SMA exprimierten.²⁷ In vitro differenzierten sich diese $c\text{-Kit}^+\text{Sca-1}^+/\text{lin}^-$ Zellen in Kokultur mit vaskulären SMCs ebenfalls zu SMC-ähnlichen Zellen.²⁷ Ferner konnte gezeigt werden, dass Stammzellen $c\text{-Kit}^+\text{Sca-1}^+/\text{lin}^-$ Zellen aus dem peripheren Blut, die kurz nach endothelialer Denudation der A. carotis communis (CCA) in ApoE^{-/-} Mäuse injiziert wurden, in die verletzte Gefäßregion rekrutiert werden und dort in SMC-ähnliche Zellen mit α -SMA und smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC) Expression differenzieren.³² Einen Einfluss auf die Rekrutierung von SPCs aus dem Knochenmark scheint auch das verwendete Modell der mechanischen Gefäßverletzung zu haben. Die von Tanaka et al. publizierten Befunde legen die Vermutung nahe, dass die neointimale Rekrutierung der Knochenmarkszellen bei Drahtverletzung deutlicher zu beobachten ist als nach periarterieller Cuff-Anlage oder Ligation.^{33,34} So dass die Schwere der Verletzung mit dem Ausmaß der SPC Rekrutierung zu korrelieren scheint. Dies könnte darauf hindeuten, dass bei einer extensiven Verletzung die ortsansässigen VSMCs für eine Reparatur nicht ausreichen, weswegen zirkulierende SPCs von anderen Quellen benötigt werden.³⁵

Außer bei den verschiedenen Formen der akzelerierten Arteriosklerose, wurde auch bei der chronisch verlaufenden nativen Atherosklerose die Herkunft der SMCs in den Plaques untersucht. In ApoE^{-/-} Mäusen nach Knochenmarkstransplantation waren unter einer 8-wöchigen cholesterinreichen Diät atherosklerotische Läsionen mit SMCs entstanden, die zu etwa 50% aus dem Knochenmark stammten.²⁷ In atherosklerotischen Läsionen der Koronararterien von Patienten nach Knochenmarkstransplantation, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass ein signifikanter Anteil der SMCs aus dem Knochenmark stammt.²⁹

Von zentraler Bedeutung bei der SPC-vermittelten vaskulären Wundheilung ist die Frage durch welche Signale die Mobilisierung und Rekrutierung in die verletzte Gefäßwand gesteuert wird. In diesem Zusammenhang haben das CXC Chemokin stromal cell-derived factor (SDF)-1 α und dessen Rezeptor CXCR4 eine wichtige Funktion.³²

1. 2. 3. Rolle der SDF-1 α /CXCR4 Achse bei der Neointimabildung

Stromal cell-derived factor (SDF)-1 α gehört zur Familie der Chemokine. Die Chemokine stellen eine Untergruppe der Zytokine dar, deren Name sich aus „Chemotaktische Zytokine“ zusammensetzt.³⁶ Anhand ihrer Cysteinreste lässt sich die Gruppe der Chemokine in vier Subfamilien unterteilen. Diese Einteilung basiert auf Sequenzhomologien und der Anzahl und Lage der aminoterminalen Cysteinreste: CXC (α)-, CC (β)-, C (γ)- und CX₃C (δ)-Chemokine.³⁷ Während die CXC-, CC- und CX₃C-Chemokine alle vier Cysteinreste aufweisen, besitzen die C-Chemokine nur zwei Cysteine. Bei den C-C Chemokinen liegen die ersten beiden Cysteinreste direkt nebeneinander, während die Cysteinreste der C-X-C Chemokine durch eine andere Aminosäure getrennt werden.³⁷

Alle Chemokine besitzen ähnliche Aminosäuresequenzen und ihre Rezeptoren sind sämtlich integrale G-Protein-gekoppelte Membranproteine mit sieben transmembranen Domänen.^{38,39} Lange Zeit war nur CXCR4 als SDF-1 α Rezeptor bekannt, der wiederum als einziger Chemokinrezeptor mit SDF-1 α nur einen Liganden besitzt.⁴⁰ Inzwischen ist mit CXCR7/RDC1/Cmkor 1 ein weiterer Rezeptor für SDF-1 α beschrieben worden^{41,42}, dessen Funktion allerdings noch nicht genau geklärt ist.

Chemokine steuern die Migration und das „homing“ von Leukozyten während der Homöostase und bei inflammatorischen Prozessen. Der chemotaktische Effekt der Chemokine auf Leukozyten bewirkt nicht nur eine Veränderung des Zytoskeletts der Leukozyten, sondern induziert in ihnen auch die Expression und Aktivierung von Integrinen, die es ermöglichen, an das Blutgefäßendothel zu adhären.⁴³

Auf molekularer Ebene spielen die Chemokine eine wesentliche Rolle bei dem adaptiven vaskulären Remodeling, indem sie die Rekrutierung von mononukleären Zellen in die verletzte Region und die Aktivierung von residenten VSMCs steuern.^{44,45}

Das CXC Chemokin stromal cell-derived factor (SDF)-1 α (auch CXCL12) ist wesentlich an der Homöostase von Stammzellen im Knochenmark und der embryonalen Arteriogenese beteiligt. SDF-1 α wird in atherosklerotischen Plaques und in neointimalen Läsionen nach Gefäßverletzung gesteigert exprimiert und spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Mobilisierung und lokalen Rekrutierung von SPCs.^{32,46,47} Durch eine mechanische Gefäßverletzung im Tiermodell wird die SDF-1 α Expression, abhängig vom Schweregrad der Verletzung, in medialen SMCs gesteigert.^{32,33} Zusätzlich gibt es Hinweise dafür, dass die

gesteigerte Expression von SDF-1, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) und vascular endothelial growth factor (VEGF) in der Gefäßwand mit der SPC Rekrutierung korreliert.³³

Einen Tag nach Gefäßverletzung kommt es zu einem transienten Anstieg der Plasmakonzentration von SDF-1 α , wodurch der SDF-1 α -Gradient zwischen Knochenmark und der Zirkulation verändert wird. Dadurch werden die SPCs in der Zirkulation mobilisiert.³² Diese SPCs werden durch SDF-1 α in die verletzte Gefäßwand rekrutiert und tragen dadurch zur Neointimabildung bei. Bei der Transplantatvaskulopathie konnte ebenfalls eine gesteigerte SDF-1 α Expression sowohl im Tiermodell als auch in Patienten nach Herztransplantation nachgewiesen werden.^{48,49} Eine Hemmung von SDF-1 α durch blockierende Antikörper bzw. eine Deletion des SDF-1 α Rezeptors CXCR4 in Knochenmarkszellen inhibierte die neointimale Hyperplasie und die Rekrutierung von SPCs im Restenosemodell und bei der Transplantatvaskulopathie.^{32,46,48}

Die transkriptionelle Regulation der gesteigerten neointimalen SDF-1 α Expression ist bislang unklar. Als wichtiges Bindeglied zwischen der Gefäßverletzung und der SDF-1 α -vermittelten SPCs Rekrutierung und Mobilisierung wurde die Apoptose der medialen SMCs unmittelbar nach der Verletzung identifiziert. So konnte gezeigt werden, dass die SPC-vermittelte Wundheilung von der SDF-1 α /CXCR4 Achse durch die Apoptose nach Gefäßverletzung induziert wird.⁴⁶ Ferner geht die Hemmung der Caspaseaktivität mit einer verminderten SDF-1 α Expression einher.⁴⁶ Die apoptotischen SMCs setzen apoptotische Mikrovesikel („apoptotic bodies“) frei, die die Sekretion von SDF-1 α aus unverletzten medialen Zellen *in vitro* induziert.⁴⁶ Ferner ist es bekannt, dass SDF-1 α Expression nach Gefäßverletzung, wo die Apoptose am meisten stattfindet, gesteigert ist im Vergleich zur Karotidenligatur oder Cuff-Anlage.³³

1. 2. 3. 1. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α

Im Ischämiemodell wird die SDF-1 α Expression und damit die Rekrutierung von Vorläuferzellen durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α und dessen Interaktion mit Bindungsstellen im SDF-1 α Promoter gesteuert.⁵⁰

HIF-1 ist ein sauerstoffregulierter Transkriptionsfaktor, der in den meisten kernhaltigen Zellen als Antwort auf Hypoxie induziert wird und eine wichtige Rolle in der Angiogenese und der Adaption von Zellen, Geweben und Organismen an Hypoxie spielt.^{51,52} HIF-1 gehört zur Familie der basic helix-loop-helix-Per/ARNT/Sim (PAS)-Proteine und bildet ein Heterodimer aus einer HIF-1 α - und einer HIF-1 β -Untereinheit.⁵³⁻⁵⁵ HIF-1 β wird konstitutiv exprimiert, unabhängig von der Sauerstoffversorgung.⁵⁶ Auch die α -Untereinheit von HIF-1 wird konstitutiv transkribiert und translatiert, unter normoxischen Bedingungen aber an zwei Prolinresten hydroxyliert und nach Bindung an Ubiquitin durch Proteasome abgebaut.^{51,52} Im Gegensatz dazu wird HIF-1 α unter hypoxischen Bedingungen durch die fehlende Hydroxylierung stabilisiert und vermindert abgebaut.⁵⁷ Die HIF-1 α -Untereinheit wird aus dem Zytoplasma in den Nukleus transportiert und bildet ein Heterodimer mit der HIF-1 β -Untereinheit.^{51,52,57} Der Transkriptionsfaktor bindet an hypoxia responsive elements (HREs), die Erkennungssequenz für HIF-1, die sich in den Promoterregionen von hypoxieinduzierbaren Genen befinden.⁵⁸ Nicht-hypoxische Stimuli induzieren entweder die HIF-1 α Gentranskription durch Stimulierung des diacylglycerol-sensitive Proteinkinase C (PKC)-Signalweges^{59,57} oder die HIF-1 Translation durch die Aktivierung des Phosphoinositol 3-Kinase (PI3K)/mTOR-Signalweges.^{59,57,60} In beiden Fällen erhöht sich die HIF-1 Proteinmenge und dadurch die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 α .⁶¹

Da die Aktivität von HIF-1 α jedoch nicht nur durch Hypoxie, sondern auch durch Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Sauerstoffradikale gesteigert wird⁶¹, könnte HIF-1 α auch für die neointimale SDF-1 α Expression nach Gefäßverletzung verantwortlich sein. In SMCs kommt es z. B. durch eine Behandlung mit Thrombin, PDGF, TGF- β oder Angiotensin II zu einer Aktivitätssteigerung und vermehrten mRNA Expression von HIF-1 α .^{59,62} Auch proinflammatorische Mediatoren, wie z. B. der Transkriptionsfaktor nuclear factor- κ B (NF- κ B), verstärken im Rahmen der Wundheilung die HIF-1 α Aktivierung.^{63,64}

1. 2. 4. Lysophosphatidsäuren (LPAs) als neuer Mediator der Neointimabildung

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass vor allem die mehrfach ungesättigten Derivate der Lysophosphatidsäure (LPA), eine entscheidende Rolle bei der Neointimabildung spielen.^{65,66} Nach Inkubation der unverletzten CCAs im Rattenmodell mit ungesättigten LPA-Derivaten, wie LPA 20:4 oder dem Acyl-Derivat AGP 18:1, kommt es innerhalb von wenigen Wochen zu einer neointimalen Hyperplasie.⁶⁵ Dagegen hatten gesättigte LPA Derivate, wie LPA 18:0, keinen Effekt auf die Gefäßwand.⁶⁶

LPA-Derivate wurden als biologisch aktive Phospholipide unter anderem in den „mildly-oxidized“ LDL, in den menschlichen atherosklerotischen Läsionen und im Überstand von aktivierten Thrombozyten nachgewiesen.⁶⁷ Es ist bekannt, dass LPA-Derivate sowohl prothrombotische als auch atherogene Eigenschaften besitzen⁶⁷ und dass ungesättigte LPAs die Differenzierung von vaskulären SMCs beeinflussen.⁶⁸

Da ungesättigte LPAs die Expression von SDF-1 α und HIF-1 α in verschiedenen Zelllinien induzieren^{69,70} und die Mikrovesikel aus aktivierten Thrombozyten oder apoptotischen SMCs nach Gefäßverletzung Vorstufen für LPAs zur Verfügung stellen⁷¹, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die ungesättigten LPAs durch eine Aktivierung von HIF-1 α an den SDF-1 α -abhängige Neointimabildung und SPC Rekrutierung beteiligt sind.

1. 2. 5. Therapeutische Optionen zur gezielten Hemmung der Neointimabildung über die SDF-1 α /CXCR4 Achse

Die bisher einzige erfolgreiche Therapie zur Reduktion der Restenose konnte durch die Implantation beschichteten Medikamente-freisetzende Stents erreicht werden, die das Risiko der Restenose reduziert.¹⁰ Bei den derzeit gebräuchlichsten Typen wird ein in einer Polymer-Beschichtung gebundener Wirkstoff kontinuierlich vom Stent am Ort der Gefäßverletzung über Wochen freigesetzt. In der klinischen Praxis werden häufig zwei Substanzen zur Stentbeschichtung verwendet: Rapamycin (Sirolimus) und Paclitaxel.^{72,73} Das Einbringen eines Stents hat den Vorteil, dass dadurch die frühen elastischen Rückstellkräfte und das negative Remodeling verhindert werden. Die Stents sind aber nicht risikolos. Sie haben den

Nachteil, dass der Stent einen Fremdkörper darstellt, der einen zusätzlichen Wachstumsreiz auslöst und sich dadurch die Neointima verstärkt ausbildet.⁷⁴ Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass die Einführung der Stents eine verzögerte Reendothelisierung und ein erhöhtes Risiko für spät auftretende Stent-Thrombosen zur Folge haben kann.^{75,76} Darüber hinaus könnten neue effektive Medikamente für die Prophylaxe der Restenose, die selektiv die Akkumulation von neointimalen SMCs hemmen, eine therapeutische Alternative darstellen. Ein möglicher Bestandteil einer solchen Therapie könnte das CXC Chemokin stromal cell-derived factor SDF-1 α und sein Rezeptor CXCR4 darstellen bzw. Substanzen, die die SDF-1 α Expression steuern, die die Mobilisierung und die Rekrutierung von SPCs nach Gefäßverletzung kontrollieren.³²

1. 3. Fragestellung

Als zentrales Signalmolekül wurde die SDF-1 α /CXCR4 Achse bei der Entstehung der neointimalen Hyperplasie durch die Mobilisierung und dem lokalen „homing“ von Vorläuferzellen von SMCs (SPCs) identifiziert. Über die molekulare Regulation der SDF-1 α /CXCR4 Achse ist allerdings wenig bekannt. Eine wichtige Rolle könnte der Transkriptionsfaktor HIF-1 α dabei spielen. Angesichts der Tatsache, dass die Aktivität von HIF-1 α nicht nur durch Hypoxie, sondern auch durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und andere nicht-hypoxischen Stimuli induziert wird, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die HIF-1 α Expression nach der Gefäßverletzung sowohl auf Protein- als auch auf transkriptioneller Ebene gesteigert wird und welchen Effekt eine HIF-1 α Aktivierung auf die Neointimabildung hat. Ferner sollte der molekulare Mechanismus einer HIF-1 α -vermittelten Neointimabildung ermittelt werden. Nach Aktivierung bindet HIF-1 α an spezifische Promotersequenzen (HRE) und führt zu einer gesteigerten Expression von HIF-1 α -abhängigen Genen (wie z. B. SDF-1 α). Da der SDF-1 α Promoter HRE-Sequenzen enthält und HIF-1 α unter Hypoxie entscheidend für die Induktion von SDF-1 α verantwortlich ist, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob HIF-1 α auch nach Gefäßverletzung die SDF-1 α Expression und damit eine neointimale Hyperplasie induziert. Ferner ist bekannt, dass die Apoptose der SMCs nach Gefäßverletzung wesentlich für die gesteigerte SDF-1 α Expression in der Gefäßwand verantwortlich ist. Die apoptotischen medialen SMCs setzen Mikovesikel

(„apoptotic bodies“) frei, die nicht nur die SDF-1 α Expression induzieren, sondern auch als Quelle für Vorstufen von Lysophosphatidsäuren (LPAs) dienen können. Des Weiteren steigern ungesättigte Lysophosphatidsäuren die SDF-1 α und HIF-1 α Expression und können nach kurzfristiger lokaler Inkubation von unverletzten Arterien eine Neointima durch Akkumulation von SMCs induzieren. Es sollte deshalb in dieser Arbeit die Frage beantwortet werden, ob LPA über G-Protein gekoppelte LPA-Rezeptoren an der HIF-1 α -vermittelten SDF-1 α Expression und damit an der Neointimabildung beteiligt ist.

2. Material und Methoden

2. 1. Chemikalien

Acrylamid Bisacrylamid, AppliChem

Albumin aus Rinderserum, (Bovine Serum Albumine, BSA), Sigma

Alcianblau 86 X, Sigma

Ammoniumhydroxid, Sigma

Ammoniumpersulfat, Sigma

Aprotinin, Sigma

Atipamezol Hydrochlorid (Antisedan[®]), Pfizer GmbH

Augensalbe (Bepanthen[®] Augen- und Nasensalbe), Roche Consumer Health GmbH

Brillant Crocein Scarlet, Sigma

Bromphenolblau Natrium-Salz, Serva

Calciumchlorid, Sigma

Chymostatin, Sigma

CXCR4 Antagonist (POL 5551), Polyphor

Diethyl-Pyrocarbonat (DEPC), Sigma

Dimethyl-Sulfoxid (DMSO), Sigma

Dinatriumhydrogenphosphat, VWR

Dithio-treitol (DTT), Sigma

Eindeckelmedium (Vecta Mount AQ Mounting Medium), Vector Laboratories

Eindeckelmedium, DAPI-gekoppelt (Vectashield[®] Hard Set[™] Mounting Medium with DAPI), Vector Laboratories

Eisenchlorid Hexahydrat, Sigma

Essigsäure 100%, Merck GmbH

Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA), Sigma

Fluorescein Streptavidin (FITC- Fluorescein-Isothiocyanat), Vector Laboratories

Glycerin, Sigma

Glycin, Sigma

Hämalaunlösung (nach P.Mayer, Romes § 648)

Hämatoxylin, Sigma

Hämolysepuffer (BD FACS™ Lysing Solution), Becton Dickinson GmbH

HIF-1 α siRNA (Custom siRNA, siSTABLEv2, Processing Option A4), Dharmacon

Hydroxyethyl-piperazinyl-ethansulfonsäure (HEPES), Sigma

Iod, Sigma

Kaliumchlorid, Roth GmbH

Kaliumhydrogenphosphat, Roth GmbH

Kaliumiodid, Sigma

Kanadabalsam, Roth GmbH

Kaninchenserum, Serotec GmbH

Ketamin Hydrochlorid (Ketavet®), Pharmacia & Upjohn

Ki16425, Sigma

Kontroll siRNA (Custom siRNA, siSTABLEv2, Processing Option A), Dharmacon

Lamin A/C siRNA (Maus siGLO® Lamin A/C siRNA), Dharmacon

Leupeptin, Sigma

LPA Derivate 20:4 (1-Arachidonoyl-2-Hydroxy-sn-Glycero-3-Phosphate), Avanti Polar Lipids

Magermilchpulver, Sigma

Magnesiumchlorid, Sigma

Medetomidin Hydrochlorid (Domitor®), Pfizer GmbH

Methanol, Merck GmbH

Molekulargewichtsstandard (PageRuler™), Fermentas

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED), Sigma

Natriumchlorid, Sigma

Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS), Sigma

Natriumfluorid, Sigma

Natriumhydroxid, Sigma

Natriumorthovanadate, Sigma

n-Butanol, Sigma

NP-40, Calbichem GmbH

Octoxinol-9 (Triton-100), Roth GmbH

Orcein, Merck GmbH

Paraformaldehyd, Roth GmbH

Pepstatin, Sigma

Pferdeserum, Vector Laboratories

Phosphorwolframsäure Hydrat, Sigma

Pluronic F-127, Sigma

Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat (Tween 20), VWR

Ponceau S, Merck GmbH

Proteinase K, Sigma

RNA Stabilisierungslösung (RNAlater RNA stabilization reagent), Qiagen GmbH

Saffron du Gatinais, Sigma

Salzsäure, Sigma

Säurefuchsin, Sigma

Schafserum, Serotec GmbH

β -Mercaptoethanol, Sigma

Transfektionsreagent (DharmaFECTTM), Dharmacon Trypsin/EDTA Lösung, Biochrom AG

Tri-natriumcitrat, Roth GmbH

Tris (hydroxymethyl) aminomethan, Sigma

Tris Hydrochlorid, Serotec GmbH

Trypsin, Sigma

Wasserstoffperoxid 3%, Sigma

2. 2. Antikörper

Polyklonaler Antikörper Kaninchen anti-HIF-1 α , Novus Biologicals

Monoklonaler Antikörper Human/Maus anti-CXCL12/SDF-1, R&D

Monoklonaler Antikörper Maus anti-Human Smooth Muscle Actin (SMA), Dako Cytomation GmbH

Polyklonaler Antikörper Ziege anti-Myocardin, Santa Cruz

Monoklonaler Antikörper Ratte anti-Maus anti-CD184 (CXCR4), Becton Dickinson Pharmingen GmbH

Monoklonaler Antikörper Maus anti-Mac-2, Cederlane Laboratories

Polyklonaler Antikörper Kaninchen anti-HIF-1 α , Santa Cruz,

Monoklonaler Antikörper Maus IgG1 anti-Lamin A/C, Upstate GmbH

Monoklonaler Antikörper Maus anti-GAPDH, Chemicon

Schaf anti-Kaninchen IgG-biotingekoppelt, Serotec GmbH

Polyklonaler Kaninchen anti-Maus Igs-TRITC-gekoppelt, Dako Cytomation GmbH

Kaninchen anti-Ziege IgG-biotingekoppelt, Santa Cruz

Kaninchen anti-Ratte IgG-biotingekoppelt, Vector Laboratories

Ziege anti-Kaninchen IgG, peroxidasegekoppelt, Calbiochem GmbH

Anti-Maus/anti-Kaninchen Ig, Peroxidase Mikropolymergekoppelt (ImmPRESS™), Vector Laboratories

anti-Maus Ly-6A/E (Sca-1), Phycoerythrin-gekoppelt, Becton Dickinson Pharmingen GmbH

anti-Maus CD11b (Mac-1), biotingekoppelt, Becton Dickinson Pharmingen GmbH

anti-Maus CD45R/B220, biotingekoppelt, Becton Dickinson Pharmingen GmbH

anti-Maus Ly-6G (Gr-1), biotingekoppelt, Becton Dickinson Pharmingen GmbH

anti-Maus TER-119/Ly-76, biotingekoppelt, Becton Dickinson Pharmingen GmbH

anti-Maus CD3e (CD ϵ), biotingekoppelt, Becton Dickinson Pharmingen GmbH

2. 3. Geräte

Brutschrank (Regler RD2), WTB Binder

Digitalkamera (KY-F75U, C-Mount), JVC

Durchflußzytometer (FACSCalibur™), Becton Dickinson GmbH

Durchlicht-Mikroskop (Leica DMRBE), Leica

Einbettautomat (Shandon Pathcentre®), Thermo Electron GmbH

Elektrophoresekammer (Hoefler Electrophoresis Unit, SE600 Series), Amersham Pharmacia Biotech

Gießform, Amersham Biosciences (SF) Corp.

Kühlzentrifuge (Mikro200R), Hettichlab

Netzgerät, Biometra Standard Power Pack 25

Paraffinspendeautomat (Microm EC 350 Paraffin Embedding Center), Microm International GmbH

PCR System (GeneAmp® PCR System 9700 thermal cycler), Applied Biosystems

Photometer (Sunrise-basic Tecan), Tecan GmbH
Rotationsmikrotom (Microm HM 340E), Microm International GmbH
Stereo Mikroskop (KL 1500 LCD), Carl Zeiss
Thermoplatte (Ttempcontrol 37 analog), Carl Zeiss
Thermoschüttler (Thermomixer comfort), Eppendorf
Waage (Adventurer™ Balances), Ohaus GmbH
Watt-Mikrowelle (Severin 700), Severin

2. 4. Verbrauchsmaterial

Augenschere (Nachstarschere Vannas, 85mm), Aesculap
Einbettkassetten, Sanowa Laborprodukte GmbH
Filter (110mm), Sartorius Biotech GmbH
Filterpapier, Schleicher & Schnell BioScience
Führungsdraht, Boston Scientific
Heparinisierte Einmal-Kapillarpipetten, Hirschmann Laborgeräte GmbH
Katheter (rat intrathecal catheter), Alzet
Pistill, Kontes Glass Company, New Jersey
Polyvinylindendifluorid (PVDF)-Membran, Peqlab Biotechnologie GmbH
Silanisierte Objektträger (SuperFrost Plus®), Menzel Gläser
Wundklammern (Michel Wundklammern 7,5 x 1,75 mm), Aesculap
Chirurgischer Faden (Seraflex EP2, (3/0), Serag Wiessner
Mikropinzette (Uhrmacher Typ, 0,2 mm, gebogen), Aesculap
Polyethylen-Schlauch (0,28 x 0,16 mm), VWR
Sterile Filter (Porengröße 0,20 µm, Minisart), Sartorius Biotech GmbH

2. 5. Verwendete Kits

cDNA-Synthese-Kit (Super ScriptTM III-First Stand Synthesis system for RT-PCR), Invitrogen
Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-(DAB) Substrate Kit for Peroxidase, Vector Laboratories
ECL (enhanced chemiluminescence) Detektion-Kit, Amersham, Pharmacia
Nicht-markierte HIF-1 α Primers und Fluoreszenz-markierte HIF-1 α Probe (TaqMan[®] MGB
FAMTM dye-labeled, Assay-on-DemandTM Gene Expression), Applied Biosystems
PCR-Master Mix (AmpliTaq Gold[®] DNA polymerase im TaqMan[®] Universal PCR Master
Mix), Applied Biosystems
Protein Assay (Bio-Rad Dc protein assay), Bio-Rad Laboratories
Qproteome FFPE Tissue Kit, Qiagen, GmbH
RNA-Isolierung-Kit (RNeasy[®] Mini Kit), Qiagen GmbH

2. 6. Lösungen

10 mM PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung) (pH=7,0-7,6):

7,4 g Dinatriumhydrogenphosphat
36 g Natriumchlorid
2,1 g Kaliumhydrogenphosphat
5000 ml Aqua dest.

siRNA Gentransfer:

Transfektionsmix:

5 nmol (100 μ mol/L) HIF-1 α siRNA (siSTABLEv2)/7 nmol (140 μ mol/L) Lamin
A/C siRNA/„non-targeting“ siRNA (siSTABLEv2)
1 x siRNA Puffer
1:50 siRNA Transfektionsreagent DharmaFECT 4

Probengewinnung:

4% Paraformaldehyd-Lösung (pH=7,4 - 8,0):

16 g Paraformaldehyd

200 ml Aqua dest.

Leicht aufwärmen und ca. 6 ml Natriumhydroxid zum Auflösen dazugeben,
pH=7,4-8,0 Wert Einstellung mit Salzsäure

200 ml zweifach PBS

Filtrieren

Immunhistochemie und Immunfluoreszenz:

10 mM Citratpuffer 0,05% Tween 20 (pH=6):

2,94 g Tri-natriumcitrat

2000 ml Aqua dest.

pH=6 Wert Einstellung mit Salzsäure

0,5 ml Tween 20

0,3% Trypsinauflösungspuffer (pH=7,8):

8,76 g Natriumchlorid

6,05 g Tris Hydrochlorid

0,1% Calciumchlorid

pH Wert mit Salzsäure einstellen

0,3% Trypsin

0,1% Proteinase K Auflösungspuffer:

0,1 g Proteinase K

100 ml Aqua dest.

Histomorphometrie:

3%-ige Essigsäure:

97 ml Aqua dest.

3 ml Essigsäure 100%

1%-ige Essigsäure:

99 ml Aqua dest.
1 ml Essigsäure 100%

Alcianblau-Lösung:

1 g Alcianblau
100 ml Aqua dest
1 ml Essigsäure 100 %

Verhoeff's-Färbelösung:

Stammlösung A:

2 g Hämatoxylin
100 ml Ethanol

Stammlösung B:

2 g Eisenchlorid Hexahydrat
100 ml Aqua dest.

Stammlösung C (Lugol'sche-Lösung):

4 g Kaliumiodid
2 g Iod
100 ml Aqua dest.

Gebrauchslösung: 3 : 2 : 1 mischen

Brilliant Crocein-Säurefuchsin Lösung:

80 ml Stammlsg. A
20 ml Stammlsg. B
Stammlösung A:
0,1g Brilliant Crocein Scarlet
99,5 ml Aqua dest
0,5 ml Essigsäure 100 %

Stammlösung B:

0,1g Säurefuchsin
99,5 ml Aqua dest.
0,5 ml Essigsäure 100 %

2 % Phosphorwolframsäure-Lösung:

2,4 g Phosphorwolframsäure Hydrat
97,6 ml Aqua dest.

Saffron du Gatinais Lösung:

3 g Saffron du Gatinais
100 ml Ethanol 99,8 %
48 h bei 50-60 °C extrahieren

Probenlyse:

Pisani`s Lysepuffer A:

100 mM Natriumchlorid
20 mM Kaliumchlorid
0,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat
20 mM Tris Hydrochlorid (pH=7,4)

Pisani`s Lysepuffer B:

100 mM Natriumchlorid
0,1 mM EDTA
20 mM Tris Hydrochlorid (Ph=7,4)
10% Glycerol
0,2% NP-40
0,1% Triton 100
1% SDS
3 µg/ml Aprotinin
25 µg/ml Leupeptin
25 µg/ml Pepstatin
25 µg/ml Chymostatin

SDS-PAGE:

4% Sammelgel:

6 ml Aqua dest.
2,5 ml 0,5M Tris Hydrochlorid pH=6,8
0,1 ml 10% (w/v) SDS
1,3 ml Acrylamid Bisacrylamid 30% / 0,8% (w/v)
0,05 ml 10% (w/v) Ammoniumpersulfat
0,01 ml TEMED

10% Trenngel:

20,1 ml Aqua dest
12,5 ml 1,5M Tris pH=8,8
0,5 ml 10% (w/v) SDS
16,6 ml Acrylamid Bisacrylamid 30% / 0,8% (w/v)
0,25 ml 10% (w/v) Ammoniumpersulfat
0,025 ml TEMED

4 x Auftragepuffer:

0,250 M Tris Hydrochlorid (pH=6,8)
8% SDS
40% Glycerin
0,02% Bromphenolblau
400 mM β -Mercaptoethanol

5 x Laufpuffer:

123 mM Tris Base
959 mM Glycine
17 mM SDS

Western Blot-Analyse:

Transferpuffer:

39 mM Glycine
48 mM Tris Base

0,037% SDS

10% Methanol

Waschpuffer:

(“Tris bufferes saline with Tween 20”-TBST)

20 mM Tris Hydrochlorid (pH=7,4)

0.9% Natriumchlorid

0.05% Tween 20

5% Blockierungspuffer:

5 g Magermilchpulver

95 ml TBST

2,5% Blockierungspuffer:

2,5 g Magermilchpulver

97,5 ml TBST

cDNA Synthese:

cDNA Synthese-Mix:

2 µl 10 x RT Puffer

4 µl 25 mM Magnesiumchlorid

2 µl 0,1 M DTT

1 µl RNase Inhibitor (RNaseOUT™ 40 U/µl)

1 µl reverse Transkriptase (SuperScript™ III RT 200 U/µl)

RT-PCR-Analyse:

TE Puffer:

1 ml 10 mM Tris Hydrochlorid (pH=7,4)

20 µl 0,5 M EDTA (pH=8,0)

98,8 ml Aqua dest.

HIF-1 α -Assay-Mix:

- 10 μ l Master Mix (DNA Polymerase)
- 1 μ l HIF-1 α TaqMan Primers (18 μ M Konzentration für jeden Maus-HIF-1 α Primer und 5 μ M für die fluoreszenzmarkierte Maus-HIF-1 α Probe)
- 7 μ l Aqua dest.

FACS-Analyse:

Waschpuffer - 0,5% BSA:

- 0,5 g BSA
- 99,5 ml PBS

2. 7. Mäusestämme

Es wurden ApoE^{-/-} Mäuse (C57Bl/6J-ApoEtm, Jackson Lab.) verwendet, die mindestens in der 10 Generation in den C57/Bl6-Hintergrund zurückgekreuzt worden sind. Durch die ApoE-Defizienz entwickeln diese Mäuse unter cholesterinreicher Diät eine massive Hyperlipidämie und eine Diät-induzierte Atherosklerose. Im Vergleich zu Wildtyp-C57/Bl6 Mäusen ist auch die Neointimabildung nach mechanischer Gefäßverletzung in hyperlipidämischen ApoE^{-/-} Mäusen deutlich gesteigert.

In einigen Experimenten wurden C57/Bl6 Wildtyp-Mäuse verwendet, um isoliert die Funktion der Lysophosphatidsäure zu untersuchen.

2. 8. Tierhaltung und Mäusezucht

Alle Mäuse werden in isoliert ventilierten Käfigen (IVC Typ 2 long, 4-5 Mäuse pro Käfig) mit einem 12-stündigem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten mit Aqua ad libitum (auch während der Testdurchführung). Die ausreichende Versorgung mit frischem Wasser und Futter wurde

täglich kontrolliert. In gleichen Intervallen wurde auf die Sauberkeit der Käfige und den Zustand der Tiere geachtet. Die Käfige wurden mindestens zweimal pro Woche autoklaviert und die Streu gewechselt.

Zur Gesundheitskontrolle wurden regelmäßig serologische, bakteriologische und parasitologische Untersuchungen durchgeführt (nach den FELASA-Guidelines).

Die Zucht der ApoE^{-/-} Mäuse fängt mit ApoE Knock-out Elternpaaren an. Das defiziente ApoE-Allel bleibt bei den Nachkommen homozygot erhalten. Nach 4 Wochen werden die Jungmäuse abgesetzt und die Zucht weitergeführt.

Die Zucht und Aufstallung der Mäuse, sowie die Operationen und die Organentnahmen, erfolgen in der Zentralen Versuchstierhaltung (ZVH) des Klinikums der LMU München-Standort Innenstadt, Nußbaumstr. 20, 80336 München.

Das Tierversuchsvorhaben wurde von der Regierung von Oberbayern gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes genehmigt.

2. 9. Endoluminale Verletzung der A. carotis communis (CCA)

Die ApoE^{-/-} Mäuse im Alter von 8-12 Wochen mit einem Gewicht von 18-23 g wurden eine Woche vor und bis 4 Wochen nach der Drahtverletzung der linken Halsschlagader (A. carotis communis, CCA) auf eine fettreiche „Western type“ Diät (21% Gesamtfett, 0,15% Cholesterin, 19,5% Casein, ssniff) gehalten. Die Narkose wurde durch intraperitoneale Injektion von 0,3 mg/kg Medetomidin Hydrochlorid und 0,6 mg/kg Ketamin Hydrochlorid durchgeführt. Die Augen wurden mit Bepanthen[®] Augensalbe vor dem Austrocknen geschützt.

Nach Fixieren der vier Extremitäten auf der Thermoplatte mit Klebestreifen wurde das Operationsgebiet rasiert und desinfiziert. Nach einer Hautinzision am Hals in der Medianlinie wurde die linke Carotisbifurkation freipräpariert und ein dünner Faden um die A. carotis interna (ICA) und die CCA gelegt, um eine vorübergehende Unterbrechung der Perfusion zu ermöglichen. Die linke A. carotis externa (ECA) wurde distal mit dem Faden abgebunden und caudal davon über eine Arteriotomie (Abb. 1) ein Angioplastie-Führungsdraht (0,36 mm)

eingeführt und etwa 7-8 mm weit in die CCA in Richtung des Aortenbogens in einer drehenden Bewegung vorgeschoben. Durch dreimaliges Vorschieben und Zurückziehen wurde die luminale Endothelschicht komplett denudiert. Nach Entnahme des Führungsdrahts wurde die Arteriotomie durch eine Ligatur ECA verschlossen und die Perfusion in CCA und der ICA wiederhergestellt. Die Wunde wurde dann mit Wundklammern verschlossen und die Mäuse nach dem Aufwachen weiter mit der cholesterinreichen Diät gefüttert.

Nach dem Eingriff erhielten die Mäuse 0,2 mg/kg Atipamezol Hydrochlorid zur Antagonisierung der Anästhetika.

Eine Versuchsgruppe von ApoE^{-/-} Mäusen bekam 3 Wochen lang nach der Gefäßverletzung eine tägliche Dosis von 100 µl 5 mg/kg LPA_{1/3} Rezeptorantagonisten Ki16425 (3-(4-[4-([1-(2-chlorophenyl)ethoxy]carbonyl amino)-3-methyl-5-isoxazolyl] benzylsulfanyl) Propansäure) oder Kontrollpuffer (PBS) intraperitoneal injiziert.

Die gesamte Operation erfolgte unter einem Stereo-Mikroskop mit mikrochirurgischen Mikropinzette und Nachstarschere.

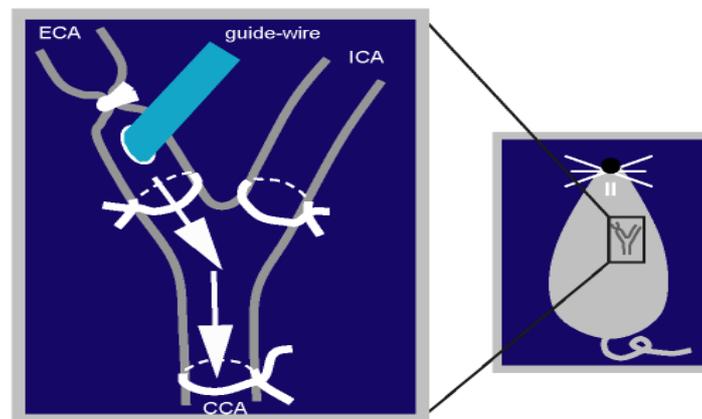


Abb. 1: Darstellung der intraluminalen Verletzung der A. carotis communis (CCA) durch einen Draht (0.36 mm). Zunächst wurde die A. carotis externa (ECA) ligiert und anschließend die CCA und die A. carotis interna (ICA) mittels eines Fadens vorübergehend abgedunden. Durch eine kleine Arteriotomie caudal der ECA-Ligatur wurde der Führungsdraht in Richtung der CCA vorgeschoben. Der Draht wurde dann in einer drehenden Bewegung dreimal vorgeschoben und zurückgezogen. Nach Entfernung des Drahtes wurde die ECA durch eine caudale zweite Ligatur verschlossen und der Blutfluss über die CCA in die ICA wiederhergestellt.

2. 10. Intraluminale Applikation von Lysophosphatidsäure (LPA)

C57BL/6J-Mäuse im Alter von 8-12 Wochen mit einem Gewicht von 18-22 g wurden wie im Abschnitt 2. 9 beschrieben narkotisiert. Die Mäuse bekamen über den gesamten Versuchsverlauf Standardfutter.

