

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I, Klinikum Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Professor Dr. Gerhard Steinbeck

**Therapeutische Neovaskularisation durch embryonale
endotheliale Progenitorzellen bei chronisch peripherer Ischämie
am Kaninchenmodell**

Dissertation

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

vorgelegt von
Kerstin Büttner
aus München

München 2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Kupatt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Oliver Schnell
Priv. Doz. Dr. Derya Tilki

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

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

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Allgemeines.....	5
2	Ziel der Arbeit	8
3	Endotheliale Progenitorzellen	9
3.1	Einführung	9
3.2	Isolierung und Kultivierung.....	11
3.3	Charakterisierung und Differenzierung	11
3.4	Rekrutierung und Mobilisierung	13
3.5	Homing und Regeneration	13
3.6	Einflussfaktoren auf die EPC-Zahl	14
3.7	Applikation und therapeutische Nutzung der EPCs	15
4	Material und Methoden	17
4.1	Isolierung und Kultivierung der eEPCs.....	17
4.2	Tierexperimentelles Modell	17
4.3	Anästhesie	18
4.4	Infektionsprophylaxe	19
4.5	Postoperative Analgesie	19
4.6	Induktion der Ischämie	19
4.7	Selektive, retrograde Infusion der EPCs	20
4.8	Angiographie	21
4.9	Auswertung der Angiogenese.....	22
4.10	Auswertung der Arteriogenese	23
4.11	Beurteilung des Blutflusses.....	24
4.12	Zellnachweis mit DiI	26
4.13	Aortenringproben	26
4.14	Genanalyse	26
4.15	RNS und Proteinanalyse	27
4.16	Statistik	27
5	Ergebnisse	28
5.1	Zellnachweis mit DiI-markierten eEPCs	28
5.2	Nachweis der endogen induzierten Angiogenese.....	30
5.3	Nachweis der proangiogenen Faktoren.....	31
5.4	Validierung der Affymetrixdaten	32

5.5	Angiogenese – Kapillardichte	34
5.6	Arteriogenese – Kollateralwerte	35
5.7	Perfusion – Blutfluss	37
6	Diskussion	38
7	Zusammenfassung	46
8	Literaturverzeichnis	48
9	Abkürzungsverzeichnis	60
10	Publikation	62
11	Danksagung	63
12	Anhang	64
12.1	Anhang A – Gen Primer	64
12.2	Anhang B - Faktoren	65

1 Allgemeines

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind in vielen Industrienationen die häufigste Todesursache. Neben der erhöhten Morbidität und Funktionsstörung stehen sie v. a. wegen den steigenden Kosten im Gesundheitswesen im Mittelpunkt des Interesses. Während v. a. die koronare Herzerkrankung (KHE) in Westeuropa, Nordamerika und Australien abnimmt (Dorner et al., 2004), steigt sie in Zentral- und Osteuropa, in Teilen der ehemaligen UdSSR sowie Asien rasant an. Ursache dafür ist der an den westlichen „way of life“ angepasste Lebensstil dieser Länder, der die kardiovaskulären Risikofaktoren Nikotin, Hyperlipidämie sowie Hypertonus und Diabetes mellitus fördert. V. a. der steigende Nikotinkonsum ist verantwortlich dafür, dass selbst in Ländern, in denen die Menschen an Hunger leiden müssen, nun Krankheiten wie Herzinfarkt und periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) zunehmend diagnostiziert werden (Buschmann et al., 2000).

In den Industrienationen leiden ca. 10 % der männlichen Bevölkerung unter Gefäßverschlüssen der Extremitäten. Betroffen sind hauptsächlich Männer über 50 Jahren. Die Häufigkeit steigt mit dem Alter und die Geschlechtsverteilung beträgt m:w = 5:1.

Äthiologisch kommen zu über 95 % alle Risikofaktoren der Arteriosklerose wie z. B. Nikotinabusus, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Fettstoffwechselstörungen, Adipositas, Insulinresistenz und Hyperinsulinämie als Hauptursache in Frage. Dagegen spielen Vaskulitiden und Angiitiden wie z. B. die Thrombangiitis obliterans (M. Winiwarter –Buerger) oder das Takayasu – Syndrom nur bei knapp 5 % eine Rolle bei der Entstehung der pAVK.

Die Beschwerden bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit reichen von anfänglichen Schmerzen beim Gehen längerer Strecken (Stadium I nach Fontaine-Ratschow) bis Schmerzen bereits in Ruhe (Stadium IV).

Die heutige Therapie beinhaltet neben der Basistherapie auch konservative und invasive Therapiemaßnahmen. Neben der Vermeidung der potentiellen Risikofaktoren kommt dem Gehtraining eine bedeutende Rolle zu. Durch das Gehtraining wird die Kollateralisierung gefördert, über die eine ausreichende Perfusion unter Umgehung des stenosierten Gefäßes im ischämischen Gebiet erzielt

werden kann. Zusätzlich vermindern Thrombozytenaggregationshemmer (ASS, Clopidogrel) die vaskuläre Gesamtmortalität um fast 20 % (Antiplatelet Trialist's Collaboration-Study). Pharmakologisch können Prostanoiden (Iloprost, Alprostadil) versucht werden. Diese verbessern über eine Vasodilatation den Abfluss im Ischämiegebiet. Neben verbesserten Stoffwechselbedingungen soll auch die Kollateralenbildung gefördert werden. Es fehlt aber bis heute ein eindeutiger Wirkungsnachweis. Vasoaktive Substanzen wie Pentoxifyllin und Naftidrofuryl verbessern über komplexe Mechanismen die Mikrozirkulation. Für sie ist ebenso ein Wirkungsnachweis in randomisierten doppelblinden Studien ausstehend. Bei einem gewissen Prozentteil der Patienten kommt es trotz Kollateralisierung zu einer Progression der Symptome. Hier wird dann meist die Indikation zu operativen (Thrombendarteriektomie, Bypässe) oder interventionellen Revaskularisation (z.B. PTA) gestellt (Herold, 2010). Versagen auch diese Methoden, bleibt nur noch die Amputation der betroffenen Extremität. Da aber v. a. bei den interventionellen Ansätzen mit Restenosen zu rechnen ist, wächst die Patientenpopulation, für die die etablierten therapeutischen Optionen erschöpft sind („no option patients“). Für diese Patienten gilt es, alternative Möglichkeiten der Re- bzw. Neovaskularisation zu finden (Buschmann et al., 2000).

Seit 20 Jahren versuchen Forscher weltweit diese Alternativen im Verstehen und damit Verändern von molekularen Abläufen der Neovaskularisation zu finden. In vielen tierexperimentellen Studien zeigen vaskuläre Wachstumsfaktoren wie VEGF und rFGF-2 positive Effekte auf die Gefäßneubildung. Studien am Menschen verliefen bisher allerdings eher enttäuschend. So konnte der Erfolg mit dem Wachstumsfaktor VEGF in der RAVE-Studie am Menschen nicht wiederholt werden (Rajagopalan et al., 2003). Auch die TRAFFIC-Studie, die mit Hilfe des rekombinanten FGF-2 die Angiogenese induzierte, zeigte keine überzeugenden Resultate (Lederman et al., 2002). Ebenso musste die Idee, die Arteriogenese durch subkutan applizierten GM-CSF zu stimulieren, aufgegeben werden. Der START-Trial konnte bei pAVK-Patienten (III-IV) keine Verbesserung der Gehstrecke nachweisen (Van Royen et al., 2005). Offensichtlich konnte bei allen drei Studien keine ausreichende Mobilisierung und Ansiedelung von endothelialen Progenitorzellen bzw. Endothelzellen im ischämischen Gewebe erzielt werden. Ein

anderer Ansatz stellt die direkte Applikation von Knochenmarkstammzellen bzw. EPC dar. In zahlreichen tierexperimentellen Studien konnte eine Revaskularisation erzielt werden (Herold, 2008). Die TACT-Studie induzierte 2002 erstmals erfolgreich therapeutische Angiogenese beim Menschen durch intramuskuläre Injektion CD34+ Knochenmarkstammzellen (Tateishi-Yuyama et al., 2002).

Zu der Gruppe der CD34+ Zellen zählen u.a. auch die endothelialen Progenitorzellen. Diesen Zellen wird eine bedeutende Rolle bei der Neovaskularisation zugeschrieben, da sie neben der direkten auch eine indirekte Beteiligung - über parakrine Ausschüttung proangiogenetischer Faktoren- an der Gefäßbildung aufzuweisen scheinen.

2 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit wurde die Hypothese getestet, dass embryonale endotheliale Progenitorzellen (eEPCs) über parakrine Faktoren eine dauerhafte therapeutische Neovaskularisierung (Angiogenese und Arteriogenese) induzieren können. Zu diesem Zweck wurde ein Tiermodell der stabilen chronischen Ischämie gewählt, in dem sich Kapillar- und Kollateraldichte über den Untersuchungszeitraum nicht ändern. Als therapeutische Intervention wurden murine embryonale EPCs gewählt, die aufgrund ihrer fehlenden MHC-I-Expression immunprivilegiert sind. Sie werden nicht von zytotoxischen T-Zellen erkannt und aktivieren auch keine natürlichen Killerzellen, da sie keine Interferone sezernieren. Damit wird die Möglichkeit einer gesteigerten Neovaskularisation aufgrund einer Entzündungs-/Immunreaktion nahezu ausgeschlossen. Auch eine Abstoßung im Sinne einer Transplantatabstoßung wird dadurch verhindert.

3 Endotheliale Progenitorzellen

3.1 Einführung

Die einschichtige Endothelschicht in unseren Gefäßen ist eine dynamische Grenze zwischen Blut und Interstitium. Die Endothelzellen verhindern die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten indem sie antiadhäsive Mediatoren wie Prostaglandine und NO produzieren (Cines et al., 1998). Bei chronischer Noxen-Exposition wie z.B. Rauchen, Hypertonus, Diabetes mellitus, Virusinfektion und genetische Veränderungen verlieren Endothelzellen ihre antiinflammatorischen und antithrombotischen Eigenschaften. Die daraus resultierende Dysfunktion spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Arteriosklerose und anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen (Dignat-George et al., 2000 / Ross, 1999). Ist ein Gefäß akut verletzt, nimmt der Anteil zirkulierender ECs stark zu und es kommt zu einer Migration und Proliferation von ECs aus der Umgebung. Um den Schaden vollständig zu reparieren, reicht jedoch das Proliferationspotential der differenzierten ECs nicht aus. Sie benötigen die Hilfe von Vorläuferzellen, sog. endothelialen Progenitorzellen. Bis Ende der 90er ging man davon aus, dass die Differenzierung eines Angioblasten in eine reife Endothelzelle nur während der embryonalen Neovaskularisation möglich sei. Die Arbeitsgruppe von T. Asahara (1997) und Q. Shi (1998) haben wiederholt beschrieben, dass vom Knochenmark abstammende Progenitorzellen auch nach der Embryogenese im Blut zirkulieren und sich ähnlich dem embryonalen Angioblasten proliferieren sowie in reife ECs differenzieren können (Asahara et al., 1997/ Shi et al., 1998). In neueren Studien beeinflussen EPCs im ischämischen Gewebe die Neovaskularisation und verbessern dadurch die Funktion der ischämischen Organe (Hristov et al., 2003). Dabei findet Neovaskularisation als Vaskulogenese (primäre embryonale Blutgefäßbildung), Angiogenese (Kapillarsprossung) und Arteriogenese (Kollateralenwachstum) statt. Diese unterschiedlichen Konzepte beschreiben alle eine direkte Beteiligung im Blut zirkulierender EPCs an der Gefäßneubildung durch Integration, Proliferation und Differenzierung. Während die embryonale Vaskulogenese ohne EPCs nicht zu funktionieren scheint, zeigen Studien der letzten Jahre, dass lediglich eine

Beteiligung der endothelialen Vorläuferzellen bei der Angio- und Arteriogenese angenommen werden kann. Kawamoto et al. postulierten, dass ex vivo expandierte humane EPCs sich nicht nur in ischämischen Myokardarealen ansiedeln, sondern durch Differenzierung in ECs auch die LV-Myokardfunktion deutlich verbessern konnten (Kawamoto et al., 2001). Diese direkte Beteiligung konnte jedoch nicht in allen experimentellen Modellen bestätigt werden. So wurde in diversen Ischämie-Modellen gezeigt, dass sich die zirkulierenden EPCs nicht in die wachsenden Gefäße zu integrieren, sondern sich paravaskulär anzusiedeln scheinen. Diese EPCs sezernieren Wachstumsfaktoren (u.a. VEGF, IGF-1, SDF-1), Chemokine und Zytokine ins Blut und schaffen so eine proangiogene Umgebung. Dadurch regen sie die bereits angesiedelten ECs und SMCs zur Proliferation an. (Ziegelhoeffer et al., 2004/ Kinnaird et al., 2004/ Urbich et al., 2004). Bei dieser parakrinen Hypothese liefern die EPCs die Software und nicht die Hardware für die Neovaskularisation (Heil et al., 2004). Allerdings scheinen auch bereits integrierte EPCs diese parakrinen Eigenschaften aufzuweisen (Urbich et al., 2005). Die Software-Hypothese würde die effektive Neovaskularisation durch zirkulierende EPCs besser erklären als die direkte Integration der EPCs allein, da die Zahl der integrierten EPCs im ischämischen Gewebe im allgemeinen eher gering zu sein scheint (Urbich et al., 2004). Sowohl die integrierten als auch die paravaskulär angesiedelten Progenitorzellen scheinen zum Gefäßwachstum beizutragen (Rehmann et al., 2003 / Carmeliet et al., 2001/ Carmeliet, 2004).

Embryonale EPCs exprimieren u.a. VEGF-A/B, Angiopoietin-like 2, bestimmte Chemokine, Zytokine, Faktoren der Insulinfamilie, Proteaseninhibitoren und Thymosin-β₄, das ein wichtiger Mediator für die Wundheilung ist (Bock-Marquette et al., 2004/ Kupatt et al., 2005). Auch sezernieren sie im Gegensatz zu den adulten EPCs eine Reihe an Molekülen des embryonal wichtigen wnt- und BMP-Signalweges. Sie tragen auf diese Weise zur Reparatur ischämischen Gewebes bei und regen Gefäßwachstum an (Kupatt et al., 2005).

3.2 Isolierung und Kultivierung

EPCs können aus Blut und Knochenmark isoliert werden. Das gewonnene Material wird auf Mikrobreads gegeben, die mit CD34+ bzw. CD133+ Antikörpern bestückt sind. Danach werden sie auf mit Fibronektin, Plastik oder Kollagen Typ I beschichteten Gewebekulturen aufgetragen. Zu diesem Medium werden noch spezifische Wachstumsfaktoren, wie z. B. VEGF, hinzu gegeben. In dieser Kultur verformen sie sich zu spindelförmigen Zellen. Diese können dann in vivo zur Neovaskularisation in ischämischen Organen oder beschädigten Gefäßen beitragen. (Asahara et al., 1997/ Quirici et al., 2001).

EPCs können auch aus fetalem Lebergewebe oder Nabelschnurrblut isoliert werden (Murohara et al., 2001/ Murohara et al., 2000).

Nach kurzer Zeit verlieren die EPCs in vitro ihre Progenitoreigenschaften und beginnen sich zu differenzieren. Nach 3–4 Wochen entsteht eine endothelähnliche Schicht (Quirici et al., 2001/ Murohara et al., 2001).

In vitro können die EPCs retikuläre Strukturen ähnlich kapillaren Netzwerken bilden und in Ko-Kultur mit CD34(-) Zellen binden sie endothelspezifisches Lecithin mit Hilfe von acetyliertem LDL (Asahara et al., 1997/ Kaushal et al., 2001/ Murohara, 2001). Die Proliferation der EPCs zeigt eine exponentielle Zunahme zwischen dem 30. und dem 60. Tag in Kultur (Lin et al., 2000).

3.3 Charakterisierung und Differenzierung

EPCs stellen eine Sub-Population mononukleärer Zellen im Knochenmark dar. Sie weisen z.T. dieselben Oberflächenmarker wie die hämatopoetischen Stammzellen auf (u.a. CD34, AC133, VEGF-R2). Man geht deshalb davon aus, dass der Hämangioblast ein gemeinsamer Vorläufer ist. Dieser ist an der postnatalen Vaskulogenese beteiligt (Peichev et al., 2000).

In der Stammzellforschung werden adulte von embryonalen Stammzellen unterschieden. Während die embryonalen Stammzellen sich in Zellen des Ekto-, Meso- und Endoderms differenzieren können, weisen adulte Stammzellen diese pluripotente Eigenschaft nicht mehr auf. Zu diesen Stammzellen zählen auch die

EPCs. Adulte EPCs können sich zu EC differenzieren (Asahara et al., 1997), ihr Anteil an Endothelium in vivo fällt nach Ziegelhoeffer und Schaper eher gering aus (Ziegelhoeffer et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden embryonale EPCs verwendet. Sowohl die adulten als auch die embryonalen EPCs siedeln sich im ischämischen Gewebe an. Die embryonalen Vorläuferzellen weisen jedoch einige Unterschiede in ihren Oberflächenmarkern im Vergleich zu den adulten Progenitorzellen auf. Tabelle 1 zeigt die unterschiedlichen Oberflächenmarker adulter (humanen) und embryonaler (murinen) EPCs auf. Hervorzuheben sind dabei die Oct-4- und MHC-I -Negativität. Ohne Oct-4 weisen die embryonalen EPCs keine pluripotente Eigenschaft mehr auf, d.h. sie können sich nur noch in endotheliales Gewebe differenzieren. Das Fehlen der MHC-Klasse I bietet einen Schutz vor NK-Zellen und einer immunologisch bedingten Transplantatabstoßung (Wei et al., 2004/Hatzopoulos et al., 1998).

Humane, adulte EPCs	Murine, embryonale EPCs
Homing im ischämischen Gewebe	Homing im ischämischen Gewebe
CD 34+	CD 34 -
AcLDL-uptake	Tie-2 +++
VE-Cadherin +	Thrombomodulin +++
vWF +	vWF induzierbar
Flk-1 +	Flk-1 induzierbar
L-Selektin +	PSGL-1, ESL-1
β 2-Integrin +	β 2-Integrin -
CXCR4 +	CXCR4 ++
	MHC-I -
	Oct-4 -

Tabelle 1: Die wesentlichen Unterschiede zwischen adulten und embryonalen EPCs

3.4 Rekrutierung und Mobilisierung

Bei der pAVK, bei Gefäßverletzungen im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes, Verbrennungen oder Bypassoperationen am Herzen kommt es zu einem massiven Anstieg von zirkulierenden EPCs im Blut (Takahashi et al., 1999/ Shintani et al., 2001/ Gill et al., 2001). Dieses Phänomen ist auf ein vermehrtes Freisetzen von EPCs aus dem Knochenmark zurückzuführen. Dazu bedarf es einer Mischung aus Wachstumsfaktoren (z. B. VEGF), Enzymen, Liganden und Rezeptoren. Zuerst induziert die aktivierte Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) die Umwandlung des membrangebundenen Liganden Kit in seine lösliche Form. Daraufhin wandern cKit+ Stamm- und Progenitorzellen, darunter auch der Hämangioblast, in das gefäßreiche Knochenmark ein (Heissig et al., 2002). Welche Signale bzw. Botenstoffe für die Ausdifferenzierung des Hämangioblasten in hämatopoetische Vorläuferzellen bzw. in EPCs verantwortlich sind, ist bis heute noch weitgehend unklar. Mehrfach gezeigt wurde, dass ein erhöhter EPC-Spiegel assoziiert ist mit einem gleichzeitig erhöhten Level an VEGF. VEGF wiederum stimuliert die Aktivierung der MMP-9 und damit die Freisetzung von EPCs aus dem Knochenmark (Takahashi et al., 1999/ Gill et al., 2001/ Kalka et al., 2000/ Kalka et al., 2000/Heissig et al., 2002).

3.5 Homing und Regeneration

EPCs sind sowohl an der physiologischen als auch an der pathologischen Neovaskularisation beteiligt. Trotz dieser Tatsache ist bisher unklar, welche Signale die EPCs veranlassen im systemischen Kreislauf zu zirkulieren und sich genau an den Stellen anzusiedeln (Homing), an denen nachfolgend die Angiogenese stattfinden soll. Bekannt ist, dass Gewebsverletzungen, Ischämie, geringe Vaskularisation und geringe Perfusion sowie hohe VEGF-Levels sowohl hämatopoetische als auch pluripotente Stamm- bzw. Vorläuferzellen mobilisieren und dadurch das Homing fördern (Grzelak et al., 1998 / Kupatt et al., 2005). Die natürliche Reaktion des Organismus auf Ischämie ist die Mobilisation der EPCs aus Knochenmark oder Blut hin zu ischämischen Orten, um die Geweberegeneration durch Neovaskularisation zu fördern (Gill et al., 2001/Takahashi et al., 1999). Für die Mobilisation und Rekrutierung von EPCs sind spezifische Zytokine und

Chemokine verantwortlich. Als Wachstumsfaktor spielt VEGF eine große Rolle für das sog. Homing von EPCs, ebenso Wachstumsfaktoren wie G-CSF oder SDF-1. Der ganze Prozess des Homings wird häufig in Analogie zu der embryonalen Vaskulogenese beschrieben. Auch hierbei ist VEGF ein entscheidender Faktor. (Carmeliet et al., 1996/ Ferrara et al., 1996 / Asahara et al., 1999/ Moore et al., 2001/ Kalka et al., 2000). Ischämie, VEGF u.a. Faktoren sind endogene Stimuli der Angiogenese. Aber es gibt auch Studien, in denen HMG-CoA-Reduktase Inhibitoren (Statine) einen stimulierenden Effekt auf ECs und EPCs besitzen (Kureishi et al., 2000). Statine aktivieren dabei den Akt-Pathway und fördern neben der Rekrutierung und Mobilisierung auch das Homing und die Regeneration (Dimmeler et al., 2001/ Vasa et al., 2001/ Urbich et al., 2002).

3.6 Einflussfaktoren auf die EPC-Zahl

Um die EPCs therapeutisch nutzen zu können, müssen sie zunächst aus dem Blut, Knochenmark oder einem anderen Gewebe gewonnen werden. In verschiedenen Studien werden unterschiedliche Angaben über die Anzahl an EPCs pro ml Blut gemacht. Die Angaben reichen von 70 Zellen/ml Blut bis zu 645 Zellen/ml Blut. Die Menge an EPCs im gesunden Organismus scheint mit der der zirkulierenden ECs zu korrelieren (Peichev et al., 2000/ Tiwari et al., 2002/ Dignat-George et al., 2000). Ein Anstieg der zirkulierenden EPCs findet sich während der embryonalen Entwicklung (Murohara et al., 2000). Aber auch Gefäßtraumen wie Bypass-Operationen, Ischämie bei pAVK und AMI, Medikamente wie die Statine und diverse Wachstumsfaktoren, wie z. B. VEGF und GM-CSF wirken sich positiv auf die Menge der EPCs aus (Peichev et al., 2000/ Takahashi et al., 1999/ Gill et al., 2001/ Vasa et al., 2001/ Kalka et al., 2000). Ebenso steigert Bewegung die Zahl der zirkulierenden EPCs über eine Zunahme an NO und VEGF sowie eine Blockierung der Apoptose (Laufs et al., 2004). Zu einer Abnahme kommt es bei Vorhandensein der so genannten kardiovaskulären Risikofaktoren, zu denen die Hypercholesterinämie, der Diabetes mellitus, die Hypertriglyceridämie, das Rauchen und die stabile Angina pectoris zählen (Vasa et al., 2001/ Hill et al., 2003).

3.7 Applikation und therapeutische Nutzung der EPCs

Seit Beschreibung der pro-angiogenen und pro-arteriogenen Eigenschaften der EPCs bzw. mononukleären Vorläuferzellen in diversen Studien, versuchte man diese Zellen nun auch gezielt therapeutisch einzusetzen. Dabei konnte in Versuchen mit Ratten und Mäusen gezeigt werden, dass in Kultur vermehrte und exogen verabreichte humane EPCs zusammen mit oder ohne Wachstumsfaktoren zu einer Neovaskularisation in ischämischen Gebieten führten. So verbesserten applizierte Vorläuferzellen in Mäusen nicht nur die Gefäßsituation und die lokalen Durchblutungsverhältnisse sondern reduzierten auch die Nekrose- und Amputationsrate um ca. 50 % gegenüber den Kontrollgruppen (Kalka et al., 2000). Auch am Myokard konnten ähnlich positive Effekte festgestellt werden. So konnte durch die Transplantation von humanen EPCs die LV-Funktion stabilisiert und die Fibroserate in Rattenherzen gleichzeitig vermindert werden (Kawamoto et al., 2001). Andere Studien konnten ähnliche Resultate erzielen, nachdem sie Mäusen frisch isolierte humane CD34(+) EPCs lokal in ischämische Hinterläufe bzw. hypoxische Myokardareale injizierten (Schatteman et al., 2000/ Kocher et al., 2001). Durch die exogene Applikation von bFGF, TGF β 1 oder VEGF in ischämische Areale konnte die Angiogenese gefördert sowie die Gewebeschädigung vermindert werden (Höckel et al., 1993). In den Experimenten konnte nach Applikation in den chronisch ischämischen Hinterlauf beim Kaninchen ein vermehrtes Kollateralen- und Kapillarwachstum nachgewiesen werden. Diese morphologische Verbesserung konnte auch funktionell nachgewiesen werden. So wurden Gewebenekrosen verhindert, der poststenotische Blutdruck und Blutfluss erhöht, sowie die maximal erreichbare Flussreserve verbessert (Folkman, 1998/ Takeshita et al., 1994/ Pu et al., 1993/ Bauters et al., 1995).

Dass Neovaskularisation mit Hilfe von EPCs auch im Menschen stattfindet, belegen Studien an Verbrennungs- und Herzinfarktpatienten. So zeigen Gill et al. an Verbrennungspatienten und Shintani et al. an Patienten nach ACVB und Herzinfarkt, dass EPCs mobilisiert werden und in das ischämische Gebiet einwandern (Gill et al., 2001/ Shintani et al., 2001). Ein weiteres Einsatzgebiet für EPCs stellt die Gefäßprothetik dar. Künstliche Gefäße, die vor der Transplantation mit EPCs beschichtet wurden, zeigten eine bessere Endothelialisierung und Vaskularisierung

verglichen mit Kontrollgruppen. Durch die EPC-Beschichtung konnte auch eine physiologische Dehnbarkeit erreicht und der Zeitraum bis zum Verschluss von 15 auf 130 Tage deutlich verlängert werden (Bhattacharya et al., 2000/ Kaushal et al., 2001). Durch die Gentherapie mit VEGF165 konnte eine erhöhte Menge an zirkulierenden EPCs und deren Mobilisierung bei Patienten mit inoperabler KHK nachgewiesen werden. Dies wiederum resultierte in einer verbesserten Perfusionssituation (Kalka et al., 2000/ Kalka et al., 2000).

In einer Pilotstudie aus dem Jahre 2002 wurde der therapeutische Effekt der autologen Transplantation von Knochenmarkszellen an pAVK-Patienten untersucht. Unter den dabei applizierten Monozyten waren auch EPCs zu finden. Neben der Anhebung der Blutspiegel von VEGF, FGF u. a. Wachstumsfaktoren konnte auch ein positiver Effekt auf die Angiogenese festgestellt werden. Dies äußerte sich bei den Patienten in einer erhöhten $SO_2\%$, einem verminderten Restschmerz und in einer deutlich verlängerten schmerzfreien Gehstrecke (Tateishi-Yuyama et al., 2002). In klinischen Studien an Herzinfarktpatienten (TOPCARE-AMI, the BOOST Trial, Repair-AMI Trial) konnte durch die Übertragung von EPCs zunächst eine deutliche Verbesserung der LV-EF erzielt werden (Britten et al., 2003/ Wollert et al., 2004/ Schächinger et al., 2009). Jedoch konnte lediglich die Studie von Schächinger et al. (Repair-AMI Trial) positive Effekte auch im follow-up nachweisen.

4 Material und Methoden

4.1 Isolierung und Kultivierung der eEPCs

Die embryonalen Progenitorzellen bezogen wir über ein externes Labor. Wir erhielten die Zellen als Klone von Dr. A. Hatzopoulos (GSF, Marchioninstr. 17), die bis zu ihrem Einsatz für 3 Monate kultiviert wurden. Die Methode nach der die Progenitorzellen isoliert und charakterisiert werden, wurde von Hatzopoulos 1998 beschrieben (Hatzopoulos et al., 1998).

4.2 Tierexperimentelles Modell

Das Tierversuchsprotokoll wurde entsprechend den Richtlinien der „Guide for the Care and Use of Laboratory animals“ (US National Institutes of Health: NIH Publication No. 85-23, revised 1985) erstellt und vom bayerischen Tierschutz- und -gebrauchskomitee genehmigt (Projektnummer: 8202; AZ: 209-1/211-2531-8202). Die Versuche wurden an weiblichen Kaninchen der Rasse „New Zealand White“ durchgeführt ($3,5 \pm 0,5$ kgKG). Sie wurden zu gleichen Teilen auf eine Kontrollgruppe (NaCl-Lösung; n=5) und eine EPC-Gruppe (EPC-Menge = 5×10^6 µg/kgKG; n=5) verteilt. Das Modell des chronisch ischämischen Hinterlaufs beim Kaninchen ist ein etabliertes Modell zur Erforschung der Angiogenese und der Arteriogenese. Als Vorlage für unser tierexperimentelles Modell dienten uns in modifizierter Form die von verschiedenen Forschern entwickelten Ischämie Modelle am Kaninchen (Takeshita et al., 1994 / Pu et al., 1994). Im Folgenden sei das Modell kurz vorgestellt:

An Tag 0 erfolgte die Exzision der distalen A. iliaca externa und der proximalen A. femoralis superficialis. Eine Baseline-Angiographie sowie die retrograde Infusion der EPCs bzw. des NaCl 0,9 % in die V. tibialis wurde 1 Woche später durchgeführt (Tag 7). Die zweite Angiographie wurde 4 Wochen später zur Bestimmung des Kollateralenzuwachses angefertigt (Tag 35). An diesem Versuchstag wurden auch

die Muskeln für die Auswertung des Muskelfaser-Kapillar-Verhältnisses entnommen (Abbildung 1).

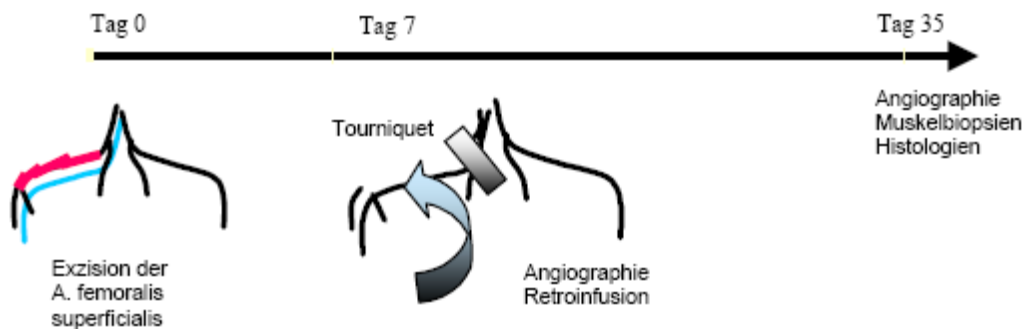


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Ischämie-Modells. Die Exzision der A. femoralis superficialis findet am Tag 0 statt. An Tag 7 wird eine Baseline-Angiographie der unteren Extremität durchgeführt. Im Anschluss daran wurde die V. tibialis anterior punktiert und die eEPCs bzw. die Kontrollsubstanz (NaCl 0,9%) mittel Katheter retrograd infundiert. Um einen zu schnellen Abstrom zu verhindern, wurde vor der Infusion ein Tourniquet am Oberschenkel der entsprechenden Extremität angelegt. Am Tag 35 erfolgten die Kontrollangiographie, die Muskelbiopsien und die Histologien.

4.3 Anästhesie

Die Einleitung der Tiere erfolgte stets intramuskulär mit einer Mischung aus 5 – 7 mg/kg KG Rompun® (Xylazinhydrochlorid, Bayer, Deutschland), 25 – 33 mg/kgKG Ketamin-Inresa® (Ketaminhydrochlorid, Solupharm GmbH, Deutschland) und 0,0015 mg Atropinsulfat (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Deutschland). Während des Versuchablaufs wurde die Anästhesie über eine Ohrvene mit 5 ml Rompun®, 10 ml Ketamin-Inresa® und 35 ml NaCl 0,9 % aufrechterhalten. Die Laufgeschwindigkeit war auf 15 ± 5 ml/h (~ 30 mg/h Rompun® + 150 mg/h Ketamin-Inresa®) eingestellt. Herz- und Atemfrequenz wurden während des gesamten Eingriffs in regelmäßigen Abständen kontrolliert.

4.4 Infektionsprophylaxe

Als Infektionsprophylaxe wurden 16 mg Gencin[®] (Gentamicinsulfat, Curasan AG, Deutschland) in den linken, lateralen Oberschenkel intramuskulär injiziert.

4.5 Postoperative Analgesie

Die postoperative Analgesie wurde peroral über das Trinkwasser appliziert. Initial wurden 63 mg Tramal[®] (Tramalhydrochlorid, Grünenthal GmbH, Deutschland) verabreicht. Über die erste Woche erfolgte die kontinuierliche Gabe von 38 mg und für weitere 7 Tage 25 mg Tramal[®] pro Tag.

4.6 Induktion der Ischämie

Unmittelbar nach der intramuskulären Einleitung, wurden die Tiere gelagert, der Hinterlauf rasiert und desinfiziert. Anschließend wurde im Bereich der Adduktorenloge ein von distal des Ligamentum inguinale bis oberhalb des Kniegelenks reichender Hautschnitt gesetzt. Anschließend wurde die A. femoralis superficialis in ihrer gesamten Länge einschließlich ihrer Abgänge (A. epigastrica interna, A. femoralis profunda, A. circumflexa lateralis und A. epigastrica superficialis) freigelegt. Unter sorgfältiger Blutstillung und Schonung des parallel verlaufenden und zum Teil kreuzenden N. femoralis sowie der äußerst vulnerablen V. femoralis wurde die A. femoralis superficialis proximal ihres Abganges sowie alle Seitenäste bis zur Bifurkation der A. poplitea und der A. saphena ligiert. Um eine vollständige Ischämie zu gewährleisten wurde die A. femoralis superficialis vollständig exziiert (Abbildung 2). Nach ausgiebiger Spülung mit NaCl 0,9 % wurde die Wunde wieder schichtweise verschlossen und ein Wundverband angelegt.