Die Bifurkation der CCA wurde freipräpariert und ein Faden um die ICA und die CCA gelegt, um eine kurzfristige Unterbrechung der Durchblutung zu ermöglichen. Die linke ECA wurde mit dem Faden abgebunden und caudal davon eine kleine Gefäßeröffnung ausgeführt. Zur Applikation der Lysophosphatidsäure (40 μ Mol, LPA 20:4) wurde über die Arteriotomie der ECA ein Katheter eingeführt und mit Faden fixiert. Während die Perfusion der CCA weiter unterbunden war, wurde 100 μ l der 20:4 LPA Lösung über den Katheter intraluminal injiziert und das Gefäß für 30 Min. damit inkubiert. Nach dem Absaugen der Lösung und Entfernung des Katheters wurde die ECA ligiert und der Blutfluss in der CCA wiederhergestellt. Die Hautwunde wurde anschließend mit 3-4 chirurgischen Wundklammern verschlossen. Direkt nach der Intervention bekamen die Mäuse eine 0,2 mg/kg Atipamezol Hydrochlorid, um die Narkose zu beenden.

Direkt nach der intraluminalen 20:4 LPA-Applikation bekam die Versuchsgruppe 4 Wochen lang eine tägliche Dosis von 100 μ l 20 mg/kg CXCR4 Antagonisten POL5551 oder Kontrollpuffer (PBS) intraperitoneal injiziert.

Die gesamte Operation erfolgte unter einem Stereo-Mikroskop mit mikrochirurgischen Instrumenten (Mikropinzette und Nachstarschere).

2. 11. Small interfering RNA (siRNA) Gentransfer

Unter RNA-Interferenz (RNAi) versteht man einen Mechanismus, der bei Anwesenheit von doppelsträngigen RNA (dsRNA) in den Zellen die Genexpression einzelner Gene herunterreguliert. Die dsRNA wird dabei von einer Ribonuklease dem „Dicer“-Proteinkomplex in kleine einzelsträngige Fragmente „small interfering RNAs (siRNAs)“ gespalten. Diese sind 21-23 Nukleotide lang und bilden einen Duplex, der auf beiden Seiten

am 3'-Ende einen Überhang von zwei Nukleotiden aufweist. In einem zweiten Schritt werden die siRNAs in einen Multiproteinkomplex RISC („RNA-induced silencing complex“) inkorporiert. Dort erkennen die siRNA Einzelstränge eine komplementäre Ziel-mRNA, die dann abgebaut wird. Damit ist die Expression des entsprechenden Ziel-Gen unterbunden.⁷⁷

In den letzten Jahren wurde die Technik der RNA-Interferenz zunehmend auch bei in vivo Experimenten sowohl mit lokaler⁷⁸ als auch mit systemischer Applikation⁷⁹ erfolgreich eingesetzt.

Zum in vivo siRNA Gentransfer wurden „SiSTABLEv2“ HIF-1 α - und control siRNA der Firma Dharmacon verwendet. „SiSTABLEv2“ Modifikationen beinhalten eine chemische Modifikation der siRNA, um sie vor RNase-Aktivitäten zu schützen und sind bestens für in vivo Applikation geeignet. Die Version 2 beinhaltet zudem die „on-target“ Modifikation, welche auf einer chemischen Änderung des „Sensestranges“ basiert, um die Aufnahme des „Sensestrangs“ in RISC zu verhindern und somit „off-target“-Effekte zu reduzieren (Dharmacon).

2. 11. 1. Pluronic F-127 und in vivo siRNA Gentransfer

Der in vivo siRNA Transfer wurde mittels Pluronic Gel (Pluronic F-127) als Tragematerial durchgeführt. Dieses nicht-ionische Detergenz (generischer Name Poloxamer 407) ist ein Thermogel/Hydrogel und gehört zur Gruppe der Polyethylenoxid-Polypropylenoxid-Polyethylenoxid (PEO-PPO-PEO) Blockcopolymeren. Das Aggregationsverhalten von PEO-PPO-PEO-Blockcopolymeren im Wasser ist bereits sehr ausführlich untersucht worden.

Dieses Dreiblockcopolymer besteht aus einem hydrophoben Zentrum mit zwei hydrophilen Endgruppen. In wässriger Lösung formt es Mizellen, um den hydrophoben Teil gegen das Wasser abzuschirmen. In Abhängigkeit von der Konzentration und der Temperatur ordnen sich diese Mizellen in verschiedenen Strukturen.

Bei tiefen Temperaturen liegen die wässrigen Lösungen von Pluronic F-127 als Flüssigkeit vor. Erst bei genügend hoher Temperatur (mehr als +31 °C, Körpertemperatur) geht das Hydropolymer in einen gelartigen Zustand über.^{80,81}

Durch diese Eigenschaften ist das Pluronic Gels besonders geeignet als Trägermaterial bei in vivo Experimenten, da es längere lokale Expositionszeit von ca. 48 h ermöglicht.⁸²

Im ersten Schritt wurde das Pluronic Pulver in eisgekühltem PBS aufgelöst und so eine 35%ige Lösung hergestellt, die anschließend steril filtriert (Filterporengröße 0,20 µm) wurde.

Der Transfektionsmix (siehe 2. 6) wurde hergestellt indem siRNA gegen HIF-1α/Lamin A/C oder „non-targeting“ siRNA in einfach konzentriertem siRNA Puffer aufgelöst und mit einem siRNA Transfektionsreagent DharmaFECT 4 vermischt wurde. Nach dem Resuspendieren wurde der Transfektionsmix für 20 Min. auf Eis inkubiert und sofort mit Hilfe vorgekühlter autoklavierten Pipettenspitzen periadventitiel auf die linke CCA direkt nach der Gefäßverletzung aufgetragen. Zwei bis drei Sekunden nach der Applikation des flüssigen Transfektionsmixes bildete die Lösung ein Gel.

Nach dem Eingriff wurden die Wunden mit Klammern verschlossen und nach verschiedenen Beobachtungszeiten die rechte und die linke CCA nach einer Perfusion mit RNase-freiem PBS (siehe Abschnitt 2. 13) entnommen und für weitere Versuche verwendet.

2. 12. Blutentnahme über die Schwanzvene

Zur Gewinnung der Blutproben wurde den Mäusen ohne Narkose vor und 24 h nach dem Eingriff aus der Schwanzvene Blut entnommen. Es wurde drauf geachtet, dass die Tiere durch behutsamen Umgang an die Hand gewöhnt und auf die Blutentnahme vorbereitet wurden. Durch diese Maßnahmen waren die Mäuse weniger Stress ausgesetzt und damit die Belastung der Tiere erheblich vermindert. Durch eine leichte Stauung der Blutgefäße am Schwanzansatz konnte nach Kappung der Schwanzspitze 50-100 µl Blut entnommen werden. Mittels heparinisierten Einmal-Kapillarpipetten wurde das Blut aufgenommen.

2. 13. Probengewinnung

Zur Gewinnung von Proben der CCA wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Gefäßverletzung oder nach 20:4 LPA Inkubation die Mäuse erneut wie im Abschnitt 2. 9 beschrieben, narkotisiert und nach einem Hautschnitt auf Höhe des Sternums entlang des Rippenbogens die Rippen im Bereich der Knochen-Knorpel-Grenze durchtrennt und das Herz freigelegt. Zur Perfusion wurde das rechte Herzohr abgeschnitten und ein Polyethylen-Schlauch (0,28 x 0,16mm) über eine Inzision des linken Ventrikels bis in die Aorta ascendens vorgeschoben. Abschließend wurde der Plastikschauch mit einem Faden fixiert und eine Perfusion durchgeführt.

Die Mäuse wurden mit 4% Paraformaldehyd- (für die immunhistologische Versuche), mit PBS- (für die Western Blot Analyse) mit eisgekühlter und RNase-freier PBS-Lösung (siRNA- und PCR-Versuche) in situ perfundiert. Direkt nach der Perfusion wurde die rechte und linke CCA einschließlich der Bifurkation entnommen, für die Western Blot Analyse in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in Einbettkassetten überführt (für Immunhistologie und siRNA Versuche) oder in einer RNA stabilisierenden Lösung aufgenommen (für RT-PCR Versuche).

Nach Entnahme der Karotisbifurkation wurde eine zervikale Dislokation durchgeführt.

2. 14. Histomorphometrie, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

2. 14. 1. Probenvorbereitung

Zur Gewinnung von Proben der CCA für histologische Färbungen wurden die CCA, wie im Abschnitt 2. 13 beschrieben, mit 4%-igem Paraformaldehyd perfusionsfixiert und anschließend entnommen.

Nach der Entnahme verblieb das Gefäß für ca. 2-4 h in der 70%-igen-Alkohollösung.

Über Nacht (18 h) wurden in dem Einbettautomaten nacheinander folgende Schritte durchlaufen: stufenweise Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70%-igem

Ethanol (5 h), 2 x 96%-igem Ethanol (jeweils 1 h), 3 x 100%-igem Ethanol (2 x 1 h, 1 x 1,5 h); Verdrängung des Alkohols mit Xylol (2 x 2 h); Vorparaffinierung in Paraffinbädern (2 x 2 h).

Das Einbetten in flüssigem Paraffin (Temperatur ca. 60 °C) und Härten der Paraffinblöcke erfolgte an einem Paraffinspendeautomaten. Es wurde darauf geachtet das Gefäß streng senkrecht und gerade mit der Bifurkation nach oben einzubetten.

Am Rotationsmikrotom wurden je Gefäß ca. 120-150 4-5 µm dicke Paraffinschnitte in Serie angefertigt. Der Ausgangspunkt war der erste Schnitt nach der Bifurkation oberhalb der CCA. Die Paraffinschnitte wurden auf silanisierte Objektträger aufgetragen, um ein Ablösen zu verhindern. Zum Trocknen wurden die Schnitte für 5-6 h bei ca. 37 °C in den Brutschrank oder bei Raumtemperatur über Nacht gelegt. Es wurden für einen Objektträger je zwei Schnitte gefertigt.

2. 14. 2. Immunfluoreszenz

Die Entparaffinierung erfolgte in einer absteigenden Alkoholreihe: 2 x 10 Min. Xylol, folgend von 2 x 5 Min. 100%-igem Ethanol, 1 x 5 Min. 96%-igem Ethanol, 1 x 5 Min 70%-igem Ethanol.

Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte zunächst zur Antigendemaskierung für 10-15 Min. in Citratpuffer in einer Mikrowelle erhitzt. Ferner wurde für einige Antigene eine proteolytische Verdauung mit Proteinase K oder Trypsin zur Antigendemaskierung durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte entweder mit 0.1%-iger Proteinase K für 3 Min. bei 37 °C oder mit 0.3%-igem Trypsinauflösungspuffer für 40 Min. bei 37 °C inkubiert (siehe Tabelle 2).

Nach einem Waschschrift mit PBS wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen mit 10%-igem Kaninchenserum oder Schafserum blockiert. Die Immunfluoreszenzfärbungen für HIF-1 α , SDF-1 α , α -SMA, Myocardin und CXCR4 erfolgten durch die Inkubation mit gegen das untersuchende Protein gerichteten Primärantikörpern: anti-HIF-1 α , anti-SDF-1 α , anti- α -SMA, anti-Myocardin und anti-CXCR4 (siehe Tabelle 2). Die Sekundärantikörper wurden so gewählt, dass sie spezifisch gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichtet sind. Als Sekundärantikörper wurden stets biotinylierte Antikörper verwendet. Biotin bindet

Streptavidin spezifisch. Um eine sichtbare Farbreaktion zu bekommen, gibt man ein Streptavidin-Fluorescein-Konjugat dazu. Die Detektion des Primärantikörpers bei den Doppelfärbungen erfolgte auch mittels eines TRITC (Tetramethylrhodaminisothiocyanat)-konjugierten Sekundärantikörpers (siehe Tabelle 2).

Eine Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole) ermöglichte die Lokalisation der Färbung im Zellkern oder Zytoplasma. Die Auswertung erfolgte mit einem konventionellen Epifluoreszenzmikroskop verbunden mit einer digitalen CCD-Kamera.

Tabelle 2: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz

| Antigendemaskierung | Blockierung | Primärantikörper | Sekundärantikörper | Fluorochrome |
|--|---|---|---|---|
| 3 Min. 0,1%-ige Proteinase K bei 37° C / 10 Min. Citratpuffer (100°C) | 10 Min. 10%- iges Schafserum | polyklonaler Antikörper Kaninchen anti-HIF- 1 α , 1:200, 18 h Inkubationszeit | Schaf anti-Kaninchen IgG-biotingekoppelt 1:200, 1h Inkubationszeit | Fluorescein Streptavidin, 1:100, 1 h Inkubationszeit |
| 10 Min. Citratpuffer (100°C) | 10 Min. 10%- iges Kaninchen- serum | monoklonaler Antikörper Human/Maus anti- CXCL12/SDF-1 α , 1:62, 1 h Inkubationszeit | polyklonaler Kaninchen anti-Maus Igs-TRITC-gekoppelt, 1:40, 30 Min. Inkubationszeit | |
| | | monoklonaler Antikörper Maus anti-Human Smooth Muscle Actin, 1:100, 1 h Inkubationszeit | polyklonaler Kaninchen anti-Maus Igs-TRITC-gekoppelt, 1:40, 30 Min. Inkubationszeit | |
| 40 Min. 0,3% Trypsinauflösungspuffer / 10 Min. Citratpuffer (100°C) | 10 Min. 10%- iges Kaninchen- serum | polyklonaler Antikörper Ziege anti-Myocardin, 1:50, 18 h Inkubationszeit | Kaninchen anti-Ziege IgG-biotingekoppelt, 1:200, 1 h Inkubationszeit | Fluorescein Streptavidin, 1:100, 1 h Inkubationszeit |
| 10 Min. Citratpuffer (100°C) | 10 Min. 10%- iges Kaninchen- serum | monoclonaler Antikörper Ratte anti-Maus anti- CD184 (CXCR4), 1:100, 18h Inkubationszeit | Kaninchen anti-Ratte IgG-biotingekoppelt, 1h Inkubationszeit | Fluorescein Streptavidin, 1:100, 1 h Inkubationszeit |

2. 14. 2. 1. Quantitative Immunfluoreszenz

Die quantitative Immunfluoreszenzauswertung der HIF-1 α - oder SDF-1 α -positive neointimale Fläche erfolgte mit Hilfe eines Bildanalyseprogramms (Diskus Software, Hilgers). Die Schnitte werden hierfür mit der digitalen CCD-Kamera direkt vom Durchlicht-Mikroskop abfotografiert, die Bilder digitalisiert und in den Rechner übertragen. Mit dem Analyseprogramm können die Umfänge der HIF-1 α - oder SDF-1 α -positive Flächen ausgemessen und berechnet werden.

2. 14. 3. Immunhistochemie

Nach Entpaffinieren und Rehydrieren (siehe 2. 14. 2) wurde die Antigendemaskierung in Citratpuffer mit Detergenzien für 10 Min. in der Mikrowelle durchgeführt (Mac-2, Macrophage Antigen-2).

Im ersten Schritt wurde die endogene Peroxidaseaktivität mit Hilfe einer 5-minütigen Inkubation mit 3%-iger Wasserstoffperoxid-Lösung gehemmt. Die unspezifischen Antikörperbindungsstellen wurden mit unverdünntem Pferdeserum blockiert. Die quantitative Immunhistochemie für α -SMA und Mac-2 wurde mit den anti- α -SMA, und anti-Mac-2 Primärantikörpern für 1 h Inkubation bei Raumtemperatur durchgeführt (siehe Tabelle 3). Um die Reaktion detektierbar zu machen, wurde ein Peroxidase-Konjugat für 1 h zugegeben. Das Substrat DAB (Diaminobenzidin) wurde durch die Peroxidase umgesetzt, es kam zu einer braunen Farbreaktion nach etwa 10-minütigen Inkubation.

In einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte entwässert und in Xylol haltbar gemacht: 1 x 1 Min. 70 %-iges Ethanol, gefolgt von 2 x 1 Min. 96 %-igem Ethanol, 2 x 1 Min. 100%-igem Ethanol und 1 x 2 Min. Xylol.

Anschließend wurden alle angefärbten Schnitte mit saurer Hämalaunlösung gegengefärbt und mit Vecta Mount Eindeckmedium luftblasenfrei eingedeckelt.

Tabelle 3: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für Immunhistologie

| Antigendemaskierung | Blockierung | Primärantikörper | Sekundärantikörper | Substrat |
|---------------------------------|-----------------------------|--|--|--|
| | 20 Min. 2,5% Pferdeserum | monoklonaler Antikörper Maus anti- Human Smooth Muscle Actin, 1:100, 1 h Inkubationszeit | anti-Maus/anti- Kaninchen Ig, Peroxidase Mikropolymergekoppelt , 30- minütige Inkubationszeit | DAB Substrate Kit für Peroxidase, 10- minütige Inkubationszeit |
| 10 Min. Citratpuffer (100°C) | 20 Min. 2,5% Pferdeserum | monoklonaler Antikörper Maus anti- Mac-2, 1:400, 1 h Inkubationszeit | anti-Maus/anti- Kaninchen Ig, Peroxidase Mikropolymergekoppelt , 30- minütige Inkubationszeit | DAB Substrate Kit für Peroxidase, 10- minütige Inkubationszeit |

Bei jeder Färbung wurden zusätzlich Negativkontrollen ohne Verwendung von Primärantikörpern durchgeführt. Dadurch garantierte man, dass die Färbungen während des gesamten Versuchsverlaufs eine gleich gute Qualität aufwiesen, und es wurde verhindert, dass fehlerhafte unspezifische Färbungen in die Auswertung einbezogen wurden. Bei korrekter Durchführung des Färbeprotokolls mussten die positiven Färbungen ein wesentlich stärkeres Signal als die Negativkontrollen aufweisen.

2. 14. 3. 1. Quantitative Immunhistochemie

Die quantitative immunhistochemische Auswertung für α -SMA- und Mac-2-positive neointimale Fläche erfolgte wie im Abschnitt 2. 14. 2. 1. beschrieben mit Diskus Software, Hilgers.

Die positive Fläche wurde ausgemessen und als Verhältnis zur totalen neointimalen Fläche dargestellt.

2. 14. 4. Histomorphometrie (Movat´s-Pentachrom-Färbung)

Die Morphometrie der Neointima wird an histologischen hintereinander folgenden Schnitten durchgeführt, die mit einer modifizierten Movat´s Pentachrom-Färbung angefärbt wurden.⁸³

Diese Färbemethode erlaubt eine differenzierte Färbung der verschiedenen Bindegewebskomponenten, die für die Quantifizierung der neointimalen Fläche wichtig sind.

Im ersten Schritt wurden die formalinfixierten paraffineingebetteten Gewebeschnitte wie im Abschnitt 2. 14. 2 beschrieben, entparaffiniert und rehydriert. Anschließend erfolgte ein 5-minütiges Waschen mit fließendem Wasser und Beizen durch 30-sekündige Inkubation mit 3%-ger Essigsäure. Das Färben von der Grundsubstanz wurde mit Hilfe einer 30-minütigen Inkubation mit Alcianblau durchgeführt. Nachdem die Schnitte ausgewaschen wurden, erfolgte das Fixieren durch die Verhoeff´s-Färbelösung für 6 Min. und das Färben der Muskeln und Zellen durch die Brilliant Crocein-Säurefuchsin-Lösung. Nach dem Fixieren mit 1%-iger Essigsäure, wurden die Gewebekomponenten durch 2%-ige Phosphorwolframsäure differenziert. Im nächsten Schritt wurden die Gewebe durch 100%-iges Ethanol entwässert und abschließend mit Safron du Gatinais für 6 Min. angefärbt. Zum Schluss wurden die Gewebeschnitte durch 100%-iges Ethanol aufgehellt und abschließend mit Kanadabalsam eingedeckelt.

Durch die Movat´s Färbungen wurden die verschiedenen Gewebetypen wie folgendes angefärbt: Zellkerne in blauschwarz, Muskeln und elastische Fasern in rot, Grundsubstanz in blau, Kollagen in gelb (Abb. 2).

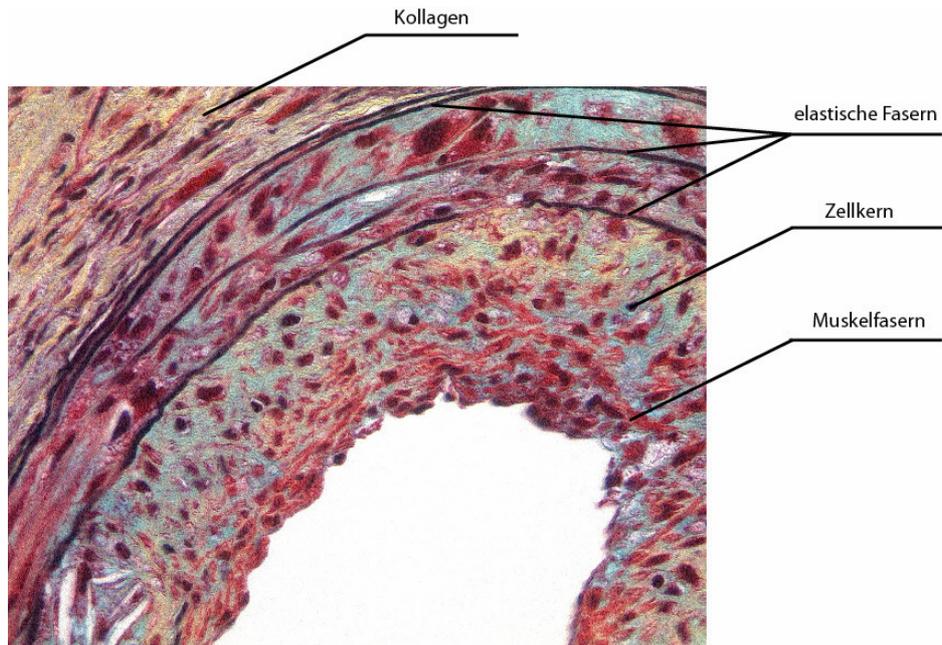


Abb. 2: Anfärbung der verschiedenen Gewebetypen durch Movat´s Pentachrome Färbung.

Die histomorphometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Diskus-Bildanalyseprogramms mit dem die luminale Fläche (L), die von der Lamina elastica interna (IEL) und der Lamina elastica externa (EEL) begrenzten Fläche bestimmt wurden.

Um die neointimale Fläche zu erhalten, wurde von Lamina elastica interna (IEL) begrenzte Fläche die Lumenfläche (L) subtrahiert (Abb. 3):

$$\text{Neointimale Fläche (mm}^2\text{)} = \text{IEL (mm}^2\text{)} - \text{L (mm}^2\text{)}$$

Zur Quantifizierung der neointimalen Fläche wurden insgesamt etwa 10 Schnitte pro Maus für die Movat´s-Färbung verwendet und ausgemessen.

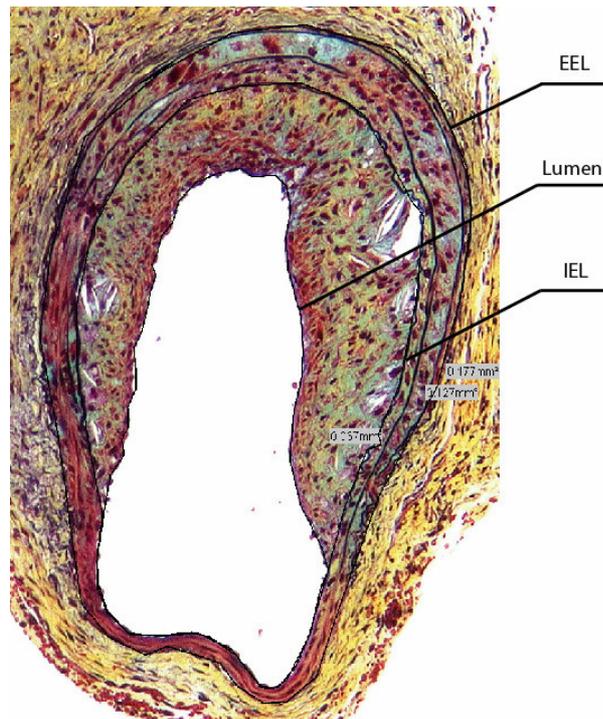


Abb. 3: Morphometrische Ausmessungen der CCA zu verschiedenen Beobachtungszeiten nach dem Eingriff. EEL-Umfang der Lamina elastica externa; IEL-Umfang der lamina elastica interna.

2. 15. Western Blot Analyse

Als ein Western Blot (Immunoblot) bezeichnet man die Identifikation und Quantifizierung spezifischer Proteine durch deren Übertragung (das Blotting) auf eine Trägermembran. Nach dem Transfer werden die Proteine mittels eines spezifischen Antikörpers visualisiert.

Die rechte und linke CCA wurden nach einer Perfundierung (siehe Abschnitt 2. 13) mit eiskühlter PBS-Lösung entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren, um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern.

Sämtliche folgende Schritte bis zur Befüllung der Western Blot Kammern wurden auf Eis durchgeführt. Alle Zentrifugationsschritte wurden mit Hilfe von Kühlzentrifugen auch bei 4 °C durchgeführt.

Das Zerkleinern und das Homogenisieren des Gewebes erfolgten durch einen konventionellen Skalpell und einen Pistill durch eine drehende Bewegung in 1 ml Pisani´s Lysepuffer A.⁸⁴ Das

Homogenat wurde in Zentrifugen-Röhrchen überführt und für 10 Min. bei 350 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das entstandene Pellet wurde in 100 µl Pisani's Lysepuffer B aufgenommen und für 10 Min. inkubiert. Anschließend wurden die Lysate erneut für weitere 10 Min. bei 350 g abzentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2. 15. 1. Proteinextraktion aus Paraffinschnitten und Paraffinblöcken

Für die Western Blot Analyse 4 Wochen nach Verletzung und HIF-1 α - oder control siRNA Applikation, wurden die Lysate aus den formalinfixierten paraffineingebetteten Gewebeschnitte mit Hilfe eines speziellen Kits-Qproteome FFPE der Firma Qiagen gewonnen. Dieser Kit wurde speziell für die Isolierung von großen Proteinmengen aus formalinfixierten paraffineingebetteten Geweben entwickelt und enthält EXB Extraktionspuffer.⁸⁵

Das Gewebe wurde mit Hilfe eines Skalpell aus den Paraffinblöcken geschnitten und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgenommen. Anschließend folgte eine routinemäßige Entparaffinierung und Dehydrierung (siehe 2. 14. 2) mit 1-minütiger Abzentrifugation dazwischen. Nach Zugabe von 100 µl EXB Extraktionspuffer pro Karotide, folgte eine 5-minütige Inkubation auf Eis. Im nächsten Schritt wurden die Proben für 20 Min. bei 100°C erwärmt und dann für 2 h bei 80 °C auf einem Schüttelinkubator bei 750 rpm behandelt. Die zwei verschiedenen Temperaturen sind notwendig, um die Aldehydvernetzung nach der Formalinfixierung zu lösen.

Aus den formalinfixierten Paraffinschnitten wurden das Gewebe nach dem Entparaffinierung und Dehydrierung (siehe 2. 14. 2) von den Objektträgern mit einem Skalpell abgekratzt und in EXB Extraktionspuffer aufgenommen. Die Isolierung der Proteine wurde, wie für die Paraffinblöcke beschrieben, durchgeführt.

2. 15. 2. Quantitative Proteinbestimmung

Nachdem das Gewebe lysiert wurde, erfolgte eine Bestimmung der Proteinkonzentration, nach dem Prinzip von Lowry.⁸⁶

Das Lowry-Verfahren hat gegenüber den anderen Methoden die Vorteile, dass nur eine 15-minütige Inkubation notwendig ist, die photometrische Messung bis zu 2 h möglich ist und ein Probenvolumen von lediglich 5 µl ausreicht. Der erste Schritt beruht auf der Biuretreaktion, bei der es zur Bildung eines blau-violetten Komplexes zwischen den Peptidbindungen und den Kupfer (II)-Ionen in alkalischer Lösung (Reagenz A und S, Bio-Rad Dc protein assay) kommt. In einem zweiten Schritt reduziert dieser biuretähnliche Komplex das gelbe Folin-Ciocalteu Reagenz (Molybdän- und Wolfram-Heteropolysäuren), indem Kupfer (II) zu Kupfer (I) reduziert wurde (Reagenz B). Es entsteht eine bläuliche Verfärbung der Proteinlösung, deren Intensität proportional ist zur Proteinkonzentration.

Entsprechend den Angaben des Herstellers (Bio-Rad Dc protein assay) wurden 25 µl von Reagenz A und S, 5 µl Probe und 200 µl Reagenz B in je eine Vertiefung einer 96-Well-ELISA-Platte pipettiert. Um die Proteinkonzentration zu bestimmen wurde zusätzlich eine Standardreihe mit Albumin aus Rinderserum (BSA) (0,09 - 1,44 mg/ml), gelöst in Lysepuffer, hergestellt. Als Leerwert wurde nur Lysepuffer eingesetzt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben für 5 Sek. geschüttelt und die resultierende Blaufärbung photometrisch bei 620 nm gemessen (Sunrise Tecan Photometer).

2. 15. 3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Nach Homogenisierung des Gewebes und Bestimmung der Proteinmenge wurde zur Analyse der Zellproteine eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese Methode durchgeführt. Durch die Behandlung mit Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine denaturiert und proportional zu ihrer Molekülgröße negativ geladen. Diese negative Ladung erlaubt es die Proteine in der Polymerstruktur eines Polyacrylamid-Gels elektrophoretisch entsprechend ihrer Molekülgröße aufzutrennen. Das SDS-PAGE-Verfahren wurde in Anlehnung an die Methode nach Laemmli et al. durchgeführt.⁸⁷

Um eine schärfere Bandentrennung zu erreichen wurde über das Trenngel ein Sammelgel gegossen. Die einzelnen Komponenten des 10%-igen Trenngels wurden in ein Becherglas pipettiert und luftblasenfrei vorsichtig gemischt. Die Polymerisation des Acrylamids wurde durch Zusatz von Ammoniumpersulfat und TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) gestartet. Die Lösung wurde in die Gießform gegossen und in noch flüssiger Form mit n-Butanol überschichtet. Die Polymerisationszeit betrug etwa 45-60 Min. Nach dem Abgießen des n-Butanols wurde das 4%-ige Sammelgel aufgegossen. Die einzelnen Komponenten des Sammelgels wurden, wie oben für das Trenngel beschrieben, behandelt. Der Probenkamm wurde sofort in das noch flüssige Sammelgel eingesetzt.

Das Gewebe wurde zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und eine Bestimmung der Proteinkonzentration (Abschnitt 2. 15. 2) durchgeführt. Zur Vorbereitung der Proben wurde den gewonnenen Zelllysaten im Verhältnis 1:4 vierfach konzentrierter SDS-Probenpuffer (4 x Auftragepuffer) zugesetzt. Es wurde drauf geachtet, dass in jede Probetasche des Sammelgels die gleiche Proteinmenge (30 µg) aufgetragen wurde. Für die Western Blot Analyse nach HIF-1 α - oder control siRNA Behandlung wurde eine Proteinmenge von 15 µg verwendet. Nach Zusatz des Auftragepuffers wurden die Proben bei 95 °C für 10 Min. aufgekocht.

Nach Entfernen des Probenkamms aus dem Sammelgel wurden die Probetaschen mit Laufpuffer gespült, das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer eingespannt und die Pufferbehälter der Kammer mit Laufpuffer befüllt.

Schließlich wurden die Proben (maximal 80 µl) mit einer Mikroliterspritze in die Probetaschen injiziert. Eine Probetasche des Gels wurde mit einem Molekulargewichtsstandard befüllt. Zu Beginn wurde eine Spannung von 10 mA angelegt, bis die Proben das Trenngel erreicht haben und anschließend eine Spannung von 35 mA pro Gel, bis die Proben das Trenngel durchlaufen haben. Gestoppt wurde die Auftrennung der Proteine, sobald die Bromphenolblaufront den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

2. 15. 4. Western Blot

Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran erfolgte auf elektrophoretischem Weg (das eigentliche Blotting). Hierzu wurde zunächst das Trenngel von den Glasscheiben entfernt und 10 Min. im Transferpuffer inkubiert. In jeweils verschiedenen Gefäßen wurden dann ein Filterpapier und ein Stück PVDF Membran in passender Größe ebenfalls im Transferpuffer 10 Min. lang inkubiert. Dann wurden die Filterpapiere, die PVDF-Membran und das Gel in vorgegebener Reihenfolge in die Semi-dry Blot-Apparatur sandwichartig eingebracht. Beim Western Blot wurde ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt, wodurch die Proteine aus dem Gel auf die Membran wanderten und dort aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften blieben.

Nach dem Zusammenbauen des so genannten Blot-Sandwiches, wird der als Kathode fungierende Deckel der Blot-Apparatur aufgelegt und beide Elektroden an ein Netzgerät angeschlossen. Geblottet wurde für 2 h mit $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gel.

Die Qualität des Transfers und die einzelnen Proteinbanden wurden durch eine 1-minütige Inkubation mit Ponceau S überprüft. Abschließend konnte die Färbung durch mehrmaliges Waschen mit Waschpuffer wieder entfernt werden.

Zum Abblocken unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden die Membran für 1,5 h in einer 5%-igen Blockierlösung bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur (GAPDH-Glutaraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) oder alternativ über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ (Lamin A/C und HIF-1 α) mit dem spezifisch gegen das jeweils zu untersuchende Protein gerichteten Primärantikörper inkubiert (siehe Tabelle 4). Die Primärantikörper wurden gegen Lamin A/C, HIF-1 α und GAPDH in 2,5% Blockierungspuffer angesetzt.

Nach erneutem Waschen (2 x 10 Min.) mit Waschpuffer, folgte eine Inkubation für 45 Min. mit dem gegen den Primärantikörper gerichteten HRP-(horseradish peroxidase, Peroxidase aus dem Meerrettich) konjugierten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 4). Abschließend wurde nach der Färbereaktion die PVDF-Membran jeweils 10 Min. in Waschpuffer und Wasser gewaschen.

Der Nachweis der Komplexe aus dem Antigen, dem Primärantikörper und dem Sekundärantikörper erfolgte mit Hilfe der Lumineszenz-Methode (ECL, Enhanced Chemiluminescence). Die ECL ist ein häufig angewandtes Verfahren zur Detektion spezifischer Antigene, welche mit einem HRP-konjugierten Antikörper markiert sind. Das Prinzip der ECL beruht auf der Anregung von Elektronen bestimmter Moleküle durch eine enzymatische Reaktion. Wenn die Elektronen in ihren Grundzustand zurückkehren, geben sie Energie ab, die im Bereich des sichtbaren Spektrums liegt. Hier wurde eine HRP Wasserstoffperoxid-katalysierte Oxidation von Luminol verwendet. Das Luminol befindet sich in einem angeregten Zustand, der durch Lichtemission im Bereich der Wellenlänge 428 nm abklingt und detektiert werden kann.

Die Membran wurde für 1 Min. in der ECL-Lösung inkubiert (0,5 ml Reagenz A und 0,5 ml Reagenz B), zwischen zwei Filterpapieren abgetrocknet, abschließend in einem Plastikbeutel eingeschweißt und dann für verschiedene Zeiträume exponiert. Die bei der Reaktion entstehende Lumineszenz konnte durch ein Biolumineszenz-Detektionssystem, angeschlossen an einer Digitalkamera (Sequoia), detektiert werden. Zur Quantifizierung der Größe und der Intensität der Signale wurde die Wasabi 5. 1 Software (Hamamatsu Photonics) verwendet.

Tabelle 4: Verwendeten Primär- und Sekundärantikörper beim Western Blot

| Primärantikörper | Sekundärantikörper |
|---|---|
| polyklonaler Antikörper Kaninchen anti-HIF-1 α , 1:200, 18 h Inkubationszeit | Ziege anti-Kaninchen IgG, peroxidasegekoppelt, 1:5000, 45-minütige Inkubationszeit |
| monoklonaler Antikörper Maus IgG1 anti-Lamin A/C, 1:500, 18 h Inkubationszeit | anti-Maus/anti-Kaninchen Ig, Peroxidase Mikropolymergekoppelt, 45- minütige Inkubationszeit |
| monoklonaler Antikörper Maus anti-GAPDH, 1:1000, 1 h Inkubationszeit | anti-Maus/anti-Kaninchen Ig, Peroxidase Mikropolymergekoppelt, 45- minütige Inkubationszeit |

2. 16. Quantitative real-time Reverse Transkription–Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

PCR (Polymerase-Kettenreaktion) Methode wird eingesetzt, um einen kurzen, genau definierten Teil eines DNA-Strangs zu vervielfältigen.

2. 16. 1. RNA-Isolierung

Zu verschiedenen Beobachtungszeiten nach Gefäßverletzung wurden sowohl die linken als auch die rechten unverletzten CCA entnommen. Nach in situ Perfundierung mit RNA-se freier PBS-Lösung (siehe Abschnitt 2. 13) wurden die Proben sofort in RNA Stabilisierungslösung aufgenommen. Die Stabilisierungslösung schützte die RNA vor Deaktivieren und Zerstören.

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus den Probelysaten wurde der RNeasy[®] Mini Kit der Firma Qiagen verwendet.

Die Gewebeproben wurden in einen stark denaturierenden Guanidine-thiocyanat-Lysepuffer (300 µl RLT pro CCA) gegeben, anschließend mit einem Skalpell zerkleinert und mit einem Mikropistill sorgfältig homogenisiert. Danach wurden die Karotidenlysate mit 10 µl Proteinase K zum Entfernen der Proteine gut durchgemischt und auf 55 °C für 10 Min. erhitzt. Im nächsten Schritt wurden die Proben für 3 Min. bei 10 000 g abzentrifugiert und der Überstand in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Für eine adäquate Bindung der RNA an die Silica-Gel Membran wurde die Probe mit 450 µl Ethanol versetzt, auf die Membransäule gegeben und für 15 Sek. bei 8000 g abzentrifugiert. Das Durchflussvolumen wurde verworfen. RNA bindet selektiv an das Säulenmaterial, dadurch wurde die RNA mit Hilfe dieser Membranen absorbiert. Anschließend wurde 350 µl RW1 Waschpuffer auf die Membransäule aufgetragen und für 15 Sek. bei 8000 g abzentrifugiert. Nachdem das Durchflussvolumen erneut verworfen wurde, folgte ein DNaseI-Verdau mit 10 µl DNase I Stammlösung, die in 70 µl RDD Puffer gelöst wurde. Abschließend wurde der DNase I Inkubationsmix für 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurde erneut 350 µl RW1 Waschpuffer auf die Membransäule aufgetragen und für 15 sek. bei 8000g

abzentrifugiert. Das Durchflussvolumen wurde verworfen und das Sammelgefäß erneuert. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit 500 µl RPE-Puffer, der als Konzentrat mitgeliefert wird und zu dem vor Gebrauch vier Volumenanteile 100%-iges Ethanol zur Verdünnung hinzugegeben wurde. RPE-Puffer (inklusive Ethanol) wurden auf jede Membransäule aufgetragen und anschließend für 15 Sek. bei 8000 g zentrifugiert. Nach Entsorgen des Durchflussvolumens wurde erneut 500 µl RPE-Puffer auf die Säulen aufgetragen, anschließend zentrifugiert und das Durchflussvolumen erneut verworfen, um die Silica-Gel Membran zu trocknen.

Zum Eluieren der so gewonnenen und gereinigten RNA wurde die Säule in ein neues Sammelgefäß gegeben und 30 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Silica-Gel-Membran pipettiert. Durch Zentrifugieren wurde die an die Membran gebundene RNA in das Sammelgefäß ausgewaschen. Es zeigte sich, dass mehrmaliges Eluieren mit geringeren Volumina keine höhere RNA-Ausbeute ermöglichte.

2. 16. 2. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die erhaltene Gesamt-RNA wurde in komplementäre DNA (cDNA) mit Hilfe einer reversen Transkription umgeschrieben. Alle Reagenzien für die Reverse Transkription waren in einem kommerziell verfügbaren Kit der Firma Invitrogen erhältlich (Super Script™ III-First Stand Synthesis system for RT-PCR).

Im ersten Schritt wurden 1 µl 50 µM Oligo-dT-Primer (oligo (dT)₂₀), 1 µl 10mM Nukleotidenmix (dNTP) und 8 µl der Probe mit der gewonnenen RNA (siehe Abschnitt 2. 16. 1) in einem Reaktionsgefäß durchgemischt. Anschließend folgte eine Inkubation für 5 Min. bei 65 °C, um die Sekundär- und Tertiärstrukturen der RNA aufzuheben. Für das Umschreiben von mRNA in cDNA wurden oligo dT-Primer verwendet, die an den für mRNAs charakteristischen Poly-A⁺-Ende binden. Die Anlagerung der Oligo-dT-Primers an der RNA erfolgt bei Raumtemperatur. Diese Reaktion wurde durch eine einminütige Inkubation auf Eis gestoppt. Im nächsten Schritt wurde 10 µl cDNA Synthese-Mix (siehe 2. 6) vorbereitet. In der vorgegebenen Reihenfolge wurden RT Puffer, Magnesiumchlorid, DTT, RNase Inhibitor und

reverse Transkriptase durchgemischt. Abschließend wurde der vorbereitete cDNA Synthesemix dem Primer-RNA-Mix hinzupipettiert.

Es folgte die Umschreibung der RNA in cDNA (Reverse Transkription) bei 50 °C für 50 Minuten. Schließlich wurde die Reaktion durch eine 5-minütige Inaktivierungsphase bei 85 °C beendet, indem das für den Umschreibevorgang verantwortliche Enzym, die Reverse Transkriptase, durch die Hitze denaturiert wurde. Damit konnte auch sichergestellt werden, dass in später folgenden Schritten keine unerwünschten Nebenreaktionen abliefen.

Zur Deaktivierung der übrig gebliebenen RNA-Reste wurde 1 µl RNase H dazupipettiert und für 20 Min. bei 37 °C damit inkubiert.

Bei jeder cDNA-Synthese wurde eine Negativkontrolle in Form einer Reaktion ohne Reverse Transkriptase (-RT-Reaktion) durchgeführt. Die auf diese Weise neu synthetisierten cDNA-Proben wurden bis zur RT-PCR bei -20 °C gelagert.

2. 16. 3. Real time RT-PCR (TaqMan[®]-PCR)

Die real time RT-PCR Analyse wurde mittels cDNA Template (die Ausgangs-cDNA), DNA Polymerase (AmpliTaq Gold[®] DNA polymerase), nicht-markierten Primern für Maus-HIF-1 α und einer Fluoreszenz-markierte Maus-HIF-1 α Probe (TaqMan[®] MGB FAMTM dye-labeled, Assay-on-DemandTM Gene Expression) durchgeführt.

Das Prinzip der TaqMan[®] Assays beruht auf dem Einsatz herkömmlichen PCR-Reagenzien und einer zusätzlichen TaqMan Sonde. Dies ist ein fluoreszenzmarkiertes Oligonucleotid, das mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und einem eingebauten oder am 3'-Ende liegenden Quencher markiert sind. Reporter- und Quencher-molekül sind so gewählt, dass das Emissionsspektrum des Reporters dem Anregungsspektrum des Quenchers entspricht. Die Reporterfluoreszenzemission wurde bei der TaqMan-Sonde aufgrund der räumlichen Nähe vom Quencher unterdrückt. Bei der Neustrangsynthese schneidet die Taq-Polymerase durch ihre 5', 3'-Exonucleaseaktivität die TaqMan-Probe in kleine Fragmente, wodurch es zu einer Dissoziation des Reporters vom Quencher kommt und die Reporterfluoreszenz freigesetzt werden kann. Häufig wird Fluorencin (FAM) als Reporter und Rhodamin (TAMRA-tetramethylrhodamine) als Quencher verwendet. TaqMan[®]-minor-groove-binder (MGB)-Proben haben einen nicht fluoreszierenden Quencher am 3'-Ende.

Im ersten Schritt wurde die gewonnene cDNA (siehe Abschnitt 2. 16. 2) mit TE-Puffer (1:10) verdünnt. In einem anderen Reaktionsgefäß wurde der HIF-1 α -Assay-Mix hergestellt (siehe 2. 6), indem 10 μ l Master Mix (DNA Polymerase), 1 μ l HIF-1 α TaqMan Primers (18 μ M Konzentration für jeden Maus-HIF-1 α Primer und 5 μ M für die Fluoreszenz-markierte Maus-HIF-1 α Probe) und 7 μ l Aqua dest. zusammengemischt wurden. Abschließend wurden 20 μ l vom HIF-1 α Assay-Mix und 2,2 μ l aus der 1:10 verdünnter cDNA Probe im Doppelansatz in je Vertiefung einer 96-Well-ELISA-Platte pipettiert.

Durch Erhitzen auf etwa 95 °C wurde das DNA Template in zwei Einzelstränge denaturiert. Beim Abkühlen auf etwa 50 °C lagern sich die Primer spezifisch an ihre komplementäre Sequenz des jeweiligen Einzelstrangs (Annealing). Die DNA Polymerase komplementierte die beiden Einzelstränge unter Verbrauch der Nukleotiden zum Doppelstrang bei etwa 60 °C (Extension). Dabei stellte der Primer ein freies 3'-OH-Ende zur Verfügung, an das die Polymerase weitere Nukleotide anknüpft. Nur die DNA-Sequenz, die zwischen zwei Primern liegt, wurde amplifiziert.

Als Standard wurde das „housekeeping gene“ rRNA genommen, von dem man annimmt, dass es in den Untersuchten Ansätzen in einer konstanten Menge exprimiert wird. Man bezeichnet die Menge an spezifischem Produkt dann auf dieses „housekeeping gene“, dessen Menge man für eine Konstante hält. Die Wiederholung der Zyklen hatte als Folge eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA-Moleküle. Die neu entstandenen DNA-Stränge dienten dabei im folgenden Zyklus als Amplifikations-Vorlage.

Zur Detektion möglicher Kontaminationen wurde parallel zu jedem PCR-Lauf eine Negativkontrolle mit Aqua dest. anstatt cDNA („NTC-no template control“) mitbestimmt. Diese blieben in allen Fällen negativ.

RNA ist im Vergleich zu DNA wesentlich instabiler und temperaturempfindlicher. Speziell bei dieser Methode war es essentiell, jegliche Art von Kontamination strengstens zu vermeiden. Es wurden zur Reinigung des Arbeitsplatzes und aller Arbeitsmaterialien neben einer 70%-igen Ethanollösung eine spezielle Lösung zur Deaktivierung von DNA- und RNasen-0,1%-ige DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Lösung verwendet.

Dazu wurden alle für die RNA-Extraktion und Umschreibung verwendeten Materialien mit 0,1 % (v/v) DEPC-haltigem Wasser, und die verwendete Lösungen mit 0,1 % (v/v) DEPC für 12 h behandelt. Die verbliebenen Reste von DEPC mussten immer entfernt werden, indem man die DEPC-Lösungen für 15 Min. bei 100 °C erhitzt wurden.

2. 16. 4. Relative Quantifizierung und $\Delta\Delta$ Cp Methode

Bei der real-time RT-PCR Methode wurden als Maß für die Quantifizierung der RNA-Startmenge die so genannte Ct oder Cp (crossing point) Werte verwendet. Sie entsprechen der Anzahl der PCR Zyklen, die nötig sind um ein konstant definiertes Fluoreszschwellenwert zu erreichen.

Bei der relativen Quantifizierung wurde die Genexpression eines Zielgens mit einem anderem nicht reguliertem „housekeeping gene“ normalisiert. Zur Normalisierung wurde rRNA herangezogen.

Den Expressionsunterschied zwischen der Expression des untersuchenden Gens und der Kontrolle wurde über die so genannte $\Delta\Delta$ Cp Methode berechnet.⁸⁸

Im ersten Schritt wurde für jede untersuchte Probe der Cp Wert des Referenzgens vom Cp Wert des zu untersuchenden Gens abgezogen:

$$\Delta\text{Cp} = \text{Cp Zielgen} - \text{Cp „housekeeping gene“}$$

Danach wurde vom ΔCp Wert der experimentell behandelten Proben der ΔCp Wert der Kontrolle subtrahiert. So kommt man zum „ $\Delta\Delta\text{Cp}$ “ Berechnungsmodell. Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle (Ratio), und normalisiert zum „housekeeping gene“ ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta\text{Cp}}$.

2. 17. Durchflußzytometrie (Flourescence Activated Cell Sorting-FACS)

Die Quantifizierung der zirkulierenden Sca-1⁺/lin⁻ Zellen wurde mittels Durchflußzytometrie (FACS) durchgeführt.

Die Durchflußzytometrie ist eine Technologie, die verschiedene physikalische Eigenschaften einzelner Partikel gleichzeitig misst und analysiert. Die vermessenen Merkmale sind die relative Partikelgröße, die relative Granularität und die relative Fluoreszenzintensität. Diese Eigenschaften werden mit Hilfe eines Durchflußzytometers (Becton Dickinson) bestimmt. Die Zellen werden durch eine Kapillare gesaugt und passieren dort einen Laserstrahl. Je nach Größe und Granularität emittieren die Zellen unterschiedliches Streulicht. Das

Vorwärtsstreulicht (FSC, Forward Light Scatter) gibt Auskunft über die Größe der Zellen und das Seitwärtsstreulicht (SSC, Side Scatter) über die Granularität der Zelle.

Zu definierten Zeitpunkten wurde den Tieren ca. 100 µl Blut aus der Schwanzvene entnommen (Abschnitt 2. 12) und in heparinisierten Kapillaren gegeben. 40 µl Vollblut wurden mit je 1 µl Primärantikörper gegen einen spezifischen Stammzellmarker (Sca-1) und Antikörpern gegen hämatopoetische Differenzierungsmarker (CD11b, CD45R, Gr-1, TER-119, CD3e) für 30 Min. auf Eis inkubiert und anschließend ein Fluorescein-Streptavidin-Konjugat für 1 h dazugegeben (siehe Tabelle 5). Danach wurden die Proben für 10 Min. in 2 ml 1:10 verdünntem Hämolysepuffer verbracht, 5 Min bei 350 g abzentrifugiert und zweimal in jeweils in 500 µl FACS-Waschpuffer resuspendiert.

Verschiedene Zellen haben unterschiedliche Eigenfluoreszenz, deswegen wurden ungefärbte Proben mit gemessen, die als Negativkontrollen dienten. Von jeder Probe wurden mindestens 10 000 Ereignisse gemessen.

Tabelle 5: Verwendete Antikörper für Durchflußzytometrie

| Primärantikörper | Fluorochrome |
|--|--|
| anti-Maus anti-Ly-6A/E (Sca-1), PE-gekoppelt, 1:40, 30-minütige Inkubationszeit | |
| anti-Maus anti-CD11b (Mac-1), biotinkoppelt, 1:40, 30-minütige Inkubationszeit | Fluorescein Streptavidin, 1:100, 1 h Inkubationszeit |
| anti-Maus anti-CD45R / B220, biotinkoppelt, 1:40, 30-minütige Inkubationszeit | Fluorescein Streptavidin, 1:100, 1 h Inkubationszeit |
| anti-Maus anti-Ly-6G (Gr-1), biotinkoppelt, 1:40, 30-minütige Inkubationszeit | Fluorescein Streptavidin, 1:100, 1 h Inkubationszeit |
| anti-Maus anti-TER-119/Ly-76, biotinkoppelt, 1:40, 30-minütige Inkubationszeit | Fluorescein Streptavidin, 1:100, 1 h Inkubationszeit |
| anti-Maus anti-CD3e (CD ϵ), biotinkoppelt, 1:40, 30-minütige Inkubationszeit | Fluorescein Streptavidin, 1:100, 1 h Inkubationszeit |

Das Erstellen von Histogrammen und die Auswertung der Rohdaten wurde mit Hilfe von WinMDI Programm (Version 2. 8, Joseph Trotter, Scipps Research Institute, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Im ersten Schritt wurde in einem Punkt-Diagramm der Forward- und Side Scatter-Eigenschaften die mononukleäre Zellfraktion identifiziert (Abb. 4 A) und mit Hilfe eines „Gates“ diese Zellfraktion weiter hinsichtlich der Fluoreszenzintensitäten ausgewertet. Dazu wurden die PE-Fluoreszenz auf der Y-Achse und die FITC-Fluoreszenz auf der X-Achse jeweils bezüglich ihrer Intensitäten aufgetragen (Abb. 4 B). Im nächsten Schritt wurden Quadranten in die Punkt-Diagramme für Sca-1⁺/lin⁻, Sca-1⁺/lin⁺, Sca-1⁻/lin⁻, Sca-1⁻/lin⁺ Zellen definiert. Die Quadranten wurden anhand der Negativkontrollen so gesetzt, dass mehr als 95% „events“ im Sca-1⁻/lin⁻ Quadranten liegen. Der sich jeweils im Quadranten befindende Prozentsatz der einzelnen Zellefraktionen wurde automatisch in der

Quadrantenstatistik bestimmt. Der Prozentanteil der Sca-1⁺/lin⁻ Zellen wurde bestimmt, indem von dem gemessenen Prozentanteil der Sca-1⁺/lin⁻ Zellen der Anteil der Sca-1⁺/lin⁻ Zellen in den Negativkontrollen subtrahiert wurde.

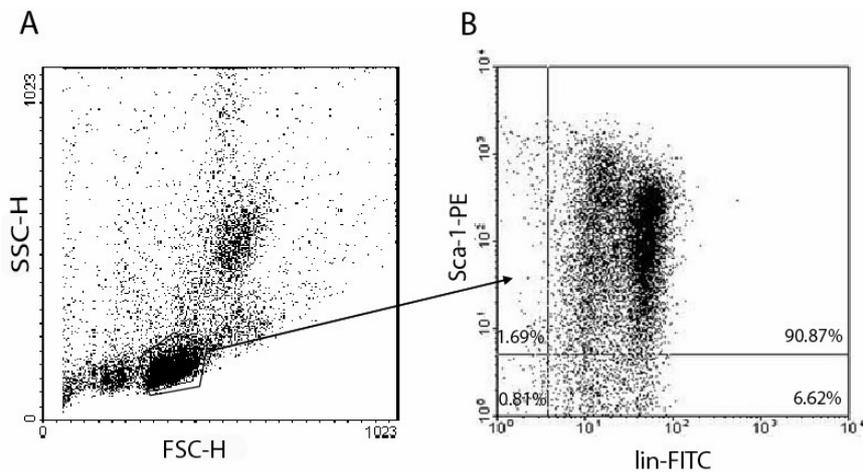


Abb. 4: Darstellung der Sca-1⁺/lin⁻ Zellen Bestimmung mittels Durchflußzytometrie. A-, „Dot-plot“-Darstellung der gemessenen Zellen mit einem Gate, das die mononukleäre Zellpopulation beschreibt. B-, „Dot-plot“ Grafik der Ergebnisse der Fluoreszenzmessung. Die FITC-Fluoreszenz („lineage“, hämopoetischer Marker) ist auf der X-Achse, die Phycoerythrin-Fluoreszenz (Sca-1, Stammzellenmarker) auf der Y-Achse aufgetragen. Die Sca-1⁺/lin⁻ Zell-Subpopulation befindet sich im oberen linken Quadrant.

2. 18. Statistische Analyse

Die Versuche wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (\pm SEM) von n unabhängigen Experimenten berechnet. Unterschiede zwischen einzelnen Versuchsgruppen wurden entweder mittels des t-Tests nach Student und gegebenenfalls einer Welch Korrektur oder mittels einer einfachen Varianzanalyse (1-way ANOVA) gefolgt von einer Posttest-Analyse nach Student-Newman-Keuls ausgewertet (Prism 4.0, GraphPad). Es wurde immer ein P-Wert < 0.05 als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3. 1. HIF-1 α Expression in der Gefäßwand nach endothelialer Denudation im ApoE $^{-/-}$ Mausmodell

3. 1. 1. Bestimmung der HIF-1 α mRNA Expression in der verletzten Gefäßwand

Um festzustellen, ob die endotheliale Denudation der CCA mit einem spezifischen Effekt auf die Expression von HIF-1 α mRNA in der Gefäßwand einhergeht, wurde die Menge der HIF-1 α mRNA zum Zeitpunkt 2 h, 6 h und 7 Tage nach Gefäßverletzung und in den unverletzten Karotiden (Kontrolle) mittels quantitativer real time RT-PCR bestimmt.

In der Kontrollgruppe und 2 h nach endothelialer Denudation war die HIF-1 α mRNA Expression nur sehr gering ausgeprägt. Sechs Stunden nach Gefäßverletzung zeigte sich ein signifikanter Anstieg der HIF-1 α mRNA Expression im Vergleich zur Kontrolle und zum Zeitpunkt 2 h nach Verletzung (n=3, P<0,05) (Abb. 5). Nach 7 Tagen war die HIF-1 α mRNA Menge wieder auf das Niveau der Kontrollwerte abgefallen.

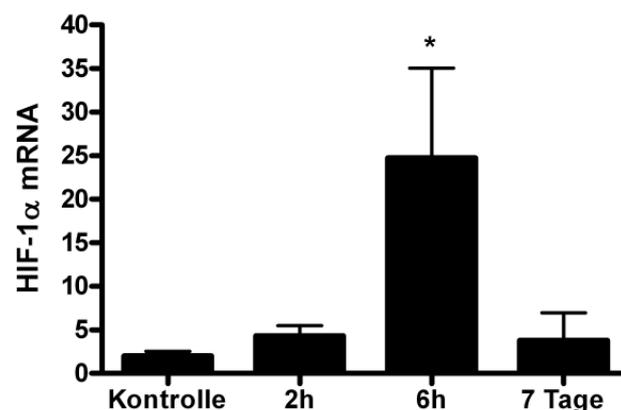


Abb. 5: HIF-1 α mRNA Menge in unverletzten Karotiden (Kontrolle) und 2, 6 h und 7 Tage nach Gefäßverletzung, untersucht durch quantitative real-time PCR. Sechs Stunden nach Verletzung wurde ein Anstieg der HIF-1 α mRNA Expression festgestellt. Die HIF-1 α mRNA Werte wurden auf die rRNA Menge normalisiert. *P<0,05.

3. 1. 2. Bestimmung der HIF-1 α Proteinexpression in der verletzten Gefäßwand

Ferner wurde die HIF-1 α Expression auf Proteinebene in der Gefäßwand von hyperlipidämischen ApoE^{-/-} Mäusen sowohl in unverletzten Karotiden als auch 1 Tag und 2 Wochen nach endothelialer Denudation mit Hilfe von Western Blot-Analysen untersucht.

Es zeigte sich eine verstärkte Proteinexpression von HIF-1 α einen Tag nach Gefäßverletzung im Vergleich zu unverletzten Karotiden. Nach 2 Wochen war die HIF-1 α Proteinmenge weiter angestiegen. Als interne Kontrolle wurde parallel in jedem Experiment das Referenzgen GAPDH bestimmt. Die Expression von GAPDH blieb annähernd konstant.

Die densitometrischen Auswertungen von drei unabhängigen Experimenten bestätigte den kontinuierlichen Anstieg der HIF-1 α Proteinmenge nach Gefäßverletzung. Nach einem Tag war die HIF-1 α Menge um 20% im Vergleich zu unverletzten Karotiden angestiegen. Zum Zeitpunkt 2 Wochen zeigte sich ein weiterer 20%-iger Anstieg von HIF-1 α im Vergleich zu einem Tag und zu den unverletzten Karotiden. (*P<0,05; Abb.6 B).

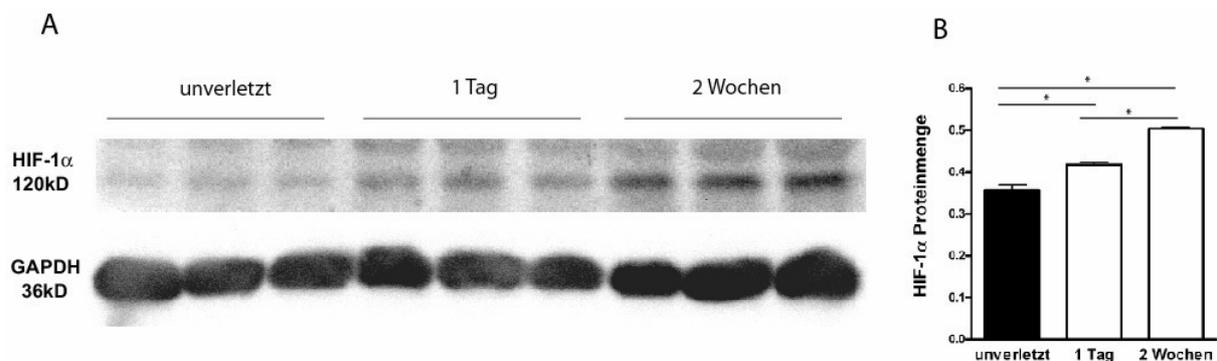


Abb. 6: Western Blot Analysen von Karotiden aus ApoE-defizienten Mäusen 1 Tag und 2 Wochen nach Gefäßverletzung und ohne Verletzung. Die Analyse von drei unabhängigen Experimenten zeigte einen Anstieg der HIF-1 α Proteinmenge in der Gefäßwand nach 1 Tag und 2 Wochen (A). Das Referenzgen GAPDH diente zur Normalisierung der HIF-1 α Proteinmenge. B-Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung ergab einen signifikanten Anstieg von HIF-1 α nach Gefäßverletzung im Verlauf von 2 Wochen Blot. *P<0,05.

3. 2. Lokalisation von HIF-1 α Expression in der verletzten Gefäßwand

Nachdem gezeigt werden konnte, dass nach Gefäßverletzung HIF-1 α sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene verstärkt exprimiert wurde (Abb. 5 und 6), wurde die Lokalisation von HIF-1 α in der verletzten CCA mittels Immunfluoreszenzfärbungen untersucht.

Im Vergleich zu den Negativkontrollen (Abb. 7 B). fand sich in unverletzten Karotiden eine schwache Immunreaktivität für HIF-1 α in der Media (Abb. 7 A). Einen Tag nach Verletzung (Abb. 7 C) war HIF-1 α deutlich stärker in medialen Zellen nachweisbar als in unverletzten Karotiden. Nach 2 Wochen zeigte sich eine intensive HIF-1 α -spezifische Fluoreszenz in medialen und vor allem auch in neointimalen Zellen (Abb. 7 D).

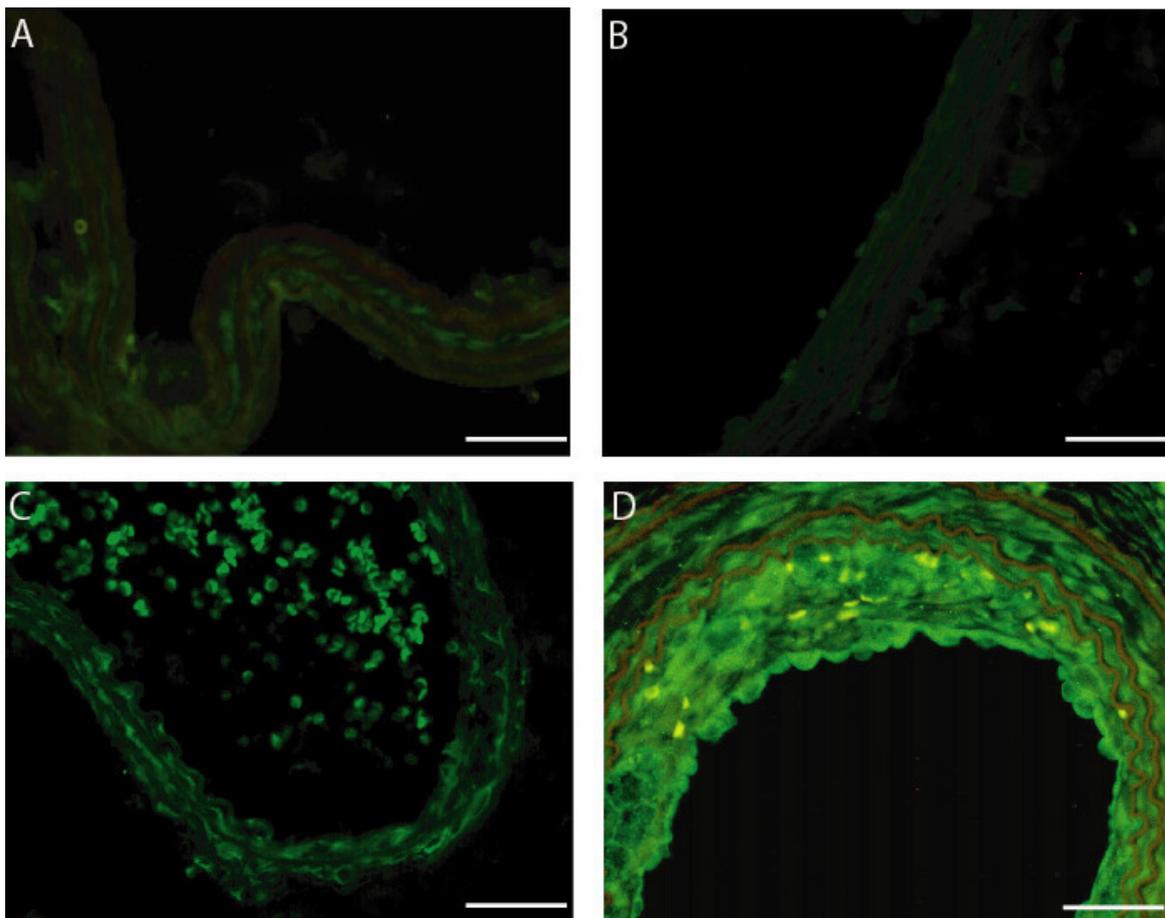


Abb. 7: HIF-1 α Lokalisation in der CCA nach Drahtverletzung im ApoE^{-/-} Mausmodell. Mittels Immunfluoreszenz wurde HIF-1 α in der unverletzten Karotide (A) und nach einem Tag (C) bzw. 2 Wochen (D) nach Verletzung nachgewiesen. In der Negativkontrolle (B) wurde unspezifisches Kaninchen Immunglobulin als Primärantikörper verwendet. Maßstab, 50 μ m.

3. 3. Zelluläre HIF-1 α Lokalisation in der verletzten Gefäßwand

In weiteren Versuchen wurde die zelluläre HIF-1 α Lokalisation nach Gefäßverletzung mittels Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie für HIF-1 α und für den SMC-Marker α -SMA untersucht (Abb. 8). Einen Tag (Abb. 8 A-C) und 2 Wochen (Abb. 8 D-F) nach Gefäßverletzung war in nahezu allen α -SMA-positiven Zellen in der Media und Neointima auch HIF-1 α nachweisbar. Das deutet darauf hin, dass HIF-1 α hauptsächlich in den SMCs induziert wird (Abb. 8 C-Overlay, gelbe Farbe). Ferner war HIF-1 α auch in einigen luminalen, α -SMA-negativen Zellen, bei denen es sich um Endothelzellen handeln dürfte, exprimiert (Abb. 8 C).

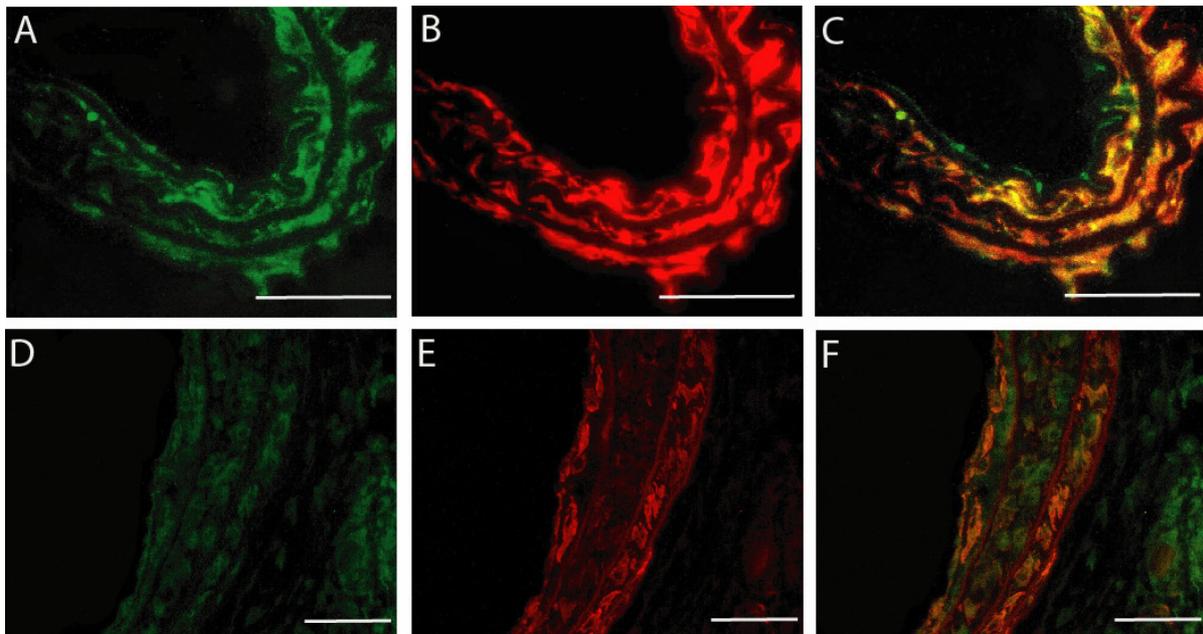


Abb. 8: HIF-1 α Expression in SMCs in der Gefäßwand 1 Tag und 2 Wochen nach endothelialer Denudation in ApoE^{-/-} Mäusen. Doppelimmunfluoreszenzfärbung für HIF-1 α (A und D, grün) und α -SMA (B und E, rot) zeigte eine deutliche Kolokalisation der HIF-1 α Expression in α -SMA-positiven Zellen (G-Overlay, gelbe Farbe). Maßstab, 25 μ m.

Um die Spezifität der α -SMA Färbung für neointimalen SMCs nachzuprüfen, wurden ferner Doppelimmunfluoreszenzfärbungen für α -SMA (Abb. 9 B, rot) und Myocardin (Abb. 9 A, grün) durchgeführt. Myocardin reguliert die SMC-spezifische Differentiation und Proteinexpression⁸⁹ und dient auch als spezifischer Marker für SMCs. Es zeigte sich, dass alle α -SMA positive Zellen auch Myocardin exprimieren, so dass sich durch die α -SMA Färbung eindeutig SMCs identifizieren werden konnten (Abb. 9 C-Overlay, gelbe Farbe).

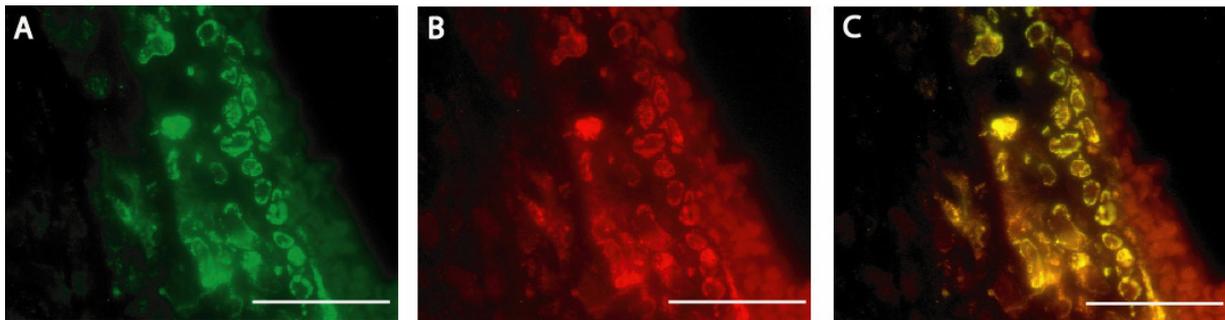


Abb. 9: Zelluläre Kolokalisation von α -SMA und Myocardin in der Neointima beweist die Spezifität von α -SMA als SMC-Marker. Gezeigt ist eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung für Myocardin (A, grün) und α -SMA (B, rot) 2 Wochen nach Gefäßverletzung. Das Overlay von Myocardin und α -SMA (C, gelbe Farbe) weist eine Kolokalisation in der neointimalen Fläche auf. Maßstab, 25 μ m.

3. 4. Nukleäre HIF-1 α Translokation

Nach der Aktivierung von HIF-1 α kommt es zur Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern, wo es zur Bindung an spezifischen Promotersequenzen (hypoxia-responsive element, HRE) und damit zu einer gesteigerten Transkription der HIF-1 α -abhängigen Gene kommt.

Um die nukleäre HIF-1 α Translokation zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen für HIF-1 α 1 Tag und 2 Wochen nach Gefäßverletzung durchgeführt. Die Abbildung 10 B-C verdeutlicht, dass HIF-1 α in den medialen SMCs 1 Tag nach Gefäßverletzung überwiegend im Zytoplasma lokalisiert war. Die Negativkontrolle zeigte keine spezifische Anfärbung (Abb. 10 A und D). Eine nukleäre Translokation von HIF-1 α wurde zu diesem Zeitpunkt nur in wenigen Zellen detektiert. Nach 2 Wochen dagegen war HIF-1 α sowohl im Zellkern als auch im perinukleären Bereich in fast allen neointimalen und luminalen Zellen nachweisbar (Abb. 10 E, F). Der immunfluoreszenzmikroskopische Nachweis von HIF-1 α wird auch durch die Aussparung der Nukleoli in der Färbung verdeutlicht.

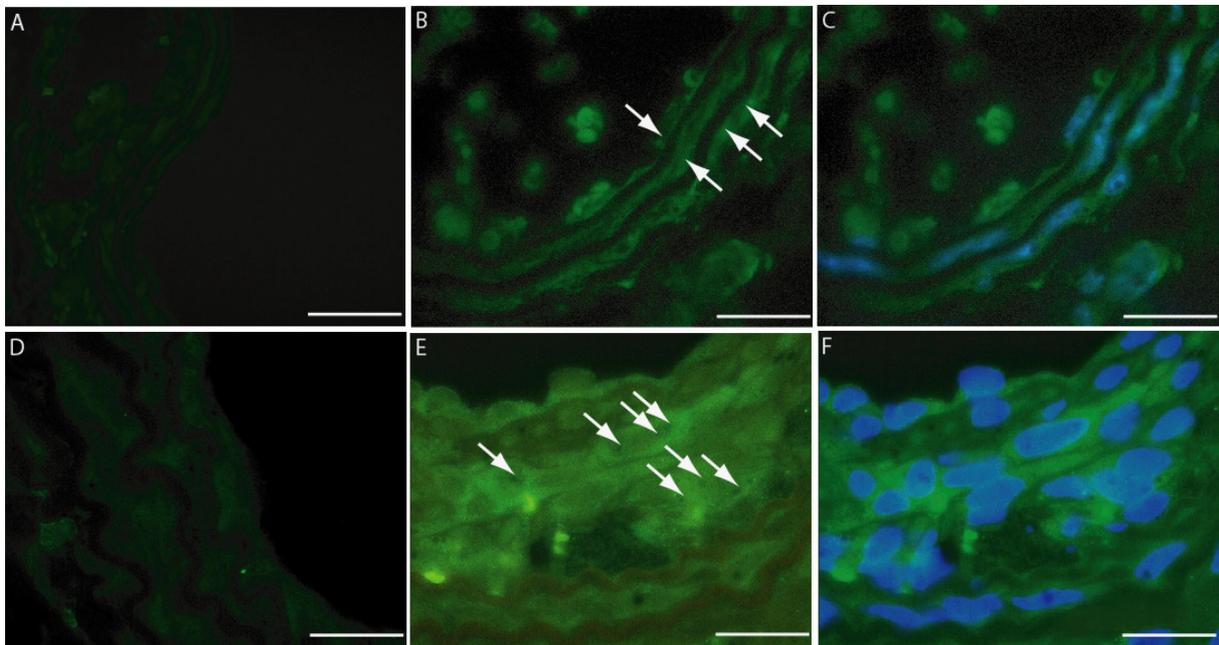


Abb. 10: Nukleäre Translokation von HIF-1 α . Der Nachweis einer nukleären Translokation von HIF-1 α (grün, B und E) einen Tag (B und C) und 2 Wochen (E und F) nach Gefäßverletzung erfolgte durch Immunfluoreszenzfärbung. Die Negativkontrollen (A und D) zeigen eine geringe Hintergrundreaktion. Die Pfeile kennzeichnen die positive zyttoplasmatische HIF-1 α Färbung (B) und die nukleäre Akkumulation von HIF-1 α (E). Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt (blau, C und F). Maßstab, 25 μ m.

3. 5. Kolokalisation von HIF-1 α und SDF-1 α

Angesichts der Tatsache, dass die Aktivierung von HIF-1 α im ischämischen Gewebe eine gesteigerte SDF-1 α Expression zur Folge hat⁵⁰, haben wir die zelluläre Kolokalisation von HIF-1 α und SDF-1 α in der Gefäßwand nach Drahtverletzung untersucht. Die Doppelimmunfluoreszenzfärbungen für HIF-1 α und SDF-1 α zeigten, dass in den meisten medialen SMCs eine deutliche Kolokalisation von HIF-1 α (Abb. 11 A, grün) und SDF-1 α (Abb. 11 B, rot) einen Tag nach Verletzung (Abb. 11 C, Overlay-gelbe Farbe) bestand. Lediglich in einigen luminalen, endothelialen Zellen war HIF-1 α nachweisbar ohne dass gleichzeitig eine Expression von SDF-1 α vorlag. (Abb. 11 C). Zwei Wochen nach Verletzung (Abb. 11 D-F) wiesen fast alle SMCs in der Gefäßwand eine deutliche Kolokalisation von HIF-1 α und SDF-1 α vor (Abb. 11 F, Overlay-gelbe Farbe).