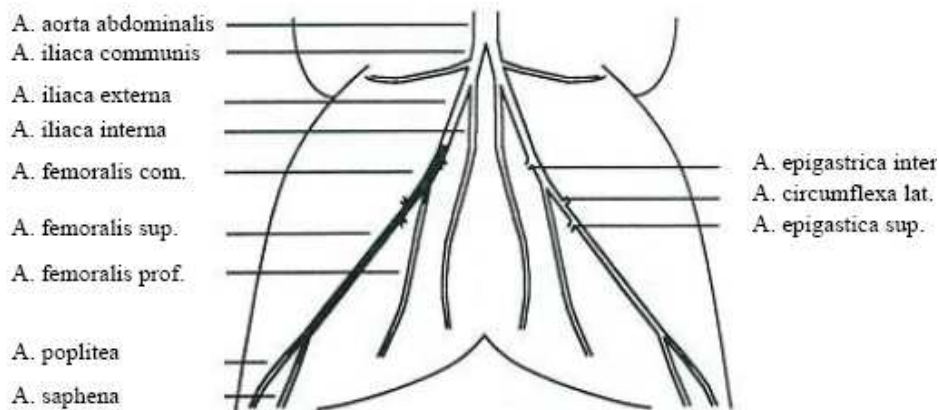


Abbildung 2: Darstellung der Gefäße der unteren Extremität sowie der Abgänge der A. femoralis superficialis. Links im Bild sind die exzidierte Femoralarterie sowie ihre legierten Abgänge.

4.7 Selektive, retrograde Infusion der EPCs

An Tag 7 wurde, nach Narkoseeinleitung und den üblichen Operationsvorbereitungen, die V. tibialis anterior medial des Kniegelenks freigelegt und inzidiert. Danach wurde der Polyethylenkatheter ca. 1 cm weit mit Hilfe einer aufgesetzten 24 G Braunüle (Becton Dickinson GmbH, Deutschland) in Flussrichtung der Vene vorgeschoben und fixiert. Nach Anlegen eines Tourniquet auf Höhe des Leistenbandes, wurden die EPCs ($\sim 5 \times 10^6$) bzw. die NaCl-Lösung 0,9 % (10 ml, heparinisiert) über 30 Minuten kontinuierlich manuell retroinfundiert. Die Blutsperre verhindert einen schnellen Abtransport der applizierten Substanzen aus dem ischämischen Areal. Der dadurch erzielte Depoteffekt führt zu einer hohen und effektiven Konzentration im Gewebe (Acevedo, 1993). Anschließend wurde die Blutsperre gelöst, der Katheter entfernt und die Vene ligiert. Die Wunde wurde unter Blutstillung schichtweise verschlossen und verbunden.

4.8 Angiographie

Eine Woche nach Exzision der A. femoralis superficialis wurde die erste Angiographie der Becken- und Beinarterien durchgeführt. Diese dokumentierte den Baseline-Status. Die 4 Wochen später durchgeführte Angiographie wurde mit der von Tag 7 verglichen.

Nach Einleitung der Narkose, Rasur und Desinfektion wurde die A. carotis communis durch einen Hautschnitt lateral des Larynx freigelegt. Nach Inzision der A. carotis communis wurde die Schleuse für den Angiographiekatheter in die Arterie gelegt und sicher fixiert. Nach vorschieben des Katheters um ca. 1 cm wurden 500 I.E. Heparin-Natrium (Braun, Deutschland) verabreicht, um thromb-embolische Ereignisse bei der anschließenden Angiographie zu verhindern. Unter Durchleuchtungskontrolle wurde nun der Führungsdraht über die A. carotis communis bis unmittelbar an die Bifurkation der A. iliaca communis vorgeschoben. Über den Führungsdraht konnte nun der Katheter eingeführt und an der Bifurkation platziert werden. Unmittelbar vor der Kontrastmittelgabe wurden 3 mg Adenosin (Sigma GmbH, Deutschland) appliziert, um die Angiographie im Zustand der maximalen Vasodilatation durchzuführen. Es wurden pro Sequenz insgesamt 4 ml Kontrastmittel (Solutrast[®], Byk Gulden, Deutschland) mittels Injektor (2 ml/s) appliziert und 25 Frames/s erstellt. Anschließend wurde der Katheter wieder entfernt, die A. carotis communis ligiert, die Wunde schichtweise zugenäht und verbunden. Die Angiographie am Tag 35 lief identisch ab. Lediglich der Zugang fand über die kontralaterale A. carotis communis statt.

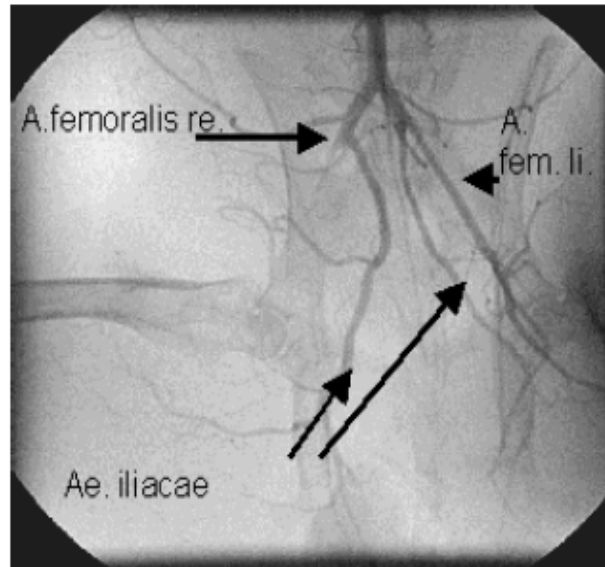


Abbildung 3: Angiographie der beiden unteren Extremitäten. Links im Bild ist die rechte untere Extremität, rechts die Linke abgebildet. Man erkennt deutlich den Kontrastmittelabbruch am Abgang der A. femoralis superficialis rechts. Dies ist der radiologische Nachweis der korrekten Exzision der Femoralarterie.

4.9 Auswertung der Angiogenese

An Tag 35 wurden die Tiere getötet und Muskelproben aus der Oberschenkel- (M. adductor magnus, M. vastus medialis) und Unterschenkelmuskulatur (M. gastrocnemius, M. tibialis anterior, M. fibularis) entnommen, in frierendem Methylbutan schockgefroren und bei -80 C° zwischengelagert. Anschließend wurden die Muskeln in $10\ \mu\text{m}$ dünne Schichten transversal zum Faserverlauf mit Hilfe eines Kryotoms geschnitten. Es wurden pro Muskel 6 Schnitte angefertigt, auf einen Objektträger aufgebracht und bis zur Färbung wieder im Gefrierschrank bei -80 C° gelagert. Die Anfärbung der Alkalischen Phosphatase in den Muskelproben erfolgte nach Ziada et al. (Ziada et al., 1984). Die alkalische Phosphatase beschleunigt die hydrolytische Spaltung von Estern der Orthophosphorsäure mit Hilfe von Alkoholen oder Phenolen bei einem pH-Optimum von pH 9,2 bis 9,8. Dieses Enzym kommt hauptsächlich in Endothelzellen, Arteriolen und Kapillaren vor. Nach der Färbung stellen sich die Kapillaren blau, die Muskelfasern hellrot dar (Brown et al., 1988). Die gefärbten Schnitte wurden mäanderförmig in 40facher Vergrößerung durch mikroskopiert und an den 5 Stellen abfotografiert, die

eindeutig Kapillaren erkennen ließen. Nach der manuellen Auszählung der Muskelfasern und Kapillaren berechnete sich die Kapillardichte wie folgt:

Zahl der Kapillaren/ Zahl der Muskelfasern pro Bild.

4.10 Auswertung der Arteriogenese

Die Angiographie stellt nur Gefäße mit einem Mindestdurchmesser von 100 µm dar. Größere Gefäße haben nach dem Hagen-Poiseuille-Gesetz einen stark reduzierten Widerstand. Durch die Arteriogenese werden bereits bestehende Arteriolen aufgrund einer Stenose der Hauptarterie und dem sich daraus ergebenden erhöhten Shear-stress in ihrem Gefäßdurchmesser vergrößert. In der Angiographie kann nun durch einen Vergleich zwischen Tag 7 und Tag 35 die Zahl der durch Kaliberzuwachs angiographisch neu darzustellenden Kollateralen quantifiziert werden. Für die Auswertung wurde über ein Standbild der Cine-Angiographie ein standardisiertes Gitterraster (Abbildung 4) gelegt (Witzenbichler et al., 1998). Es wurden alle Schnittpunkte zwischen Kollateralen und dem Gitter ausgezählt, die im Bereich der A.iliaca interna unterhalb des Leistenbandes und der Patella lagen. Die Summe an Tag 35 wurde auf die an Tag 7 bezogen und als Kollateralenwachstum in % gewertet (Asahara et al., 1995). Die Auszählung erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher doppelverblindet.

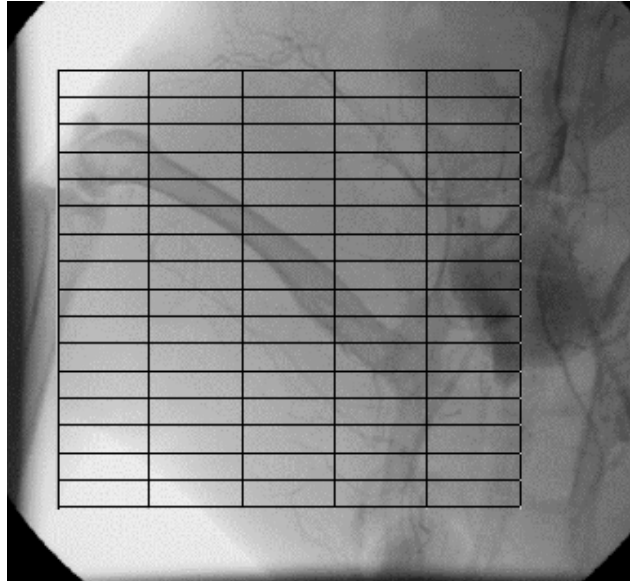


Abbildung 4: Standardisiertes Gitternetz nach Witzendichler et al. Dieses wird über das Gebiet der exzidierten A. femoralis gelegt.

4.11 Beurteilung des Blutflusses

Mit Hilfe der TIMI frame Methode lässt sich der Blutfluss angiographisch ermitteln. Dabei werden zwei Punkte (A und B) definiert, zwischen denen die Zählung des Kontrastmittelflusses vorgenommen wird (Abbildung 5). A entspricht der Bifurkation der A. iliaca communis, B dem Ursprung der A. poplitea. Für die Zählung gelten drei Bedingungen:

1. Ein Kollateralast, der nahezu vollständig bzw. komplett mit KM gefüllt ist, muss sich über die gesamte Weite des Ursprungs der Arterie ausbreiten.
2. Das KM muss beide Wände am Ursprung der Arterie ausfüllen und
3. Das KM muss einen antegraden Fluss aufweisen (Gibson et al., 1996).

Da in diesem Bereich die Ischämie durch Exzision der A. femoralis superficialis induziert wurde, kann man davon ausgehen, dass die neu gebildeten Kollateralarterien aus der A. iliaca interna hervorgehen (Morishita et al., 1999). Die

Zahl der Bilder, die das KM benötigte, um beide Punkte zu passieren, wurde für sowohl den ischämischen (i.H.) als auch für den nicht-ischämischen (n.H.) Hinterlauf an Tag 7 und 35 ausgewertet. Die Flussgeschwindigkeit ist indirekt proportional zu der Zahl der gezählten Bilder (Frame count) (Rutishauser et al., 1967). Der Blutfluss wird mit nachfolgender Formel berechnet, wobei der Frame count der ischämischen auf den der nicht-ischämischen Extremität bezogen wurde.

$$\text{Frame count score} = \frac{1/\text{frame count (i. H.)}}{1/\text{frame count (n. H.)}}$$

-> $\text{Frame count score} = \frac{\text{frame count (n. H.)}}{\text{frame count (i. H.)}}$

Die Differenz zwischen Tag 7 und Tag 35 wurde dann in Prozent bezogen auf Tag 7 angegeben. Daraus folgte, je höher die Differenz, desto gesteigertes Kollateralenwachstum und desto schneller der Blutfluss. Die Ergebnisse dieser Flussanalyse korrelieren signifikant mit denen, die man mit der Messung des Blutflusses via fluoreszierender Mikrosphären erhält (Lebherz et al., 2003).

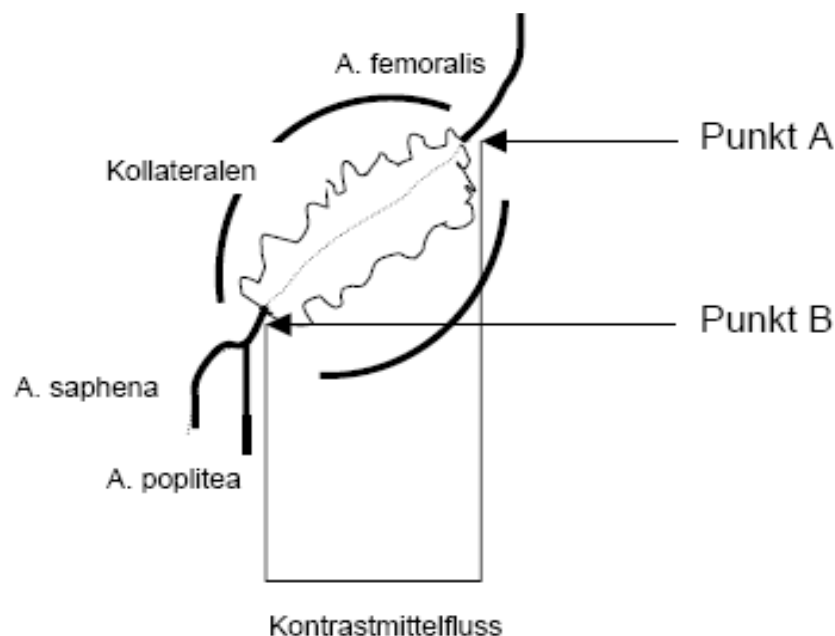


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Beurteilung des Blutflusses. Punkt A entspricht dabei der Bifurkation der A. iliaca communis, Punkt B dem Ursprung der A. poplitea. Zwischen diesen beiden Punkten wird die Zahl der Bilder ermittelt, die das Kontrastmittel benötigt, um diese Strecke zu passieren. Dabei ist die Flussgeschwindigkeit indirekt proportional zu der Zahl der Bilder.

4.12 Zellnachweis mit DiI

Um die eEPCs im Empfängerorganismus nachzuweisen, wurden sie mit der fluoreszierenden Substanz DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3,3'-tetramethylindocarbocyanineperchlorat) markiert. Das Empfängerendothel wurde mit HPA-FITC markiertem Lectin eingefärbt. Damit konnten die eEPCs nach der Retroinfusion unter dem Fluoreszenzmikroskop in der unmittelbaren Nähe zu den Blutgefäßen nachgewiesen werden (Vajkoczy et al., 2003/ Wei et al., 2004). Durch die Entnahme der Muskeln zu verschiedenen Endpunkten (Tag 2, 5, 7, 10 und 12 nach Markierung) nach Retroinfusion konnte die Überlebensdauer der xenotransplantierten Progenitorzellen festgelegt werden.

4.13 Aortenringproben

Die Aorta descendens wurde unverzüglich nach Terminierung des Kaninchens entnommen. Nach Abspülen mit Krebs-Lösung wurde sie in 2 mm dünne Ringe geschnitten und in 400 µl Matrigel (Becton-Dickenson, Heidelberg, Deutschland) eingebettet. 24 Stunden später wurden entweder 1 µg bFGF-2 oder 5×10^4 eEPCs über das polymerisierte Matrigel gegeben, um einen direkten Kontakt mit den Aortenringen und eine mögliche Integration der Progenitorzellen zu verhindern (Koczulla et al., 2003).

4.14 Genanalyse

Die gesamte RNS der eEPCs wurde mit dem Reagenz Trizol (Sigma) isoliert und nach Herstellerangaben weiterverarbeitet. Um die Qualität der RNS zu überprüfen, wurden optische Dichtemessungen, Gelelektrophorese und Genexpressionsanalysen mittels RT-PCR eingesetzt (Vajkoczy et al., 2003). Mit Hilfe der Genechips der Firma Affymetrix (Santa Clara, Kalifornien, USA) wurde die RNS in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Hoffmann (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, TU München) aus verschiedenen Proben auf ihre exprimierten Gene analysiert.

4.15 RNS und Proteinanalyse

Die Isolation der RNS, die Reverse Transkription (RT) und die PCR wurde wie bei Vajkoczy beschrieben durchgeführt (Vajkoczy et al., 2003). Für die einzelnen Gene wurden die entsprechenden Primer verwendet (s. Anhang 12A). Um die Proteine zu detektieren, wurden 2×10^6 Zellen in 600 μ l 2 x Laemmli Puffer lysiert und 15 μ l pro Spur mittels Gelelektrophorese und Western-Blot nach Standardprotokollen analysiert. Die Anti- Mif, Timp1, Timp2 und PdgfA Antikörper wurden über R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland) bezogen.