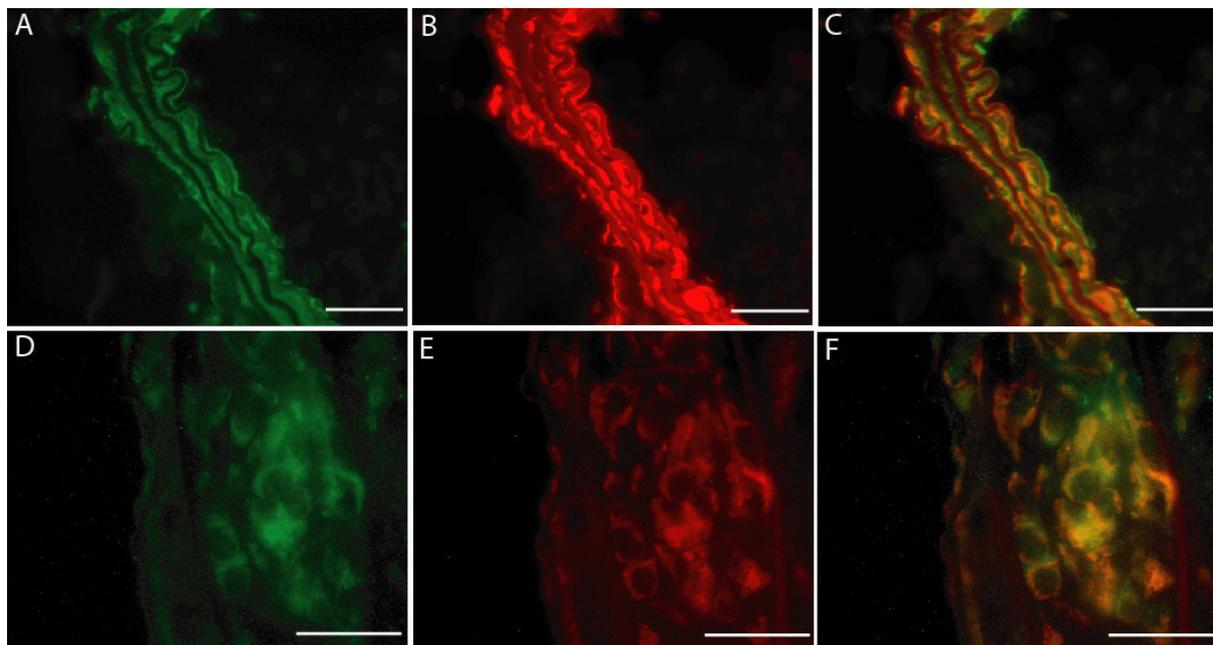


Abb. 11: Zelluläre Kolokalisation von HIF-1 α und SDF-1 α in der Gefäßwand nach Drahtverletzung. Mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbung wurde die Kolokalisation von HIF-1 α (grün, A und D) und SDF-1 α (rot, B und E) 1 Tag (A-C) und 2 Wochen (D-F) nach Gefäßverletzung untersucht. Das Overlay von HIF-1 α und SDF-1 α Färbungen 1 Tag nach Gefäßverletzung zeigte eine sichtbare Kolokalisation (C, gelbe Farbe) im Zytoplasma der medialen SMCs. Zwei Wochen nach Gefäßverletzung zeigte sich im Zytoplasma der neointimalen und medialen SMCs eine Kolokalisation von HIF-1 α und SDF-1 α (Overlay F, orange Farbe.). Maßstab, 25 μ m.

3. 6. Effekt eines HIF-1 α siRNA Gentransfers in vivo

Um die Beteiligung von HIF-1 α an der Neointimabildung und SPC Mobilisierung zu untersuchen, wurde lokal in die CCA von ApoE^{-/-} Mäusen nach Drahtverletzung ein Gentransfer von siRNA spezifisch für HIF-1 α durchgeführt, um die frühe HIF-1 α Expression zu blockieren.

3. 6. 1. Untersuchung der Effizienz eines Gentransfers durch lokal applizierte siRNA in vivo

Um den Effekt einer periadventitiellen Applikation von siRNA gelöst in Pluronic Gel auf die Genexpression in vivo zu untersuchen, wurde zunächst das „housekeeping gene“ Lamin A/C als Positivkontrolle in unverletzten CCAs verwendet. Zweiundsiebzig Stunden nach Lamin A/C siRNA Behandlung war die Lamin A/C Proteinexpression, bestimmt durch Western Blot Analyse, signifikant um 60% im Verhältnis zur „non-targeting“ Kontroll siRNA reduziert ($0,38 \pm 0,041$ vs. $0,15 \pm 0,011$ Lamin A/C Proteinwerte, $n=3$, $***P<0,001$) (Abb. 12). Die Lamin A/C Proteinmenge wurde auf das Referenzgen GAPDH normalisiert

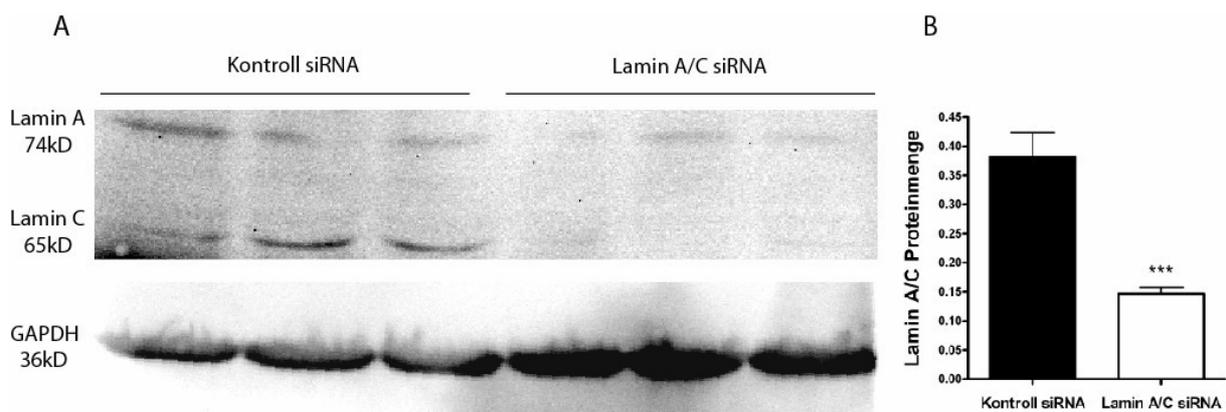


Abb. 12: Western Blot Analysen von Karotiden aus ApoE-defizienten Mäusen 72 h nach Kontroll- und Lamin A/C siRNA Behandlung. Die Analyse von drei unabhängigen Experimenten zeigte eine Reduktion der Lamin A und Lamin C Proteinmenge in der Gefäßwand. Das Referenzgen GAPDH diente zur Normalisierung der Lamin A/C Proteinmenge. B-Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung ergab eine signifikante 60%-ige Reduktion von Lamin A/C nach siRNA Lamin A/C Behandlung. ***P<0,001.

3. 6. 2 Effekt von HIF-1 α siRNA Gentransfer auf die HIF-1 α Expression

3. 6. 2. 1. Western Blot Analyse

Mit Hilfe einer Western Blot Analyse wurde die HIF-1 α Proteinmenge in der Gefäßwand der CCA nach Gefäßverletzung quantifiziert. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit HIF-1 α siRNA nach 4 Wochen zu einer 54%-igen Reduktion der HIF-1 α Proteinmenge führt im Vergleich zu Karotiden, die mit Kontroll siRNA behandelt wurden (Abb. 13) ($0,50 \pm 0,05$ vs. $0,23 \pm 0,04$ HIF-1 α Proteinmenge, n=3, *P<0,05). Die HIF-1 α Proteinmenge wurde auf das Referenzgen GAPDH normalisiert (Abb. 13 B).

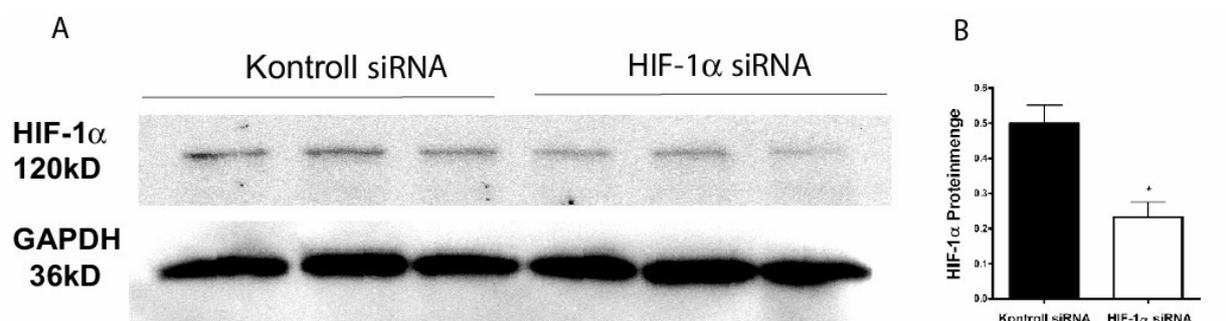


Abb. 13: Western Blot Analyse von Karotiden aus ApoE-/- Mäusen 4 Wochen nach Verletzung und einer Kontroll- oder HIF-1 α siRNA-Behandlung (A). Die densitometrischen Analysen von drei unabhängigen Experimenten zeigte eine 54%-ige Reduktion der HIF-1 α Proteinmenge in der Gefäßwand (B). Die Ergebnisse wurden auf das Referenzgen GAPDH normalisiert (B) *P<0,05.

3. 6. 2. 2. Quantitative Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenzfärbung für HIF-1 α 4 Wochen nach Gefäßverletzung in Kontroll siRNA-transfizierten Mäusen zeigte eine gesteigerte zytoplasmatische und nukleäre HIF-1 α Expression sowohl in den medialen als auch in den neointimalen und luminalen Zellen (Abb. 14 A). Dieses Muster der HIF-1 α Färbung entspricht den Ergebnissen, die mittels Immunfluoreszenz 2 Wochen nach Verletzung ohne siRNA-Applikation gewonnen wurden. (Abb. 7 D, 10 E). Nach HIF-1 α siRNA Behandlung war dagegen die HIF-1 α -spezifische Fluoreszenz kaum erkennbar (Abb. 14 B). Die Quantifizierung der HIF-1 α -positiven Neointimafläche 4 Wochen nach der Drahtverletzung zeigte in den HIF-1 α siRNA-behandelten CCA eine 82%-ige Reduktion (Abb. 14 C) verglichen mit den Kontroll siRNA-transfizierten Mäusen ($0,11 \pm 0,05$ vs. $0,64 \pm 0,04$ HIF-1 α /Neointima Ratio, $n=3$, $**P<0,01$).

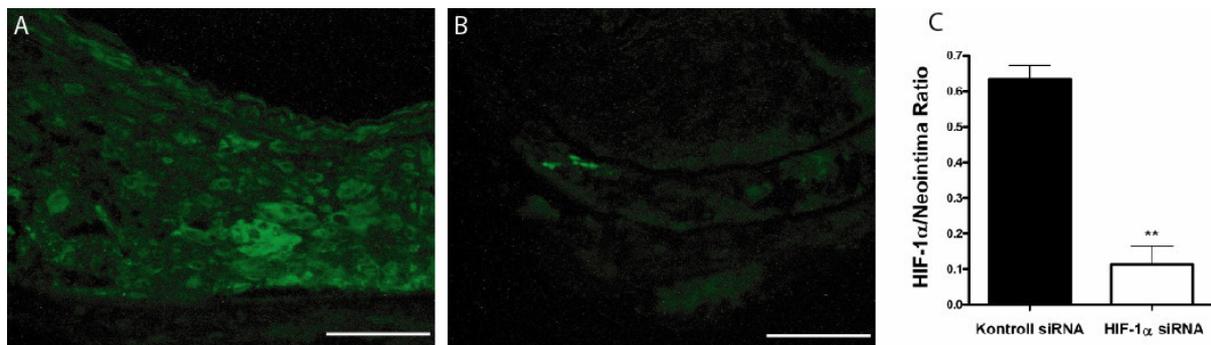


Abb. 14: Hemmung der HIF-1 α -Expression nach Gefäßverletzung durch spezifische HIF-1 α siRNA-Applikation. Immunfluoreszenzfärbungen für HIF-1 α zeigten ein starkes HIF-1 α Signal in den medialen und neointimalen SMCs 4 Wochen nach Gefäßverletzung in der Kontroll siRNA Gruppe (A). In den HIF-1 α siRNA-behandelten Mäusen wies HIF-1 α eine wesentlich schwächere Fluoreszenz auf (B). Maßstab, 25 μ m. Die planimetrische Quantifizierung ergab eine Reduktion der HIF-1 α -positiven neointimalen Fläche um 82% (C). $**P<0,01$.

3. 6. 3. Effekt von HIF-1 α siRNA Gentransfer auf die SDF-1 α Expression

Um die Wirkung von HIF-1 α siRNA Gentransfer auf die SDF-1 α Expression zu untersuchen, wurden weitere quantitative Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Das SDF-1 α -spezifische Signal in den medialen und neointimalen Zellen 4 Wochen nach Gefäßverletzung war in den Kontroll siRNA-behandelten Mäusen wesentlich stärker (Abb. 15 A) als nach HIF-1 α siRNA Behandlung (Abb. 15 B). Die planimetrische Quantifizierung zeigte eine signifikante Reduktion der SDF-1 α Expression um 78% nach HIF-1 α siRNA Behandlung im Vergleich zu Kontroll siRNA-behandelten Mäusen ($0,56 \pm 0,03$ vs. $0,12 \pm 0,002$ SDF-1 α /Neointima Ratio; $n=3-5$, $***P<0,001$) (Abb. 15 C).

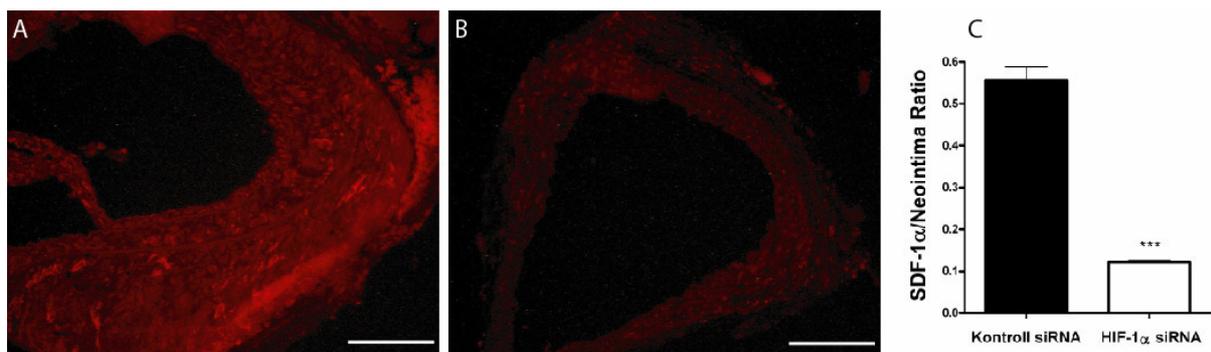


Abb. 15: Hemmung der SDF-1 α Expression nach Gefäßverletzung durch spezifische HIF-1 α siRNA-Applikation. Die Immunfluoreszenzfärbungen für SDF-1 α zeigten ein starkes SDF-1 α Signal in den medialen und neointimalen SMCs 4 Wochen nach Gefäßverletzung in der Kontroll siRNA Gruppe (A). In den HIF-1 α siRNA-behandelten Mäusen wies SDF-1 α eine wesentlich schwächere Fluoreszenz auf (B). Maßstab, 50 μ m. Die planimetrische Quantifizierung ergab eine Reduktion der SDF-1 α positiven neointimalen Fläche um 78% (C). $***P<0,001$.

3. 6. 4. Effekt von HIF-1 α siRNA Gentransfer auf die SPCs Mobilisierung

SDF-1 α ist entscheidend für die Mobilisierung von Sca-1 $^+$ /lin $^-$ Zellen in die Zirkulation nach Gefäßverletzung.³²

Um zu untersuchen, ob HIF-1 α an der Mobilisierung der Sca-1⁺/lin⁻ Zellen beteiligt ist, wurden diese Zellen durchflusszytometrisch im peripheren Blut von HIF-1 α siRNA-behandelten Mäusen 24 h nach Verletzung der CCA quantifiziert.

Im Vergleich zur Kontroll siRNA Behandlung, reduzierte die Applikation von HIF-1 α siRNA den Anteil an zirkulierenden Sca-1⁺/lin⁻ SPCs in der mononukleären Zellpopulation des peripheren Bluts nach Gefäßverletzung um 65% ($1,8 \pm 0,3\%$ vs. $0,62 \pm 0,12\%$ von mononukleären Zellen, n=3, *P<0,05) (Abb. 16 A-C). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die gesteigerte HIF-1 α Expression nach Verletzung vermittelt durch SDF-1 α die Mobilisierung von SPCs induziert.

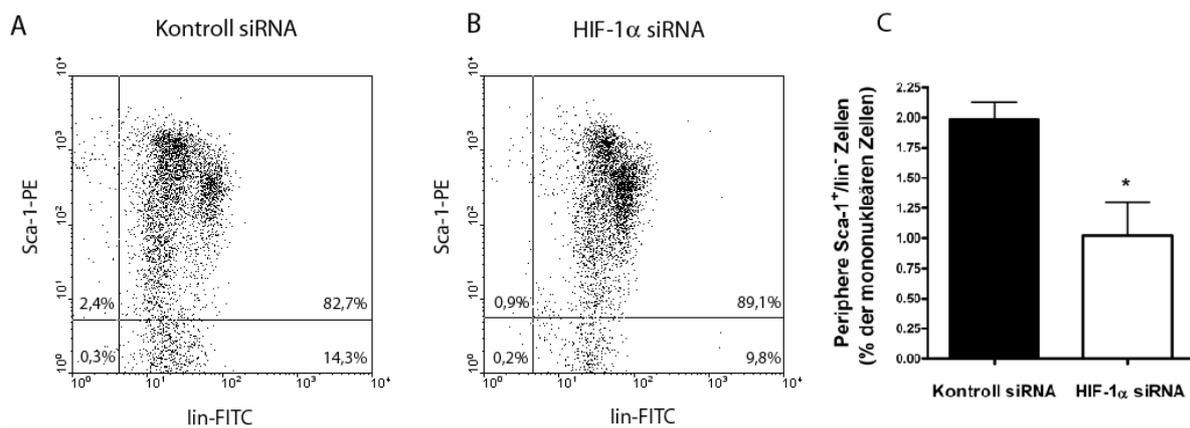


Abb. 16: Hemmung der Sca-1⁺/lin⁻ SPCs Mobilisierung nach HIF-1 α siRNA-Behandlung einen Tag nach Gefäßverletzung (A-B). Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse für den Anteil Sca-1⁺/lin⁻ Zellen im peripheren Blut in Kontroll- (A) und HIF-1 α siRNA-behandelte Mäusen (B). Insgesamt zeigte sich, dass nach HIF-1 α siRNA Gentransfer der Anteil der peripheren SPCs Sca-1⁺/lin⁻ signifikant um 65% reduziert war (C). Aufgetragen ist der durchschnittliche Prozentanteil von Sca-1⁺/lin⁻ Zellen in der mononukleären Zellfraktion (C). *P<0,05.

3. 6. 5. Effekt von HIF-1 α siRNA Gentransfer auf die Neointimabildung

Mit der Methode des Gentransfers von spezifischen HIF-1 α siRNA kann man die funktionelle Relevanz des Transkriptionsfaktors HIF-1 α hinsichtlich der Neointimabildung nach

Gefäßverletzung untersucht werden. Dazu wurden die entstehende neointimale Läsion und die mediale Fläche in Kontroll siRNA- (Abb. 17 A) und in HIF-1 α siRNA- (Abb. 17 B) behandelten Mäusen 4 Wochen nach Gefäßverletzung morphologisch analysiert.

In den histologischen Schnitten der CCA lässt sich 4 Wochen nach Verletzung eine Abnahme der neointimalen Fläche in HIF-1 α siRNA-behandelten Mäusen erkennen (Abb. 17) Die planimetrische Quantifizierung zeigte, dass nach Kontroll siRNA Behandlung die Fläche der Neointima $0,015 \pm 0,003 \text{ mm}^2$ (n=5) betrug. Die Behandlung der linken CCA mit HIF-1 α siRNA führte zu einer Reduktion der Neointimaformation um 49% auf $0,007 \pm 0,002 \text{ mm}^2$ (n=5, *P<0,05) (Abb. 17 C). Die mediale Fläche war dagegen nicht statistisch signifikant verändert ($0,05 \pm 0,007 \text{ mm}^2$ n=5 vs. $0,06 \pm 0,014 \text{ mm}^2$ mediale Fläche, n=5, P=NS) (Abb. 17 D).

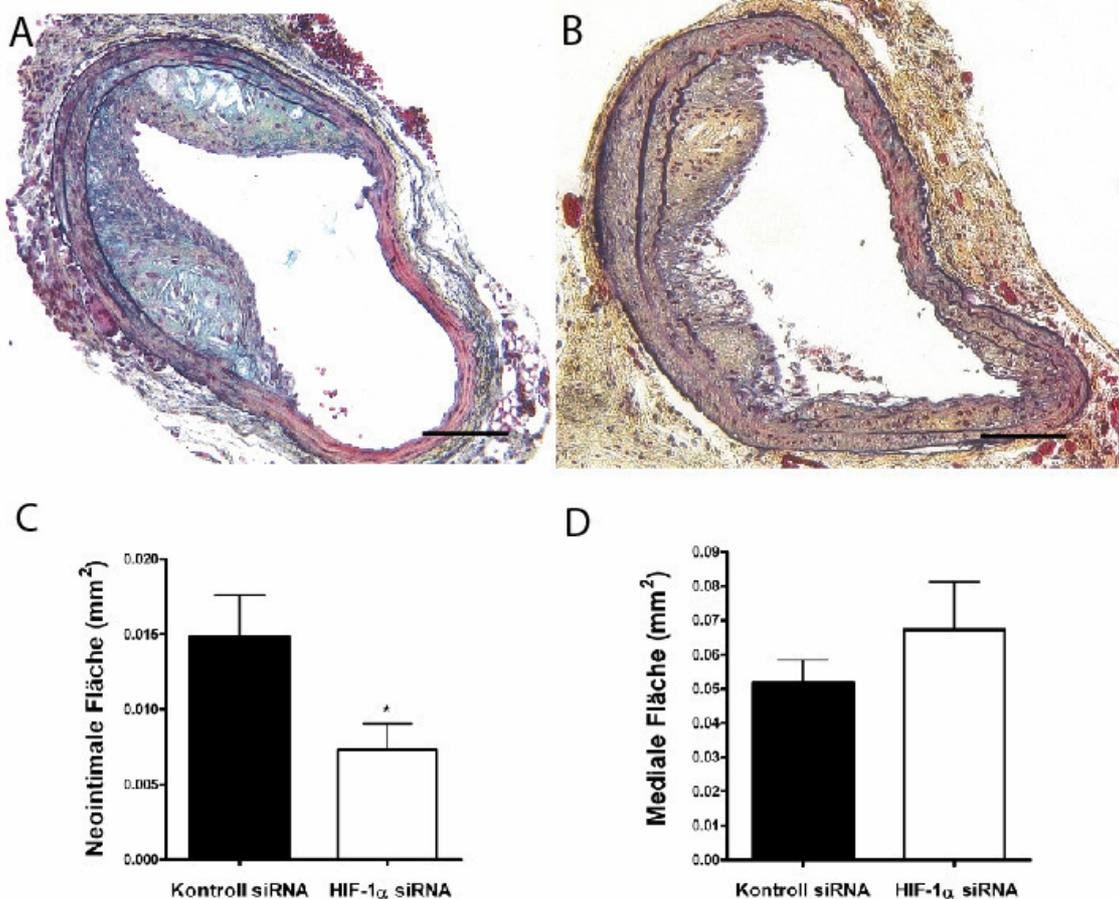


Abb. 17: Hemmung der Neointimabildung durch HIF-1 α siRNA Gentransfer 4 Wochen nach Drahtverletzung im ApoE^{-/-} Mausmodell. Gezeigt sind repräsentative mit Movat's Pentachrome angefärbten Schnitte der CCA nach Kontroll siRNA- (A) und HIF-1 α siRNA Applikation (B). Maßstab, 100 μ m. (C) Die quantitative Auswertung der Neointimafläche zeigte eine 49%-ige Reduktion in HIF-1 α siRNA-behandelten Mäusen, im Vergleich zur Kontrollgruppe. *P<0,05. Die mediale Fläche war demgegenüber nicht statistisch signifikant vermindert (D). P=NS.

3. 6. 6. Effekt von HIF-1 α siRNA Gentransfer auf die zelluläre Zusammensetzung der Neointima

Um die zelluläre Zusammensetzung der Neointima nach Kontroll- und HIF-1 α siRNA Behandlung zu analysieren, wurden quantitative immunhistologische Färbungen für α -SMA (Abb. 18, A-D) als spezifischer Marker für SMCs und Mac-2 (Abb. 18, E-H) als spezifischer Marker für Makrophagen/Monozyten, durchgeführt. Die planimetrische Ausmessung zeigte, dass der neointimale SMC Anteil 4 Wochen nach Verletzung in der Kontrollgruppe 40% betrug und in HIF-1 α siRNA-behandelten Mäusen signifikant um 58% reduziert war ($0,4 \pm 0,03$ vs. $0,23 \pm 0,04$, n=5 α -SMA/Neointima Ratio, **P<0,01) (Abb. 18 D). Der neointimale Anteil der Makrophagen war dagegen nicht statistisch signifikant verändert ($0,15 \pm 0,04$ vs. $0,16 \pm 0,02$ Mac-2/Neointima Ratio, n=5, P=NS) (Abb. 18 H).

Die geringfügige Hintergrundreaktion bei den Negativkontrollen (Abb. 18 A und E) belegt die Spezifität der immunhistologischen Färbungen für α -SMA (Abb. 19 A-B) und Mac-2 (Abb. 19 C-D). Als Positivkontrollen wurde α -SMA in unverletzten Karotiden (Abb. 19 B) und Mac-2 (Abb. 19 D) in der Milz angefärbt. Im Vergleich zu den entsprechenden Negativkontrollen (Abb. 19 A und C) zeigte sich in beiden Fällen deutlich eine spezifische Färbung (Abb. 19 B und D).

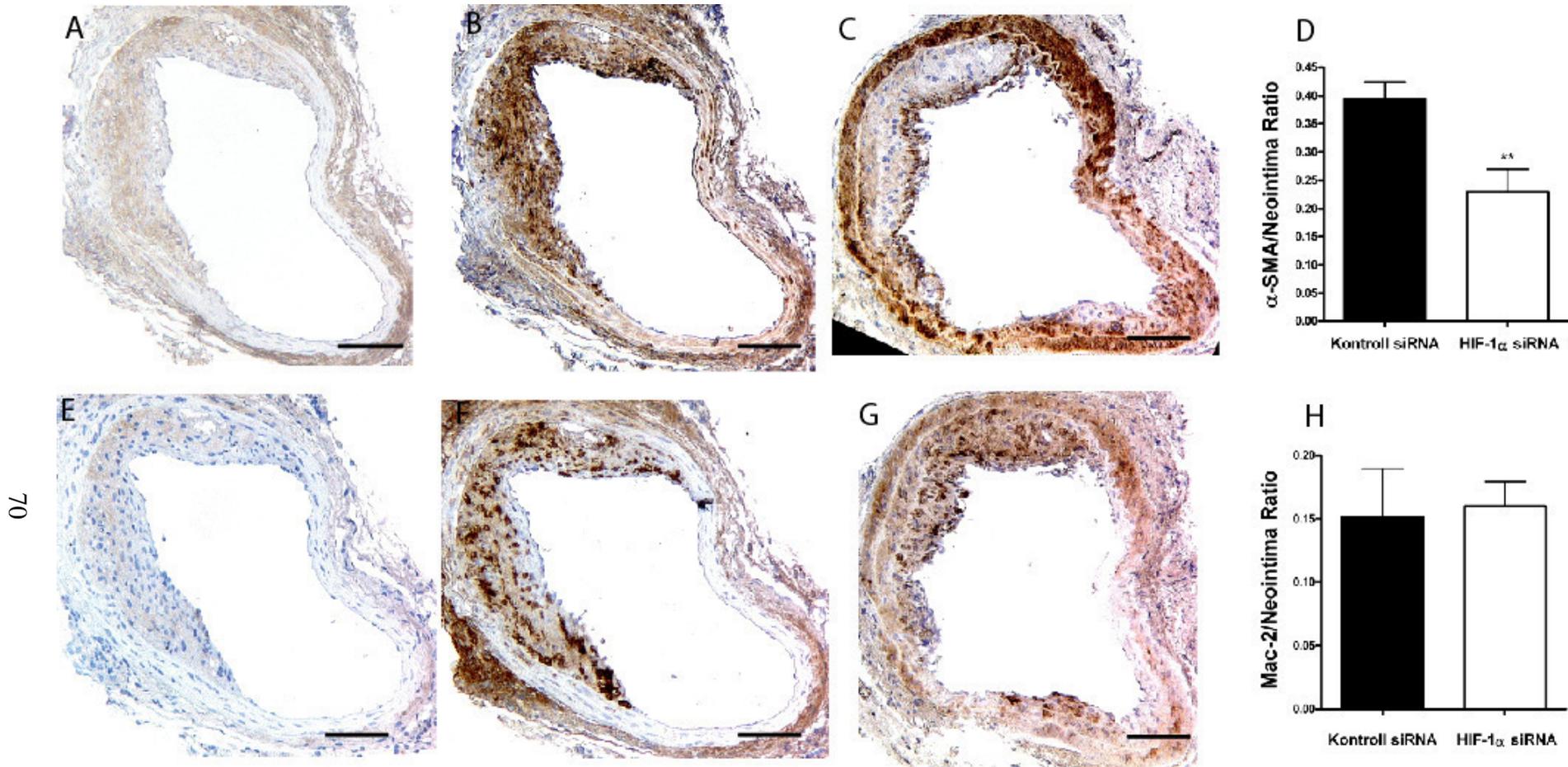


Abb. 18: Effekt von HIF-1 α siRNA auf die zelluläre Zusammensetzung der Neointima. Es wurden immunhistochemische Färbungen für α -SMA (B und C) und Mac-2 (F und G) 4 Wochen nach Drahtverletzung in HIF-1 α siRNA- (C und G) und Kontroll siRNA- (B und F) behandelten Mäusen durchgeführt. Der neointimale SMC-Anteil wurde nach der HIF-1 α siRNA Applikation um 58% reduziert (D). **P<0,01. Die Immunhistochemische Färbungen für Mac-2 zeigten einen unveränderten neointimalen Makrophagenanteil, bezogen auf die ausgewertete positive neointimale Mac-2 Färbung (H). Die Ergebnisse wurden ausgewertet als Verhältnis der α -SMA- (D) und Mac-2- (H) positiven Neointimafläche zur gesamten Neointimafläche. Die Negativkontrollen zeigten eine sehr geringe Hintergrundreaktion (A und E). Maßstab, 100 μ m.

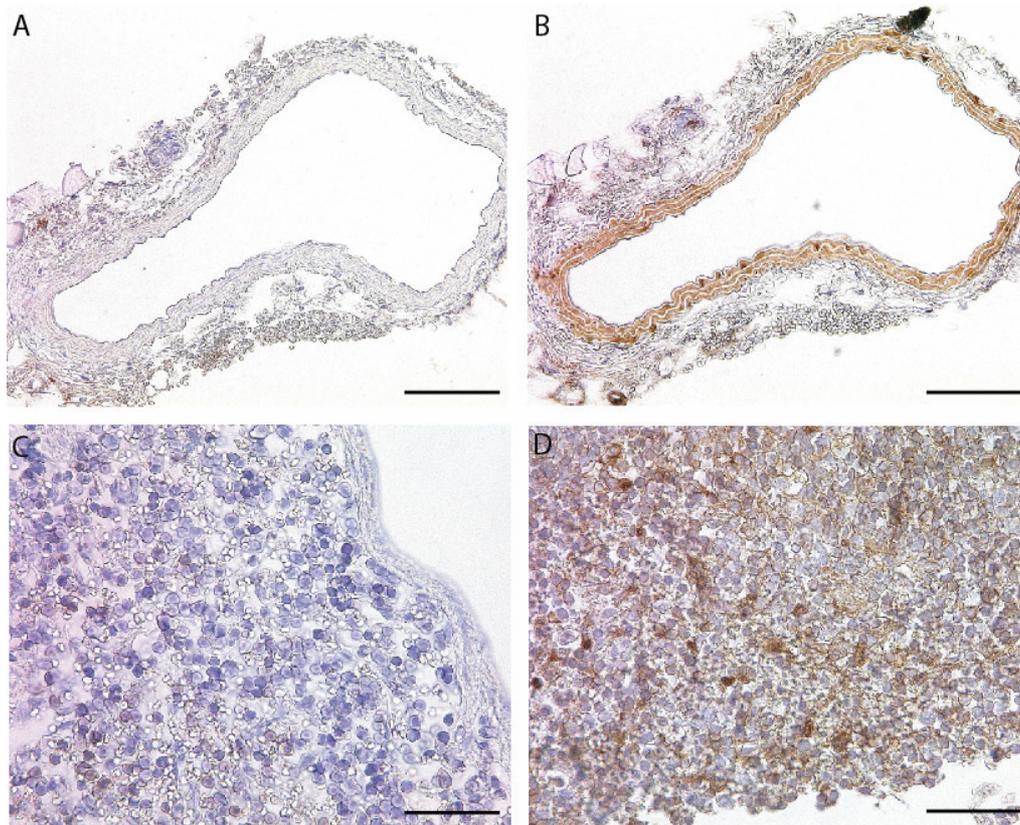


Abb. 19: Als Positivkontrollen wurden immunhistochemische Färbungen für α -SMA (A und B) und Mac-2 (C und D) in unverletzten Karotiden (A und B) und in der Milz (C und D) durchgeführt. Während in der Negativkontrolle (A) eine geringe α -SMA Färbung zu erkennen ist, zeigte sich in den Positivkontrollen ein starkes α -SMA Signal in medialen Zellen (B). Maßstab, 50 μ m. In der Negativkontrolle für Mac-2 war fast keine unspezifische Hintergrundfärbung erkennbar (C), während in den Positivkontrollen zahlreiche Mac-2 positive Zellen in der Milz nachweisbar waren. (D). Maßstab, 25 μ m.

3. 7. Beteiligung der SDF-1 α /CXCR4 Achse bei der Neointimabildung durch Lysophosphatidsäure

Es ist bekannt, dass eine kurzfristige intraluminale Exposition von Arterien mit ungesättigten LPAs zu einer Neointimabildung führt.^{65,66}

Um die funktionelle Bedeutung von SDF-1 α und dessen Rezeptor CXCR4 bei der Neointimabildung durch ungesättigte Lysophosphatidsäuren (LPAs) zu untersuchen, wurden

zunächst die Karotiden von C57Bl6 Wildtyp-Mäusen intraluminal mit LPA 20:4 behandelt, ohne dass die Arterien verletzt wurden. Anschließend erfolgte eine systemische Behandlung der Mäuse über 4 Wochen entweder mit dem CXCR4 Antagonisten POL5551 oder Kontrollpuffer (PBS). Die neointimale Fläche wurde dann in beiden Versuchsgruppen morphologisch analysiert. Die Quantifizierung ergab eine signifikante Reduktion der neointimalen Fläche in Mäusen, die mit dem CXCR4 Antagonisten behandelt wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe (20:4/PBS) ($0,0062 \pm 0,002 \text{ mm}^2$ vs. $0,0003 \pm 0,0002 \text{ mm}^2$ neointimale Fläche, $n=5$, $**P<0,01$) (Abb. 20 C). Die mediale Fläche war nach POL5551 Applikation ($0,025 \text{ mm}^2 \pm 0,0014 \text{ mm}^2$ vs. $0,020 \pm 0,0024 \text{ mm}^2$ mediale Fläche, $n=4-5$, $P=NS$) (Abb. 20 D) nicht signifikant verschieden von der Kontrollgruppe (20:4/PBS).

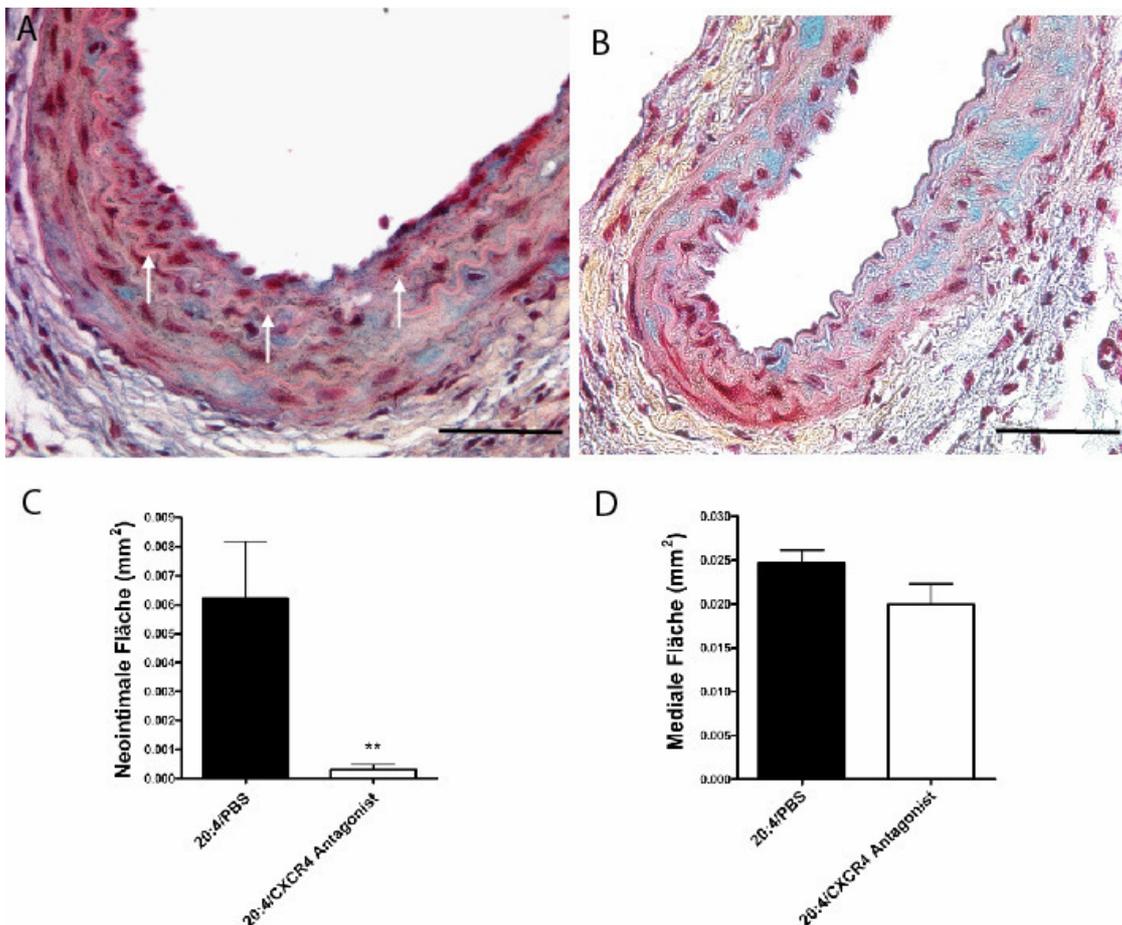


Abb. 20: Hemmung der LPA-induzierten Neointimabildung durch Behandlung mit einem CXCR4 Antagonisten. Nach 30-minütiger Exposition der CCA mit LPA 20:4 und täglicher Injektion von PBS (Kontrollgruppe) zeigte sich nach 4 Wochen eine Neointimabildung (A). Dagegen war in Mäusen, die nach der LPA 20:4 Exposition über 4 Wochen mit dem CXCR4 Antagonisten POL5551 behandelt wurden, fast keine Neointima erkennbar (B).

Die Pfeile kennzeichnen die Lamina elastica interna. Maßstab, 50 μm . (C) Im Vergleich zu der Kontrollgruppe (20:4/PBS) zeigte die quantitative Auswertung in POL5551-behandelten Mäusen eine 95%-ige Reduktion der neointimalen Fläche. $**P < 0,01$. Die mediale Fläche war demgegenüber nicht statistisch signifikant vermindert (D). $P = \text{NS}$.

3. 8. Einfluss von CXCR4 auf die Mobilisierung von SPCs durch Lysophosphatidsäure

Es ist bekannt, dass die ungesättigte Lysophosphatidsäure LPA 20:4 nach luminaler Exposition der CCA zu einer Mobilisierung von $\text{Sca-1}^+/\text{lin}^-$ Zellen führt, ähnlich wie nach einer mechanischen Gefäßverletzung. Da nach einer Drahtverletzung die $\text{SDF-1}\alpha/\text{CXCR4}$ Achse entscheidend an dieser Mobilisierung von SPCs beteiligt ist, wurde die Rolle von CXCR4 bei der LPA-vermittelten SPC Mobilisierung untersucht. Nach einer 30-minütigen endoluminalen Inkubation der CCA in C57/Bl6 Mäusen kommt es nach 24 h zu einem deutlichen Anstieg der zirkulierenden $\text{Sca-1}^+/\text{lin}^-$ Zellen ($1,3 \pm 0,22\%$ der mononukleären Zellen, $n=5$, $*P < 0,05$) im Vergleich zu unbehandelten Mäusen ($0,67 \pm 0,14\%$ der mononukleären Zellen, $n=5$) (Abb. 21). Wurde nach der LPA 20:4 Behandlung zusätzlich der CXCR4-Antagonist POL5551 systemisch appliziert konnte die Mobilisierung der $\text{Sca-1}^+/\text{lin}^-$ Zellen fast vollständig blockiert werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die LPA 20:4-induzierte SPC Mobilisierung durch die $\text{SDF-1}\alpha/\text{CXCR4}$ Achse vermittelt ist (Abb. 21).

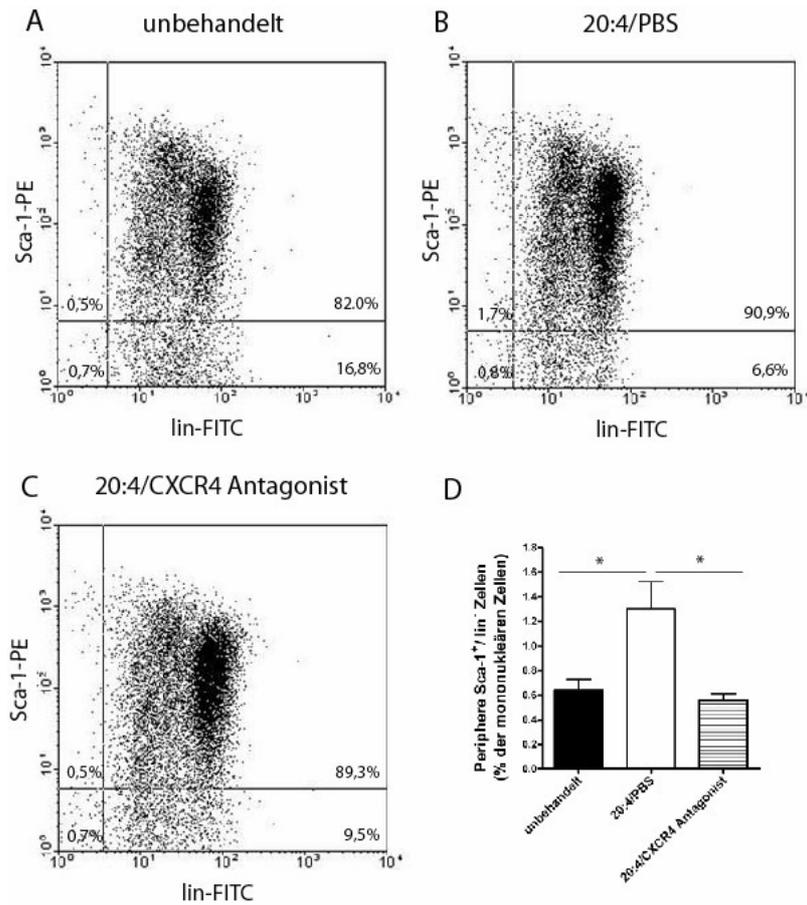


Abb. 21: Die Mobilisierung von Sca-1⁺/lin⁻ Zellen durch LPA 20:4 wird durch einen CXCR4 Antagonisten blockiert. Im Vergleich zu unbehandelten Mäusen (A) war 24 h nach einer 30-minütigen Inkubation der CCA mit LPA 20:4 der Anteil zirkulierender Sca-1⁺/lin⁻ Zellen deutlich angestiegen (B). Dieser LPA 20:4-induzierte Anstieg nach 24 h konnte durch Behandlung mit dem CXCR4 Antagonisten POL5551 deutlich reduziert werden (C, D). *P<0,05 im Vergleich zu unbehandelten CCAs und 20:4/CXCR Antagonist.

3. 9. CXCR4 ist beteiligt an der Akkumulation von CXCR4-positiven SMCs nach LPA 20:4 Applikation

Es ist bekannt, dass die neointimalen CXCR4-positiven SMCs bei der Transplantatarteriopathie in erster Linie von zirkulierenden Vorläuferzellen abstammen.⁴⁸ Deshalb wurde die CXCR4 Expression in den vaskulären SMCs nach LPA 20:4 Behandlung der CCA durch Doppelimmunfluoreszenzfärbungen für CXCR4 und α -SMA untersucht. Vier Wochen nach der lokalen LPA 20:4 Applikation zeigten die Ergebnisse eine deutliche CXCR4 Expression vor allem in den neointimalen α -SMA-positiven Zellen (SMCs) (Abb. 22

A-C). Im Vergleich dazu war unter Behandlung mit dem CXCR4 Antagonisten POL5551 die CXCR4 Expression in α -SMA-positiven Zellen und die Zahl an CXCR4-positiven SMCs in der Gefäßwand vermindert (Abb. 22 D-F). Die Intensität und Verteilung der CXCR4 Expression in vaskulären SMCs war damit nach CXCR4 Blockade in LPA 20:4-behandelten Zellen nahezu identisch zu der in unbehandelten CCAs beobachteten Färbung (Abb. 22 G-I).

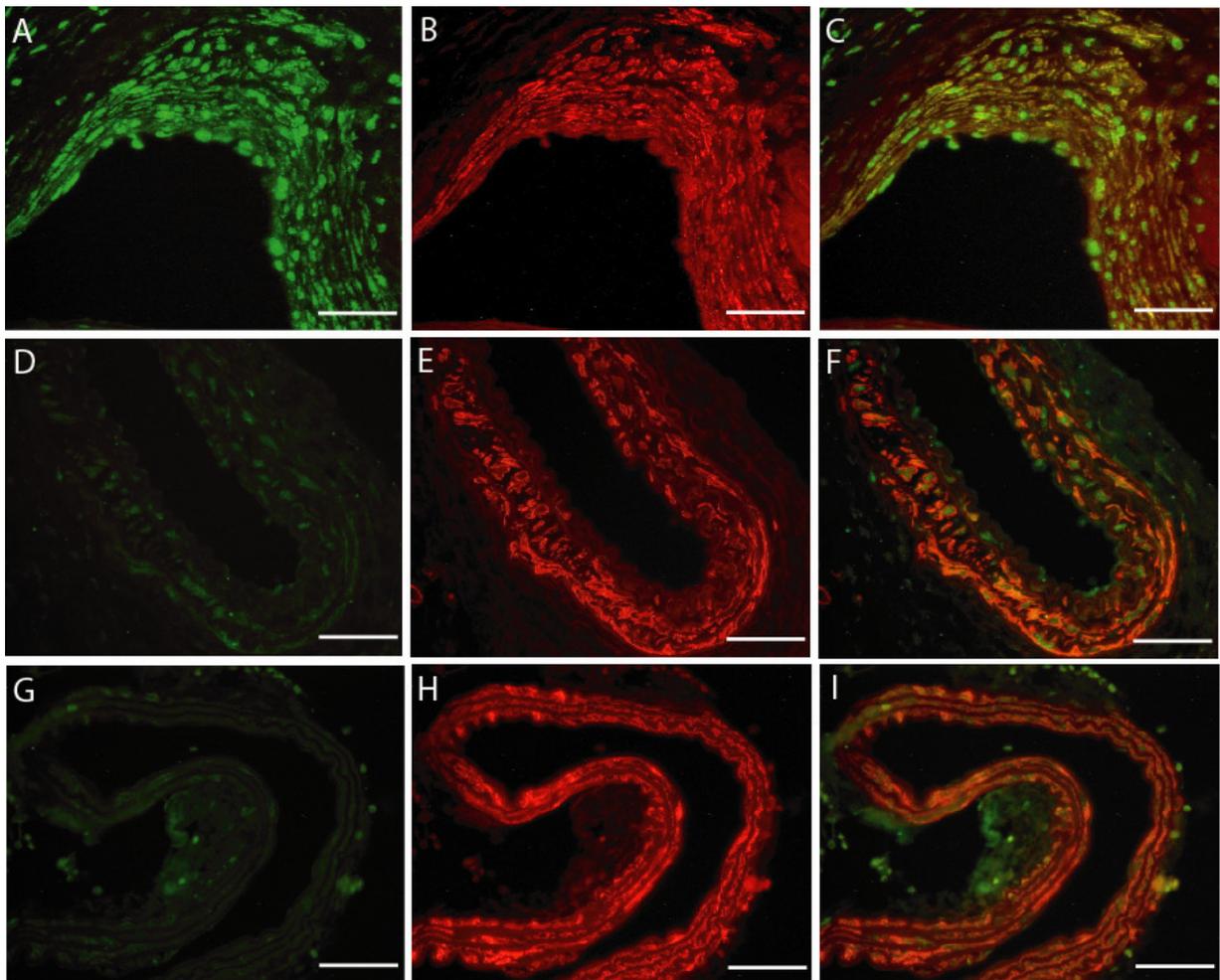


Abb. 22: Die Akkumulation von CXCR4 exprimierenden SMCs nach LPA 20:4 Applikation wird verringert durch Behandlung mit einem CXCR4 Antagonisten. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen für CXCR4 (grün, A, D und G) und α -SMA (rot, B, E und H) 4 Wochen nach LPA 20:4/PBS- (A-C), nach LPA 20:4/CXCR4 Antagonist Behandlung (D-F) und in unbehandelten CCAs (G-I) zeigen, dass es nach LPA 20:4 Inkubation zu einer Anreicherung von CXCR4-positiven SMCs in der Neointima kommt (A-C). In den POL5551-behandelten Mäusen dagegen war die CXCR4 Expression in den SMCs deutlich reduziert (D-F), ähnlich wie in der unbehandelten Kontrollgruppe (G-I). Die Overlay-Färbungen (C, F und I) zeigen die zelluläre Kollokalisation von CXCR4 und α -SMA (gelbe Farbe). Maßstab, 50 μ m.

3. 10. Blockade von LPA-Rezeptoren reduziert die Neointimabildung nach Gefäßverletzung

Eine Beteiligung von LPA an der Neointimabildung nach mechanischer Gefäßverletzung ist bisher nicht untersucht worden. Es wurden deshalb ApoE^{-/-} Mäuse nach Drahtverletzung der CCA mit einem systemisch applizierten Antagonisten der LPA₁ und LPA₃ Rezeptoren Ki16425 (3-(4-[4-([1-(2-chlorophenyl)ethoxy]carbonyl amino)-3-methyl-5-isoxazolyl]benzylsulfanyl) Propansäure) behandelt und der Effekt auf die Neointimabildung ausgewertet. Die Quantifizierung der Neointimafläche zeigte 4 Wochen nach der Gefäßverletzung eine 60%-ige Reduktion in Mäusen, die mit Ki16425 behandelt wurden ($0,0077 \pm 0,002 \text{ mm}^2$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($0,019 \pm 0,003 \text{ mm}^2$, *P<0,05, n=4) (Abb. 23 C). Die mediale Fläche war nach Ki16425 Applikation nicht signifikant verschieden von der Kontrollgruppe ($0,034 \pm 0,002 \text{ mm}^2$ vs. $0,033 \pm 0,003 \text{ mm}^2$ mediale Fläche, n=4, P=NS) (Abb. 23 D).

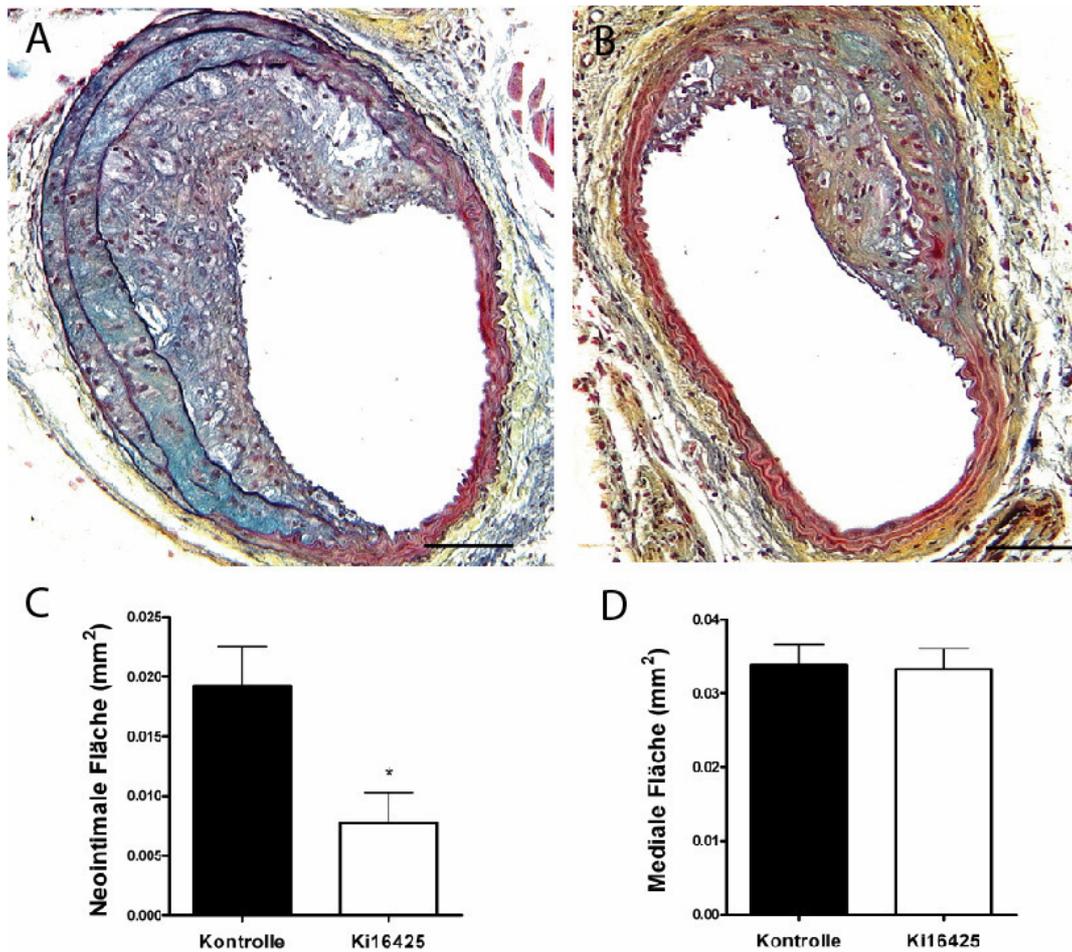


Abb. 23: Hemmung der Neointimabildung durch den LPA_{1/3} Rezeptorantagonisten Ki16425 nach Gefäßverletzung im ApoE^{-/-} Mausmodell. Die Morphometrie der histologischen Schnitte zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe (A) eine deutlich verminderte neointimale Fläche in Ki16425-behandelten Mäusen (B) Maßstab, 100 μ m. (C) Die quantitative Auswertung zeigte eine 60%-ige Reduktion der Neointimafläche durch Ki16425 im Vergleich zur Kontrollgruppe. *P<0,05. Die mediale Fläche war demgegenüber nicht statistisch signifikant vermindert (D). P=NS.

3. 11. LPA Rezeptoren regulieren die SDF-1 α und HIF-1 α Expression nach Gefäßverletzung

Da ungesättigte LPAs die Expression von SDF-1 α und HIF-1 α in der Gefäßwand induzieren und die Neointimabildung durch LPA 20:4 über die SDF-1 α /CXCR4 Achse vermittelt wird, stellt sich die Frage, ob die LPA-Rezeptoren bei der Neointimabildung nach Gefäßverletzung auch an der gesteigerten HIF-1 α -abhängigen Expression von SDF-1 α beteiligt sind.

Um die Wirkung von LPA auf die SDF-1 α - und HIF-1 α Expression nach Gefäßverletzung zu untersuchen, wurden weitere quantitative Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung mit Ki16425 4 Wochen nach Gefäßverletzung zu einer Abnahme der SDF-1 α - (Abb. 24 A-C) und HIF-1 α (Abb. 24 D-F) Expression in den medialen und neointimalen Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe führt. Die planimetrische Quantifizierung zeigte eine signifikante 90%-ige Reduktion der SDF-1 α Expression ($0,64 \pm 0,035$ vs. $0,05 \pm 0,03$ SDF-1 α /Neointima Ratio; n=4-5, ***P<0,0001) (Abb. 24 C) und eine 70%-ige Reduktion der HIF-1 α Expression ($0,63 \pm 0,05$ vs. $0,20 \pm 0,04$ HIF-1 α /Neointima Ratio; n=4-5, ***P<0,0001) durch Ki16425 (Abb. 24 D).

Die Hemmung der HIF-1 α -abhängigen SDF-1 α Expression durch Ki16425 deutet auf eine zentrale Rolle von LPAs bei der Neointimabildung nach Gefäßverletzung hin.

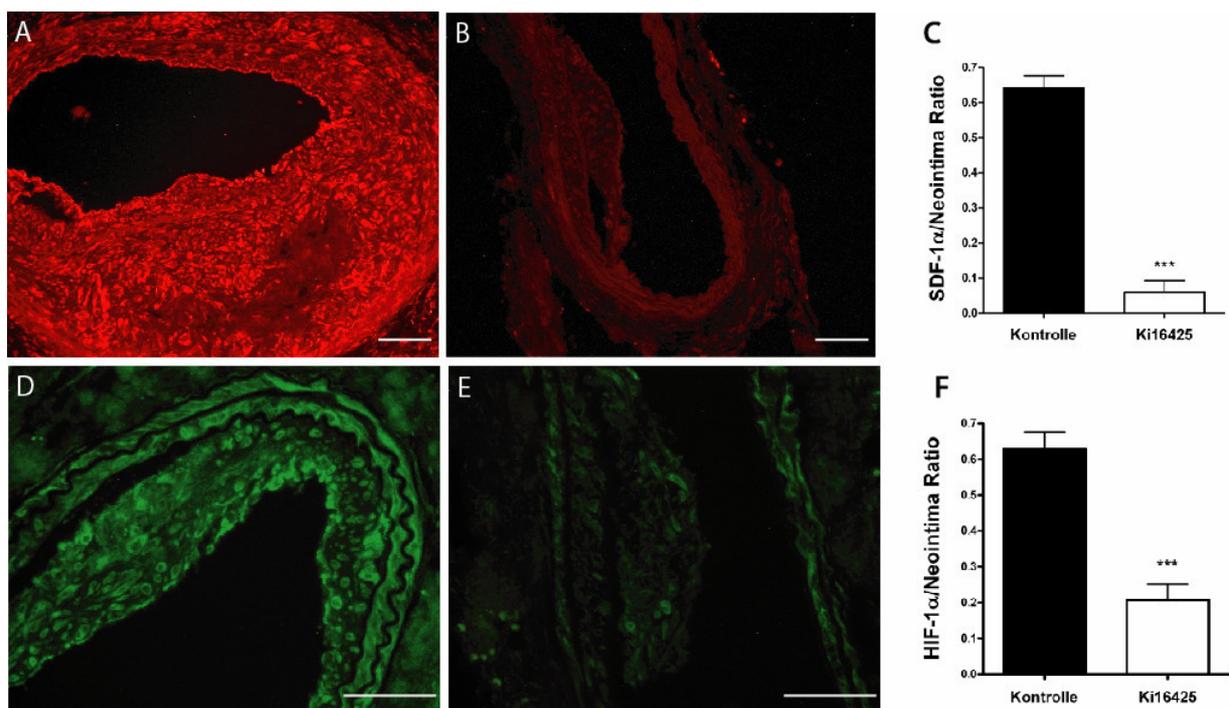


Abb. 24: Einfluss von Ki16425 auf die neointimale SDF-1 α - und HIF-1 α Expression nach Gefäßverletzung. In der Immunfluoreszenzmikroskopie zeigte sich eine prominente SDF-1 α - (A) und HIF-1 α (D) Färbung in den medialen und neointimalen Zellen 4 Wochen nach Gefäßverletzung in ApoE $^{-/-}$ Mäusen, die mit Kontrollpuffer behandelt wurden. Die Behandlung mit Ki16425 dagegen führte zu einer deutlich verminderten SDF-1 α - (B) und HIF-1 α (E) Expression in der verletzten Gefäßwand. Die planimetrische Quantifizierung ergab eine 90%-ige SDF-1 α - (C, ***P<0,0001) und eine 70%-ige HIF-1 α Reduktion durch die Behandlung mit dem LPA $_{1/3}$ Rezeptorantagonisten (F, ***P<0,0001). Die Ergebnisse bei (C) und (F) wurden als Verhältnis der neointimalen

Fläche mit spezifischer Immunfluoreszenzfärbung zu der gesamten neointimalen Fläche dargestellt. Maßstab, 50µm.

3. 12. LPA Rezeptoren regulieren die SPCs Mobilisierung nach Gefäßverletzung

Um die funktionelle Beteiligung von LPAs an der SDF-1 α -abhängigen Mobilisierung von SPCs nach Gefäßverletzung zu untersuchen, wurde der Einfluss des LPA_{1/3} Rezeptorantagonisten Ki16425 auf den Anteil der zirkulierenden Sca-1⁺/lin⁻ Zellen untersucht.

Nach mechanischer Gefäßverletzung der CCA in ApoE^{-/-} Mäusen kommt es nach 24 h zu einem deutlichen Anstieg der zirkulierenden Sca-1⁺/lin⁻ Zellen im Vergleich zu unbehandelten Mäusen ($0,9 \pm 0,18\%$ vs. $0,24 \pm 0,05\%$ der mononukleären Zellen, n=4, *P<0,05) (Abb. 25).

Wurden die Mäuse zusätzlich zur Drahtverletzung mit Ki16425 behandelt, konnte die Mobilisierung der Sca-1⁺/lin⁻ Zellen fast vollständig blockiert werden ($0,3 \pm 0,14\%$ vs. $0,9 \pm 0,18\%$ mononukleären Zellen, n=4, **P<0,01) (Abb. 25). Dieser Befund weist auf eine wichtige Funktion von LPA Rezeptoren bei der Stammzell-vermittelten vaskulären Wundheilung durch SDF-1 α hin.

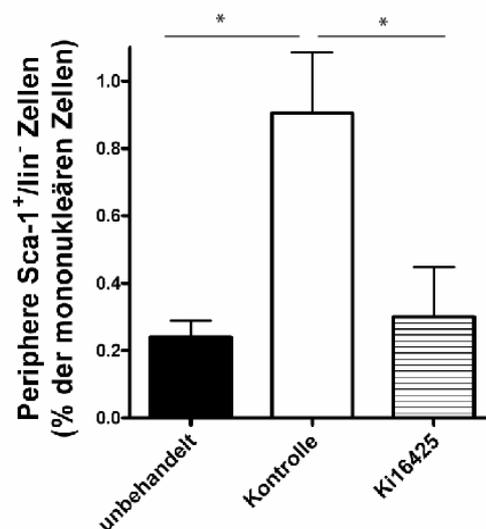


Abb. 25: Die Mobilisierung von Sca-1⁺/lin⁻ Zellen nach Gefäßverletzung wird durch den LPA_{1/3} Rezeptorantagonisten Ki16425 blockiert. Im Vergleich zu unbehandelten Mäusen war 24 h nach einer Drahtverletzung der Anteil zirkulierender Sca-1⁺/lin⁻ Zellen deutlich angestiegen (Kontrolle). Dieser Anstieg nach 24 h konnte durch Behandlung mit Ki16425 fast vollständig verhindert werden. *P<0,05 im Vergleich zu unbehandelten CCA und Kontrollgruppe.

4. Diskussion

Die SDF-1 α /CXCR4 Achse reguliert die Entstehung einer neointimalen Hyperplasie nach Gefäßverletzung durch die Rekrutierung von zirkulierenden Vorläuferzellen von SMCs (SPCs). Die verletzungsbedingte Apoptose der SMCs ist dabei wesentlich verantwortlich für die gesteigerte SDF-1 α Expression in der Gefäßwand. Allerdings ist unklar welche molekularen Mechanismen die Expression von SDF-1 α nach einer Gefäßverletzung regulieren. Unter hypoxischen Bedingungen ist der Transkriptionsfaktor HIF-1 α entscheidend für die Induktion von SDF-1 α . Ferner ist bekannt, dass ungesättigte Lysophosphatidsäuren die SDF-1 α und HIF-1 α Expression steigern und nach kurzfristiger lokaler Inkubation von unverletzten Arterien eine Neointima aus SMCs induzieren können. So dass in der vorliegenden Arbeit die Hypothese geprüft wurde, ob ungesättigte LPAs durch eine Aktivierung von HIF-1 α die SDF-1 α -abhängige Neointimabildung und SPC Rekrutierung steuern.

Es zeigte sich, dass eine mechanische Gefäßverletzung zu einer gesteigerten Expression von HIF-1 α sowohl auf Protein- als auch auf mRNA Ebene führt. Die nukleäre Translokation von HIF-1 α in den neointimalen Zellen wies auf eine Aktivierung von HIF-1 α -abhängigen Signaltransduktionswegen hin. Ferner fand sich eine zelluläre Kolo-kalisation von HIF-1 α und SDF-1 α in neointimalen Zellen. Die Applikation einer siRNA gegen HIF-1 α führte nicht nur zu einer Reduktion der HIF-1 α -, sondern auch neointimalen SDF-1 α Expression und der SDF-1 α -abhängigen Mobilisierung von SPCs. Dies ging darüber hinaus einher mit einer deutlich verminderten neointimalen Fläche und einem verringerten neointimalen SMC Anteil. Ähnlich wie nach einer mechanischen Gefäßverletzung konnte auch die Mobilisierung von SPCs und die Neointimabildung nach Behandlung der unverletzten Arterienwand mit der ungesättigten LPA 20:4 durch einen CXCR4 Antagonisten blockiert werden. Der Anteil an CXCR4-positiven SMCs in der LPA-induzierten Neointima konnte ebenfalls durch den CXCR4 Antagonisten reduziert werden. Dass LPA auch an der Neointimabildung nach mechanischer Gefäßverletzung beteiligt ist, zeigen Experimente mit dem LPA_{1/3} Rezeptorantagonisten Ki16425. Die Behandlung mit Ki16425 verminderte die Neointimabildung, die neointimale HIF-1 α und SDF-1 α Expression.

Zusammenfassend zeigte sich, dass ungesättigte Lysophosphatidsäuren zu einer gesteigerten HIF-1 α -vermittelten SDF-1 α Expression führen, so dass in dieser Arbeit entscheidende Hinweise auf die Regulation von SDF-1 α nach Gefäßverletzung gewonnen werden konnten.

4. 1. Hypoxia-inducible factor (HIF-)1 α

4. 1. 1. Vaskuläre HIF-1 α Expression und Lokalisation nach Gefäßverletzung

Viele zelluläre Prozesse zur Adaptation an eine ungenügende Sauerstoffversorgung werden durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 reguliert.^{51,52} Die Aktivierung von HIF-1 führt zur gesteigerten Expression von zahlreichen Zielgenen, wie z. B. VEGF oder Erythropoietin, mit dem Effekt einer besseren Sauerstoffversorgung und anaeroben Energiegewinnung auf zellulärer und systemischer Ebene.^{51,52,90}

HIF-1 ist ein heterodimeres Protein, bestehend aus einer 120 kDa schweren α - und einer 91 bis 94 kDa schweren β -Untereinheit, die ubiquitär exprimiert werden. Beide Untereinheiten gehören zur PAS-Superfamilie, einer Gruppe von Sensorproteinen deren Name sich von den zuerst identifizierten Proteinen Per (Period), ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) und Sim (single-minded) ableitet (Abb. 26)⁵³⁻⁵⁵ und die v. a. auf Umwelt- und Entwicklungssignale spezialisiert sind.^{51,53} Die Untereinheiten enthalten basische helix-loop-helix Motive (bHLH), die für die Bindung der HIF-1 α/β -Proteine an die DNA verantwortlich sind. Die Dimerisierung von HIF-1 α und HIF-1 β erfolgt über die HLH-Domäne.

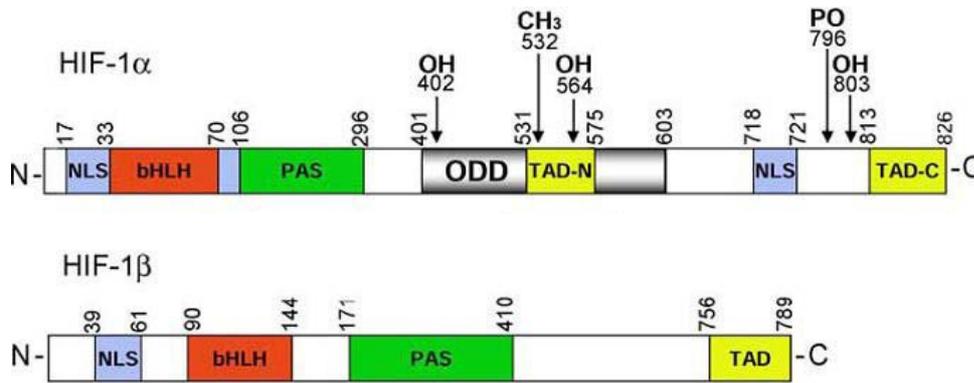


Abb. 26: Sekundärstruktur der HIF-1 α - und HIF-1 β -Proteine. Die Lokalisation der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)-, der Per-Arnt-Sim (PAS)- und der „oxygen-dependent degradation“ (ODD)-Domäne sind dargestellt. Hydroxylierungs-, Acetylierungs- und Phosphorylierungsstellen sind mit jeweils OH, CH₃ und mit PO markiert. Die Bindung des von-Hippel-Lindau (VHL)-Proteins erfolgt über die hydroxylierten Prolinreste 402 und 564 und ist der Ansatzort der Ubiquitinligase, die unter normoxischen Bedingungen HIF-1 α im Proteasom degradiert. Ferner sind die TAD-C-carboxy-terminale und die TAD-N-amino-terminale Transaktivierungsdomäne eingezeichnet.⁵⁷

Die Hydroxylierung der ODD (oxygen-dependent degradation domain)-Domäne unter normoxischen Bedingungen ermöglicht die Degradation von HIF-1 α (Abb. 26).⁹¹

Am C- und N-Terminus des HIF-1 α -Proteins befindet sich je eine Transaktivierungsdomäne (TAD-C bzw. TAD-N), die eine wichtige Rolle für die Initiation der Transkription der HIF-1 α -Zielgene spielen (Abb. 26). HIF-1 β enthält auch eine TAD, die aber für die HIF-1 Transkriptionsaktivität keine Bedeutung hat.⁵⁷

HIF-1 β wird konstitutiv exprimiert, unabhängig von der Sauerstoffversorgung und wurde auch als Dimerisierungspartner des Dioxin-Rezeptors (aryl hydrocarbon receptor, AhR) beschrieben.⁵⁶

Die α -Untereinheit (HIF-1 α) dagegen wird in Abhängigkeit von Sauerstoff reguliert und dient damit als zellulärer Sauerstoffsensoren. Die Expression des HIF-1 α Gens wird im Wesentlichen durch den Transkriptionsfaktor specificity protein-1 (Sp1) vermittelt, es gibt aber im Promoterbereich von HIF-1 α auch Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie activator protein-1 (AP-1), activator protein-2 (AP-2), nuclear factor-1 (NF-1) und nuclear factor- κ B (NF- κ B).⁵⁷

Das HIF-1 α Protein ist bei physiologischem Sauerstoffangebot sehr instabil mit einer Halbwertszeit von wenigen Minuten. In Anwesenheit von Sauerstoff wird HIF-1 α an zwei Prolinresten (Prolin 402 und 564) durch Prolyl-4-Hydroxylasen (PHD1, PHD2, PHD3) hydroxyliert und nach Bindung an Ubiquitin durch Proteasome abgebaut (Abb. 27).^{51,52} Unmittelbar nach Hydroxylierung der Proline bindet dort das „von Hippel-Lindau“ Protein (pVHL), ein Produkt des Hippel Lindau Tumorsuppressor-Genes⁹²⁻⁹⁴, das die Erkennung dieses Proteinkomplexes durch die E3-Ubiquitinligase ermöglicht.^{92,95} Die Bindung von VHL wird durch Acetylierung des Lysins (532, Abb. 26) über eine Acetyltransferase (ARD1) erleichtert.^{57,96} Der Multiproteinkomplex, bestehend aus E3-Ubiquitinligase und pVHL, polyubiquitiniert HIF-1 α , das daraufhin durch das Proteasom der Zelle abgebaut wird.⁹²

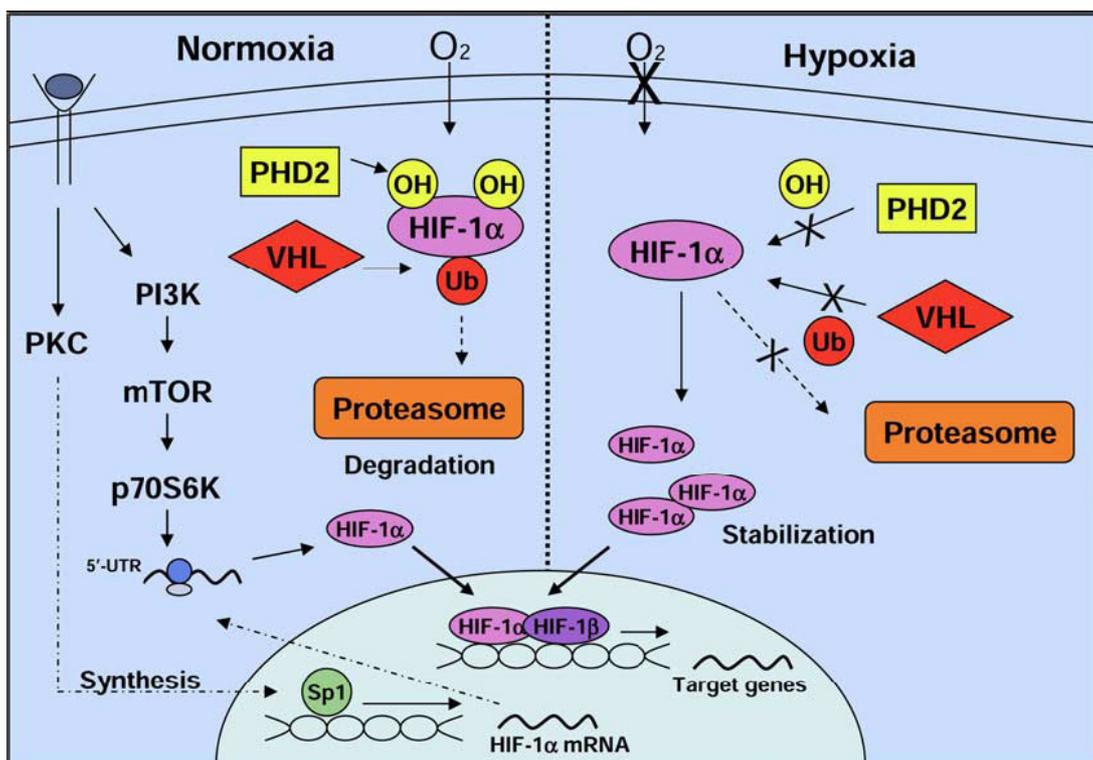


Abb. 27. Sauerstoff-abhängige und -unabhängige Regulation von HIF-1. Unter nicht-hypoxischen Bedingungen wird HIF-1 α durch die PHD2 hydroxyliert, durch pVHL Komplex ubiquitinyliert und über Proteasomen abgebaut. Im Gegensatz dazu wird HIF-1 α unter hypoxischen Bedingungen durch die fehlende Hydroxylierung stabilisiert und vermindert abgebaut. Nach nukleärer Translokation von HIF-1 kommt es zur transkriptionellen Aktivierung der HIF-1 α -Zielgene. Nicht-hypoxische Stimuli induzieren die HIF-1 α Gentranskription durch Stimulierung der PKC, während der HIF-1 Translation durch die Aktivierung des PI3K-Signalwegs bedingt ist. In beiden Fällen erhöht sich die HIF-1 Proteinmenge und dadurch die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 α .⁵⁷

Die Aktivierung von HIF-1 α erfolgt in der Regel unter Hypoxie. Da molekularer Sauerstoff für die Aktivität der Prolyl-4-Hydroxylasen essentiell ist, kann HIF-1 α unter hypoxischen Bedingungen folglich nicht abgebaut werden. Unter Hypoxie wird die Hydroxylierung der Prolinreste blockiert und die Acetylierung herunterreguliert, wodurch HIF-1 α stabilisiert wird.⁵⁷ Die intrazelluläre HIF-1 α Proteinmenge steigt an und HIF-1 α transloziert in den Zellkern (Abb. 27).^{51,52,57} Dort dimerisiert es mit HIF-1 β und bindet als HIF-1-Komplex an die DNA der Gene, die in ihrem Promoter hypoxia-responsive element (HRE) besitzen, wodurch die Expression dieser Zielgene induziert wird (Abb. 27).⁵⁸

Ferner wurde in einigen Studien gezeigt, dass an einer erhöhten transkriptionellen HIF-1-Aktivität auch eine Phosphorylierung von HIF-1 α beteiligt ist.^{87,97} Über die p42/p44 Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (p42/p44-MAPK) wird HIF-1 α an bislang nicht bekannten Aminosäureresten zeitlich schon vor der Translokation in den Kern phosphoryliert.⁹⁷

In den letzten Jahren häufen sich die Forschungsergebnisse über nicht-hypoxische Stimuli, wie z. B. vasoaktive Peptide oder Wachstumsfaktoren, die eine Akkumulierung von HIF-1 α und eine gesteigerte HIF-1-DNA-Bindung hervorrufen können.^{57,59,62,98}

Im Gegensatz zur hypoxischen Aktivierung, spielt die HIF-1 α Stabilisierung und damit die verminderte Degradation keine bedeutende Rolle bei der normoxischen HIF-1 Induktion, sondern es wird die HIF-1 Proteinsynthese sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationaler Ebene erhöht.^{57,59}

Es ist inzwischen bekannt, dass proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β) und der tumor necrosis factor- α (TNF- α) potente Effektoren einer normoxischen HIF-1 α -Aktivierung sind.⁹⁹ Während IL-1 β sowohl den HIF-1 α -Proteingehalt als auch die HIF-1-DNA-Bindungsaktivität erhöht, kommt es durch TNF- α nur zu einer gesteigerten HIF-1-DNA-Bindung.⁹⁹

Vasoaktive Peptide, wie Thrombin^{62,100} oder Angiotensin II^{59,62,100}, und Wachstumsfaktoren, wie PDGF-AB^{62,100} oder insulin-like growth factor-1/2 (IGF-1 und IGF-2)¹⁰¹, führen in VSMCs zu einem Anstieg der HIF-1 Proteinmenge.