4.16 Statistik

Die Ergebnisse setzen sich aus Mittelwert \pm SEM zusammen. Für die statistische Evaluation wurde der einseitige ANOVA Test verwendet. Unterschiede in den beiden Gruppen hinsichtlich des Kollateralenwachstums, des Blutflusses und der Kapillardichte wurden als signifikant angenommen bei einem $p < 0,05$. Signifikante Ergebnisse wurden mit dem Student-Newman-Keul's-Test (SPSS statistical program) überprüft.

5 Ergebnisse

Dass eEPCs die Neovaskularisation anregen und damit die Zirkulation deutlich verbessern, konnten wir mit verschiedenen Methoden nachweisen.

Die unmittelbare Nähe der Progenitorzellen zu den Gefäßen konnte mit DiI-markierten EPCs und der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden.

5.1 Zellenachweis mit DiI-markierten eEPCs

7 Tage nach Exzision der Femoralarterie wurden die mit DiI-markierten eEPCs über die Tibialvene infundiert. 5 Tage später konnten die speziell markierten eEPCs in den ischämischen Muskeln mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden (Abbildung 6A). Dabei präsentierten sich die eEPCs leuchtend rot. Um die Endothelschicht der Blutgefäße des Kaninchenmuskels darzustellen, wurde 5 Minuten vor Muskelentnahme HPA-FITC markiertes Lectin infundiert. Danach stellten sich gut perfundierte Blutgefäße des Empfängergewebes grün dar (Abbildung 6B). Damit ließ sich eine eindeutige Existenz der eEPCs in unmittelbarer Nähe zu den Blutgefäßen nachweisen.

Durch die Entnahme der Muskeln zu unterschiedlichen Zeitpunkten, konnte gezeigt werden, dass die xenotransplantierten eEPCs für ca. 10 Tage nach der Infusion im Kaninchen nachzuweisen sind. 14 Tage nach der Übertragung konnten keine signifikanten Mengen DiI-markierter eEPCs unter dem Fluoreszenzmikroskop mehr registriert werden (Abbildung 7).

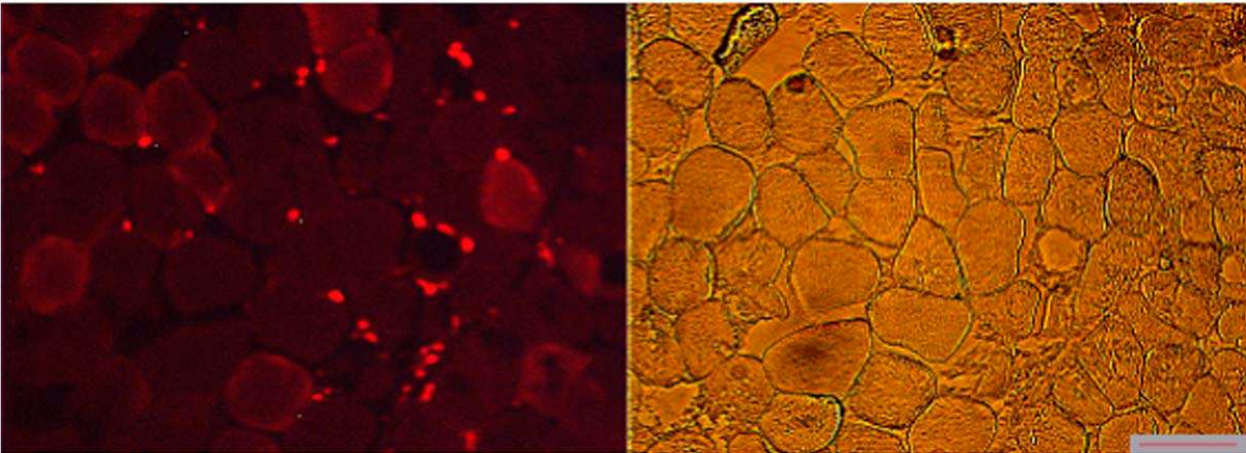
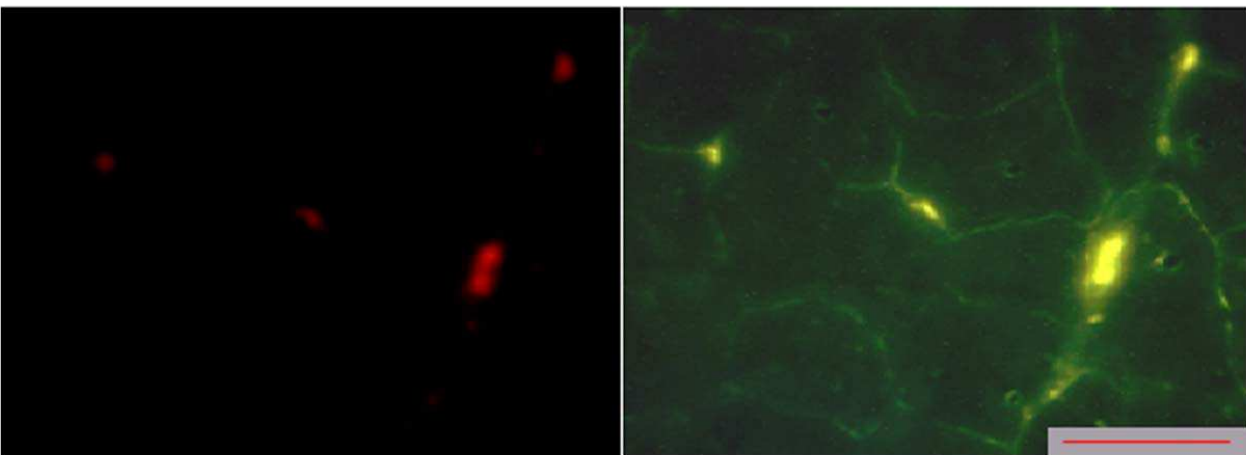
A**B**

Abbildung 6: A) Links: Die mit DiI-markierten eEPCs wurden via Retroinfusion eine Woche nach Induktion der Ischämie appliziert. 5 Tage später wurde der M. gastrocnemius entnommen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnten die transplantierten eEPCs in und um die Gefäßstrukturen detektiert werden. Rechts: Phasenkontrastaufnahme desselben Ausschnitts. **B)** Links: die DiI-markierten eEPCs stellen sich rot dar; Rechts: das Endothel stellt sich grün dar, nachdem es 5 Minuten vor Muskelentnahme mit FITC konjugierter Helix pomatia Lectin gefärbt wurde.

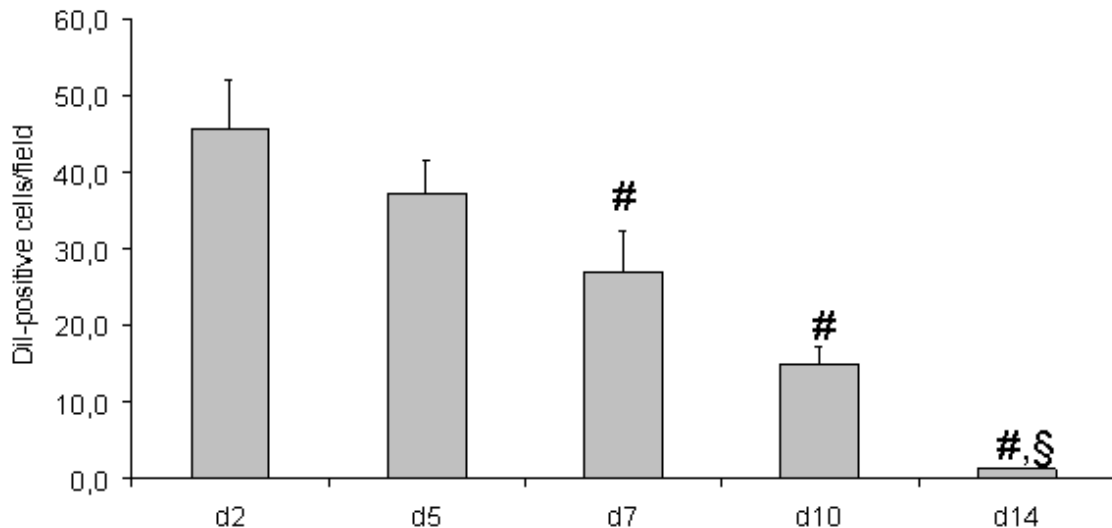


Abbildung 7: Quantitative Darstellung der vorhandenen eEPCs zu verschiedenen Zeitpunkten der Muskelentnahme (2, 5, 7, 10 und 14 Tage nach Retroinfusion der eEPCs). n=3 pro Tag; # P < 0,05 vs. Tag 2; § P < 0,05 vs. alle anderen Tage der Entnahme.

Neben dem Nachweis der direkten Anwesenheit der eEPCs in unmittelbarer Nähe zu Muskelzellen und Gefäßen, wurde mit Hilfe der Aortenringversuche die proangiogene Eigenschaft der eEPCs nachgewiesen.

5.2 Nachweis der endogen induzierten Angiogenese

Mit Hilfe der Aortenringversuche konnten wir nachweisen, dass die embryonalen EPCs nicht nur mit neuen Gefäßen räumlich assoziiert, sondern auch eine reichhaltige Quelle an Angiogenese induzierende Faktoren sind. Die auf die explantierten Aortenringe aufgetragenen eEPCs verstärkten die Aussprossung neuer Kapillaren mittels Sekretion proangiogenetischer Faktoren. Die ausgeprägten Gefäßnetzwerke glichen den durch FGF-2 induzierten Gefäßnetzwerken außerordentlich stark (Abbildung 8). Verglichen mit der Kontrollgruppe war die Zunahme der Kapillarsprossen deutlich zu erkennen.



Control

FGF-2

eEPCs

Abbildung 8: Im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennt man eine ausgeprägte Induktion der Angiogenese ex vivo. Nach der Platzierung der Aortenringe auf Matrigel und der Polymerisation wurden 5×10^4 eEPCs bzw. $10 \mu\text{l/ml}$ FGF-2 hinzu gegeben. Verglichen mit der Kontrollgruppe induzieren die eEPCs eine ausgeprägte Aussprossung neuer Kapillaren. Diese ähnelt stark der durch FGF-2 induzierten Angiogenese. Dies zeigt, dass die eEPCs proangiogene Faktoren sezernieren.

Da die aufgetragenen eEPCs einen ähnlich starken Effekt auf die Kapillaraussprossung in den Aortenringversuchen zeigten wie bereits bekannte proangiogene Faktoren wie FGF-2, versuchten wir mit Hilfe der PCR und Western-Blot-Methode die entsprechenden angiogenen Faktoren der eEPCs zu analysieren.

5.3 Nachweis der proangiogenen Faktoren

Mit Hilfe der Affymetrix Genchips untersuchten wir die aus Zellkulturen isolierte RNA. Das exprimierte Genmuster wies ein breites Spektrum an Wachstumsfaktoren und Proteinen mit enzymatischer Wirkung auf das Gewebe auf. Die Sequenzierung zeigte die molekularen Optionen der eEPCs ihre unmittelbare Umgebung mit Hilfe sezernierter Faktoren zu beeinflussen auf (siehe Anhang 12 B). Nach der Transplantation in ischämische Gebiete produzieren die embryonalen Vorläuferzellen große Mengen proangiogener Faktoren. Darunter finden sich nicht nur die bekannten Wachstumsfaktoren VEGF-A und -B, sondern auch Moleküle deren Funktionsweisen weniger gut bekannt sind. All diese Faktoren stimulieren die

Neovaskularisation auf verschiedene Art und Weise. Auch Faktoren der Wundheilung, z.B. Thymosin β 4, werden in großen Mengen sezerniert. Thymosin- β 4 hat einen bedeutenden Anteil bei der Regeneration kardialer Zellen nach einem Myokardinfarkt (Bock-Marquette et al., 2004). Die hohen Spiegel an Metalloproteaseinhibitoren lassen auf eine Modulation der Proteasenaktivität durch die embryonalen Vorläuferzellen schließen. Die äußerst geringen Mengen der proinflammatorischen Zytokine (IL-1,2 und 6) zeigen, dass die eEPCs kein Trigger für eine akute Entzündungsreaktion sind.

Um die Affymetrixdaten zu validieren und die Gene bzw. Proteine herauszufiltern, die tatsächlich relevant für die angiogene Eigenschaft der eEPCs waren, setzten wir die RT-PCR und den Western-Blot ein.

5.4 Validierung der Affymetrixdaten

Die Analyse der angiogenen Faktoren erfolgte mit genspezifischen Primern. Sie zeigt, dass mit Hilfe der RT-PCR verschiedene Wachstumsfaktoren und Proteaseregulatoren in unterschiedlichen Mengen nachzuweisen waren. Dabei zeigte die Dichte der Bandbreite eine gute Übereinstimmung mit dem Expressionslevel in den Affymetrixdaten. In dem anschließend durchgeführten Western-Blot wurden nur noch die Proteine detektiert (z.B. PDGFA, MiF), die bereits in den Affymetrixdaten und in der PCR in ausreichend hoher Menge exprimiert wurden. Je höher der Expressionswert des Gens, desto intensiver wurde die Bandbreite in der RT-PCR, was einer erhöhten Menge an mRNA entspricht. Anhand der Western-Blot-Analysen zeigte sich, dass ein Rückschluss auf die Proteinmenge anhand der Höhe der mRNA-Spiegel möglich war. Ließen sich die Proteine mittels RT-PCR gut darstellen, war dies gleichzusetzen mit erhöhten mRNA Spiegeln. Dies wiederum ließ auf eine ausgezeichnete Detektion im Western-Blot schließen. MiF z.B. zeigte einen hohen Expressionswert in den Affymetrixdaten. Er ließ sich ebenfalls sehr gut in der RT-PCR abbilden. Auch im Western-Blot konnte das Protein detektiert werden. VEGF dagegen hatte einen niedrigen Expressionswert, wurde nur

mäßig mittels der RT-PCR abgebildet und konnte im Western-Blot nicht dargestellt werden (Abbildung 9).

In den bisher aufgeführten Ergebnissen konnten wir zeigen, dass sich die eEPCs in unmittelbarer Gefäßnähe zu finden sind und über proangiogene Faktoren zu einer Kapillaraussprossung in-vitro führen. Aber auch in-vivo führen die transplantierten eEPCs zu einer deutlichen Zunahme der Kapillaren und Kollateralen sowie – daraus resultierend- auch zu einer Perfusionsteigerung in ischämischen Geweben.

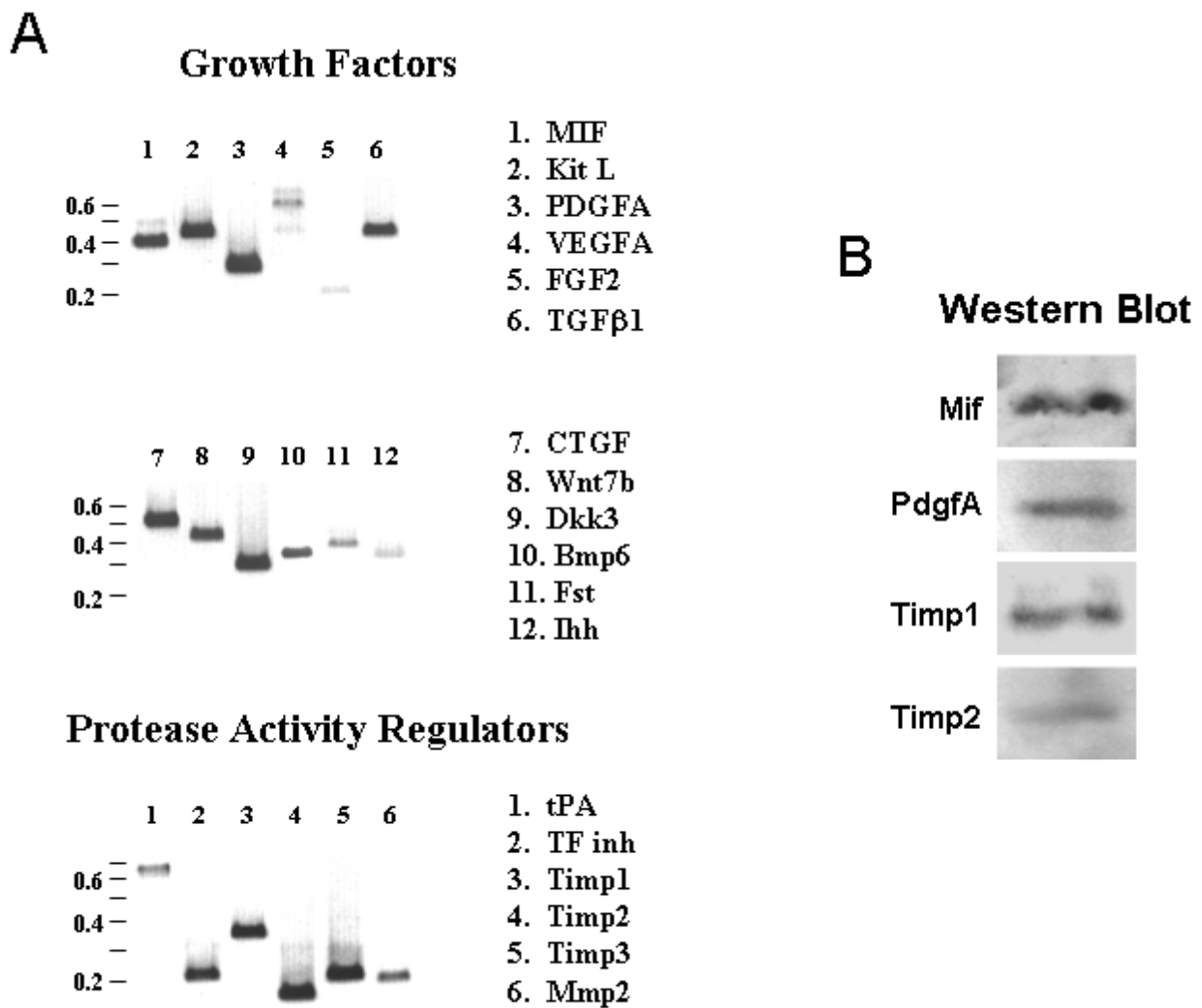


Abbildung 9: eEPCs exprimieren ein breites Spektrum an Wachstumsfaktoren und Proteaseaktivatoren. Die Abbildung **A)** zeigt die von eEPCs exprimierten Gene, die wir mittels RT-PCR und spezifischen Primern darstellen konnten. In **B)** erkennt man die mittels Western-Blot validierten Affymetrixdaten.

Eine Zunahme der Angiogenese wurde anhand der Kapillardichte analysiert.

5.5 Angiogenese – Kapillardichte

Nach der histochemischen Färbung der Alkalischen Phosphatase stellten sich die Kapillaren blau, die Muskelfasern hellrot dar. Dadurch konnten wir unter dem Lichtmikroskop die Kapillardichte als Verhältnis Zahl der Kapillaren zu der Zahl der Muskelfasern bestimmen. Im rechten Bild der Abbildung 10 erkennt man eine deutliche Zunahme der Kapillaren um die einzelnen Muskelfasern nach Retroinfusion der eEPCs. Zum Vergleich ist die Kapillarendichte der Kontrollgruppe (linkes Bild) nur gering ausgeprägt.

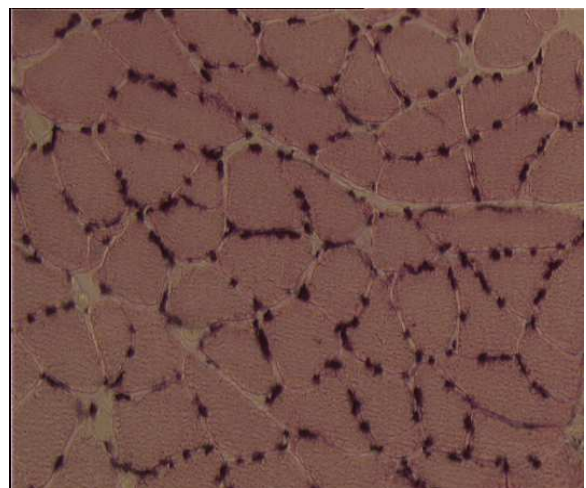
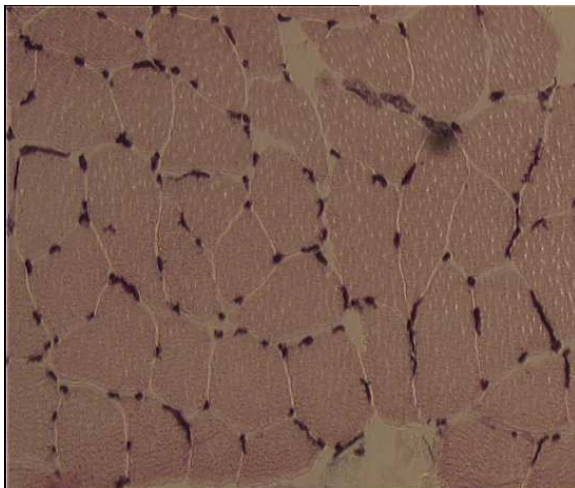


Abbildung 10: Rechts ist ein mit AP eingefärbter Muskel der EPC-Gruppe abgebildet. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe links lässt sich ein deutliche Zunahme der Kapillarendichte (schwarz) um die einzelnen Muskelfasern erkennen.

Vier Wochen nach der retrograden Infusion der eEPCs in die V. tibia konnten wir in allen untersuchten Muskeln des Hinterlaufs eine signifikant verbesserte Kapillardichte feststellen ($p < 0,05$). Die EPC-Gruppe wies eine Kapillardichte von $1,60 \pm 0,3$ auf, während sie in der Kontrollgruppe $0,99 \pm 0,2$ betrug (Abbildung 11).

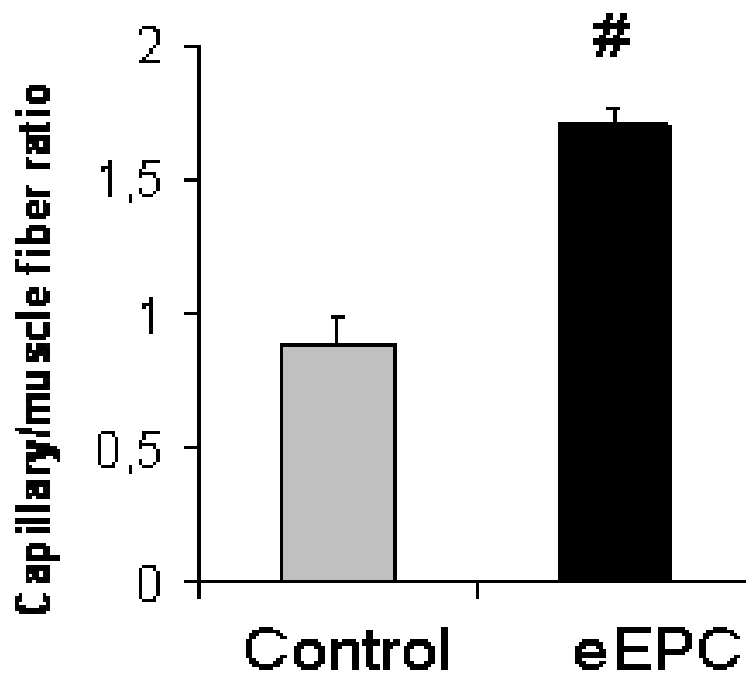
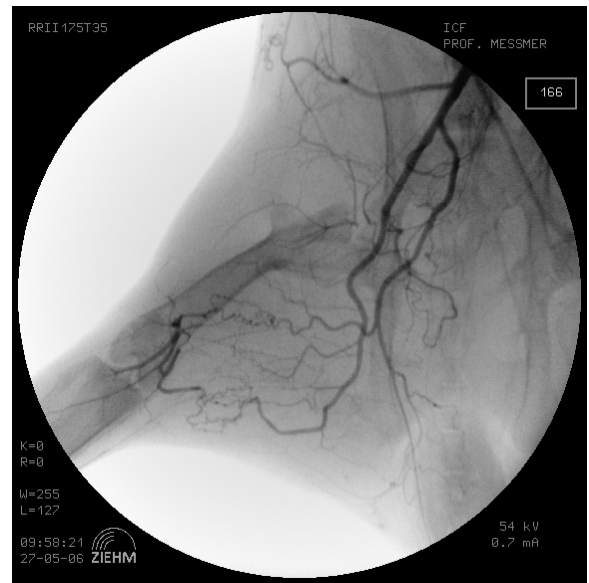
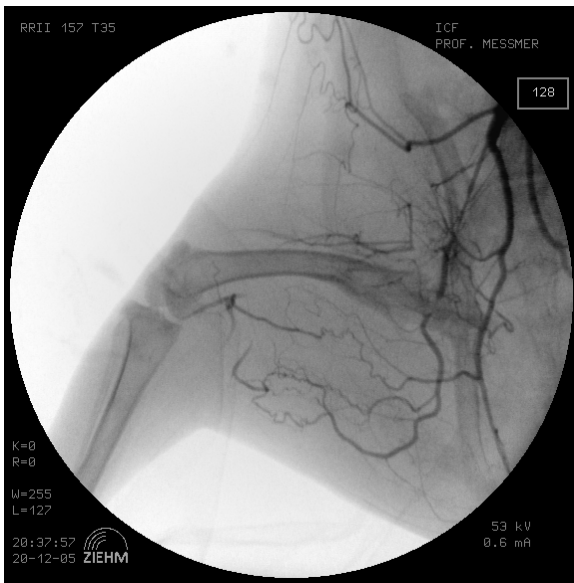


Abbildung 11: 28 Tage nach der Transplantation der eEPCs (Tag 35) hat das Verhältnis Kapillare zu Muskelfaser signifikant zugenommen. Die Quantifizierung erfolgte in 3 verschiedenen Muskeln (Mm. Gastrocnemius, tibialis anterior und adductor). n=5; # P< 0,05 vs. der Kontrollgruppe.

Mit Hilfe eines über die Angiographiebilder gelegten Gitternetzes konnten wir die Arteriogenese als Kollateralenzuwachs analysieren.

5.6 Arteriogenese – Kollateralwerte

Vier Wochen nach der Retroinfusion zeigte sich ein deutlicher Unterschied in den Kollateralwerten zwischen den beiden Versuchsgruppen. Vergleicht man die Werte der Kontrollgruppe an Tag 35 mit denen an Tag 7, konnte kein signifikanter Zuwachs an Kollateralen erkannt werden (101 ± 9 %). Im Gegensatz dazu konnte man bei den Tieren der EPC-Gruppe einen deutlichen Anstieg der Kollateralenzahl feststellen (201 ± 51 %, $p < 0,05$) (Abbildung 13). Die Kollateralwerte an Tag 7 entsprechen 100 %. Die Werte an Tag 35 werden dazu in Relation gesetzt und geben das prozentuale Kollateralenwachstum zwischen Tag 7 und Tag 35 an. In der EPC-Gruppe zeigt sich eine signifikante Zunahme der Kollateralen verglichen mit der Kontrollgruppe ($p < 0,05$).



Die **Abbildung 12** zeigt einen Ausschnitt der Angiographie an Tag 35. Dargestellt ist der ischämische Hinterlauf der beiden Gruppen. Der Zuwachs an Kollateralen ist in der eEPC-Gruppe (rechts) eindeutig größer als in der Kontrollgruppe (links).

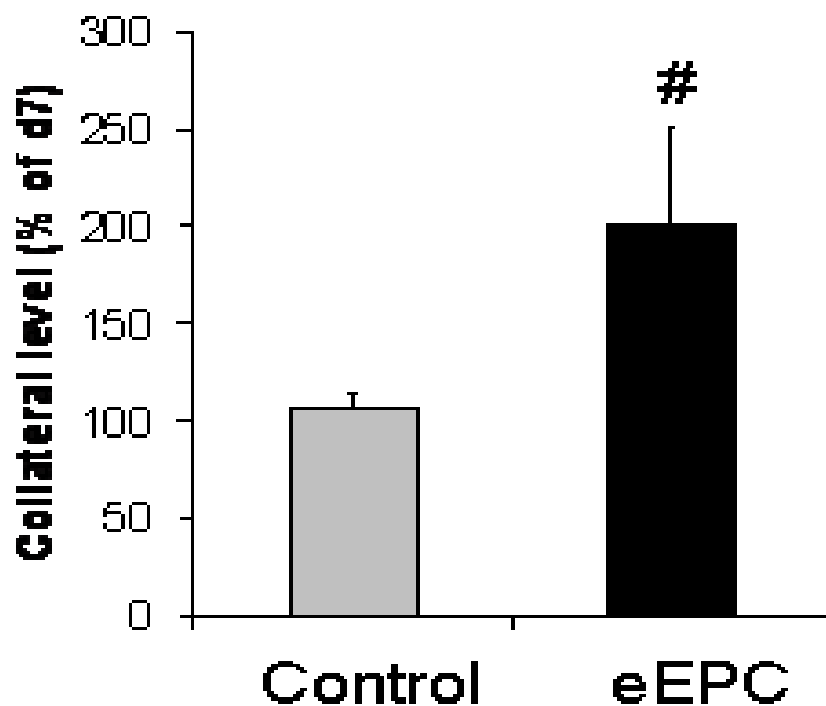


Abbildung 13: Die Kollateralenzahl wurde an Tag 35 ermittelt und in % zu Tag 7 angegeben. Auch hier zeigte sich, dass die mit eEPCs behandelten Tiere eindeutig mehr neue Kollateralen ausgebildet hatten als die Tiere in der Kontrollgruppe. n=5; # P< 0,05 vs. Kontrollgruppe.

Mit Hilfe der Cinedensitometrie wurde der Blutfluss im ischämischen Hinterlauf gemessen.

5.7 Perfusion – Blutfluss

Die Zunahme der Kapillaren und der Kollateralen korrelierte mit einer Verbesserung der Perfusion. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den beiden Gruppen. Während die Kontrollgruppe einen um $111,7 \pm 17,9$ % verbesserten Blutfluss aufwies, steigerten die retroinfundierten EPCs diesen um $140 \pm 14,4$ % in der eEPC-Gruppe (Abbildung 14; $p < 0,05$).

Beide Werte bezogen sich auf die Baseline-Angiographie an Tag 7. Je höher die Differenz zwischen Tag 7 und Tag 35, desto gesteigerte ist der Kollateralenzuwachs und daraus folgend die Perfusion.

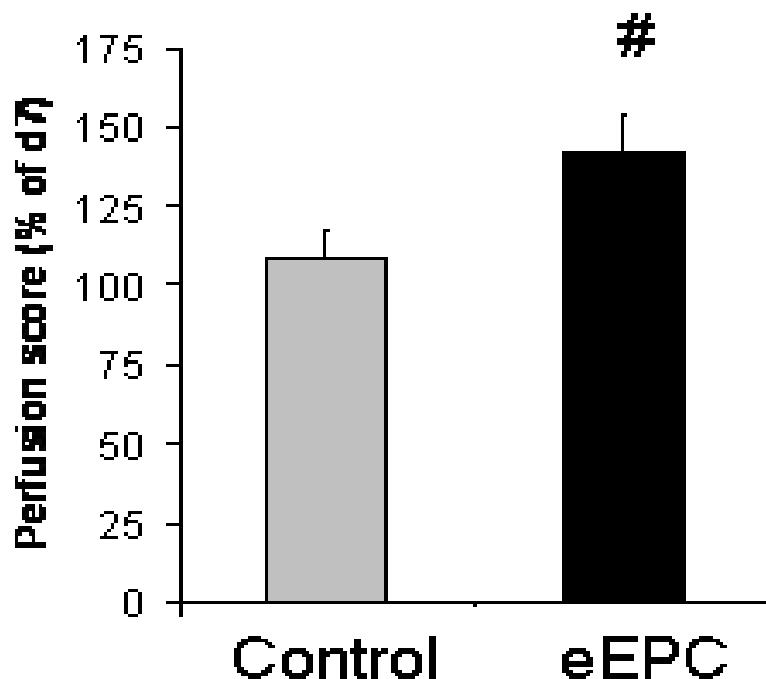


Abbildung 14: Bei der Angiographie mit Kontrastmittel an Tag 35 zeigte sich eine signifikant verbesserte Perfusionssituation bei der EPC-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. $n=5$; # $P < 0$.

6 Diskussion

Die therapeutische Induktion der Neovaskularisation stellt einen verlockenden Ansatz in der Therapie des ischämischen Gewebeuntergangs nach einem akuten Herzinfarkt, einem Schlaganfall oder bei der chronischen peripheren arteriellen Verschlusskrankheit dar. Dabei gilt es zu beachten, dass die Neovaskularisation in unterschiedliche Prozesse unterteilt werden kann. Die Vaskulogenese bezeichnet heutzutage nur noch die primäre Ausbildung embryonaler Gefäßnetzwerke. Die Angiogenese beschreibt die Kapillaraussprossung durch Integration und Differenzierung endothelialer Progenitorzellen in Endothelzellen. Bei der Arteriogenese entstehen neue Kollateralgefäße aus bereits bestehenden Arteriolen aufgrund eines erhöhten Shear-stress nach Verschluss eines großen arteriellen Gefäßes. Über die Höhe des Anteils der Angio- und Arteriogenese bei der Neovaskularisation im adulten Organismus und damit auf die Verbesserung der Perfusionssituation im verletzten Gebiet gibt es unterschiedliche Meinungen. Auch über die beteiligten Substanzen oder Vorläuferzellen gibt es zahlreiche Studien und unterschiedliche Ergebnisse. Wir haben in der vorliegenden tierexperimentellen Studie den potentiellen Einfluss embryonaler endothelialer Progenitorzellen auf die Angiogenese und Arteriogenese untersucht. Dabei wurden die eEPCs in den ischämischen Hinterlauf des Kaninchens venös retroinfundiert.

Bei der Angiogenese finden sich erhöhte Spiegel zirkulierender EPCs. Ursache dafür ist ein signifikanter Anstieg des Wachstumsfaktors VEGF und des HIF-1a im hypoxischen Gewebe sowie eine gesteigerter Aktivierung der MMP-9. Die Folge ist eine Stimulation der Freisetzung der EPCs aus dem Knochenmark (Takahashi et al., 1999/ Gill et al., 2001/ Kalka et al., 2000/ Kalka et al., 2000/Heissig et al., 2002). In früheren experimentellen Arbeiten mit retrograd infundierten Wachstumsfaktoren wie z. B. FGF oder VEGF konnte meist nur eine Zunahme der Kapillardichte in der ischämischen Unterschenkelmuskulatur nachgewiesen werden. Dagegen konnte keine Angiogenese im Oberschenkelbereich festgestellt werden. Dies führte man auf die ischämieabhängige Wirkung der Wachstumsfaktoren und damit der Angiogenese zurück. Da verschiedene Untersucher zeigen konnten, dass die Oberschenkelmuskulatur im Kaninchenmodell für chronische Ischämie keine

bzw. nur eine geringe Ischämie aufwies, ließen sich diese Befunde gut in Einklang damit bringen (Deindl et al., 2001/ Ito et al., 1997/Karl, 2005). Die Schlussfolgerung, Angiogenese funktioniere hauptsächlich in hypoxischen Arealen, konnten wir aus unseren Untersuchungen nicht nachvollziehen. Die retroinfundierten eEPCs führten zu einer signifikant erhöhten Kapillardichte sowohl in der Oberschenkel- als auch in der Unterschenkelmuskulatur. Anders als die Angiogenese scheint die Arteriogenese nicht in hypoxischem Gewebe statt zu finden. Die Arteriogenese stellt damit ein eigenes Phänomen der Perfusionsverbesserung dar (Schaper et al., 1999/ Carmeliet, 2000). Sie findet proximal der ischämischen Zone statt und ist auch nicht auf erhöhte VEGF-Spiegel angewiesen (Helisch et al., 2003/ Schaper et al., 1996/ Ito et al., 1997/ Deindl et al., 2000). Nach Okklusion der Femoralarterie konnten zum Beispiel keine erhöhten Spiegel von HIF-1 alpha bzw. VEGF gefunden werden (Deindl et al., 2001). Da aber die Versuche meist am Model des ischämischen Hinterlaufs vorgenommen wurden, ist nach wie vor nicht auszuschließen, dass Arteriogenese nicht doch auch unter hypoxischen Bedingungen ablaufen könnte (Heil et al., 2006). Kollateralarterien sind bereits bestehende Arteriolen, die sich in funktionierende Arterien umwandeln können. Dieses Phänomen wird als Arteriogenese bezeichnet. Kennzeichen der Arteriogenese sind zunehmender Shear-stress als Folge der Okklusion einer Arterie, das Vorhandensein von Arteriolen und v.a. das Einwandern von zirkulierenden EPCs. Erst der vermehrte Blutfluss über die Arteriolen lässt diese in ihrem Durchmesser größer werden. Dass sowohl die Angio- als auch die Arteriogenese ohne EPCs nicht signifikant nachzuweisen war, zeigte der Vergleich mit der Kontrollgruppe, in der NaCl 0,9% appliziert wurde. In dieser Gruppe konnte keine eindeutig nachweisbare Zunahme der Kapillardichte, des Kollateralenwachstums oder des Blutflusses zwischen Tag 7 und Tag 35 festgestellt werden. Hershey und v.a. Schaper postulieren, dass der Prozess der Arteriogenese einen wesentlich effektiveren Mechanismus zur Kompensation eines arteriellen Verschlusses darstellt als die Angiogenese (Hershey et al., 2001/ Buschmann; 1999/ Buschmann, 2000). Diese Ansicht wird auch von Ito et al. geteilt. Zwar trägt die Angiogenese wahrscheinlich zur Verbesserung der Durchblutungssituation im ischämischen Gebiet bei, eine ausreichende Blutversorgung ist jedoch nur über die neu

ausgebildeten Kollateralarterien möglich (Ito et al., 1997). Matsuo et al. postulieren, dass v.a. die Fähigkeit Kollateralen auszubilden den Schaden im ischämischen Gebiet begrenzen kann (Matsuo et al., 2008). Beide Lager beschreiben eine direkte Beteiligung der EPCs an der Neovaskularisation. Dies wird auch mit dem Begriff der Hardware Hypothese bezeichnet.

Neuere präklinische Studien können jedoch die Hypothese, dass vom Knochenmark abstammende Stamm- oder Progenitorzellen sich tatsächlich in das Endothel wachsender Gefäße einfügen, nicht immer bestätigen. Die verbesserte Gefäß- und Perfusionssituation könnte auch als indirekter Effekt der vorhandenen EPCs innerhalb des verletzten Gewebes verstanden werden (Ziegelhoeffer et al., 2004/ Heil et al., 2004). Hier lässt sich entgegenhalten, dass in unseren Versuchen die Tiere der Kontrollgruppe keinen signifikanten Anstieg des Kapillar-Muskelfaser-Verhältnisses aufwiesen. Auch die Zahl der Kollateralen zeigte an Tag 35 keine wesentliche Steigerung gegenüber Tag 7. Käme eine Induktion der Angio- bzw. Arteriogenese nur durch den Einfluss lokal bereits vorhandener EPCs zustande, sollten sich die Ergebnisse in der Versuchs- und Kontrollgruppe gleichen. Auch konnten wir anhand der DI-markierten EPCs nachweisen, dass diese ab dem 14. Tag nicht mehr vorhanden waren. Ein therapeutischer Effekt war jedoch über den 14. Tag hinaus zu erkennen. Dies bestätigt die parakrine Hypothese, nach der die Neovaskularisation über sezernierte Wachstumsfaktoren und parakrin angelockte EPCs hauptsächlich von zirkulierenden EPCs angestoßen und aufrecht erhalten wird. Wären v.a. integrierte Vorläuferzellen dafür verantwortlich, müssten wir auch nach dem 14. Tag noch relevante Mengen dieser am Ort des Geschehens nachweisen können. Einen weiteren Hinweis einer indirekten, parakrinen Beteiligung der eEPCs an der Angiogenese lieferten uns die Aortenringversuche. Durch Aufbringen der Progenitorzellen auf in Matrigel eingebettete Aortenringe konnten wir eine ausgeprägte Induktion der Kapillaraussprossung induzieren. Aufgrund des Matrigels wurde ein direkter Kontakt der Zellen mit den Endothelzellen der Aorta verhindert. Das Ausmaß der Angiogenese war vergleichbar mit der durch den potenten Wachstumsfaktor FGF-2 ausgelösten Angiogenese. D.h., die Aussprossung konnte nur durch parakrine Faktoren stimuliert worden sein. Und diese Substanzen wurden eindeutig von den aufgetragenen eEPCs sezerniert, da das Matrigel keine

proangiogenetischen Faktoren enthielt. Bei der genaueren Analyse der potentiell in Frage kommenden Faktoren stellten wir fest, dass der bis dato als überaus wichtiger Motor der Angiogenese beschriebene Wachstumsfaktor VEGF im Expressionsprofil der eEPCs eine eher untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Mit Hilfe der Affymetrix Genchips war VEGF nur mit einem geringen Expressionswert vertreten. Auch in der PCR ließen sich nur geringe Mengen mRNA detektieren. Und auch im Western-Blot war VEGF überhaupt nicht mehr nachzuweisen. Dasselbe konnten wir für bFGF feststellen. Im Gegensatz dazu waren v.a. der Angiogenesefaktor PDGFA und das Zytokin MiF sowie die Proteaseregulatoren Timp 1 und 2 in großen Mengen vertreten. Die These, dass bei Ischämie VEGF die EPC verstärkt aus dem Knochenmark ausschwemmt und sie in das Gebiet der Ischämie leitet, scheint uns daher zunehmend umstritten. Angiogenese ist vielmehr die Induktion der Neovaskularisation mittels Wachstumsfaktoren, Zytokinen u.a. Proteinen die von den eEPCs sezerniert werden. Wichtig dabei ist, dass diese auch noch stattfindet, selbst wenn die ursprünglich transplantierten Progenitorzellen bereits nicht mehr nachzuweisen sind. Die infundierten eEPCs schaffen eine proangiogene Umgebung, in dem sie angiogenesefördernde Proteine exprimieren und sezernieren und gleichzeitig weitere EPCs aus der Blutzirkulation und damit auch aus dem Knochenmark in das ischämische Gewebe anlocken. Diese geben dann ebenfalls wieder angiogenetische Proteine an das Blut und ihre Umgebung ab. Dabei bleibt zu klären, ob die adulten aus dem Knochenmark stammenden EPCs die Angiogenese in ähnlich potenter Weise stimulieren können wie die embryonalen. Die in dieser Studie verwendeten klonalen embryonalen EPCs weisen eine große Varietät exprimierter und sezernierter Proteine auf. So nehmen sie mit Hilfe von Zytokinen, Chemokinen, Angiogenesefaktoren und verschiedenen Proteaseinhibitoren Einfluss auf den Gewebeumbau. Überraschend ist dabei, dass ca. 35% dieser Moleküle und ihre Rezeptoren aus dem embryonalen BMP und wnt Signalweg stammen. Diese sind nicht nur für die Organentwicklung sondern auch für die embryonale Vaskulogenese enorm wichtig. Diese einzigartige Quelle an entwicklungsaktiven Proteinen ist vielleicht der Vorteil embryonaler Zellen. Dass sich die Expressionsprofile embryonaler von denen adulter Stammzellen unterscheiden und somit auch für unterschiedliche Aufgaben zuständig sein

könnten, zeigte ein Vergleich zwischen exprimierten Zytokinen in embryonalen und adulten, vom Knochenmark abstammenden, Stammzellen (Kinnaird et al., 2004). Vergleicht man nun die exprimierten Zytokine der eEPCs mit denen adulter Stammzellen, findet man nur eine begrenzte Übereinstimmung. Von den 19 gefundenen Zytokinen finden sich lediglich TGF β , PDGF, VEGF-A und VEGF-B wieder (Urbich et al., 2005). Aus dieser Erkenntnis lässt sich möglicherweise ableiten, dass EPCs unterschiedlicher Herkunft nicht nur ein jeweils eigenes Expressionsverhalten zeigen sondern auch für verschiedene Aufgaben vorgesehen sind. Um diese Vermutung zu untermauern gilt es die Expressionsprofile der verschiedenartigen EPCs genauer herauszuarbeiten (Kupatt et al., 2005).

Für die therapeutische Zukunft scheinen die auf Stammzellen basierende Therapieansätze einen entscheidenden Vorteil gegenüber der Applikation einzelner Faktoren zu haben. Die EPCs induzieren die Angiogenese durch die Ausdifferenzierung in reife ECs und durch die Sekretion proangiogener Faktoren. Ein weiterer Vorteil ist die Produktion hoher Spiegel an kardioprotektiven Molekülen wie zum Beispiel Thymosin- β 4. Zu klären bleibt die Frage, ob es notwendig ist, das gesamte Spektrum an potentiell exprimierbaren Proteinen zu applizieren. Von großem Interesse ist die Überlegung, dass eine effektive Induktion der Angiogenese und damit der Geweberegeneration lediglich durch die Applikation weniger Vertreter der einzelnen Proteingruppen möglich sein könnte. Zu klären bleibt dabei auch, ob sich die unerwünschten Wirkungen der Zelltransplantation (Tumorinduktion, Verbleib der Stammzellen im Gewebe über den gewünschten Zeitraum hinaus, unkontrollierbare Langzeitnebenwirkungen) durch Gabe bestimmter Proteine oder spezieller Zellen vermieden werden können. Optimal wäre dabei, wenn die Zellen exakt auf die jeweilige Krankheit zugeschnitten werden oder der Proteinmix viele verschiedenen Aufgaben gleichzeitig erledigen könnte (Kupatt et al., 2005).

Neben der applizierten Substanz spielt auch die Applikationsart eine entscheidende Rolle. In diversen Studien wurden die Progenitor-/Stammzellen bzw. Wachstumsfaktoren meist intramuskulär oder systemisch intravenös bzw. intraarteriell verabreicht. Bei der systemischen Applikation benötigt man große Mengen der entsprechenden Substanz, um im Zielgebiet einen ausreichenden Effekt zu erzielen sowie eine mehrmalige Applikation (Lazarous et al., 2000/ Baffour et

al., 1992). Das setzt voraus, dass die Substanz in großen Mengen erhältlich ist und dem übrigen Organismus möglichst keinen Schaden zufügt. Verabreicht man systemisch Wachstumsfaktoren wäre eine unerwünschte Angiogenese z.B. der Retina zumindest denkbar. Miller et al. konnten 1994 einen Zusammenhang zwischen erhöhten VEGF-Spiegeln und einer Retinopathie feststellen (Miller et al., 1994). Auch Liu et al. kommen in ihrer Studie an Diabetespatienten zu dem Schluss, dass durch die Retinaischämie die Zahl an aktivierten EPCs zunimmt und in einer Retinopathie resultiert (Liu et al., 2010). Eine intraarterielle Infusion setzt voraus, dass die Perfusion proximal des ischämischen Gewebes wieder eröffnet ist. Intramuskulär stellt im Hinblick auf den Patientenkomfort keine Alternative dar. Außerdem verteilen sich die applizierten Substanzen nur sehr inhomogen und an der Injektionsstelle kann es zu Kapillarschwämmen und Abszessen kommen (Dor et al., 2002). Lebherz et al. zeigten 2003, dass sich mittels venöser Retroinfusion eine höhere Konzentration eines radioaktiv markierten Tracers im Zielgebiet erzielen lässt als mit einer intraarteriellen Applikation (Lebherz et al., 2003). Auch Karl kam im Rahmen seiner Dissertation zu dem Schluss, dass die venöse retrograde Infusion der intraarteriellen und intramuskulären Applikation von Wachstumsfaktoren überlegen sei (Karl, 2005). Der Vorteil dabei sind eindeutig die direkte Applikation in das ischämische Zielgewebe und durch ein gleichzeitig angelegtes Tourniquet verhindertem schneller Abfluss der infundierten eEPCs. Die Verweildauer wird erhöht und gleichzeitig erhöht sich die Chance, dass sich die transplantierten eEPCs integrieren bzw. durch Sekretion proangiogener Faktoren sowohl weitere EPCs aus der Zirkulation anzulocken als auch wichtige Schritte in Richtung Geweberegeneration einzuleiten.

Bei den positiven Ergebnissen in tierexperimentellen Studien gilt es nach Heil et al., drei wichtige Voraussetzungen zu berücksichtigen, bevor eine Anwendung am Menschen stattfinden könnte:

Erstens, hat man bei Tierversuchen den großen Vorteil, dass man den Zeitpunkt der Behandlung optimal wählen kann. Dies ist bei Menschen nahezu unmöglich, da der Zeitpunkt des Verschlusses oft nicht bekannt ist oder schon länger zurück liegt. Zweitens, die meisten Experimente finden an jungen, gesunden Tieren statt. Das Patientenkollektiv, das später von den Erkenntnissen profitieren soll, ist meist älter

und weist zahlreiche kardiovaskuläre Erkrankungen als Folge der Atherosklerose auf.

Drittens, haben die Tierversuche gezeigt, dass selbst junge Tiere nur ca. 40% des maximalen Flusses durch Kollateralarterien ersetzen. Eine echte therapeutische Option wäre allerdings nur eine Zunahme des Flusses über Kollateralen auf 100% (Heil et al., 2004).

Diese Anmerkungen von Heil et al. können durch zahlreiche Studien an Menschen widerlegt werden. Klinische Studien an pAVK- und Herzinfarktpatienten konnten durch die Applikation von EPCs eine verbesserte Perfusionssituation erzielen. Die verbesserte Morphologie zeigte sich auch funktionell. U. a. in einer Reduktion des Ischämieschmerzes und einer Verlängerung der Gehstrecke sowie in einer verbesserten LV-EF (Tateishi-Yuyama et al., 2002/ Britten et al., 2003/ Wollert et al., 2004/Shintani et al., 2001). All diese Patienten wiesen kardiovaskuläre Risikofaktoren auf, zeigten artherosklerotische Gefäßveränderungen und waren eher von höherem Alter. Auch der Zeitpunkt des Gefäßverschlusses war nicht immer exakt zu definieren, so dass auch die Therapie mit den EPCs nicht immer unmittelbar im Anschluss an das Ereignis appliziert werden konnten. Ein Nutzen durch die applizierten EPCs konnte auch an Verbrennungspatienten nachgewiesen werden. Auch hier konnten die Progenitorzellen das ischämische Areal reduzieren sowie die Neovaskularisation induzieren und fördern (Gill et al., 2001).

Ein weiterer Kritikpunkt sind mögliche Einflußfaktoren auf die Proliferation und Differenzierung der EPCs in Kultur und in vivo. In vitro könnten bestimmte Wachstumsfaktoren im Medium, die Antikörper der Mikrobreads oder auch der Kontakt mit extrazellulärem Material (z.B. Plastik) eine wichtige Rolle spielen. Hingegen könnten reife ECs im Körper die EPCs ebenso beeinflussen. (Quirici et al., 2001/ Murohara, 2001).

Ein anderes Problem stellt die Gewinnung und Bereitstellung ausreichender Mengen applizierbarer EPCs dar. Endotheliale Progenitorzellen lassen sich u.a. aus Knochenmark oder Blut gewinnen. Beide Methoden sind jedoch nicht optimal. Um an Knochenmark in ausreichender Menge zu gelangen ist meist eine Anästhesie notwendig, die bei dem betroffenen Patientenkollektiv mit multiplen Vorerkrankungen nicht ohne Risiko ist (Tateno et al., 2006). Außerdem scheinen

die Vorläuferzellen, die man von pAVK-Patienten gewinnt, nicht mehr optimal bzgl. ihrer proangiogenen Eigenschaften zu sein (Schatteman et al., 2006/ Yamamoto et al., 2004). Auch über die Zahl der zirkulierenden EPCs ist man sich nicht einig (Peichev, Dignat-Georg). Sicher jedoch ist, dass in gesunden Probanden die Zahl der EPCs deutlich höher ist als in bereits erkrankten Patienten. Eine Studie von Pelliccia et al. zeigte einen deutlichen Unterschied in der Anzahl zirkulierender Vorläuferzellen bei gesunden Frauen in der Menopause verglichen mit Frauen und Männern im selben Alter mit bereits bestehender KHK (Pelliccia et al., 2009). Eine Alternative wäre also die Gewinnung der EPCs aus gesunden Freiwilligen oder die Verwendung EPC- ähnlicher Side-Populations, die man normalerweise aus dem Knochenmark gewinnt. Eine weitere Option stellt die Zahnpulpa bereits gezogener Zähne dar (Iohara et al., 2008).

7 Zusammenfassung

Die periphere arterielle Verschlusskrankheit betrifft in den Industrienationen 10 % der männlichen Bevölkerung. Trotz vieler therapeutischer Optionen (Behandlung von Risikofaktoren, Perfusionsverbesserung durch PTA, Bypasschirurgie) endet diese Erkrankungen noch häufig in der Amputation der betroffenen Extremität. In den letzten 2 Jahrzehnten wurden grundlegende Erkenntnisse der Neovaskularisation erforscht und in experimentelle Studien zur therapeutischen Neovaskularisation umgesetzt.

Ziel dieser Arbeit war es, einen eindeutig positiven Effekt der durch retrograde intravenöse Infusion applizierten eEPCs auf die Neovaskularisation zu beweisen, da es bislang nur Hinweise auf ihre Beteiligung gab.

Mit der DiI-Methode konnten wir zum einen beweisen, dass die transfundierten eEPCs tatsächlich im Empfängergewebe vorhanden waren. Zum anderen konnten wir deren Überlebensdauer bis auf ca. 10 ± 2 Tage nach Retroinfusion datieren. Die retrograde intravenöse Applikation der eEPCs führte zu einer deutlichen Verbesserung der Neovaskularisation in der betroffenen Extremität. Verglichen mit der Kontrollgruppe wies die EPC-Gruppe ein signifikant höheres Kapillar-Muskelfaser-Verhältnis in der AP-Färbung auf. Die Angiogeneserate war in dieser Gruppe deutlich stärker ausgeprägt. Die Auszählung der Zahl der Kollateralen mit Hilfe des standardisierten Gitters ergab eine ausgeprägtere Arteriogenese in der EPC-Gruppe. Die Kontrollgruppe wies nahezu keine Zunahme der Kollateralenzahl auf. Auch die Perfusion war nach Infusion der eEPCs verbessert. Dies zeigte die Ermittlung des Blutflusses anhand der TIMI Frame Count Methode. Das Kontrastmittel benötigte in der Studiengruppe deutlich weniger Zeit, um vom proximalen zum distalen Exzisionspunkt zu gelangen. Dies wiederum ließ auf einen verbesserten Blutfluss durch das einst ischämische Gebiet schließen. Anhand unserer Aortenringversuchen konnten wir beweisen, dass eEPCs parakrin wirkende Faktoren sezernieren und damit die Kapillaraussprossung induzieren. Die Affymetrix Genchips lieferten uns eine lange Liste möglicher Wachstumsfaktoren, Chemokine und Zytokine, die für diesen parakrinen Effekt in Frage kamen. Die RT-PCR-Analyse lieferte dann einen Hinweis auf die Menge der mRNA der einzelnen Substanzen. Der

Western-Blot filterte dann letztendlich die Faktoren heraus, die wirklich relevant für die parakrine Eigenschaft der eEPCs waren. Interessant war dabei das Ergebnis, dass der bekannte Wachstumsfaktor VEGF exprimiert wurde, jedoch bei unseren eEPCs keine wichtige Rolle bei der parakrinen Induktion der Angiogenese zu spielen scheint.

Zusammenfassend stellt die Applikation von eEPCs direkt in das ischämische Gebiet via venöser, retrograder Infusion eine therapeutische Option dar, eine pAVK effektiv zu behandeln. Durch diese Technik werden eine zielgenaue Applikation und ausreichend lange Anreicherung der eEPCs im Bereich der Ischämie erreicht. Die Neovaskularisation induzieren die eEPCs hauptsächlich indirekt mittels parakrin wirkender Wachstumsfaktoren, Regulatoren und Inhibitoren der Angiogenese. Über diese Substanzen locken sie weitere EPCs aus der Zirkulation in das ischämische Gebiet an. Die Angiogenese wird fortgeführt, obwohl die ursprünglich applizierten Progenitorzellen nicht mehr nachzuweisen sind. Ein positiver Nebeneffekt ist, dass wir bei unseren Versuchstieren keine Nebenwirkungen in Form starker Entzündungs- oder Abstoßungsreaktionen beobachten konnten. Dies ist ein weiterer Vorteil in der therapeutischen Applikation dieser Zellen, da auch keine immunsuppressive oder antiphlogistische Therapie notwendig ist. Endotheliale Progenitorzellen stellen aus unserer Sicht auch in Zukunft eine therapeutische Option in der Behandlung einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit dar, sofern diese retrograd am Ort der Ischämie venös infundiert werden. Zukünftige Studien werden benötigt, um das angiogenetische Potential der endothelialen Progenitorzellen noch exakter zu erforschen und dessen therapeutische Einsatzmöglichkeiten am Menschen zu verbessern.

8 Literaturverzeichnis

- A
- Acevedo A.
Die kontrollierte Kreislaufsperrung: Historische Grundlagen und Zukunftsperspektiven.
Wiener Wochenschrift, 1993; 143(7/8):144-146.
- Asahara T, Bauters C, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM.
Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo.
Circ., 1995; 92(9Suppl): II365-371.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM.
Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis.
Science, 1997; 275:964-967.
- Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM.
VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells.
EMBO J., 1999; 18:3964-3972.
- B
- Baffour R.
Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by in vivo administration of recombinant basic fibroblast growth factor in a rabbit model of acute lower limb ischemia:dose-response effect of basic fibroblast growth factor.
J. Vasc. Surg., 1992; 16:181-191.
- Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM.
Site-specific therapeutic angiogenesis after systemic administration of vascular endothelial growth factor.
J. Vasc. Surg., 1995; 21(2):314-325.
- Bhattacharya V, McSweeney PA, Shi Q, Bruno B, Ishida A, Nash R, Storb RF, Sauvage LR, Hammond WP, Wong MH-D.
Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34+ bone marrow cells.
Blood, 2000; 95:581-585.
- Bock-Marquette I, Saxena A, White MD, DiMaio J, Srivastava D.
Thymosin β 4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair.
Nature, 2004; 432:466-472.

Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, Vogl TJ, Martin H, Schachinger V, Dimmeler S, Zeiher AM.

Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging.

Circ., 2003; 108:2212-2218.

Brown MD, Hudlická O.

Protective effects of long-term bradycardial pacing against catecholamine-induced myocardial damage in rabbit hearts.

Circ. Res., 1988; 62:965-974.

Buschmann I, Schaper W.

Arteriogenesis versus angiogenesis: two mechanisms of vessel growth.

News Physiol. Sci., 1999; 14:121-125.

Buschmann I, Schaper W.

The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis).

J. Pathol., 2000; 190:338-342.

C

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kiekens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Riseau W, Nagy A.

Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele.

Nature, 1996; 380:435-439.

Carmeliet P.

Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis.

Nature Med., 2000; 6:389-395.

Carmeliet P, Luttun A.

The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis.

Thromb. Haemost., 2001; 86:289-297.

Carmeliet P.

Manipulating angiogenesis in medicine.

J. Internal Medicine, 2004; 255:538-561.

Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM.

Endothelial cells in physiology and pathophysiology of vascular disorders.

Blood, 1998; 91:3527-3561.

- D Deindl E, Neubauer E, Fernandez B, Tomas S, Podzuweit T.
Collateral artery growth in rabbit is not dependent on ischemia or an increased expression of VEGF.
Circ., 2000; 102:II-51.
- Deindl E, Buschmann I, Hoefler IE, Podzuweit T, Boengler K, Vogel S, van Royen N, Fernandez B, Schaper W.
Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit.
Circ. Res., 2001; 89(9):779-786.
- Dignat-George F, Sampol J.
Circulating endothelial cells in vascular disorders: new insights into an old concept.
Eur. J. Haematol., 2000; 65:215-220.
- Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildern-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rütten Hartmut, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM.
HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway.
J. Clin. Invest., 2001; 108:391-397.
- Dor Y, Djonov V, Abramovitch R, Itin A, Fishman GI, Carmeliet P, Goelman G, Keshet E.
Conditional switching of VEGF provides new insights into adult neovascularization and pro-angiogenic therapy.
EMBO J., 2002; 1(8):1939-47.
- Dorner T, Rieder A.
Risk management of coronary heart disease-prevention.
Wien. Med. Wochenschr., 2004; 154(11-12):257-65.
- F Fadini GP, Avogaro A.
Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor- mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia in diabetes.
Diabetes Care, 2006, 29:478-479.
- Ferrara N, Carver Moore K, Chen H, Dowd M, Lou L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW.
Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene.
Nature, 1996; 380:439-442.
- Folkman J.
Therapeutic angiogenesis in ischemic limbs.
Circ., 1998; 97:1108-1110.

- G Gibson CM, Cannon CP, Daley WL, Dodge JT, Alexander B, Marble SJ, McCabe CH, Raymond L, Fortin T, Poole K, Braunwald E.
TIMI frame count: a quantitative method of assessing coronary artery flow.
Circ., 1996; 93:879-888.
- Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S.
Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells.
Circ. Res., 2001; 88:167-174.
- Grzelak I, Olszewski WL, Zaleska M, Ziolkowska A, Durlik M, Lagiewska B, Muszynski M, Rowinski W.
Surgical trauma evokes a rise in the frequency of hematopoietic progenitor cells and cytokine levels in blood circulation.
Eur. Surg. Res., 1998; 30:198-204.
- H Hatzopoulos AK, Folkman J, Vasile Eliza, Eiselen GK, Rosenberg RD.
Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from mouse embryos.
Development, 1998; 125:1457-1468.
- Heil M, Schaper W.
Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis).
Circ. Res., 2004; 95:449-458.
- Heil M, Ziegelhoeffer T, Mees B, Schaper W.
A different outlook on the role of bone marrow stem cells in vascular growth: bone marrow delivers software not hardware.
Circ. Res., 2004; 94:573-574.
- Heil M, Eitenmüller I, Schmitz-Rixen T, Schaper W.
Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences.
J. Cell. Mol. Med., 2006; 10:45-55.
- Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S.
Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand.
Cell., 2002; 109:625-637.
- Herold G.
Innere Medizin.
2008; 739 – 743.

Hershey JC, Baskin EP, Glass JD, Hartman HA, Gilberto DB, Rogers IT, Cook JJ.

Revascularization in the rabbit hindlimb: dissociation between capillary sprouting and arteriogenesis.

Cardiovasc. Res., 2001; 49:618-625.

Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T.

Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk.

N. Engl. J. Med., 2003; 348:593-600.

Höckel M, Schlenger K, Doctrow S, Kissel T, Vaupel P.

Therapeutic angiogenesis.

Arch. Surg., 1993; 128:423-429.

Hristov M, Erl W, Weber PC.

Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2003; 23:1185-1189.

I Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Nabekura J, Wakita H, Nakamura H, Into T, Matsushita K, Nakashima M.

A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp.

Stem cells, 2008; 26:2408-2418.

Ito WD, Arras M, Scholz D, Winkler B, Htun P, Schaper W.

Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion.

Am. J. Physiol., 1997; 273:H1255-H1265.

Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W.

Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion.

Circ. Res., 1997; 80:829-837.

K Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Gordon R, Tepper O, Gravereaux E, Pieczek A, Iwaguro H, Hayashi SI, Isner JM, Asahara T.

Vascular endothelial growth factor 165 gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects.

Circ. Res., 2000; 86:1198-1202.

Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T.

Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000; 97:3422-3427.

Kalka C, Tehrani H, Laudenberg B, Vale PR, Isner JM, Asahara T, Symes JF.
VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease.
Ann. Thorac. Surg., 2000; 70:829-834.

Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, Rabkin E, Moran AM, Schoen FJ, Atala A, Soker S, Bischoff J, Mayer JE Jr.
Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo.
Nature Med., 2001; 7:1035-1040.

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

Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE.
Bone marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms.
Circ. Res., 2004; 94:678-685.

Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S.
Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function.
Nature Med., 2001; 7:430-436.

Koczulla R, Degenfeld G, Kupatt C, Krötz F, Zahler S, Gloe T, Issbrücker K, Unterberger P, Zaiou M, Lebherz C, Karl A, Raake P, Pfosser A, Boekstegers P, Welsch U, Hiemstra PS, Vogelmeier C, Gallo RL, Clauss M, Bals R.
An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18.
J. Clin. Invest., 2003; 111:1665-1672.

Kupatt C, Horstkotte J, Vlastos GA, Pfosser A, Lebherz C, Semisch M, Thalgott M, Büttner K, Browarzyk C, Mages J, Hoffmann R, Deten A, Lamparter M, Müller F, Beck H, Büning H, Boekstegers P, Hatzopoulos AK.
Embryonic endothelial progenitor cells expressing a broad range of proangiogenic and remodelling factors enhance vascularization and tissue recovery in acute and chronic ischemia.
FASEB J., 2005; 19: 1576-1578.

Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton A, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nature Med.*, 2000; 6:1004-1010.

L Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, Miche E, Böhm M, Nickenig G. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circ.*, 2004; 109:220-226.

Lazarous DF, Unger EF, Epstein SE, Stine A, Arevalo JL, Chew EY, Quyyumi AA. Basic fibroblast growth factor in patients with intermittent claudication: results of a phase I trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000;36(4):1239-1244.

Lebherz C, von Degenfeld G, Karl A, Pfosser A, Raake P, Pachmayr F, Scholz D, Kupatt C, Boekstegers P. Therapeutic angiogenesis/arteriogenesis in the chronic ischemic rabbit hindlimb: effect of venous basic fibroblast growth factor retroinfusion. *Endothelium*, 2003; 10:257-265.

Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD, Saucedo JF, Tenaglia AN, Hermiller JB, Hillegass WB, Rocha-Singh K, Moon TE, Whitehouse MJ, Annex BH. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet.* 2002; 359(9323):2053-2058.

Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J. Clin. Invest.*, 2000; 105:71-77.

M Matsuo Y, Imanishi T, Hayashi Y, Tomobuchi Y, Kubo T, Hano T, Akasaka T. The effect of endothelial progenitor cells on the development of collateral formation in patients with coronary artery disease. *The Japanese Society of Internal Medicine* 2008.

Miller JW, Adamis AP, Shima DT, D'Amore PA, Moulton RS, O'Reilly MS, Folkman J, Dvorak HF, Brown LF, Berse B, Yeo T-K, Yeo K-T.

Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model.

Am. J. Pathol. 1994; 145:574-584.

Moore MA, Hattori K, Heissig B, Shieh JH, Dias S, Crystal RG, Rafii S.

Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1.

Ann. NY. Acad. Sci., 2001; 938:36-45.

Morishita R, Nakamura S, Hayashi S, Taniyama Y, Moriguchi A, Nagano T, Taiji M, Noguchi H, Takeshita S, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T.

Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as cytokine supplement therapy.

Hypertension, 1999; 33(6):1379-1384.

Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T.

Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization.

J. Clin. Invest., 2000; 105:1527-1536.

Murohara T.

Therapeutic vasculogenesis using human cord blood-derived endothelial progenitors.

Trends Cardiovasc. Med., 2001; 11:303-307.

P Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S.

Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors.

Blood, 2000; 95:952-958.

Pelliccia F, Pasceri V, Vitale C, Meoni G, Pristipino C, Speciale G, Mercurio G, Rosano G.

Circulating endothelial progenitor cells in postmenopausal women with and without coronary artery disease.

Climacteric. 2009;12(3):259-265.

Pu LQ, Sniderman AD, Brassard R, Lachapelle KJ, Graham AM, Lisbona R, Symes JF.

Enhanced revascularization of the ischemic limb by angiogenic therapy.

Circ., 1993; 88:208-215.

Pu LQ, Jackson S, Lachapelle KJ, Arekat Z, Graham AM, Lisbona R, Brassard T, Carpenter S, Symes JF.
A persistent hindlimb ischemia model in the rabbit.
J. Invest. Surg., 1994; 7(1):49-60.

Q Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Deliliers GL.
Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells.
Br. J. Haematol., 2001; 115:186-194.

R Rajagopalan S, Mohler ER, Lederman RJ, Mendelsohn FO, Saucedo JF, Goldman CK, Blebea J, Macko J, Kessler PD, Rasmussen HS, Annex BH.
Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication.
Circulation. 2003;108:1933-1938.

Rehmann J, Li J, Orschell CM, March KL.
Peripheral blood „endothelial progenitor cells“ are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors.
Circ., 2003; 107:1164-1169.

Risau W.
Mechanisms of angiogenesis.
Nature 1997; 386:671-674.

Ross R.
Atherosclerosis – An inflammatory disease
N. Engl. J. Med., 1999; 340(2):115-126

Rutishauser W, Simon H, Stucky JP, Schad N, Nosedá G, Wellauer J.
Evaluation of Roentgen cinedensitometry for flow measurement in models and in the intact circulation.
Circ., 1967; 36(6): 951-963.114.

S Schaper W, Ito WD.
Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth.
Circ. Res. 1996; 79:911-919.

Schaper W, Buschmann I.
Arteriogenesis, the good and bad of it.
Cardiovasc. Res., 1999; 43:835-837.

Schächinger V, Assmus B, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM; REPAIR-AMI investigators.

Intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells abrogates adverse left ventricular remodelling post-acute myocardial infarction: insights from the reinfusion of enriched progenitor cells and infarct remodelling in acute myocardial infarction (REPAIR-AMI) trial.

Eur. J. Heart. Fail. 2009;11(10):973-979.

Schatteman GC, Ma N.

Old bone marrow cells inhibit skin wound vascularization.

Stem Cells., 2006; 24:717-721.

Shi Q, Rafii S, Wu M H-D, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MAS, Storb RF, Hammond WP.

Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells.

Blood 1998; 92:363-367.

Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T.

Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction.

Circ., 2001; 103:2776-2779.

T Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T.

Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization.

Nature Med., 1999; 5:434-438.

Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM.

Therapeutic angiogenesis: a single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hindlimb model.

Clin. Invest., 1994; 93:662-670.

Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T.

Therapeutic angiogenesis using cell transplantation (TACT) study investigators. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial.

Lancet, 2002; 360:427-435.

Tateno K, Minamino T, Toko H, Akazawa H, Shimizu N, Takeda Shinichi, Kunieda T, Miyauchi H, Oyama T, Matsuura K, Nishi J, Kobayashi Y, Nagai T, Kuwabara Y, Iwakura Y, Nomura F, Saito Y, Komuro I.
Critical roles of muscle-secreted angiogenic factors in therapeutic neovascularization.
Circ. Res. 2006;98:1194-1202.

Tiwari A, Hamilton G, Seifalian AM, Lowdell MW, O`Neill E.
Regarding isolation of endothelial cells and their progenitor cells from human peripheral blood.
J. Vasc. Surg., 2002; 35:827.

U Urbich C, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S.
Double-edged role of statins in angiogenesis signaling.
Circ. Res., 2002; 90:737-744.

Urbich C, Dimmeler S.
Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology.
Circ. Res. 2004; 95:343-35.

Urbich C, Aicher A, Heeschen C, Dernbach E, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S.
Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells.
J. Mol. Cell. Cardiol. 2005; 39:733 – 752.

V Vajkoczy P, Blum S, Lamparter M, Mailhammer R, Erber R, Engelhardt B, Vestweber D, Hatzopoulos AK.
Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis.
J. Exp. Med., 2003; 197:1755-1765.

Van Royen N, Schirmer SH, Atasever B, Behrens CY, Ubbink D, Buschmann EE, Voskuil M, Bot P, Hoefler I, Schlingemann RO, Biemond BJ, Tijssen JG, Bode C, Schaper W, Oskam J, Legemate DA, Piek JJ, Buschmann I.
START Trial: a pilot study on stimulation of arteriogenesis using subcutaneous application of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as a new treatment for peripheral vascular disease.
Circulation. 2005; 112: 1040–6.

Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbrich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S.

Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease.

Circ Res., 2001; 89:e1-e7.

W Wei J, Blum S, Lamparter M, Mailhammer R, Erber R, Engelhardt B, Vestweber D, Hatzopoulos A K.

Embryonic endothelial progenitor cells armed with a suicide gene target hypoxic lung metastases after intravenous delivery.

Cancer Cell 2003; 5:477-488.

Witzenbichler B, Asahara T, Murohara T, Silver M, Spyridopoulos I, Magner M, Principe N, Kearney M, Hu JS, Isner JM.

Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia.

Am. J. Pathol., 1998; 153:381-394.

Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D.

Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial.

Lancet, 2004; 364:141-148.

Y Yamamoto K, Kondo T, Suzuki S, Izawa H, Kobayashi M, Emi N, Komori K, Naoe T, Takamatsu J, Murohara T.

Molecular evaluation of endothelial progenitor cells in patients with ischemic limbs: therapeutic effect by stem cell transplantation.

Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24:e192-196.

Z Ziada AMAR, Hudlicka O, Tyler KR, Wright AJA.

The effect of long-term vasodilatation on capillary growth and performance in rabbit heart and skeletal muscle.

Cardiovasc. Res., 1984; 18:724-732.

Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, Heil M, Voswinckel R, Helisch A, Schaper W.

Bone marrow-derived cells do not incorporate into adult growing vasculature.

Circ. Res., 2004; 94:230-238.

9 Abkürzungsverzeichnis

Index	Abkürzung	Erklärung
A	AcLDL Akt AMI	Acetyliertes LDL Proteinkinase B Akuter Myokardinfarkt
B	bFGF BMP	Basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor Bone morphogenic protein
C	CD CXCR	Cluster of differentiation Chemotaktischer Rezeptor
D	DiI	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'- Tetramethylindocarbocyanin Perchlorat
E	EC/ECs eEPC/eEPCs ESL	Endothelzellen/ plural Embryonale Endotheliale Progenitorzellen/ plural E-selectin Ligand
F	Flk	Fötale Leberkinase
G	GM-CSF	Granulozyten Makrophagen – Kolonie stimulierender Faktor
H	HiF-1 α HMG-CoA HPA-FITC	Hypoxia inducible factor - 1 alpha β -Hydroxy- β -methylglutaryl-Coenzym A Helix Pomatia Agglutinin - Fluorescein Isothiocyanat
I	IGF-1 i.H. IL	Insulinartiger Wachstumsfaktor Ischämischer Hinterlauf Interleukin
K	KHE	Koronare Herzerkrankung
L	LV-EF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
M	MHC-I MiF	Haupthistokompatibilitätskomplex-I Macrophage migration inhibitor factor

	MMP-9 mRNA	Matrixmetalloproteinase-9 Boten RNS (Ribonukleinsäure)
N	n. H. NK-Zellen NO	Nichtischämischer Hinterlauf Natürliche Killerzellen Stickoxid
O	Oct-4	Octamer-4
P	pAVK PCR PDGFA PTA PSGL	Periphere arterielle Verschlusskrankheit Polymerase Ketten Reaktion Platelet-derived Growth Factor A Perkutane transluminale Angioplastie P-selectin glycoprotein ligand-1
R	rFGF-2 RNS/RNA RT RT-PCR	Rekombinanter Fibroblasten Wachstumsfaktor 2 Ribonukleinsäure/ Ribonucleinacid Reverse Transkription Reverse Transkription- Polymerase Ketten Reaktion
S	SDF-1 SMC/SMCs SO ₂ %	Von Stromazellen abstammender Faktor Glatte Muskelzelle/ plural Sauerstoffsättigung in %
T	TGF β1 Tie-2	Transforming Growth Factor β 1 Thyrosine kinase receptor - 2
V	VE-Cadherin VEGF vWF	Vascular endothelial cadherin Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor Von Willebrandfaktor
W	wnt	Wingless Int-1 (Signaltransduktionsweg)

10 Publikation

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Teilen in folgender Publikation veröffentlicht worden:

Christian Kupatt, Jan Horstkotte, Georgios A. Vlastos, Achim Pfosser, Corinna Lebherz, Matthias Semisch, Mark Thalgott, Kerstin Büttner, Christian Browarzyk, Jörg Mages, Reinhard Hoffmann, Alexander Deten, Mathias Lamparter, Fabian Müller, Heike Beck, Hildegard Büning, Peter Boekstegers, Antonis K. Hatzopoulos.

Embryonic endothelial progenitor cells expressing a broad range of proangiogenic and remodeling factors enhance vascularization and tissue recovery in acute and chronic Ischemia.

The FASEB Journal 2005; 19 :1576-1578

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben:

Herrn Professor Dr. Christian Kupatt für die Überlassung dieses interessanten und anspruchsvollen Dissertationsthemas sowie die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung.

Herrn Dr. Achim Pfosser für die gute Einarbeitung und Anleitung in die operativen Fertigkeiten dieser experimentellen Dissertation.

Ein spezieller Dank gilt auch den externen Partnern Dr. Antonis Hatzopoulos für die Überlassung der eEPCs und Prof. Hoffmann für die Genanalysen. Ohne ihre Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe wäre diese Dissertation nicht zustande gekommen.

Frau Susanne Helbig und Elisabeth Ronft danke ich sehr für ihre große Unterstützung und Hilfe während der Laborarbeiten.

Meiner Familie und meinen Freunden, die mich stets unterstützt und bei Schwierigkeiten moralisch wieder aufgebaut haben.

12 Anhang

12.1 Anhang A – Gen Primer

Bmp6	5'-ACTACAACGGCAGTGAGTTAAAAAC-3', 5'-CTCTCACGACCATATTCCTGTA CTT-3'
Ctgf	5'-AGCAGCTGGGAGAACTGTGTA-3', 5'-GCAGAAGGTATTGTCATTGGTAACT-3'
Dkk3	5'-CGGCTCGGGGGTATTTTGTCTGTG-3', 5'-CGTGCTGGTCTCATTGTGATAGTTGGG-3'
Fgf2	5'-TGCCAACCGGTACCTTGCTATGA-3', 5'-AGGTCCCGTTTTGGATCCGAGTT-3'
Fst	5'-ATAAGACAGAACTGAGCAAGGAAGA-3', 5'-TCCCTACAAGTCTTTTTACATTTGC-3'
Ihh	5'-CCATCACTCAGAGGAGTCTTTACAC-3', 5'-CAGGAAAATAAGCACATCACTGAA-3'
Kit-L	5'-GCCTCGAAGCTTGCGGCTTTTCTATTACTGCTACTGC-3', 5'- CCTCGAGCATGCAGGAGATCTGCGGGAATCCTGTGAC-3'
Mif	5'-CCATGCCTATGTTTCATCGTG-3', 5'-GAACAGCGGTGCAGGTAAGTG- 3'
Mmp2	5'-GAAGGCTGTGTTCTTCGCAGG-3', 5'- CACGACAGCATCCAGGTTATCAG-3'
PdgfA	5'-CGAGCGGCTGGCTCGAAGTCAG-3', 5'-GGCCAGATCAGGAAGTTGGCCGAT-3'
tPA	5'-GTGTGACTTACCGTGGCACCC-3', 5'-CATCGTGGAGGTCTTGGTTGCC-3'
Tfpi	5'-GGATTATGTAAAGCCAGTGAGAGAA-3', 5'- CACAGTAGAAGCACCGTATAGGAAT-3'
Tgfβ1	5'-GAGACGGAATACAGGGCTTTTCG-3', 5'-CGGGTTGTGTTGGTTGTAGAGG-3'
Timp1	5'-CCTAGAGACACACCAGAGATACCAT-3', 5'-CAGCACTATAGGTCTTTGAGAAAGC-3'
Timp2	5'-CTGTTAGGGCAGAGCTGGGAATGTGC-3',5'-ACTGGTTGGAGGGTGATTCTTAGACC-3'
Timp3	5'- CTTTGGCACTCTGGTCTACACTATT-3', 5'- GCAAGTAGTAGCAGGACTTGATCTT-3'
VegfA	5'-GGGTGCACTGGACCCTGGCT-3', 5'- GAATTCACCGCCTCGGCTTGTC-3'
Wnt7b	5'-AGTGGATCTTTTACGTGTTTCTCTG-3', 5'-CTGGTTGTAGTAGCCTTGCTTCTC-3'

12.2 Anhang B - Faktoren

Genname	Abkürzung	Exprim. Wert	Zugangsnr.
<u>Angiogenesefaktoren</u>			
angio-associated migratory protein	Aamp	3253.2	NM_146110
PDGFA associated protein 1	Pdap1	2702.5	-
vascular endothelial growth factor B	Vegfb	1996.9	NM_011697
platelet derived growth factor α	Pdgfa	826.4	NM_008808
vascular endothelial growth factor A	Vegfa	703.1	NM_009505
angiogenin	Ang	673.8	NM_007447
transforming growth factor α	Tgfa	522.3	NM_031199
angiopoietin-like 2	Angptl2	396.1	NM_011923
<u>Chemokine</u>			
chemokine-like factor super family 7	Cklfsf7	1556.3	NM_133978
chemokine-like factor super family 8	Cklfsf8	1296.1	NM_027294
chemokine-like factor super family 3	Cklfsf3	978.2	NM_024217
chemokine-like factor super family 6	Cklfsf6	781.5	NM_026036
chemokine (C-X-C motif) ligand 16	Cxcl16	487.8	NM_023158
chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Cxcl1	431.9	NM_008176
chemokine-like factor super family 5	Cklfsf5	286.2	NM_026066
chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	Cx3cl1	260.8	NM_009142
chemokine (C-C motif) ligand 24	Ccl24	251.1	NM_019577
chemokine (C-X-C motif) ligand 13	Cxcl13	249.6	NM_018866
<u>Zytokine</u>			
macrophage migration inhibitory factor	Mif	8745.1	NM_010798
interleukin 25	Il25	1644.5	NM_080837
interleukin 14	Il14	648.1	—
kit ligand	Kitl	489.2	NM_013598
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13	Tnfsf13	407.9	NM_023517
leukemia inhibitory factor	Lif	407.1	NM_008501
colony stimulating factor 1 (macrophage)	Csf1	403.7	NM_007778
interferon α family, gene 12	Ifna12	340.4	NM_177361
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12	Tnfsf12	272.7	NM_011614
interleukin 18 binding protein	Il18bp	244.8	NM_010531

Insulinfamilie

insulin-like growth factor binding protein 4	Igfbp4	3116.9	NM_010517
insulin-like growth factor 2, binding protein 1	Igf2bp1	2367.7	NM_009951
insulin-like growth factor 2, binding protein 3	Igf2bp3	1518.2	NM_023670
insulin-like growth factor binding protein 5	Igfbp5	649.5	NM_010518
insulin-like growth factor 1	Igf1	330.4	NM_010512 NM_184052

BMPs/TGF β Signalweg

folliculin	Fst	4494.9	NM_008046
bone morphogenetic protein 6	Bmp6	969.3	NM_007556
latent transforming growth factor β binding protein 3	Ltbp3	592.2	NM_008520
latent transforming growth factor β binding protein 4	Ltbp4	438.1	NM_175641
bone morphogenetic protein 2	Bmp2	379.7	NM_007553
BMP and activin membrane-bound inhibitor growth differentiation factor 9	Bambi Gdf9	370.7 329.4	NM_026505 NM_008110
folliculin-like	Fstl	318.1	NM_008047
inhibin β -A	Inhba	242.2	NM_008380
folliculin-like 3	Fstl3	237.5	NM_031380

Wnt Signalweg

connective tissue growth factor	Ctgf	6477.3	NM_010217
wingless-related MMTV integration site 11	Wnt11	1775.5	NM_009519
wingless-related MMTV integration site 7B	Wnt7b	1593.9	NM_009528
frizzled-related protein	Frzb	1428.3	NM_011356
wingless-related MMTV integration site 7A	Wnt7a	537.7	NM_009527
dickkopf homologue 3 (<i>Xenopus laevis</i>)	Dkk3	330.4	NM_015814
secreted frizzled-related sequence protein 4	Sfrp4	295.6	NM_016687
wingless-related MMTV integration site 4	Wnt4	252.4	NM_009523
secreted frizzled-related sequence protein 1	Sfrp1	263.1	NM_013834
secreted frizzled-related sequence protein 5	Sfrp5	248.8	NM_018780
wingless-type MMTV integration site 9A	Wnt9a	236.9	NM_139298

Sonstige Wachstumsfaktoren

thymosin, β 10	Tmsb10	12165.7	NM_025284
prothymosin α	Ptma	10004.1	NM_008972
thymosin, β 4, X chromosome	Tmsb4x	7172.9	NM_021278

hepatoma-derived growth factor	Hdgf	5922.8	NM_008231
Indian hedgehog Ihh	Ihh	905.6	NM_010544
Indian hedgehog	β Cgb	503.8	NM_053189
chorionic gonadotropin			
endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)	Ecgf1	429.6	NM_138302
hepatoma-derived growth factor, related protein 2	Hdgfrp2	349.7	NM_008233
neurturin	Nrtn	348.7	NM_008738
glia maturation factor, gamma	Gmfg	304.5	NM_022024
neuropeptide Y	Npy	262.4	NM_023456
fibroblast growth factor 3	Fgf3	258.4	NM_008007
glycoprotein hormone α 2	Gpha2	254.9	NM_130453
hepatoma-derived growth factor, related protein 3	Hdgfrp3	241.2	NM_013886
sonic hedgehog	Shh	237.7	NM_009170

Proteasenaktivitätsregulatoren

tissue inhibitor of metalloproteinase 2	Timp2	6447.9	NM_011594
serine protease inhibitor, Kazal type 3	Spink3	4502.2	NM_009258
plasminogen activator, tissue	Plat	3494.9	NM_008872
α disintegrin and metalloprotease domain 10	Adam10	3042.1	NM_007399
serine protease inhibitor, Kunitz type 2	Spint2	2930.7	NM_011464
tissue factor pathway inhibitor	Tfpi	2368.1	NM_011576
tissue inhibitor of metalloproteinase 1	Timp1	2071.5	NM_011593
tissue inhibitor of metalloproteinase 3	Timp3	1074.2	NM_011595
bone morphogenetic protein 1	Bmp1	759.9	NM_009755
serine protease inhibitor, Kunitz type 1	Spint1	715.9	NM_016907
α disintegrin-like and metalloprotease motif 15	