Die Induktion von HIF-1 α durch Faktoren, wie Thrombin oder Angiotensin II, wird entscheidend durch reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS), wie Hydrogenperoxid vermittelt, die somit eine bedeutende Rolle bei der nicht-hypoxischen Regulation der HIF-1 α Expression spielen.^{98,100,102}

Intrazellulär erfolgt die gesteigerte Translation von HIF-1 α durch normoxischen Stimuli durch eine Aktivierung des Phosphoinositol 3-Kinase (PI3K)/mTOR-Signalweges (Abb. 27).^{57,59,60}

Neben einer gesteigerten Translation führen nicht-hypoxische Stimuli von HIF-1 α auch zu einer vermehrten Transkription in VSMCs durch eine Aktivierung des diacylglycerol-sensitive Proteinkinase C (PKC)-Signalweges.^{57,59} PKC aktiviert den Transkriptionsfaktor Sp1, von dem bekannt ist¹⁰³, dass für diesen Bindungsstellen im HIF-1 Promoter existieren.
104

Im Rahmen von Prozessen des vaskulären Remodelings ist HIF-1 α bisher als ein entscheidender Mediator bei der Neubildung von Blutgefäßen aus zirkulierenden Progenitorzellen (Vaskulogenese), bei der Ausbreitung bestehender Gefäßsysteme (Angiogenese), bei der Entwicklung von Arterien sowie bei Umbauvorgängen in Arterien, wie man sie bei der pulmonalen Hypertonie findet, beschrieben worden.¹⁰⁵ HIF-1 α induziert eine große Anzahl proangiogenetischer Faktoren, die an diesem vaskulären Remodeling beteiligt sind, von denen VEGF als entscheidender Regulator der physiologischen Angiogenese der wichtigste ist.¹⁰⁶⁻¹¹⁰ HIF-1 α -defiziente (hif1 α -/-) Mäuse sind nicht überlebensfähig und weisen aufgrund einer verminderten VEGF Expression schwere Defekte der Angiogenese und der Vaskulogenese auf.^{111,112} Darüber hinaus scheint auch eine durch HIF-1 α gesteigerte Expression des VEGF-Rezeptors-1 auf mesenchymalen Zellen aus dem Knochenmark die Vaskulogenese durch eine vermehrte Rekrutierung dieser Zellen zu verstärken.^{105,113} In hif1 α +/- Mäusen mit pulmonaler Hypertonie zeigte sich ferner eine verminderte Verdickung der Gefäßwand, wie sie sonst für diese Form des vaskulären Remodelings charakteristisch ist.¹¹⁴ Entsprechend findet man in Arterien von Ratten mit experimentell-induzierter systemischer arterieller Hypertonie eine transient gesteigerte HIF-1 α Expression assoziiert mit einer Mediahypertrophie und vermehrten Neoangiogenese.¹¹⁵ Über die Details der molekularen Mechanismen des HIF-1 α -vermittelten vaskulären Remodelings ist allerdings wenig bekannt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es nach einer mechanischen Gefäßverletzung zu einem frühen Anstieg der HIF-1 α mRNA Expression (Abb. 5) kommt. Diese gesteigerte HIF-1 α Expression war transient, da nach 7 Tagen wieder normale Werte gefunden wurden (Abb. 5). Einen vergleichbaren Zeitverlauf der HIF-1 α Expression mit einem Maximum der HIF-1 α mRNA nach 6 h wurde auch in anderen Verletzungsmodellen ohne Hypoxie beschrieben.^{63,109} Da eine hypoxische HIF-1 α Regulation nach Gefäßverletzung

aufgrund der guten Sauerstoffversorgung unwahrscheinlich ist, dürfte am ehesten eine nicht-hypoxische, transkriptionelle Regulation von HIF-1 α vorliegen, die möglicherweise auf einer PKC Aktivierung beruht. Diese Schlussfolgerung stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen überein. Es wurde gezeigt, dass nach endothelialer Denudation der intrazelluläre PKC-Signalweg innerhalb von 30 Min. aktiviert wird und die neointimale Hyperplasie beeinflusst.¹¹⁶

Ferner kam es nach Gefäßverletzung zu einem kontinuierlichen Anstieg der HIF-1 α Proteinmenge, nachgewiesen sowohl durch Western Blot (Abb. 6) als auch durch Immunfluoreszenzfärbungen (Abb. 7). Da die HIF-1 α mRNA zu diesem Zeitpunkt bereits wieder auf Ausgangswerte zurückgegangen war (Abb. 5), könnte diese persistierende Erhöhung der HIF-1 α Expression auf eine gesteigerte Translation der HIF-1mRNA oder auf einen verminderten Abbau, ähnlich wie unter hypoxischen Bedingungen, zurückzuführen sein. Die translationale Regulation der HIF-1 α Expression unter nicht-hypoxischen Bedingungen wird durch PI3K vermittelt.⁵² Dieser Signaltransduktionsweg wird auch nach Gefäßverletzung aktiviert, so dass eine gesteigerte Translation vermittelt durch die PI3K bei der dauerhaft erhöhten HIF-1 Expression von Bedeutung sein könnte.^{117,118}

Neben den möglichen intrazellulären Regulationsmechanismen der HIF-1 α Expression könnten auf extrazellulärer Ebene Wachstumsfaktoren und Zytokine eine wichtige Rolle spielen, da es unmittelbar nach einer endothelialen Denudation zur Aktivierung des Gerinnungssystems, zur Aggregation von aktivierten Thrombozyten und zur Infiltration mit Leukozyten kommt¹³, wodurch lokal in die Gefäßwand Thrombin, PDGF, TGF, EGF^{13,119} sowie IL-1 β und TNF- α ¹³ freigesetzt wird. Die Tatsache, dass Thrombin¹²⁰ und PDGF-AB²² bei den Reparaturvorgängen nach Gefäßverletzung eine wichtige Rolle spielen, könnte auf eine zentrale Rolle von HIF-1 im Rahmen der Wundheilung hinweisen. Zum anderen ist bekannt, dass nach Gefäßverletzung im Rattenmodell eine deutlich erhöhte Expression und Phosphorylierung des PDGF- β Rezeptors, assoziiert mit der Aktivierung der PI3-Kinase, auftritt.^{13,121}

Kürzlich konnten auch Derivate der Lysophosphatidsäure identifiziert werden, die eine gesteigerte HIF-1 α Expression hervorrufen.⁶⁹ Da aktivierte Thrombozyten eine wichtige Quelle von LPA-Vorstufen sind und ungesättigte LPAs zur Neointimabildung führen^{65,66}, könnte auch LPA bei der HIF-1 α Aktivierung nach Gefäßverletzung von zentraler Bedeutung sein (siehe 4. 2).

Die Untersuchungen zur zellulären Lokalisation von HIF-1 α in der verletzten Gefäßwand durch Immunfluoreszenzfärbungen zeigten eine deutlich gesteigerte HIF-1 α Expression (Abb. 7 C) in medialen SMCs nach einem Tag und zusätzlich in neointimalen SMCs nach 2 Wochen (Abb. 7 D). Diese Ergebnisse sprechen für eine konstant erhöhte HIF-1 α Expression in den neointimalen SMCs nach Gefäßverletzung. Diese neointimalen SMCs weisen einen proinflammatorischen Phänotyp auf durch eine konstitutive Aktivierung von NF- κ B.¹²² In SMCs wird die nicht-hypoxische HIF-1 α Aktivierung durch ROS oder Thrombin über den NF- κ B Signaltransduktionsweg auf transkriptioneller Ebene reguliert.¹²³ Es wäre deshalb denkbar, dass es nach dem initialen Maximum nach 6 h (Abb. 5) zu einem erneuten Anstieg der HIF-1 mRNA Expression zu einem späteren Zeitpunkt kommt, getriggert durch die gesteigerte NF- κ B Aktivität. Ferner war HIF-1 α auch in einigen luminalen, α -SMA-negativen Zellen, bei denen es sich um Endothelzellen handeln dürfte, exprimiert (Abb. 8). Die Ursache der gesteigerten endothelialen HIF-1 α Expression ist jedoch unklar, da die normoxische HIF-1 Aktivierung bisher nur in SMCs beschrieben wurde und die Regulation der HIF-1 α Expression zelltyp-spezifische Unterschiede aufweist.^{124,125}

Einen Tag und 2 Wochen nach Verletzung war HIF-1 α nicht nur im Zytoplasma sondern auch im Zellkern von wenigen medialen aber fast allen neointimalen und luminalen Zellen mittels Immunfluoreszenz nachweisbar (Abb. 10). Diese nukleäre Translokation von HIF-1 α ist die Voraussetzung für die Bindung an spezifische Promotersequenzen und der gesteigerten Expression der entsprechenden Zielgene¹⁰⁵, wie z. B. PDGF²² oder VEGF¹²⁶, die bei der Neointimabildung eine Rolle spielen.

4. 1. 2. HIF-1 α und vaskuläres Remodeling durch SPCs

Es ist bekannt, dass HIF-1 α unter Hypoxie für die erhöhte Expression des CXC-Chemokins stromal cell-derived factor (SDF)-1 α verantwortlich ist und dadurch die Rekrutierung von EPCs steuert.⁵⁰ SDF-1 α ist wesentlich an der neointimalen Rekrutierung von SPCs beteiligt und trägt damit zur Neointimabildung bei. Über die molekulare Regulation der SDF-1 Expression nach Gefäßverletzung ist bisher jedoch nichts bekannt.³²

4. 1. 2. 1 Die SDF-1 α /CXCR4 Achse reguliert die Neointimabildung durch SPCs

4. 1. 2. 1. 1. Das CXC Chemokin SDF-1 α und der Rezeptor CXCR4

SDF-1 α /CXCL12 (preB-cell growth-stimulating factor, PBSF) gehört zu einer Gruppe von strukturell verwandten Proteinen, die eine chemotaktische Aktivität v. a. für hämatopoetische Zellen besitzen und deshalb als chemotaktische Zytokine (Chemokine) bezeichnet werden.³⁶ Die Gruppe der Chemokine wird entsprechend der Position der ersten zwei eng benachbarten Cysteine in der Aminosäuresequenz unterschieden in CXC-, CC-, CX₃C- und C-Chemokine. Es ist bekannt, dass die Chemokine eine wichtige Rolle bei der Wundheilung durch die Rekrutierung von zirkulierenden mononukleären Zellen in die verletzte Region spielen.^{44,45} SDF-1 wurde ursprünglich als ein von stromalen Zellen des Knochenmarks sezerniertes Protein identifiziert.^{127,128} Obwohl die Primärstruktur SDF-1 α als CXC-Chemokin ausweist, ist die Aminosäuresequenz von SDF-1 α deutlich verschieden von anderen CXC- aber auch von CC-Chemokinen.⁴⁰ Die Funktionen von SDF-1 unterscheiden sich ebenfalls von anderen Chemokinen: SDF-1 ist weniger von Bedeutung bei proinflammatorischen Prozessen, als vielmehr bei grundlegenden Funktionen der embryonalen Entwicklung und der Hämatopoese. Es wird konstitutiv in einer Vielzahl von Geweben, wie Herz, Leber, Lunge, Gehirn, Skelettmuskel, Milz und Niere, exprimiert.^{127,129} Der SDF-1 Promoter enthält im Unterschied zu anderen CXC Chemokinen, wie z. B. growth-related oncogene- α (GRO- α) oder epithelial cell-derived neutrophil-activating protein-78 (ENA-78,) keine Bindungsmotive für proinflammatorische Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, NF-IL6 und AP-1.^{129,130} Die Struktur des SDF-1 Promoters ist vergleichbar mit der von „housekeeping genes“, passend zur konstitutiven Expression von SDF-1 in zahlreichen Gewebetypen¹²⁹, mit Bindungsstellen für den ubiquitären Transkriptionsfaktor Sp1.¹³⁰ Dennoch gibt es Hinweise dafür, dass die SDF-1 α Transkription unter dem Einfluss von verschiedenen Stimuli, wie VEGF¹³¹, IL-1 β oder Bestrahlung, induziert werden kann.¹³⁰

Die Effekte von Chemokinen werden durch eine Familie von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben transmembranalen Domänen vermittelt.³⁸ Der CXC-Rezeptor 4 (CXCR4) besitzt im Gegensatz zu den meisten anderen Chemokinrezeptoren mit SDF-1 nur einen bekannten Liganden¹³² und wurde lange als einziger Rezeptor für SDF-1 α betrachtet,

der primär aus Leukozyten kloniert¹³³ und funktionell als essentieller Kofaktor der Infektion von CD4+ T-Zellen durch T-Zell-tropische HIV1 und HIV2 erkannt wurde.^{134,135} In den letzten Jahren wurde ferner mit CXCR7/RDC1/Cmkr 1 ein weiterer Rezeptor für SDF-1 α identifiziert^{41,42}, der ein funktionales Heterodimer mit CXCR4 bilden kann und dadurch die Rezeptorfunktion steuert.¹³⁶ Die Rolle von CXCR7 bei der SPCs Rekrutierung nach Gefäßverletzung ist bisher nicht untersucht. Es gibt jedoch Hinweise für eine differentielle Funktion von CXCR4 und CXCR7 beim „homing“ von renalen Progenitorzellen.¹³⁷

Die Bindung von SDF-1 an CXCR4 führt über eine Dimerisierung des Rezeptors¹³⁸ zur Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege, die zu einer gesteigerten Phosphorylierung von Komponenten der Focal Adhesions¹³⁹, der (extracellular signal regulated kinase) ERK-1 und ERK-2¹⁴⁰, der Phospholipase C- γ (PLC- γ), der PKC sowie der PI3-K zur Folge haben. Ferner kommt es zur Aktivierung der Janus Kinasen und des Janus Kinasen/signal transducers and activation of transcription (JAK/STAT) Transkriptionswegs¹³⁸, sowie von NF- κ B (Abb. 28).¹⁴¹

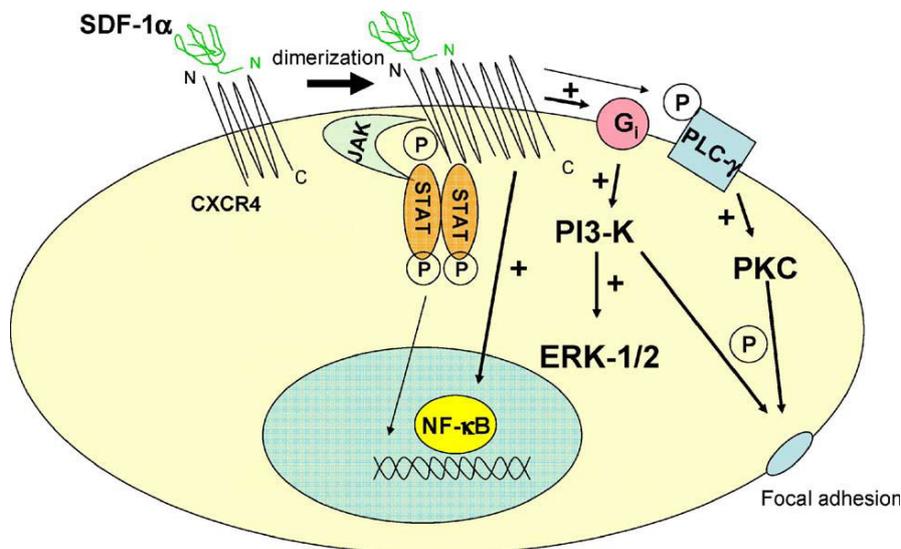


Abb. 28: Mechanismen der Signaltransduktion durch SDF-1 α -CXCR4 Interaktion. Nach der Bindung von SDF-1 α an CXCR4 kommt es zur Rezeptordimerisierung und Aktivierung von inhibitorischer G-Proteinen. Dies führt zur Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswegen, die eine gesteigerte Phosphorylierung von Komponenten der Focal Adhesions, der ERK-1 und ERK-2, der PLC- γ , der PKC sowie der PI3-K zur Folge hat. SDF-1 α induziert die nukleäre Translokation von NF- κ B und steigert die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B. Ferner binden Janus Kinasen (JAKs) direkt an CXCR4 und werden durch Phosphorylierung aktiviert. Die phosphorylierten JAKs triggern die Aktivierung und die nukleäre Translokation von „signal transducers and activators of transcription“ (STAT).⁴⁷

SDF-1^{-/-} oder CXCR4^{-/-} Mäuse sterben perinatal und weisen einen schweren Defekt der B-Zell Entwicklung bei normaler T-Zell Entwicklung sowie eine reduzierte Myelopoese und eine verminderte Kolonisierung mit hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark auf.¹⁴²⁻¹⁴⁵

SDF-1 induziert effektiv über CXCR4 die Thrombozytenaggregation und die Calcium-Freisetzung in Thrombozyten. Die Bestimmung der Plasmakonzentration von SDF-1 in Patienten mit instabiler Angina Pectoris zeigte eine deutliche Reduktion im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina Pectoris oder gesunden Probanden. Dies ging einher mit einer verminderten CXCR4 Expression auf Monozyten und CD3-positiven T-Lymphozyten. Ein antiinflammatorischer Effekt des SDF-1 im Rahmen der Koronarsklerose wurde ferner aus der Tatsache abgeleitet, dass SDF-1 die Expression und Sekretion von proinflammatorischen Chemokinen, wie MCP-1 aus mononukleären Zellen von Patienten mit instabiler Angina Pectoris, inhibiert.¹⁴⁶

4. 1. 2. 1. 2 Die SDF-1 α /CXCR4 Achse bei der Reparatur von Gewebeschädigung durch Stammzellen

Stammzellen aus hämatopoietischem Gewebe, wie Knochenmark und peripheren Blut, besitzen eine enorme Entwicklungskapazität, die eine Reparatur von Schädigungen in verschiedenen Organen durch die gewebsspezifische Differenzierung dieser Zellen ermöglicht.¹⁴⁷ Unmittelbar nach einer Gefäßverletzung kommt es zur Apoptose der Mehrzahl der medialen SMCs.¹⁸ Die Apoptoserate der SMCs nach einer Schädigung steigt in Abhängigkeit von der Intensität der Verletzung an.¹⁴⁸ Die Hemmung der SMCs Apoptose nach Gefäßverletzung führt zu einer Reduktion der Neointimabildung, was als Hinweis dafür gewertet werden kann, dass die Apoptose in der frühen Phase nach Verletzung direkt die SMC Akkumulation zur Regeneration der verletzten Region reguliert.^{149,150} Das bisher gültige Paradigma der Restenoseentstehung ging davon aus, dass nicht-apoptotische SMCs aus der Media proliferieren, ihren Phänotyp in Richtung eines „synthetischen Typs“ verändern bzw. dedifferenzieren und in die Intima migrieren.^{14,26,151} Man weiß heute jedoch, dass zusätzlich zu diesen lokal eingewanderten neointimalen SPCs aus dem peripheren Blut rekrutiert werden

und wesentlich zur neointimalen SMC-Population beitragen.^{27,152} Bei einer extensiven frühen Apoptose der Zellen sind die ortsansässigen VSMCs nicht ausreichend für eine Reparatur, weswegen zirkulierende SPCs benötigt werden.³⁵ Abgeschlossen wird die neointimale Reparatur durch die Freisetzung von extrazellulärer Matrix wie Kollagen Typ I aus neointimalen SMCs und der Reendothelialisierung mit aktivierten Endothelzellen.^{153,154}

In verschiedenen tierexperimentellen Studien der Transplantatvaskulopathie mit Aorten bzw. heterotoper Herztransplantation konnte nachgewiesen werden, dass mehr als 80% der neointimalen SMCs aus den Empfängertieren stammen und damit nicht lokal aus der Media der Spenderorgane abstammen.^{155,156} In der Studie nach intraluminaler Denudation wurde ferner weiblichen Mäusen das Knochenmark von männlichen Spendertieren transplantiert und wurde nachgewiesen, dass die entstandene Neointima überwiegend aus SMCs bestand, die zu etwa 50% auch Y-Chromosom-positiv waren und somit aus dem Knochenmark stammten.³⁰ In Ratten stammten nach Knochenmarkstransplantation und Ballondilatation der CCA etwa 10-13% der neointimalen Zellen aus dem Knochenmark und ein Teil dieser Zellen exprimierte auch SMC-typische Marker α -SMA oder smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC).¹⁵⁷

Der Nachweis, dass adulte Stammzellen ($Sca-1^+/lin^-$) aus dem peripheren Blut auch tatsächlich SPCs enthalten, wurde unter anderem in vivo nach Injektion dieser Zellen erbracht. Durch kombinierte in situ Hybridisierung und Immunhistologie konnte gezeigt werden, dass die injizierten $Sca-1^+/lin^-$ Zellen in die Neointima rekrutiert werden und dort α -SMA und SMMHC, exprimieren.³² Neben hämatopoetische $c-Kit^+/Sca-1^+/lin^-$ Stammzellen²⁷ enthalten vor allem $c-Kit$ -primitive, PDGFR- β -positive Knochenmarkszellen SPCs, die nach Gefäßverletzung zur Neointimabildung beitragen.⁴⁶

Das CXC Chemokin SDF-1 α und sein Rezeptor CXCR4 regulieren entscheidend die Rekrutierung von Progenitorzellen bei der Reparatur verschiedener Organschädigungen. In einem Modell der toxischen Leberschädigung führt der Anstieg der SDF-1 Expression zu einem verstärkten CXCR4-abhängigem „homing“ von humanen CD34-positiven Progenitorzellen in die geschädigte Leber und deren Differenzierung in Hepatozyten. Eine Leberschädigung durch Bestrahlung resultierte ebenfalls in einer vermehrten Rekrutierung von CD34-positiven Zellen, die durch CXCR4 Antikörper blockiert werden konnte.¹⁵⁸ Ferner führte die intramyokardiale Transplantation von transfizierten Fibroblasten, die SDF-1 überexprimieren, zu einer Zunahme der Rekrutierung von CD117-positiven Stammzellen

nach granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)-Zugabe in das Myokard und zu einer Verbesserung der kardialen Funktion.¹⁵⁹

Nach Gefäßverletzung ist die SDF-1 α /CXCR4 Achse entscheidend verantwortlich für die Mobilisierung von SPCs in die Zirkulation, für deren Rekrutierung in die verletzte Gefäßwand und damit auch für die Neointimabildung.^{47,160} SDF-1 α wird nach der Verletzung in medialen und neointimalen SMCs verstärkt exprimiert und von aktivierten Thrombozyten freigesetzt.^{46,161}

In humanen atherosklerotischen Plaques ist die Expression von SDF-1 in SMCs, Endothelzellen und Makrophagen deutlich gesteigert, während man in normalen Arterien kein SDF-1 nachweisen kann.¹⁶²

Die gesteigerte SDF-1 α Expression in der Gefäßwand nach Gefäßverletzung geht einher mit einem kurzfristigen Anstieg der SDF-1 α Konzentration im Plasma³², wodurch der SDF-1 α -Gradient zwischen Knochenmark und peripherem Blut verändert und SPCs in die Zirkulation mobilisiert werden.^{47,163-165} Neben der Mobilisierung von SPCs induziert die gesteigerte SDF-1 α Expression in der verletzten Gefäßwand den Arrest von SPCs auf luminal-adhärierenden Thrombozyten in der Frühphase der Neointimabildung und fördert die Migration von SPCs während des neointimalen Wachstums (Abb. 29).^{32,47}



Abb. 29: Schematische Darstellung der SDF-1 α -vermittelten Effekte auf SPCs bei der Entstehung neointimaler Plaques. Neben der Mobilisierung von SPCs in die Zirkulation durch erhöhte SDF-1 α Serumkonzentrationen, führt die gesteigerte neointimale SDF-1 α Expression in der Frühphase der Neointimabildung zur Adhäsion von SPCs über Thrombozyten an der verletzten Gefäßwand und ist während des neointimalen Wachstums wesentlich für die Rekrutierung von SPCs verantwortlich.⁴⁷

Um die Rolle von SDF-1 α bei der Rekrutierung von SPCs aus dem Knochenmark in die Neointima zu untersuchen, wurde ApoE^{-/-} Mäusen Knochenmarkszellen, die das LaktoseZ (LacZ) Gen exprimieren, transplantiert. Die Gabe eines SDF-1 α blockierenden Antikörper 4 Wochen nach Gefäßverletzung reduzierte signifikant die neointimale Fläche und die Population der neointimalen β -galactosidase-positiven SMCs aus dem Knochenmark.⁴⁶

Eine Hemmung durch Deletion des Rezeptors CXCR4 oder lentiviraler SDF-1 α Gentransfer inhibierte die neointimale Hyperplasie und die Rekrutierung von SPCs im Mausmodell.^{32,46}

Ferner ist es bekannt dass SDF-1 α eine Rolle bei der Mobilisierung und Rekrutierung der SPCs aus dem Knochenmark nach Transplantarteriosklerose spielt.⁴⁸ Die SDF-1 α Expression war in Adventitia und anschließend sowohl in der Media als auch in der Neointima von transplantierten murinen Aorten erhöht.⁴⁸

4. 1. 2. 2 HIF-1 α reguliert die SDF-1 α Expression nach Gefäßverletzung

4. 1. 2. 2. 1. Zelluläre Kolokalisation von HIF-1 α und SDF-1 α

Aus Untersuchungen an Endothelzellen weiß man, dass die Regulation der SDF-1 α Expression unter Hypoxie direkt durch Aktivierung von HIF-1 α erfolgt.^{50,166} Die gesteigerte Bindung von HIF-1 an den SDF-1 α Promoter führt zu einer erhöhten SDF-1 α Expression und dadurch zu einer gesteigerten Rekrutierung von Vorläuferzellen für Endothelzellen (endothelial progenitor cells, EPCs) in ischämisches Gewebe und einer verbesserten Neovaskularisation.⁵⁰

Da die Mechanismen der SDF-1 α Expression nach Gefäßverletzung auf transkriptioneller Ebene völlig unklar sind, wurde deshalb der Einfluss von HIF-1 α auf die verstärkte SDF-1 α Synthese untersucht.

SDF-1 α wird nach Gefäßverletzung vorzugsweise in den SMCs exprimiert³², weshalb in der vorliegenden Arbeit zunächst überprüft wurde, ob eine zelluläre Kolokalisation von HIF-1 α

und SDF-1 α besteht. In Doppelimmunfluoreszenzfärbungen zeigte sich, dass HIF-1 α und SDF-1 α nach 1 Tag und 2 Wochen in denselben Zellen der Gefäßwand verstärkt exprimiert wurden (Abb. 11). Dies stellt einen indirekten Hinweis dafür dar, dass SDF-1 durch die gesteigerte DNA-Bindungsaktivität von HIF-1 α reguliert wird.

4. 1. 2. 2. 2. HIF-1 α siRNA Gentransfer inhibiert die SDF-1 α Expression

Um die Beteiligung von HIF-1 α an der Neointimabildung und die direkte Regulation von SDF-1 α durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 α nach mechanischer Gefäßverletzung zu untersuchen, wurde lokal in die CCAs von ApoE $^{-/-}$ Mäusen nach Drahtverletzung ein Gentransfer von siRNA spezifisch für HIF-1 α durchgeführt.

Um die Effizienz der periadventitiellen Applikation von siRNA gelöst in Pluronic Gel auf die Genexpression zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit das Referenzgen Lamin A/C als Positivkontrolle verwendet. Die Lamin A/C Proteinexpression, bestimmt durch Western Blot Analyse, war 3 Tage nach Applikation der Lamin A/C siRNA um 60% reduziert (Abb. 12). Durch die HIF-1 α -spezifische siRNA konnte die gesteigerte HIF-1 α Expression nach Gefäßverletzung deutlich reduziert werden. HIF-1 α war in der gesamten CCA um 54% (Western Blot Analyse, Abb. 13) und in der Neointima um 82% (quantitative Immunfluoreszenz, Abb. 14) vermindert.

Der direkte Nachweis, dass HIF-1 α die SDF-1 α Expression nach Gefäßverletzung steuert, konnte in den mit HIF-1 α -spezifischer siRNA-behandelten Mäusen gezeigt werden. Die neointimale SDF-1 α Expression war 4 Wochen nach Verletzung um 78% vermindert (Abb. 15).

Diese Ergebnisse stimmen mit beschriebenen Daten in der Literatur überein, wo der Tumoringhibitor und PI3K/Akt Antagonist PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) als ein weiterer Mediator der HIF-1 α Aktivität identifiziert wurde. Es ist bekannt, dass PTEN die Neointimabildung nach Gentransfer reduziert.¹⁶⁷ In transgenen Mäusen mit einer PTEN-Defizienz in SMCs zeigte sich eine Steigerung der HIF-1 α -vermittelte SDF-1 α Expression, wodurch eine mediale Hyperplasie induziert wurde.¹⁶⁸ Zusätzlich zeigte eine weitere

Arbeitsgruppe, dass die Applikation von macrophage-colony stimulation factor (M-CSF), von dem bekannt ist, dass es die HIF-1 α Expression induziert¹⁶⁹, die neointimale SDF-1 α Expression nach Gefäßverletzung erhöht wurde.¹⁷⁰

4. 1. 2. 2. 3. HIF-1 α siRNA Gentransfer inhibiert die SPC Mobilisierung

Da bekannt ist, dass SDF-1 α entscheidend für die Mobilisierung von Sca-1⁺/lin⁻ Zellen in die Zirkulation nach Gefäßverletzung ist³², und dass die Blockade von SDF-1 α durch einen Antikörper zu einer Inhibition der SPCs Mobilisierung führt⁴⁶, wurde untersucht, ob die Hemmung der HIF-1 α Expression auch Auswirkung auf die SPC Mobilisierung hat. Durch den HIF-1 α siRNA Gentransfer konnte die SDF-1 α -vermittelte Mobilisierung der Sca-1⁺/lin⁻ SPCs in die Zirkulation komplett gehemmt werden (Abb. 16). Dieser Befund zeigt, dass die gesteigerte HIF-1 α Expression nach Verletzung direkt für funktionelle SDF-1 α Effekte in vivo verantwortlich ist und durch die Mobilisierung von SPCs auch die Neointimabildung beeinflussen kann.

4. 1. 2. 2. 4. HIF-1 α siRNA Gentransfer reduziert die Neointimabildung

Die HIF-1-Aktivität wird des Weiterem durch einen Effektor des PI3K-Signalwegs, die Proteinkinase mammalian target of rapamycin (mTOR), die spezifisch durch Rapamycin inhibiert wird, gesteuert.¹⁷¹ Angesichts der Tatsache, dass Rapamycin sehr effektiv die Neointimabildung und auch die SDF-1 Expression hemmt¹⁷², könnte dies, obwohl eine direkte Beteiligung von HIF-1 bei der Restenose bisher nicht bekannt ist, auf eine bedeutende Rolle dieses Transkriptionsfaktors, z.B. durch Induktion einer SDF-1-abhängigen Rekrutierung von SPCs hinweisen.

In HIF-1 α siRNA behandelten CCAs konnte die Beteiligung von HIF-1 α an der Neointimabildung nachgewiesen werden, da 4 Wochen nach Verletzung eine 49%-ige

Reduktion der neointimalen Fläche (Abb. 17) zu beobachten war. Da durch die Hemmung der HIF-1 α Expression spezifisch der neointimale SMC Anteil vermindert wurde (Abb. 18), ohne Änderung des Anteils an neointimalen Macrophagen (Abb. 18), könnte ein wesentlicher Mechanismus für Hemmung der Neointimabildung in der verminderten neointimalen Rekrutierung von SPCs aus dem peripheren Blut bestehen.

Diese Daten stimmen mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen überein. Die Behandlung von ApoE^{-/-} Mäusen nach Gefäßverletzung³² mit einem blockierenden SDF-1 α Antikörper⁴⁶ oder nach lokalem lentiviralem Gentransfer eines SDF-1 α Antagonisten führte ebenfalls zu einer ca. 40-60%-igen Neointimareduktion aufgrund eines geringeren neointimalen SMC Anteils. Die Hemmung von SDF-1 α Expression hatte keinen Effekt auf die neointimale Monozytenrekrutierung.

Es bleibt jedoch unklar durch welches Signal die HIF-1 α -vermittelte SDF-1 α Expression nach Gefäßverletzung induziert wird. Als ein mögliches Signalmolekül, das über eine gesteigerte SDF-1 α -Expression an der Stammzell-vermittelten Gefäßreparatur beteiligt sein könnte, wurde die Rolle von Lysophosphatidsäuren (LPAs) untersucht.

4. 2. Lysophosphatidsäuren (LPAs) und SDF-1 α beim vaskulären Remodeling

Die Lysophosphatidsäure (LPA) ist ein einfach strukturiertes Lipid, das aus einem Glycerolgerüst mit einer freien Phosphatgruppe an der C1-Position und einem Fettsäurerest an der C2 oder C3-Position besteht (Abb. 30).¹⁷³ Der Fettsäurerest kann in der Länge und Zahl der ungesättigten Kohlenstoffbindungen variieren. Diese Variabilität in der Art der Fettsäure und die Form der Bindung an die Glycerolgruppe können einen entscheidenden Einfluss auf die biologische Aktivität und Wirkung haben.¹⁷⁴

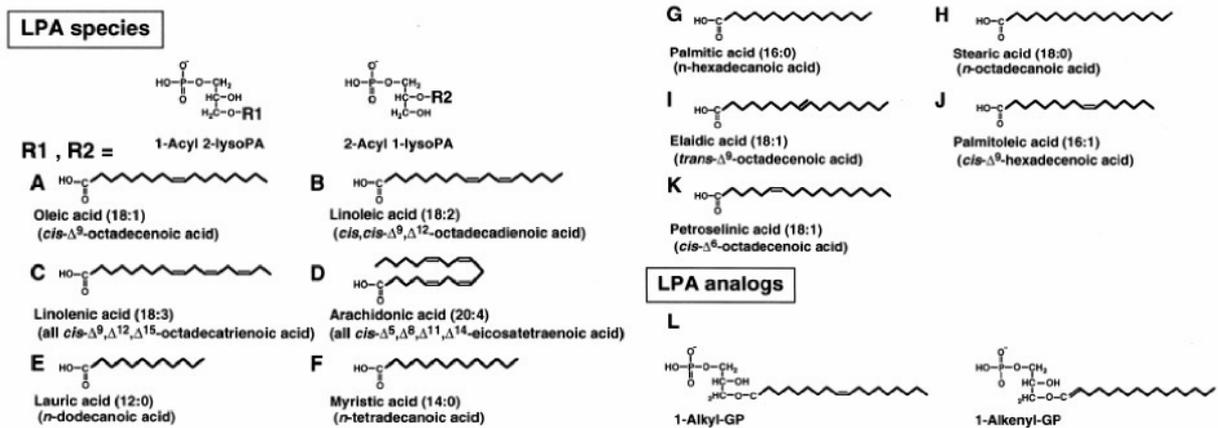


Abb. 30: Strukturformel verschiedener Lysophosphatidsäure-Derivate und seiner Strukturanaloga. A-K Chemische Struktur der wichtigsten Fettsäuren, die über das C1- oder C2-Atom an LPA gebunden sind. L: Strukturformel der LPA-Analoga Alkyl-Glycerophosphat (GP) und Alkenyl-GP.¹⁷⁵

Die Bildung von extrazellulärem LPA wird über verschiedene Stoffwechselwege generiert. LPA im Serum ist deutlich höher konzentriert als im Plasma und enthält überwiegend ungesättigte Fettsäurereste.¹⁷⁶ Eine mögliche Ursache dieser Differenz könnte darin bestehen, dass aktivierte Thrombozyten die Bildung von LPA stimulieren.¹⁷⁷ Dabei werden LPAs nicht direkt aus Thrombozyten sezerniert, wie z.B. Sphingosin-1-phosphat, sondern aktivierte Thrombozyten setzen Phospholipide frei, die dann durch die lösliche Phospholipase A₂ (sPLA₂) oder der Phosphatidylserin-spezifische Phospholipase A₁ (PS-PLA₁) in Anwesenheit von Calcium zunächst in Lysophospholipide (LPL), wie Lysophosphatidylcholin (LPC), Lysophosphatidylethanolamin (LPE) und Lysophosphatidylserin (LPS), und anschließend durch die Lysophospholipase D (lysoPLD/autotaxin) im Plasma in LPA umgewandelt werden (Abb. 31).^{174,178,179}

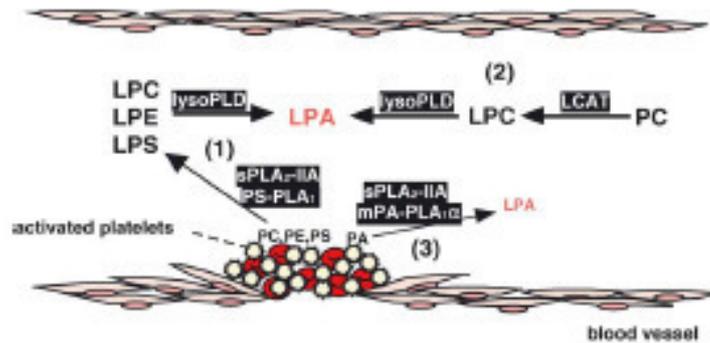


Abb. 31: Verschiedene Stoffwechselwege für die Bildung von extrazellulärem LPA. (1) Etwa die Hälfte des LPA im Serum wird über die Bildung von LPL aus Phospholipiden der Membran von aktivierten Thrombozyten durch lösliche Phospholipasen vermittelt mit der nachfolgenden Umwandlung in LPA durch lysoPLD. (2) Die nicht zellvermittelte LPA-Synthese führt im Serum auch über lysoPLD. (3) LPA kann auch aus Phosphatidsäure (PA) der Zellmembran durch lösliche Phospholipasen gebildet werden.¹⁷⁶

Die Degradation von extrazellulärem LPA wird durch membranständige Lipidphosphat Phosphatasen (LPP) vermittelt. Durch Dephosphorylierung von exogenem LPA durch LPP-1 wurden gleichzeitig die zellulären Effekte von LPA vermindert.¹⁸⁰ Dieser Mechanismus scheint auch unter physiologischen Bedingungen von Bedeutung zu sein, da thrombozytäres LPP-1 nach LPA-Behandlung vermehrt exprimiert und dadurch LPA verstärkt dephosphoryliert wird.¹⁸¹

Angeht die Tatsache, dass LPA in atherosklerotischen Plaques enthalten ist und ungesättigte LPAs eine neointimale Hyperplasie induzieren können, wird eine proatherogene Wirkung vermutet.

4. 2. 1. LPA induziert eine neointimale Hyperplasie durch die SDF-1 α /CXCR4 Achse

Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen ergaben, dass die intraluminale Applikation spezifisch von ungesättigten Derivaten der LPA in Arterien zur Ausbildung einer neointimalen Hyperplasie führt.^{65,66} Die Inkubation der CCA mit LPA 18:1 führte nach 3 Wochen zu einer signifikanten Neointimabildung, während LPA 18:0 keinen Effekt zeigte.⁶⁶ LPA 18:1 aktiviert die ERK- und p38MAPK Signaltransduktionswege in der Gefäßwand und

führt zur nukleären Translokation von NF- κ B in Endothelzellen und medialen SMCs. Eine kombinierte Inhibierung von ERK und p38MAPK hemmt dementsprechend die LPA 18:1-induzierte Neointimabildung.⁶⁶

In einer weiteren Studie zeigte sich, dass LPA 18:1 und die mehrfach ungesättigten LPA-Derivate, wie z. B. 18:2, 18:3 und vor allem 20:4, ebenfalls einen deutlichen Effekt auf die Neointimabildung haben.⁶⁵ Zusätzlich führt die Behandlung mit dem ungesättigten LPA-Analogon Alkyl-Glycerophospholipiden (z. B. 1-AGP 18:1) zu einer signifikanten neointimalen Hyperplasie.⁶⁵ Die Gabe eines G_i-Protein-Inhibitors Pertussistoxin und eines kombinierten LPA₁- und LPA₃-Rezeptorantagonisten führte zu einer ca. 50%-igen Reduktion der LPA 20:4-induzierten Neointima. Die komplette Hemmung der LPA 20:4-vermittelten Neointimabildung durch den peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR- γ)-Antagonisten deutet auf eine wichtige Rolle dieses Transkriptionsfaktors hin⁶⁵, da bekannt ist, dass ungesättigte LPA-Derivate als PPAR- γ Agonisten wirken können.¹⁸²

Allerdings wurde nach einer mechanischen Gefäßverletzung sowohl im Tiermodell als auch im Menschen eine Reduktion der Neointima durch PPAR- γ Agonisten beschrieben¹⁸³⁻¹⁸⁵, so dass unklar bleibt ob der PPAR- γ Signaltransduktionsweg tatsächlich die Effekte von ungesättigten LPAs nach Gefäßverletzung vermittelt.

In VSMCs aus der Rattenaorta konnte eine spezifische Aktivität von ungesättigten LPAs auf das Differenzierungsverhalten *in vitro* nachgewiesen werden. Die ungesättigten LPAs (16:1, 18:1 und 18:2) induzieren im Gegensatz zu gesättigten LPAs die Dedifferenzierung von VSMCs durch eine Aktivierung der ERK und der p38MAPK, ähnlich wie durch PDGF-BB und EGF. Diese Entdifferenzierung wird als entscheidender Faktor für vaskuläre Wundheilung und Neointimabildung gewertet.⁶⁷

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde der Einfluss von verschiedenen LPA-Derivaten auf die Neointimaformation im Mausmodell untersucht. Es zeigte sich, dass im Vergleich zu LPA 18:0 oder PBS nur das ungesättigte LPA 20:4 und 1-AGP 18:1 nach intraluminaler Applikation zu einer signifikanten Neointimabildung führen.¹⁸⁶ Interessanterweise führte die LPA 20:4-Behandlung zu einer gesteigerten Expression von HIF-1 α und SDF-1 α in der Gefäßwand.¹⁸⁶ Ähnliche Effekte von LPA wurden bereits auch in anderen Zelltypen beschrieben.^{69,70} Aufgrund dieser Ergebnisse erscheint ein Zusammenhang zwischen der LPA-induzierten Neointimabildung und der Rekrutierung von SPCs nahe liegend, da das Chemokin SDF-1 α der entscheidende Mediator der Mobilisierung und Rekrutierung von SPCs nach Gefäßverletzung ist.^{32,46}

In der vorliegenden Arbeit wurde die funktionelle Bedeutung von SDF-1 α und dessen Rezeptor CXCR4 bei der Neointimabildung durch ungesättigte LPAs im Wildtyp-Mausmodell untersucht. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der LPA 20:4-induzierten Neointimabildung durch Behandlung mit einem CXCR4 Antagonisten (POL551) (Abb. 20). Diese Ergebnisse deuten auf eine wichtige Rolle der SDF-1 α /CXCR4 Achse bei der durch LPA vermittelten Neointimabildung hin, ähnlich wie nach mechanischer Gefäßverletzung.^{32,46}

4. 2. 2. LPA 20:4 induziert die SPC Mobilisierung durch SDF-1 α /CXCR4

Es ist bekannt, dass die ungesättigte Lysophosphatidsäure LPA 20:4 24 h nach lokaler Exposition der CCA zu einer Mobilisierung von Sca-1⁺/lin⁻ Zellen führt, ähnlich wie es nach mechanischer Gefäßverletzung beschrieben wurde^{32,186}, allerdings ist der molekulare Mechanismus unklar. Durch Applikation des CXCR4 Antagonisten POL551 konnte die Mobilisierung der Sca-1⁺/lin⁻ Zellen durch lokale LPA 20:4 Inkubation komplett blockiert werden (Abb. 21). Dies legt die Vermutung nahe, dass die durch LPA 20:4 induzierte SDF-1 α Expression in der Gefäßwand die zirkulierenden SPCs erhöht. Nach einer Drahtverletzung der CCA konnte die SPC Mobilisierung sowohl durch einen blockierenden Antikörper gegen SDF-1 α als auch durch einen CXCR4 Antagonisten verhindert werden.^{32,46,187} Dieser sehr ähnliche Mechanismus der SPC Mobilisierung durch LPA 20:4 und einer mechanischen Gefäßverletzung ist vereinbar mit der Hypothese, dass nach einer Drahtverletzung ungesättigte LPAs entscheidend zur SPC Mobilisierung beitragen könnten.

4. 2. 3. Die Hemmung von CXCR4 reduziert die CXCR4-positiven SMCs in der Neointima nach 20:4 LPA Applikation

Im Mausmodell der Transplantatarteriosklerose konnte gezeigt werden, dass die von SPCs abstammenden neointimalen SMCs eine deutlich verstärkte Expression von CXCR4 im Vergleich zu residenten SMCs aufweisen.⁴⁸ Als Hinweis auf die neointimale Rekrutierung von SPCs durch LPA 20:4 wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit die CXCR4-positiven SMCs untersucht. Vier Wochen nach der lokalen LPA 20:4 Applikation zeigten vor allem die neointimalen α -SMA-positiven Zellen (SMCs) eine deutliche CXCR4 Expression (Abb. 22). Unter Behandlung mit dem CXCR4 Antagonisten war die Zahl an CXCR4-positiven SMCs in der Gefäßwand, ähnlich wie in unbehandelten CCAs, deutlich geringer. (Abb. 22). Dieser Effekt kann mit einer verminderten Rekrutierung der CXCR4-positiven SPCs in die mit LPA 20:4 behandelte Gefäßwand erklärt werden. Die verminderte SPC Rekrutierung könnte den entscheidenden Mechanismus für die Reduktion der LPA-induzierten Neointimabildung durch CXCR4 Blockade darstellen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die ungesättigten LPAs den Mechanismus der SDF-1-vermittelten vaskulären Wundheilung über SPCs induzieren und deshalb möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Neointimabildung nach mechanischer Gefäßverletzung spielen können.

4. 2. 4. Die Neointimabildung nach Gefäßverletzung wird durch LPA-Rezeptoren reguliert

Es ist bekannt, dass die meisten LPA-Effekte durch spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt werden. Bisher konnten vier verschiedene LPA-Rezeptoren identifiziert werden, von denen LPA₁ (Edg-2), LPA₂ (Edg-4) und LPA₃ (Edg-7) strukturell eng verwandt sind und durch die Edg (endothelial differentiation gene)-Familie kodiert werden.¹⁸⁸

Die LPA-Rezeptoren aktivieren über multiple G-Proteine ein komplexes System aus Signaltransduktionswegen. Über das G_i-Protein stimuliert LPA Tyrosinkinasen, Ras und MAPK und dadurch Prozesse des Zellwachstums und Proliferation¹⁸⁹, sowie die PI3-Kinase

und dadurch eine Hemmung der Apoptose.¹⁹⁰ Ferner durch G_q-vermittelte Aktivierung der Phospholipase C-abhängigen Proteinkinase C kommt es zur Mobilisierung von intrazellulärem Calcium.¹⁸⁹ Die verschiedenen LPA-Derivate zeigen eine gewisse Rezeptorspezifität: während LPA₁ und LPA₂ eine hohe Bindungsaffinität für viele gesättigte und ungesättigte LPA-Derivate aufweisen, bindet LPA₃ vorzugsweise an ungesättigte LPAs, wie z.B. LPA 18:1 und 20:4.¹⁷⁵

Um die Beteiligung von LPAs an der Neointimabildung zu klären, wurde in der vorliegenden Arbeit ApoE^{-/-} Mäuse nach Drahtverletzung der CCA mit einem Antagonisten der LPA₁ und LPA₃ Rezeptoren Ki16425 (3-(4-[4-([1-(2-chlorophenyl)ethoxy]carbonyl amino)-3-methyl-5-isoxazolyl] benzylsulfanyl) Propansäure)¹⁹¹ systemisch in einer Dosis behandelt, die bereits in vivo im Mausmodell erfolgreich verabreicht wurde.¹⁹²

Es zeigte sich eine 60%-ige Reduktion der Neointimabildung nach 3-wöchiger Behandlung mit LPA Rezeptorantagonisten (Abb. 23), ohne dass die Mediafläche verändert wurde.

Die Zellen der Gefäßwand und zirkulierende Blutzellen exprimieren verschiedene LPA-Rezeptoren und die LPA-Effekte hängen entscheidend vom jeweiligen zellulären LPA-Rezeptor-Expressionsprofil ab. Während LPA₁ in Mäusen und im Menschen in zahlreichen Organen, wie im Gehirn, Herz, Milz und Intestinum stark exprimiert wird, war in der Leber und in zirkulierenden Leukozyten keine LPA₁-Expression nachweisbar.^{180,188} Vor allem im zentralen Nervensystem ist eine strikte räumliche und zeitliche Regulation der LPA₁-Expression während der Entwicklung beschrieben.¹⁸⁰ Der LPA₂-Rezeptor wurde dagegen nur in wenigen Organsystemen, wie im Hoden oder in Leukozyten, konstitutiv nachgewiesen.¹⁸⁰ In der Maus wird LPA₃ bevorzugt in der Niere, im Hoden und der Lunge exprimiert.¹⁸⁰ Die LPA₁ und LPA₃ Rezeptoren wurden sowohl in differenzierten als auch entdifferenzierten SMCs der Ratte gefunden.⁶⁷ PA₂ dagegen war in diesen Zellen nicht nachweisbar. Da in vaskulären SMCs aus Mäusen der LPA₁- und der LPA₂-Rezeptor, aber nicht LPA₃, exprimiert werden¹⁹³, ist es sehr wahrscheinlich, dass der Effekt des LPA₁/LPA₃-Antagonisten auf die Neointimabildung nach Gefäßverletzung durch den LPA₁ Rezeptor vermittelt wird. In mesenchymalen Stammzellen induziert LPA 18:1 eine gesteigerte SDF-1 α Expression, die durch Ki16425 vollständig gehemmt werden kann.⁷⁰ Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Effekt des LPA_{1/3} Antagonisten auf die Neointimabildung nach Drahtverletzung möglicherweise durch eine verminderte neointimale SDF-1 α Expression verursacht wird.

4. 2. 5. LPA Rezeptoren regulieren die SDF-1 α und HIF-1 α Expression nach Gefäßverletzung

Ungesättigte LPA induziert die Expression von HIF-1 α in verschiedenen Tumorzelllinien durch Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR Signaltransduktionsweges⁶⁹ und von SDF-1 α in mesenchymalen Stammzellen.^{69,70} In vivo konnte bereits gezeigt werden, dass LPA durch eine vermehrte HIF-1 α Expression die Metastasierung von Ovarialkarzinomzellen fördert.¹⁹³ In der Gefäßwand kommt es nach endoluminaler Exposition mit ungesättigten LPAs ebenfalls zu einer vermehrten Expression von SDF-1 α und HIF-1 α ¹⁸⁶ und die Neointimabildung durch LPA 20:4 wird über die SDF-1 α /CXCR4 Achse vermittelt. Es wurde deshalb untersucht, ob LPAs über die LPA₁ und LPA₃ Rezeptoren bei der Neointimabildung nach Gefäßverletzung auch an der gesteigerten HIF-1 α -abhängigen Expression von SDF-1 α beteiligt ist.

Die 3-wöchige Behandlung mit Ki16425 führte 4 Wochen nach Gefäßverletzung zu einer 90%-gen Abnahme der SDF-1 α Expression und einer Reduktion von HIF-1 α Expression um 70% in den medialen und neointimalen Zellen (Abb. 24).

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass LPAs über die Rezeptoren LPA₁ und LPA₃ die Expression von SDF-1 α und HIF-1 α in der Neointima entscheidend beeinflussen. Da HIF-1 α sowohl unter hypoxischen Bedingungen⁵⁰ als auch in der Neointima die SDF-1 α Expression induziert (Abb. 11), ist der Befund vereinbar mit der Hypothese, dass ungesättigte LPAs über die Aktivierung von HIF-1 α zu einer vermehrten SDF-1 α Expression führt. Als Quelle von LPAs nach einer Drahtverletzung der CCA kommen einerseits aktivierte Thrombozyten und andererseits Mikrovesikel aus apoptotischen SMCs in Frage.

Es ist bekannt, dass die Aktivierung von Thrombozyten mit Thrombin zur Bildung von LPA 16:0, 18:0 und 20:4 führt, wobei nur die LPA 18:0-Synthese auf die PLA₂ zurückzuführen war.¹⁹⁴ Die lysoPLD/autotaxin hydrolisiert vorwiegend Lysophosphatidylcholin, das ungesättigte Fettsäuren enthält, und generiert dadurch auch im Wesentlichen ungesättigte LPA-Derivate (20:4 > 18:2).¹⁹⁵ sPLA₂ deacyliert bevorzugt Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS), die in der inneren Schicht des Lipidbilayers der Zellmembran lokalisiert sind und damit für extrazelluläre Phospholipasen nicht zugänglich sein dürften.¹⁷⁶ Kommt es allerdings zur Destruktion der asymmetrischen Phospholipidverteilung, z. B. bei aktivierten Thrombozyten, apoptotischen Zellen oder Zytokin-stimulierten Leukozyten, kann

LPA durch lösliche Phospholipasen aus PE und PS generiert werden.^{173,176} Diese Möglichkeit der Bildung von LPA wurde vor allem im Zusammenhang mit der Wirkung von LPA bei akuter Gewebeschädigung, wie bei der Wundheilung und der inflammatorischen Reaktion, diskutiert.¹⁷⁶ LPA wird darüber hinaus auch durch die milde Oxidierung von LDL-Partikeln (moxLDL) gebildet. Es wird an der Oberfläche von moxLDL exponiert und kann so zur LPA-Rezeptor-vermittelten Aktivierung von z. B. Thrombozyten oder Endothelzellen führen.¹⁹⁵

Die Rolle von den Thrombozyten bei der Neointimabildung nach Gefäßverletzung wurde bereits in verschiedenen Tiermodellen untersucht. Die Depletion von Thrombozyten führte zu einer verminderten Neointimabildung in den ersten Tagen nach Gefäßverletzung, wobei die SMCs Proliferation nicht signifikant verändert wurde. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Thrombozyten die Initiierung der SMCs Proliferation nicht beeinflussen, aber eine wichtige Rolle bei der neointimalen SMC Akkumulation spielen.^{196,197}

Die Apoptose von medialen SMCs wenige Minuten nach der mechanischen Gefäßverletzung spielt eine wichtige Rolle bei der Neointimabildung.¹⁴⁹ Durch Behandlung mit einem Pan-Caspase-Inhibitor konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Apoptose der medialen SMCs mit einer geringeren Neointimabildung assoziiert ist.¹⁵⁰ Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die Transplantatvaskulopathie beschrieben.¹⁹⁸ Ein möglicher Mechanismus durch den apoptotische SMCs die Neointimabildung beeinflussen ist die Induktion der SDF-1 α Expression. So konnte in verschiedenen Modellen der Neointimabildung, wie Drahtverletzung, Ligatur oder Anlage einer periarteriellen Manschette, eine Korrelation zwischen dem Grad an Apoptose der medialen SMCs und der SDF-1 α Expression gefunden werden.³³ In einer weiteren Studie wurde einen Tag nach Gefäßverletzung neben den apoptotischen Zellen eine erhöhte SDF-1 α Expression in den medialen SMCs nachgewiesen.⁴⁶ Ein direkter Hinweis auf die ursächliche Rolle der Apoptose medialer SMCs bei der SDF-1 α Expression wurde dadurch gewonnen, dass die Hemmung der Apoptose durch einen Pan-Caspase-Inhibitor zu einer deutlich verminderten SDF-1 α Expression sowohl *in vivo* als auch *in vitro* führte.⁴⁶ Einen wesentlichen Faktor für die Induktion von SDF-1 α spielen dabei Mikrovesikel („apoptotic bodies“), die aus apoptotischen SMCs freigesetzt werden, da diese *in vitro* ausreichen um die SDF-1 α Expression in vitalen SMCs zu erhöhen.⁴⁶

Es ist bekannt, dass aus Mikrovesikeln aktivierter Blutzellen, wie Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten, LPA durch eine sPLA2-vermittelte Hydrolyse von Phosphatidsäure (PA) gebildet wird.¹⁹⁹ Ferner führt eine Veränderung der asymmetrischen

Aufteilung der Phospholipiden in der Zellmembrane der apoptotischen Zellen zu einer Freilegung von LPA Vorstufen⁷¹, was eine erhöhte lokale LPA Konzentration zur Folge haben kann. Es ist also denkbar, dass LPA ein wichtiges Signalmolekül darstellt, dass im Rahmen der Apoptose generiert wird und durch eine Induktion der SDF-1 α Expression zur vaskulären Wundheilung durch SPCs beiträgt (Abb. 32).

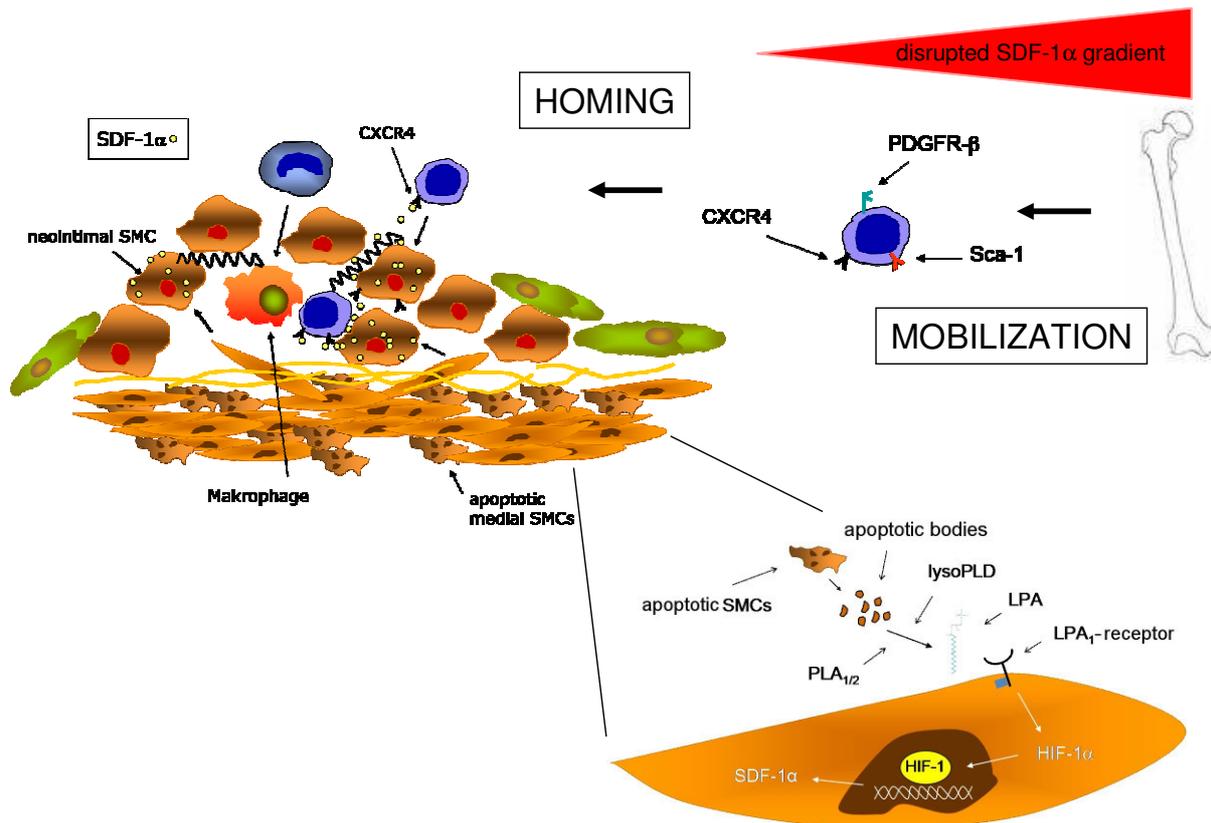


Abb. 32: SDF-1 α /CXCR4 Achse kontrolliert den Wundheilungsprozess durch SPCs. Die SDF-1 α Expression ist nach Verletzung in der Gefäßwand gesteigert. Dies geht einher mit einem kurzfristigen Anstieg der SDF-1 α Konzentration im Plasma, wodurch der SDF-1 α -Gradient zwischen Knochenmark und peripherem Blut verändert wird und SPCs in die Zirkulation mobilisiert werden. Die neointimale SDF-1 α Expression via CXCR4 Rezeptor führt in der Frühphase der Neointimabildung zur Adhäsion von SPCs über Thrombozyten an der verletzten Gefäßwand und ist verantwortlich für die neointimale SMC Akkumulation. Die SPCs exprimieren den Stammzellenmarker "stem cell antigen-1" Sca-1 und den PDGFR- β . Die medialen SMCs setzen Mikrovesikel („apoptotic bodies“) frei, die die Expression von SDF-1 α in der verletzten Gefäßwand induzieren. Die Aktivierung von SDF-1 α auf transkriptioneller Ebene erfolgt durch HIF-1 α , von dem bekannt ist, dass nach Gefäßverletzung aktiviert wird. Aus den Mikrovesikeln können LPAs gebildet werden, die die HIF-1 α -vermittelte SDF-1 α Expression über LPA-Rezeptoren regulieren. Über den genauen molekularen Mechanismus der SDF-1 α Regulation über apoptotischen SMCs ist jedoch unklar.

4. 2. 6. LPA Rezeptoren regulieren die SPCs Mobilisierung nach Gefäßverletzung

Um die funktionelle Beteiligung von LPAs an der SDF-1 α -abhängigen Mobilisierung von SPCs nach Gefäßverletzung zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung des LPA_{1/3} Rezeptorantagonisten Ki16425 auf den Anteil der zirkulierenden Sca-1⁺/lin⁻ Zellen untersucht.

Nach dem Anstieg der zirkulierenden Sca-1⁺/lin⁻ Zellen 24 h nach Gefäßverletzung der CCAs in ApoE^{-/-} Mäusen wurde die Mobilisierung dieser Zellen nach Ki16425 Applikation fast vollständig blockiert (Abb. 25). Dieser Befund weist auf eine wichtige Funktion von LPA Rezeptoren bei der Stammzell-vermittelten vaskulären Wundheilung durch SDF-1 α hin.

5. Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen und Schlaganfälle sind die häufigsten Todesursachen weltweit, häufiger als maligne Erkrankungen. In den meisten Fällen liegt eine Ausbildung neointimaler Plaques zu Grunde, die zu einer Stenosierung, Ruptur oder zu einem thrombotischen Verschluss führen. Dadurch kann es zu einer kritischen Reduktion des Blutflusses kommen und durch diese zu typischen klinischen Beschwerden wie Angina pectoris, Myokardinfarkt, zerebralen Infarkt, Niereninsuffizienz oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit. Die zentrale Therapieform von stenosierten oder verschlossenen Arterien ist die perkutane transluminale Angioplastie (PTA), bei der durch intraluminalen Druck das Gefäß aufgedehnt wird. Eine wesentliche Limitation des Langzeiterfolgs dieser Therapie ist die Restenose, eine erneute Verengung einer stenosierten, atherosklerotischen Arterie in den ersten Monaten nach der Intervention. Eine medikamentöse Prävention der Restenose mit dem Ziel erneute kostenintensive invasive Eingriffe zu vermeiden, wäre von großer Bedeutung. Während nach PTCA das negative Remodeling und die neointimale Hyperplasie zum Lumenverlust beitragen, ist bei der Stentimplantation über 90% des Lumenverlustes auf die Neointimabildung zurückzuführen. Um effektive Medikamente für die Prävention und Therapie atherosklerotischer Gefäßerkrankungen zu finden, ist es wichtig die molekularen Mechanismen der Atherogenese und Neointimabildung zu kennen.

Es ist bekannt, dass die Neointima zu 50% aus SMCs besteht. Bisher ging man von der Hypothese aus, dass die neointimalen SMCs, sowohl bei der nativen Atherosklerose als auch bei der akzelerierten Arteriosklerose, lokal aus der Media der Arterienwand einwandern und in der Intima proliferieren. Inzwischen ist bekannt, dass ein Hauptanteil der intimalen SMCs aus einem adulten Stammzellpool des Knochenmarks stammt und diese permanent als Vorläuferzellen von SMCs im peripheren Blut zirkulieren. Dabei stellte sich die Frage, über welche molekularen Mechanismen die Mobilisierung von Stammzellen in der Zirkulation und deren Rekrutierung in die verletzte Region gesteuert wird.

In den letzten Jahren konnte man das Chemokin stromal cell-derived factor (SDF)-1 α in atherosklerotischen Plaques und in neointimalen Läsionen nach Gefäßverletzung als ein wesentliches Signalmolekül bei der Neointimabildung durch die Mobilisierung und lokale Rekrutierung von SPCs identifiziert werden. Ein wichtiges Bindeglied zwischen der Gefäßverletzung und der SDF-1 α -vermittelten SPC-Rekrutierung stellt die Apoptose der

medialen SMCs unmittelbar nach der Verletzung dar. Es ist bekannt, dass die apoptotische medialen SMCs Mikrovesikel freisetzen, die die SDF-1 α Expression induzieren können und als eine wichtige Quelle für Vorstufen für Lysophosphatidsäuren (LPAs) dienen. Die aktivierten Thrombozyten setzen nach einer Verletzung außerdem LPA-Vorstufen frei. Ferner wurde gefunden, dass der Transkriptionsfaktor hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α im Ischämiemodell die Regulation von SDF-1 α induzieren kann und dass die Aktivität von HIF-1 α jedoch nicht nur durch Hypoxie, sondern auch durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und anderen nicht-hypoxischen Stimuli wie PDGF oder Angiotensin II gesteigert wird. Darüber hinaus steigern die ungesättigten Lysophosphatidsäuren die SDF-1 α und HIF-1 α Expression und können nach kurzfristiger lokaler Inkubation von unverletzten Arterien eine Neointimabildung aus SMCs induzieren.

Allerdings ist unklar welche molekularen Mechanismen die Expression von SDF-1 α nach einer Gefäßverletzung regulieren. Ziel dieser Arbeit war es daher die Beteiligung von HIF-1 α und LPAs bei der SDF-1 α -vermittelte Neointimabildung und SPC-Rekrutierung zu erhalten.

Als Tiermodell der Restenose wurden in der vorliegenden Arbeit weibliche ApoE^{-/-} Mäuse verwendet. Die Gefäßverletzung der linken CCA wurde nach einer vorübergehenden Unterbrechung der Blutzirkulation durch einen Führungsdraht erreicht. Zusätzlich wurde bei einigen Experimenten systemisch einen LPA Rezeptorantagonisten (Ki16425) täglich appliziert. Zur LPA-Analyse wurden außerdem Wildtyp-Mäuse verwendet. Das LPA-Derivat (LPA 20:4) wurde intraluminal in die CCA appliziert, ohne die CCA zu verletzen, folgend von einer täglich applizierten peritonealen Injektion mit CXCR4 (POL551) Antagonisten.

Der spezifische HIF-1 α siRNA Gentransfer wurde in vivo durch ein periadventiel appliziertes Polymer-Pluronic Gel durchgeführt.

Die HIF-1 α mRNA wurde durch quantitative real-time PCR und die Proteinmenge von HIF-1 α in verschiedenen Zellfraktionen mit Western Blot Analyse ermittelt. Ferner wurde HIF-1 α bezüglich der zellulären Lokalisation, der nukleäre Translokation und der Kolo-kalisation mit SDF-1 α untersucht. Die SDF-1 α - und CXCR4 Expression wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Die neointimale und mediale Flächen wurden in Movat's Pentachrom-angefärbten CCAs ausgemessen und die zelluläre Zusammensetzung für glatte Muskelzellen (SMCs) und Makrophagen durch quantitative Immunhistologie ausgewertet. Um die Mobilisierung des Anteil an zirkulierenden Sca-1⁺/lin⁻ SPCs in der mononukleären Zellpopulation zu untersuchen, wurden diese Zellen im peripheren Blut vor- und 24 h nach dem Eingriff durchflusszytometrisch quantifiziert.

Die Untersuchungen zeigten, dass eine mechanische Gefäßverletzung zu einem frühen Anstieg der HIF-1 α mRNA Expression und zu einer kontinuierlichen Zunahme der HIF-1 α Proteinmenge führt. Zusammen mit dem Befund, dass nach der Verletzung HIF-1 α nicht nur im Zytoplasma sondern auch im Zellkern von wenigen medialen aber fast allen neointimalen und luminalen Zellen war, weist auf eine HIF-1 α nukleäre Translokation hin. Dies ist die Voraussetzung für die Bindung an spezifische Promotersequenzen und eine nicht-hypoxische Aktivierung von HIF-1 α -abhängigen Signaltransduktionswegen. Ferner fand sich eine zelluläre Kolo-kalisation von HIF-1 α und SDF-1 α in den medialen und neointimalen Zellen 1 Tag und 2 Wochen nach Gefäßverletzung. Dies stellt einen indirekten Hinweis dafür dar, dass die SDF-1 Expression durch eine gesteigerte DNA-Bindungsaktivität von HIF-1 α reguliert wird.

Die in vivo Applikation einer siRNA gegen HIF-1 α führte zur Reduktion der Proteinmenge des als Positivkontrolle diente Referenzgens Lamin A/C und einer Abnahme der HIF-1 α Expression. Diese Ergebnisse dienten als Nachweis für den erfolgreichen Gentransfer. Die HIF-1 α siRNA Applikation führte zusätzlich zu einer Abnahme der neointimalen SDF-1 α Expression. Dadurch konnte ein direkter Nachweis dafür erbracht werden, dass die SDF-1 α Regulation nach Gefäßverletzung über HIF-1 α erfolgt. Die endotheliale Denudation führte ferner zu einer Mobilisation der Sca-1⁺/lin⁻ SPCs in die Zirkulation, die durch den HIF-1 α siRNA Gentransfer fast vollständig gehemmt werden konnte. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die gesteigerte HIF-1 α Expression nach Gefäßverletzung vermittelt durch SDF-1 α die Mobilisierung von SPCs in der Zirkulation induziert. Dies ging einher mit einer deutlich verminderten neointimalen Fläche und einem verringerten neointimalen SMC Anteil. Dadurch konnte die Beteiligung von HIF-1 α bei der Neointimabildung durch die SPC Rekrutierung nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung von SDF-1 α und dessen Rezeptor CXCR4 bei der Neointimabildung nach Behandlung der unverletzten CCA mit ungesättigten Lysophosphatidsäuren (LPAs) wurde im Wildtyp-Mausmodell eine signifikante Reduktion der Neointima durch LPA 20:4 nach einem CXCR4 Antagonisten (POL551) gefunden. Aus diesem Befund lässt sich folgen, dass die SDF-1 α /CXCR4 Achse eine wichtige Rolle bei der Ausbildung neointimaler Hyperplasie, ähnlich wie nach Gefäßverletzung, spielt.

Die LPA 20:4 Behandlung führte ferner zu einem deutlichen Anstieg der zirkulierenden Sca-1⁺/lin⁻ Zellen, der durch die CXCR4-Antagonist Applikation blockiert wurde. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die gesteigerte SDF-1 α Expression in der

unverletzten Gefäßwand durch LPA 20:4 die Mobilisierung von SPCs induziert wird. Dies könnte als Hinweis auf die Rolle von der SDF-1 α /CXCR4 Achse bei der SPCs Mobilisierung, ähnlich wie nach Gefäßverletzung, gewertet werden. Durch den CXCR4 Antagonisten wurde ebenfalls die CXCR4 Expression und der Anteil der CXCR4-positiven SMCs in der LPA-induzierten Neointima reduziert werden. Da die neointimalen CXCR4-positiven SMCs bei der in erster Linie von zirkulierenden Vorläuferzellen abstammen, könnte der beobachtete Effekt auf eine Hemmung der CXCR4-positiven SPC Rekrutierung in die LPA 20:4-behandelten Gefäßwand zurückzuführen sein.

Zur Untersuchung der Rolle von LPA an der Neointimabildung nach mechanischer Gefäßverletzung zu analysieren, wurde in der vorliegenden Arbeit ApoE^{-/-} Mäusen nach Drahtverletzung der CCA ein systemisch applizierter Antagonist der LPA₁ und LPA₃ Rezeptoren (Ki16425) täglich injiziert. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Neointimabildung, die für eine Beteiligung von LPA bei der Ausbildung neointimaler Hyperplasie über die LPA-Rezeptoren nach Gefäßverletzung spricht. Zusätzlich führte die Ki16425 Behandlung zu einer Abnahme sowohl der neointimalen SDF-1 α - als auch der HIF-1 α Expression. Da die HIF-1 α -vermittelte SDF-1 α Expression entscheidend für die Neointimabildung ist, lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass LPAs eine zentrale Rolle bei der Neointimabildung nach Gefäßverletzung spielen. Nach dem Anstieg der zirkulierenden Sca-1⁺/lin⁻ Zellen 24 h nach Gefäßverletzung wurde die Mobilisierung dieser Zellen nach Ki16425 Applikation fast vollständig gehemmt. Dieser Befund deutet auf eine wichtige Funktion von LPA Rezeptoren bei der Stammzell-vermittelten vaskulären Wundheilung durch SDF-1 α hin.

Insgesamt zeigen die vorliegenden Untersuchungen, dass ungesättigte Lysophosphatidsäuren möglicherweise freigesetzt aus apoptotischen Mikrovesikeln der medialen SMCs zu einer gesteigerten HIF-1 α -vermittelten SDF-1 α Expression führen. Die gewonnenen Ergebnisse bilden eine wichtige Grundlage bei der Untersuchung der molekularen Regulation der SDF-1 α Expression bei der Neointimabildung nach Gefäßverletzung.

6. Literaturverzeichnis

1. Mackay J, Mensah G. *The Atlas of Heart Disease and Stroke*. Geneva: World Health Organization; 2004.
2. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801-9.
3. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-41.
4. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868-74.
5. Ip JH, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman MB, Chesebro JH. Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J Am Coll Cardiol*. 1990;15:1667-87.
6. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:508-19.
7. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 2001;104:503-16.
8. Gruntzig AR, Senning A, Siegenthaler WE. Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med*. 1979;301:61-8.
9. Ruygrok PN, Webster MW, de Valk V, van Es GA, Ormiston JA, Morel MA, Serruys PW. Clinical and angiographic factors associated with asymptomatic restenosis after percutaneous coronary intervention. *Circulation*. 2001;104:2289-94.
10. Arjomand H, Turi ZG, McCormick D, Goldberg S. Percutaneous coronary intervention: historical perspectives, current status, and future directions. *Am Heart J*. 2003;146:787-96.
11. Detre K, Holubkov R, Kelsey S, Cowley M, Kent K, Williams D, Myler R, Faxon D, Holmes D, Jr., Bourassa M, et al. Percutaneous transluminal coronary angioplasty in 1985-1986 and 1977-1981. The National Heart, Lung, and Blood Institute Registry. *N Engl J Med*. 1988;318:265-70.

12. Forrester JS, Fishbein M, Helfant R, Fagin J. A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies. *J Am Coll Cardiol.* 1991;17:758-69.
13. Ferns GA, Avades TY. The mechanisms of coronary restenosis: insights from experimental models. *Int J Exp Pathol.* 2000;81:63-88.
14. Schwartz SM. The intima : A new soil. *Circ Res.* 1999;85:877-9.
15. Komatsu R, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Becker AE. Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses. *Circulation.* 1998;98:224-33.
16. Poon M, Badimon JJ, Fuster V. Overcoming restenosis with sirolimus: from alphabet soup to clinical reality. *Lancet.* 2002;359:619-22.
17. Liu MW, Hearn JA, Luo JF, Anderson PG, Roubin GS, Iyer S, Bilodou L. Reduction of thrombus formation without inhibiting coagulation factors does not inhibit intimal hyperplasia after balloon injury in pig coronary arteries. *Coron Artery Dis.* 1996;7:667-71.
18. Perlman H, Maillard L, Krasinski K, Walsh K. Evidence for the rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells after balloon injury. *Circulation.* 1997;95:981-7.
19. Cirillo P, Golino P, Ragni M, Battaglia C, Pacifico F, Formisano S, Buono C, Condorelli M, Chiariello M. Activated platelets and leucocytes cooperatively stimulate smooth muscle cell proliferation and proto-oncogene expression via release of soluble growth factors. *Cardiovasc Res.* 1999;43:210-8.
20. Chong H, Vodovotz Y, Cox GW, Barcellos-Hoff MH. Immunocytochemical localization of latent transforming growth factor-beta1 activation by stimulated macrophages. *J Cell Physiol.* 1999;178:275-83.
21. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-26.
22. Ferns GA, Raines EW, Sprugel KH, Motani AS, Reidy MA, Ross R. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science.* 1991;253:1129-32.

23. Farb A, Sangiorgi G, Carter AJ, Walley VM, Edwards WD, Schwartz RS, Virmani R. Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. *Circulation*. 1999;99:44-52.
24. Farb A, Weber DK, Kolodgie FD, Burke AP, Virmani R. Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans. *Circulation*. 2002;105:2974-80.
25. Virmani R, Farb A. Pathology of in-stent restenosis. *Curr Opin Lipidol*. 1999;10:499-506.
26. Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ER. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res*. 1995;77:445-65.
27. Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med*. 2002;8:403-9.
28. Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation*. 2002;106:1199-204.
29. Caplice NM, Bunch TJ, Stalboerger PG, Wang S, Simper D, Miller DV, Russell SJ, Litzow MR, Edwards WD. Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:4754-9.
30. Han CI, Campbell GR, Campbell JH. Circulating bone marrow cells can contribute to neointimal formation. *J Vasc Res*. 2001;38:113-9.
31. Shimizu K, Sugiyama S, Aikawa M, Fukumoto Y, Rabkin E, Libby P, Mitchell RN. Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth-muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy. *Nat Med*. 2001;7:738-41.
32. Schober A, Knarren S, Lietz M, Lin EA, Weber C. Crucial role of stromal cell-derived factor-1alpha in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2003;108:2491-7.
33. Tanaka K, Sata M, Hirata Y, Nagai R. Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries. *Circ Res*. 2003;93:783-90.

34. Xu Y, Arai H, Zhuge X, Sano H, Murayama T, Yoshimoto M, Heike T, Nakahata T, Nishikawa S, Kita T, Yokode M. Role of bone marrow-derived progenitor cells in cuff-induced vascular injury in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:477-82.
35. Schober A, Zernecke A. Chemokines in vascular remodeling. *Thromb Haemost.* 2007;97:730-7.
36. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:675-705.
37. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev.* 2000;52:145-76.
38. Horuk R. Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12:313-35.
39. Gerlach LO, Skerlj RT, Bridger GJ, Schwartz TW. Molecular interactions of cyclam and bicyclam non-peptide antagonists with the CXCR4 chemokine receptor. *J Biol Chem.* 2001;276:14153-60.
40. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med.* 1996;184:1101-9.
41. Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelier F. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem.* 2005;280:35760-6.
42. Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold ME, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med.* 2006;203:2201-13.
43. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994;76:301-14.
44. Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol.* 2001;2:108-15.

45. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006;354:610-21.
46. Zernecke A, Schober A, Bot I, von Hundelshausen P, Liehn EA, Mopps B, Mericskay M, Gierschik P, Biessen EA, Weber C. SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circ Res.* 2005;96:784-91.
47. Schober A, Karshovska E, Zernecke A, Weber C. SDF-1alpha-mediated tissue repair by stem cells: a promising tool in cardiovascular medicine? *Trends Cardiovasc Med.* 2006;16:103-8.
48. Sakihama H, Masunaga T, Yamashita K, Hashimoto T, Inobe M, Todo S, Uede T. Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 interaction is critical for development of transplant arteriosclerosis. *Circulation.* 2004;110:2924-30.
49. Yamani MH, Ratliff NB, Cook DJ, Tuzcu EM, Yu Y, Hobbs R, Rincon G, Bott-Silverman C, Young JB, Smedira N, Starling RC. Peritransplant ischemic injury is associated with up-regulation of stromal cell-derived factor-1. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:1029-35.
50. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med.* 2004;10:858-64.
51. Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, Song HY, Kim YM, Cho M, Suh DS, Yoon MS, Chang CL, Jung JS, Kim JH. Cancer-derived lysophosphatidic acid stimulates differentiation of human mesenchymal stem cells to myofibroblast-like cells. *Stem Cells.* 2008;26:789-97.
52. Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol.* 2002;64:993-8.
53. Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40:519-61.

54. Murre C, Bain G, van Dijk MA, Engel I, Furnari BA, Massari ME, Matthews JR, Quong MW, Rivera RR, Stuver MH. Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1218:129-35.
55. Kodama T, Shimizu N, Yoshikawa N, Makino Y, Ouchida R, Okamoto K, Hisada T, Nakamura H, Morimoto C, Tanaka H. Role of the glucocorticoid receptor for regulation of hypoxia-dependent gene expression. *J Biol Chem*. 2003;278:33384-91.
56. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 1995;270:1230-7.
57. Dery MA, Michaud MD, Richard DE. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37:535-40.
58. Camenisch G, Stroka DM, Gassmann M, Wenger RH. Attenuation of HIF-1 DNA-binding activity limits hypoxia-inducible endothelin-1 expression. *Pflugers Arch*. 2001;443:240-9.
59. Page EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, Richard DE. Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem*. 2002;277:48403-9.
60. Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol*. 2001;21:3995-4004.
61. Park JW, Chun YS, Kim MS. Hypoxia-inducible factor 1-related diseases and prospective therapeutic tools. *J Pharmacol Sci*. 2004;94:221-32.
62. Gorlach A, Diebold I, Schini-Kerth VB, Berchner-Pfannschmidt U, Roth U, Brandes RP, Kietzmann T, Busse R. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res*. 2001;89:47-54.
63. Albina JE, Mastrofrancesco B, Vessella JA, Louis CA, Henry WL, Jr., Reichner JS. HIF-1 expression in healing wounds: HIF-1alpha induction in primary inflammatory cells by TNF-alpha. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;281:C1971-7.

64. Frede S, Stockmann C, Freitag P, Fandrey J. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *Biochem J.* 2006;396:517-27.
65. Zhang C, Baker DL, Yasuda S, Makarova N, Balazs L, Johnson LR, Marathe GK, McIntyre TM, Xu Y, Prestwich GD, Byun HS, Bittman R, Tigyi G. Lysophosphatidic acid induces neointima formation through PPARgamma activation. *J Exp Med.* 2004;199:763-74.
66. Yoshida K, Nishida W, Hayashi K, Ohkawa Y, Ogawa A, Aoki J, Arai H, Sobue K. Vascular remodeling induced by naturally occurring unsaturated lysophosphatidic acid in vivo. *Circulation.* 2003;108:1746-52.
67. Hayashi K, Takahashi M, Nishida W, Yoshida K, Ohkawa Y, Kitabatake A, Aoki J, Arai H, Sobue K. Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells induced by unsaturated lysophosphatidic acids. *Circ Res.* 2001;89:251-8.
68. Siess W, Tigyi G. Thrombogenic and atherogenic activities of lysophosphatidic acid. *J Cell Biochem.* 2004;92:1086-94.
69. Lee J, Park SY, Lee EK, Park CG, Chung HC, Rha SY, Kim YK, Bae GU, Kim BK, Han JW, Lee HY. Activation of hypoxia-inducible factor-1alpha is necessary for lysophosphatidic acid-induced vascular endothelial growth factor expression. *Clin Cancer Res.* 2006;12:6351-8.
70. Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, Song HY, Kim YM, Cho M, Suh DS, Yoon MS, Chang CL, Jung JS, Kim JH. Cancer-derived lysophosphatidic acid stimulates differentiation of human mesenchymal stem cells to myofibroblast-like cells. *Stem Cells.* 2008;26:789-97.
71. Williamson P, Schlegel RA. Transbilayer phospholipid movement and the clearance of apoptotic cells. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1585:53-63.
72. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, Caputo RP, Kereiakes DJ, Williams DO, Teirstein PS, Jaeger JL, Kuntz RE. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med.* 2003;349:1315-23.

73. Stone GW, Ellis SG, Cox DA, Hermiller J, O'Shaughnessy C, Mann JT, Turco M, Caputo R, Bergin P, Greenberg J, Popma JJ, Russell ME. A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2004;350:221-31.
74. Costa MA, Simon DI. Molecular basis of restenosis and drug-eluting stents. *Circulation.* 2005;111:2257-73.
75. Finn AV, Joner M, Nakazawa G, Kolodgie F, Newell J, John MC, Gold HK, Virmani R. Pathological correlates of late drug-eluting stent thrombosis: strut coverage as a marker of endothelialization. *Circulation.* 2007;115:2435-41.
76. Daemen J, Wenaweser P, Tsuchida K, Abrecht L, Vaina S, Morger C, Kukreja N, Juni P, Sianos G, Hellige G, van Domburg RT, Hess OM, Boersma E, Meier B, Windecker S, Serruys PW. Early and late coronary stent thrombosis of sirolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents in routine clinical practice: data from a large two-institutional cohort study. *Lancet.* 2007;369:667-78.
77. Gilmore IR, Fox SP, Hollins AJ, Sohail M, Akhtar S. The design and exogenous delivery of siRNA for post-transcriptional gene silencing. *J Drug Target.* 2004;12:315-40.
78. Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med.* 2005;11:50-5.
79. Sioud M, Sorensen DR. Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;312:1220-5.
80. Furnkranz A, Schober A, Bochkov VN, Bashtrykov P, Kronke G, Kadl A, Binder BR, Weber C, Leitinger N. Oxidized phospholipids trigger atherogenic inflammation in murine arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:633-8.
81. Simons M, Edelman ER, DeKeyser JL, Langer R, Rosenberg RD. Antisense c-myc oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulation in vivo. *Nature.* 1992;359:67-70.
82. West JL, Hubbell JA. Comparison of covalently and physically cross-linked polyethylene glycol-based hydrogels for the prevention of postoperative adhesions in a rat model. *Biomaterials.* 1995;16:1153-6.

83. Movat HZ. Demonstration of all connective tissue elements in a single section; pentachrome stains. *AMA Arch Pathol.* 1955;60:289-95.
84. Pisani DF, Dechesne CA. Skeletal muscle HIF-1alpha expression is dependent on muscle fiber type. *J Gen Physiol.* 2005;126:173-8.
85. Becker KF, Schott C, Hipp S, Metzger V, Porschewski P, Beck R, Nahrig J, Becker I, Hofler H. Quantitative protein analysis from formalin-fixed tissues: implications for translational clinical research and nanoscale molecular diagnosis. *J Pathol.* 2007;211:370-8.
86. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.
87. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-5.
88. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25:402-8.
89. Wang Z, Wang DZ, Pipes GC, Olson EN. Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:7129-34.
90. Wenger RH, Gassmann M. Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol Chem.* 1997;378:609-16.
91. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:7987-92.
92. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature.* 1999;399:271-5.
93. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* 2001;292:468-72.

94. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG, Jr. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*. 2001;292:464-8.
95. Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, Pavletich N, Chau V, Kaelin WG. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol*. 2000;2:423-7.
96. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW. Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell*. 2002;111:709-20.
97. Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouyssegur J. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem*. 1999;274:32631-7.
98. Bonello S, Zahringer C, BelAiba RS, Djordjevic T, Hess J, Michiels C, Kietzmann T, Gorch A. Reactive oxygen species activate the HIF-1 α promoter via a functional NF κ B site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:755-61.
99. Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood*. 1999;94:1561-7.
100. Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 α in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2000;275:26765-71.
101. Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res*. 1999;59:3915-8.
102. BelAiba RS, Djordjevic T, Bonello S, Flugel D, Hess J, Kietzmann T, Gorch A. Redox-sensitive regulation of the HIF pathway under non-hypoxic conditions in pulmonary artery smooth muscle cells. *Biol Chem*. 2004;385:249-57.

103. Han JW, Ahn SH, Kim YK, Bae GU, Yoon JW, Hong S, Lee HY, Lee YW, Lee HW. Activation of p21(WAF1/Cip1) transcription through Sp1 sites by histone deacetylase inhibitor apicidin: involvement of protein kinase C. *J Biol Chem.* 2001;276:42084-90.
104. Iyer NV, Leung SW, Semenza GL. The human hypoxia-inducible factor 1alpha gene: HIF1A structure and evolutionary conservation. *Genomics.* 1998;52:159-65.
105. Hanze J, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Rose F. Cellular and molecular mechanisms of hypoxia-inducible factor driven vascular remodeling. *Thromb Haemost.* 2007;97:774-87.
106. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature.* 1996;380:435-9.
107. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1999;237:1-30.
108. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;161:851-8.
109. Szabo IL, Kawanaka H, Jones MK, Pai R, Soreghan BA, Baatar D, Husain SS, Tarnawski AS. Activation of hypoxia inducible factor-1alpha in gastric mucosa in response to ethanol injury: a trigger for angiogenesis? *Life Sci.* 2001;69:3035-44.
110. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* 1996;16:4604-13.
111. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL. Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* 1998;12:149-62.
112. Tang N, Wang L, Esko J, Giordano FJ, Huang Y, Gerber HP, Ferrara N, Johnson RS. Loss of HIF-1alpha in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2004;6:485-95.

113. Okuyama H, Krishnamachary B, Zhou YF, Nagasawa H, Bosch-Marce M, Semenza GL. Expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 in bone marrow-derived mesenchymal cells is dependent on hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 2006;281:15554-63.
114. Yu AY, Shimoda LA, Iyer NV, Huso DL, Sun X, McWilliams R, Beaty T, Sham JS, Wiener CM, Sylvester JT, Semenza GL. Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Clin Invest.* 1999;103:691-6.
115. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Shibata R, Kusaba K, Tahara N, Niiyama H, Nagata T, Imaizumi T. Hypoxia-inducible factor-1alpha/vascular endothelial growth factor pathway for adventitial vasa vasorum formation in hypertensive rat aorta. *Hypertension.* 2002;39:46-50.
116. Andrassy M, Belov D, Harja E, Zou YS, Leitges M, Katus HA, Nawroth PP, Yan SD, Schmidt AM, Yan SF. Central role of PKCbeta in neointimal expansion triggered by acute arterial injury. *Circ Res.* 2005;96:476-83.
117. Zhou RH, Lee TS, Tsou TC, Rannou F, Li YS, Chien S, Shyy JY. Stent implantation activates Akt in the vessel wall: role of mechanical stretch in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:2015-20.
118. Jonas M, Edelman ER, Groothuis A, Baker AB, Seifert P, Rogers C. Vascular neointimal formation and signaling pathway activation in response to stent injury in insulin-resistant and diabetic animals. *Circ Res.* 2005;97:725-33.
119. Assoian RK, Grotendorst GR, Miller DM, Sporn MB. Cellular transformation by coordinated action of three peptide growth factors from human platelets. *Nature.* 1984;309:804-6.
120. Groves HM, Kinlough-Rathbone RL, Richardson M, Jorgensen L, Moore S, Mustard JF. Thrombin generation and fibrin formation following injury to rabbit neointima. Studies of vessel wall reactivity and platelet survival. *Lab Invest.* 1982;46:605-12.
121. Panek RL, Dahring TK, Olszewski BJ, Keiser JA. PDGF receptor protein tyrosine kinase expression in the balloon-injured rat carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1283-8.

122. Zeiffer U, Schober A, Lietz M, Liehn EA, Erl W, Emans N, Yan ZQ, Weber C. Neointimal smooth muscle cells display a proinflammatory phenotype resulting in increased leukocyte recruitment mediated by P-selectin and chemokines. *Circ Res.* 2004;94:776-84.
123. Gorlach A, Kietzmann T. Superoxide and derived reactive oxygen species in the regulation of hypoxia-inducible factors. *Methods Enzymol.* 2007;435:421-46.
124. Chi JT, Wang Z, Nuyten DS, Rodriguez EH, Schaner ME, Salim A, Wang Y, Kristensen GB, Helland A, Borresen-Dale AL, Giaccia A, Longaker MT, Hastie T, Yang GP, van de Vijver MJ, Brown PO. Gene expression programs in response to hypoxia: cell type specificity and prognostic significance in human cancers. *PLoS Med.* 2006;3:e47.
125. Bracken CP, Fedele AO, Linke S, Balrak W, Lisy K, Whitelaw ML, Peet DJ. Cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha stabilization and transactivation in a graded oxygen environment. *J Biol Chem.* 2006;281:22575-85.
126. Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res.* 1995;77:638-43.
127. Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science.* 1993;261:600-3.
128. Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:2305-9.
129. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, Honjo T. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics.* 1995;28:495-500.
130. Garcia-Moruja C, Alonso-Lobo JM, Rueda P, Torres C, Gonzalez N, Bermejo M, Luque F, Arenzana-Seisdedos F, Alcami J, Caruz A. Functional characterization of SDF-1 proximal promoter. *J Mol Biol.* 2005;348:43-62.

131. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, Chimenti S, Landsman L, Abramovitch R, Keshet E. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell*. 2006;124:175-89.
132. Murdoch C. CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. *Immunol Rev*. 2000;177:175-84.
133. Loetscher M, Geiser T, O'Reilly T, Zwahlen R, Baggiolini M, Moser B. Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J Biol Chem*. 1994;269:232-7.
134. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*. 1996;272:872-7.
135. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 1996;381:661-6.
136. Sierro F, Biben C, Martinez-Munoz L, Mellado M, Ransohoff RM, Li M, Woehl B, Leung H, Groom J, Batten M, Harvey RP, Martinez AC, Mackay CR, Mackay F. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:14759-64.
137. Mazzinghi B, Ronconi E, Lazzeri E, Sagrinati C, Ballerini L, Angelotti ML, Parente E, Mancina R, Netti GS, Becherucci F, Gacci M, Carini M, Gesualdo L, Rotondi M, Maggi E, Lasagni L, Serio M, Romagnani S, Romagnani P. Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells. *J Exp Med*. 2008;205:479-90.
138. Vila-Coro AJ, Rodriguez-Frade JM, Martin De Ana A, Moreno-Ortiz MC, Martinez AC, Mellado M. The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *Faseb J*. 1999;13:1699-710.
139. Wang JF, Park IW, Groomman JE. Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of

- hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C. *Blood*. 2000;95:2505-13.
140. Tilton B, Ho L, Oberlin E, Loetscher P, Baleux F, Clark-Lewis I, Thelen M. Signal transduction by CXC chemokine receptor 4. Stromal cell-derived factor 1 stimulates prolonged protein kinase B and extracellular signal-regulated kinase 2 activation in T lymphocytes. *J Exp Med*. 2000;192:313-24.
141. Ganju RK, Brubaker SA, Meyer J, Dutt P, Yang Y, Qin S, Newman W, Groopman JE. The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem*. 1998;273:23169-75.
142. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*. 1996;382:635-8.
143. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*. 1998;393:591-4.
144. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*. 1998;393:595-9.
145. Ara T, Tokoyoda K, Sugiyama T, Egawa T, Kawabata K, Nagasawa T. Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny. *Immunity*. 2003;19:257-67.
146. Damas JK, Waehre T, Yndestad A, Ueland T, Muller F, Eiken HG, Holm AM, Halvorsen B, Froland SS, Gullestad L, Aukrust P. Stromal cell-derived factor-1alpha in unstable angina: potential antiinflammatory and matrix-stabilizing effects. *Circulation*. 2002;106:36-42.
147. Korblyng M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med*. 2003;349:570-82.

148. Rivard A, Luo Z, Perlman H, Fabre JE, Nguyen T, Maillard L, Walsh K. Early cell loss after angioplasty results in a disproportionate decrease in percutaneous gene transfer to the vessel wall. *Hum Gene Ther.* 1999;10:711-21.
149. Walsh K, Smith RC, Kim HS. Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture. *Circ Res.* 2000;87:184-8.
150. Beohar N, Flaherty JD, Davidson CJ, Maynard RC, Robbins JD, Shah AP, Choi JW, MacDonald LA, Jorgensen JP, Pinto JV, Chandra S, Klaus HM, Wang NC, Harris KR, Decker R, Bonow RO. Antirestenotic effects of a locally delivered caspase inhibitor in a balloon injury model. *Circulation.* 2004;109:108-13.
151. Schwartz SM. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest.* 1997;99:2814-6.
152. Sata M. Circulating vascular progenitor cells contribute to vascular repair, remodeling, and lesion formation. *Trends Cardiovasc Med.* 2003;13:249-53.
153. Asahara T, Bauters C, Pastore C, Kearney M, Rossow S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation.* 1995;91:2793-801.
154. Wight TN. The extracellular matrix and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 1995;6:326-34.
155. Hillebrands JL, Klatter FA, van den Hurk BM, Popa ER, Nieuwenhuis P, Rozing J. Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *J Clin Invest.* 2001;107:1411-22.
156. Saiura A, Sata M, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M. Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis. *Nat Med.* 2001;7:382-3.
157. Religa P, Bojakowski K, Maksymowicz M, Bojakowska M, Sirsjo A, Gaciong Z, Olszewski W, Hedin U, Thyberg J. Smooth-muscle progenitor cells of bone marrow origin contribute to the development of neointimal thickenings in rat aortic allografts and injured rat carotid arteries. *Transplantation.* 2002;74:1310-5.

158. Kollet O, Shivtiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA, Lapidot T. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest.* 2003;112:160-9.
159. Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, Rovner A, Ellis SG, Thomas JD, DiCorleto PE, Topol EJ, Penn MS. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet.* 2003;362:697-703.
160. Weber C, Schober A, Zernecke A. Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1997-2008.
161. Massberg S, Konrad I, Schurzinger K, Lorenz M, Schneider S, Zohlnhoefer D, Hoppe K, Schiemann M, Kennerknecht E, Sauer S, Schulz C, Kerstan S, Rudelius M, Seidl S, Sorge F, Langer H, Peluso M, Goyal P, Vestweber D, Emambokus NR, Busch DH, Frampton J, Gawaz M. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med.* 2006;203:1221-33.
162. Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, Sukhova GK, Libby P, Luster AD. The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. *Circ Res.* 2000;86:131-8.
163. Sweeney EA, Lortat-Jacob H, Priestley GV, Nakamoto B, Papayannopoulou T. Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem/progenitor cells. *Blood.* 2002;99:44-51.
164. Hattori K, Heissig B, Tashiro K, Honjo T, Tateno M, Shieh JH, Hackett NR, Quitariano MS, Crystal RG, Rafii S, Moore MA. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood.* 2001;97:3354-60.
165. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fujii N, Sandbank J, Zipori D, Lapidot T. G-

- CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol.* 2002;3:687-94.
166. Ceradini DJ, Gurtner GC. Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue. *Trends Cardiovasc Med.* 2005;15:57-63.
167. Koide S, Okazaki M, Tamura M, Ozumi K, Takatsu H, Kamezaki F, Tanimoto A, Tasaki H, Sasaguri Y, Nakashima Y, Otsuji Y. PTEN reduces cuff-induced neointima formation and proinflammatory cytokines. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H2824-31.
168. Nemenoff RA, Simpson PA, Furgeson SB, Kaplan-Albuquerque N, Crossno J, Garl PJ, Cooper J, Weiser-Evans MC. Targeted deletion of PTEN in smooth muscle cells results in vascular remodeling and recruitment of progenitor cells through induction of stromal cell-derived factor-1alpha. *Circ Res.* 2008;102:1036-45.
169. Varney ML, Olsen KJ, Mosley RL, Singh RK. Paracrine regulation of vascular endothelial growth factor--a expression during macrophage-melanoma cell interaction: role of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-stimulating factor. *J Interferon Cytokine Res.* 2005;25:674-83.
170. Shiba Y, Takahashi M, Yoshioka T, Yajima N, Morimoto H, Izawa A, Ise H, Hatake K, Motoyoshi K, Ikeda U. M-CSF accelerates neointimal formation in the early phase after vascular injury in mice: the critical role of the SDF-1-CXCR4 system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:283-9.
171. Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ, Abraham RT. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol.* 2002;22:7004-14.
172. Zohlhofer D, Nuhrenberg TG, Neumann FJ, Richter T, May AE, Schmidt R, Denker K, Clauss MA, Schomig A, Baeuerle PA. Rapamycin effects transcriptional programs in smooth muscle cells controlling proliferative and inflammatory properties. *Mol Pharmacol.* 2004;65:880-9.
173. Mills GB, Moolenaar WH. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:582-91.

174. Saba JD. Lysophospholipids in development: Miles apart and edging in. *J Cell Biochem.* 2004;92:967-92.
175. Bando K, Aoki J, Taira A, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K. Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species. Structure-activity relationship of cloned LPA receptors. *FEBS Lett.* 2000;478:159-65.
176. Aoki J. Mechanisms of lysophosphatidic acid production. *Semin Cell Dev Biol.* 2004;15:477-89.
177. Eichholtz T, Jalink K, Fahrenfort I, Moolenaar WH. The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J.* 1993;291 (Pt 3):677-80.
178. Sano T, Baker D, Virag T, Wada A, Yatomi Y, Kobayashi T, Igarashi Y, Tigyi G. Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood. *J Biol Chem.* 2002;277:21197-206.
179. Aoki J, Taira A, Takanezawa Y, Kishi Y, Hama K, Kishimoto T, Mizuno K, Saku K, Taguchi R, Arai H. Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *J Biol Chem.* 2002;277:48737-44.
180. Anliker B, Chun J. Cell surface receptors in lysophospholipid signaling. *Semin Cell Dev Biol.* 2004;15:457-65.
181. Smyth SS, Sciorra VA, Sigal YJ, Pamuklar Z, Wang Z, Xu Y, Prestwich GD, Morris AJ. Lipid phosphate phosphatases regulate lysophosphatidic acid production and signaling in platelets: studies using chemical inhibitors of lipid phosphate phosphatase activity. *J Biol Chem.* 2003;278:43214-23.
182. McIntyre TM, Pontsler AV, Silva AR, St Hilaire A, Xu Y, Hinshaw JC, Zimmerman GA, Hama K, Aoki J, Arai H, Prestwich GD. Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:131-6.
183. Lim S, Jin CJ, Kim M, Chung SS, Park HS, Lee IK, Lee CT, Cho YM, Lee HK, Park KS. PPARgamma gene transfer sustains apoptosis, inhibits vascular smooth muscle

- cell proliferation, and reduces neointima formation after balloon injury in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:808-13.
184. Marx N, Wohrle J, Nusser T, Walcher D, Rinker A, Hombach V, Koenig W, Hoher M. Pioglitazone reduces neointima volume after coronary stent implantation: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial in nondiabetic patients. *Circulation.* 2005;112:2792-8.
185. Phillips JW, Barringhaus KG, Sanders JM, Yang Z, Chen M, Hesselbacher S, Czarnik AC, Ley K, Nadler J, Sarembock IJ. Rosiglitazone reduces the accelerated neointima formation after arterial injury in a mouse injury model of type 2 diabetes. *Circulation.* 2003;108:1994-9.
186. Reinhard P, Sevilimis G, Karshovska E, Zagorac D, Globke B, Theisen K, Klauss V, Schober A. Lysophosphatidic acid-induced neointima formation is mediated by mobilization of vascular progenitor cells and enhanced SDF-1alpha expression. *European Heart Journal.* 2007;28:362.
187. Zagorac D, Karshovska E, Sevilimis G, Reinhard P, Globke B, Weber C, Schober A. A small molecule CXCR4 antagonist inhibits neointima formation and smooth muscle progenitor cell mobilization after arterial injury. *Clin Res Cardiol.* 2007;96:V634.
188. Ishii I, Fukushima N, Ye X, Chun J. Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:321-54.
189. Anliker B, Chun J. Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J Biol Chem.* 2004;279:20555-8.
190. Weiner JA, Chun J. Schwann cell survival mediated by the signaling phospholipid lysophosphatidic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:5233-8.
191. Ohta H, Sato K, Murata N, Damirin A, Malchinkhuu E, Kon J, Kimura T, Tobo M, Yamazaki Y, Watanabe T, Yagi M, Sato M, Suzuki R, Murooka H, Sakai T, Nishitoba T, Im DS, Nochi H, Tamoto K, Tomura H, Okajima F. Ki16425, a subtype-selective antagonist for EDG-family lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol.* 2003;64:994-1005.

192. Boucharaba A, Serre CM, Guglielmi J, Bordet JC, Clezardin P, Peyruchaud O. The type 1 lysophosphatidic acid receptor is a target for therapy in bone metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:9643-8.
193. Kim J, Keys JR, Eckhart AD. Vascular smooth muscle migration and proliferation in response to lysophosphatidic acid (LPA) is mediated by LPA receptors coupling to Gq. *Cell Signal*. 2006;18:1695-701.
194. Gerrard JM, Robinson P. Identification of the molecular species of lysophosphatidic acid produced when platelets are stimulated by thrombin. *Biochim Biophys Acta*. 1989;1001:282-5.
195. Siess W. Athero- and thrombogenic actions of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1582:204-15.
196. Fingerle J, Johnson R, Clowes AW, Majesky MW, Reidy MA. Role of platelets in smooth muscle cell proliferation and migration after vascular injury in rat carotid artery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:8412-6.
197. Friedman RJ, Stemerman MB, Wenz B, Moore S, Gauldie J, Gent M, Tiell ML, Spaet H. The effect of thrombocytopenia on experimental arteriosclerotic lesion formation in rabbits. Smooth muscle cell proliferation and re-endothelialization. *J Clin Invest*. 1977;60:1191-201.
198. Balsam LB, Mokhtari GK, Jones S, Peterson S, Hoyt EG, Kofidis T, Tanaka M, Cooke DT, Robbins RC. Early inhibition of caspase-3 activity lessens the development of graft coronary artery disease. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24:827-32.
199. Fourcade O, Simon MF, Viode C, Rugani N, Leballe F, Ragab A, Fournie B, Sarda L, Chap H. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell*. 1995;80:919-27

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| 1-AGP..... | Alkyl-Glycerophospholipid |
| A..... | Arteria |
| Akt..... | Akt Kinase |
| AP-1/2..... | activator protein-1/2 |
| ApoE..... | Apolipoprotein E |
| Aqua dest..... | destilliertes Wasser |
| bHLH..... | basisches helix-loop-helix Motiv |
| BSA..... | bovine serum albumin (Albumin aus Rinderserum) |
| CCA..... | arteria carotis communis, Halsschlagader |
| CD..... | cluster of differentiation |
| c-Kit..... | Rezeptor für Stammzellfaktor |
| Cp..... | crossing point |
| CXCR4/7..... | CXC Chemokinrezeptor 4/7 |
| DAB..... | Diaminobenzidin |
| DAPI..... | Diaminophenylindole |
| DEPC..... | Diethyl-Pyrocbonat |
| DMSO..... | Dimethyl-Sulfoxid |
| DNA..... | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase..... | Desoxyribonukease |
| dNTP..... | 2'-Deoxynukleosid-5'-triphosphat |
| DTT..... | Dithio-treitol |
| ECA..... | arteria carotis externa |
| ECL..... | enhanced chemiluminescence |
| Edg..... | endothelial differentiation gene |
| EDTA..... | Ethylendinitrilotetraessigsäure |
| EEL..... | lamina elastica externa |
| EGF..... | epidermal growth factor |
| ELISA..... | enzyme linked Immunosorbent assay |
| ENA-78..... | epithelial cell-derived neutrophil-activating protein-78 |
| EPCs..... | endothelial progenitor cells |

| | |
|----------------------|--|
| ERK-1/2 | extracellular signal regulated kinase-1/2 |
| FACS | fluorescence activated cell sorting |
| FELASA | Federation of European Laboratory Animal Science Associations |
| FGF | fibroblast growth factor |
| FITC | Fluorescein-Isothiocyanat |
| FSC | forward light scatter, Vorwärtsstreulicht |
| GAPDH | Glutaraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| G-CSF | granulocyte-colony stimulating factor |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein |
| GP | Alkyl-Glycerophosphat |
| GRO- α | growth-related oncogene- α |
| HEPES | Hydroxyethyl-piperazinyl-ethansulfonsäure |
| HIF-1 α | hypoxia-inducible factor-1 α |
| HIV | humanes Immundefizienz-Virus |
| HRE | hypoxia-responsive element |
| HRP | horseradish peroxidase, (Peroxidase aus dem Meerrettich) |
| ICA | arteria carotis interna |
| ICAM-1 | intercellular adhesion molecule-1 |
| IEL | lamina elastica interna |
| Ig | Immunglobulin |
| IGF-1/2 | insulin like growth factor-1/2 |
| IL-1 β | interleukin-1 β |
| IVC | einzelventilirtes Käfigsystem |
| Jan | Janus Kinase |
| LacZ | Laktose Z Gen |
| LDL | low-densitylipoprotein |
| lin | lineage |
| LPA | Lysophosphatidsäure |
| LPC | Lysophosphatidylcholin |
| LPE | Lysophosphatidylethanolamin |
| LPL | Lysophospholipide |
| LPP | Lipidphosphat Phosphatasen |
| LPS | Lysophosphatidylserin |

| | |
|----------------------|--|
| lysoPLD..... | Lysophospholipase D |
| Mac-2 | macrophage antigen-1 |
| MAPK | mitogen-activated protein kinase |
| MCP-1 | monocyte chemoattractant protein-1 |
| M-CSF..... | macrophage-colony stimulation factor |
| MMPs | Matrix Metalloproteinasen |
| moxLDL..... | mildly oxidized LDL |
| mRNA | messenger RNA |
| mTOR..... | mammalian target of rapamycin |
| NF-1 | nuclear factor-1 |
| NS..... | nicht signifikant |
| NTC..... | no template control |
| ODD | oxygen-dependent degradation |
| OH..... | Hydroxy- |
| PA..... | Phosphatidsäure |
| PBS..... | phosphate buffered saline |
| PDGF..... | platelet-derived growth factor |
| PE | Phosphatidylethanolamin |
| PEO-PPO-PEO..... | Polyethylenoxid-Polypropylenoxid- Polyethylenoxid |
| PHD..... | Prolyl-4-Hydroxylasen |
| PI3K | phosphoinositol 3-kinase |
| PKC..... | Proteinkinase C |
| PLA 1/2 | Phospholipase 1/2 |
| PLC- γ | Phospholipase C- γ |
| PPAR- γ | peroxisome proliferator activated receptor- γ |
| PS | Phosphatidylserin |
| PS-PLA..... | Phosphatidylserin-spezifische Phospholipase A ₁ |
| PTCA..... | percutane transluminale koronare Angioplastie |
| PTEN..... | phosphatase and tensin homolog |
| PVDF..... | Polyvinylindendifluorid |
| pVHL..... | von Hippel-Lindau Protein |
| RISC | RNA-induced silencing complex |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| Rnase | Ribonuklease |

| | |
|-------------------------|--|
| ROS | reactive oxygen species |
| rRNA | ribosomale RNA |
| RT-PCR..... | reverse transkription–Polymerasekettenreaktion |
| Sca-1 | stem cell antigen-1 |
| SDF-1 α | stromal cell-derived factor-1 α |
| SDS..... | Natrium-Dodecyl-Sulfat |
| SDS-PAGE..... | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| siRNA/RNAi | small interfering RNA |
| SMCs..... | smooth muscle cells |
| SMMHC | smooth muscle myosin heavy chain |
| Sp1..... | specificity protein-1 |
| SPCs | smooth muscle progenitorcells |
| sPLA ₂ | lösliche Phospholipase A ₂ |
| SSC..... | side scatter, Seitwärtsstreulicht |
| STAT | signal transducers and activation of transcription |
| TAD..... | Transaktivierungsdomän |
| TBST | Tris bufferes saline with Tween 20 |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TGF- β | transforming growth factor- β |
| TNF- α | tumor necrosis factor- α |
| TRITC | Tetramethylrhodaminisiothiocyanat |
| VCAM-1..... | cell adhesion molecule 1 |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |
| VSMCs..... | vascular smooth muscle cells |
| α -SMA..... | α -smooth muscle actin |

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. med. Andreas Schober, der mir den Einstieg in die medizinische Forschung und die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit gegeben hat. Ohne seine kompetente wissenschaftliche Betreuung und hilfreiche fachliche Ratschläge wäre die Fertigstellung dieses Projektes nicht denkbar gewesen.

Mein Dank gilt besonders dem Team von Herrn Prof. Dr. med. Christian Weber (Leiter des Instituts für Molekulare Herz-Kreislaufforschung (IMCAR), Universitätsklinikum Aachen) für die engagierte wissenschaftliche Anteilnahme und Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Frau Andrea Millet für die engagierte Arbeit und Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Zudem möchte ich mich bei den Tierpflegern in der Zentralen Versuchstierhaltung (ZVH) am Klinikum der Universität München in der Chirurgischen Klinik und Chirurgischen Poliklinik unter der Leitung von Dr. med. vet. Peter Scheuber für die intensive und verantwortungsvolle Betreuung der Tiere bedanken.

Sehr herzlich möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Freund für deren Unterstützung und ihre Motivation bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Publikationen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Publikationen angefertigt:

Schober A, **Karshovska E**, Zerneck A, Weber C. SDF-1alpha-Mediated Tissue Repair by Stem Cells: A Promising Tool in Cardiovascular Medicine? *Trends Cardiovasc Med.* 2006;16:103-108.

E. Karshovska, A. Zerneck, G. Sevilmis, A. Millet, M. Hristov, C. Cohen, H. Schmid, F. Krotz, H.-Y. Sohn, V. Klauss, C. Weber, A. Schober. Expression of HIF-1 α in injured arteries controls SDF-1 α -mediated neointima formation in apoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(12):2540-7.

E. Karshovska*, D. Zagorac*, A. Zerneck, V. Klauss, C. Weber, A. Schober. A small molecule CXCR4 antagonist inhibits neointima formation and smooth muscle progenitor cell mobilization after arterial injury. *J Thromb Haemost.* Oct;6(10):1812-5.2008.

E. Karshovska, A. Schober. Mechanisms of arterial remodeling and neointima formation: an updated view on the chemokine system. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms.* DDMEC 303.2008;Vol.5:e293-e298.

P. Subramanian*, **E. Karshovska***, P. Reinhard, R. T. A. Megens, S. Akhtar, M. van Zandvoort, C. Ludin, C. Weber, A. Schober. Lysophosphatidic acid receptors LPA₁ and LPA₃ promote SDF-1 α -mediated smooth muscle progenitor cell recruitment in neointima formation. *In Revision 2009.*

Publizierte Kongressbeiträge:

E. Karshovska, G. Sevilmis, A. Zerneck, A. Millet, H. Schmid, H.-Y. Sohn, C. Weber, A. Schober. Expression and activation of HIF-1alpha in neointima formation after vascular injury in apoE-deficient mice. *Clin Res Cardiol.* 2006; 95: Suppl 7. P103

Karshovska E., Sevilimis G., Millet A., Sohn H.-Y., Weber C., Schober A. Inhibition of HIF-1alpha in injured arteries reduces neointimal formation and SDF-1alpha expression in apoE-deficient mice. *Clin Res Cardiol.* 2007;96:V1726.

Zagorac D., **Karshovska E.**, Sevilimis G., Reinhard P., Globke B., Weber C., Schober A. A small molecule CXCR4 antagonist inhibits neointima formation and smooth muscle progenitor cell mobilization after arterial injury. *Clin Res Cardiol.* 2007;96:V634.

Reinhard P., Sevilimis G., **Karshovska E.**, Globke B., Schober A. Neointima formation by unsaturated lysophosphatidic acid is associated with smooth muscle progenitor cell mobilization and SDF-1alpha expression. *Clin Res Cardiol.* 2007;96:V296.

Karshovska E., Zerneck A., Sevilimis S., Millet A., Sohn H.-Y., Klauss V., Theisen K., Weber C., Schober A. Inhibition of HIF-1alpha in injured arteries reduces neointimal formation and SDF-1alpha expression in apoE-deficient mice. *European Heart Journal.* 2007;28:P1829.

Reinhard P., Sevilimis S., **Karshovska E.**, Zagorac D., Globke B., Theisen K., Klauss V., Schober A. Lysophosphatidic acid-induced neointima formation is mediated by mobilization of vascular progenitor cells and enhanced SDF-1alpha expression. *European Heart Journal.* 2007;28:362.

Zagorac D., **Karshovska E.**, Sevilimis S., Reinhard P., Globke B., Theisen K., Klauss V., Weber C., Schober A. A small molecule CXCR4 antagonist inhibits neointima formation and smooth muscle progenitor cell mobilization after arterial injury. *European Heart Journal.* 2007;28:P4556.

Karshovska E., Millet A., Sohn H.-Y., Klauss V., Weber Chr., Schober A. Inhibition of HIF-1 α in injured arteries reduces neointimal formation and SDF-1 α expression in apoE-deficient mice. 14. Dreiländertagung der Deutschen, Östreichischen und Schweizerischen Gesellschaft für Angiologie;2007:FV10.03.

E. Karshovska, A. Zerneck, C. Weber and A. Schober. Inhibition of HIF-1 α in injured arteries reduces neointimal formation and SDF-1 α expression in apoE-deficient mice. 4th European Meeting on Vascular Biology and Medicine-EMVBM, Bristol, UK;2007:W282.

E. Karshovska, G. Sevilimis, P. Reinhard, H.-J. Anders, V. Klauss, C. Weber, A. Schober. The SDF-1 α /CXCR4 axis mediates vascular progenitor cell mobilization and neointima formation by unsaturated lysophosphatidic acid. *Clin Res Cardiol.* 2008;97- Suppl 1:V1032.

B. Globke, **E. Karshovska**, G. Sevilimis, P. Reinhard, D. Zagorac, V. Klauss, C. Weber, A. Schober. Unsaturated lysophosphatidic acid induce atherogenic monocyte adhesion in murine carotid arteries. *Clin Res Cardiol.* 2008; 97- Suppl 1:V1648.

E. Karshovska, A. Zerneck, G. Sevilmis, V. Klauss, Chr. Weber, A. Schoner. Die Expression von HIF-1 α reguliert die SDF-1 α -vermittelte Neointimabildung nach Gefäßverletzung in ApoE^{-/-} Mäusen. 114. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin.2008:PS110.

Lebenslauf

Name: Ela Karshovska
Adresse: Sinzingerstr. 1
82256 Fürstenfeldbruck
Geburtsdatum und -ort: 13.01.1978 in Pleven, Bulgarien
Familienstand: ledig
Eltern: Kunka Karshovska (Pensionärin), Strashimir Karshovski
(Pensionär)

Schulbildung

1985-1992 Grundschole, Bulgarien
1992-1997 Deutschsprachiges Gymnasium „Prof. Konstantin Galabov“, Sofia,
Bulgarien

Hochschulausbildung

10/2004 Staatsexamen und Diplomarbeit im Fach Pharmazie;
Magisterprüfung
04/2004-09/2004 Auslandssemester an der Ruprecht-Karls-Universität,
Heidelberg
1999-2005 Studium der Pharmazie, Medizinische Universität, Sofia;
erworbener akademischer Grad-Magister für Pharmazie
1997-1995 Studium der Biologie und Chemie an der Universität „Kliment
Ochridski“, Sofia

Wissenschaftlicher Werdegang

Seit 05/2005 Wissenschaftliche Tätigkeit als wissenschaftlicher Angestellter
an der Medizinischen Poliklinik der Innenstadt, Ludwigs-
Maximilians-Universität (LMU) München (Direktor Prof. Dr.
M. Reincke); Anfertigung einer Dissertation in Humanbiologie
an der medizinischen Fakultät der LMU-München unter
Anleitung von Prof. Dr. med. Andreas Schober
04/2004-09/2005 Gastwissenschaftliche Tätigkeit am Deutschen
Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg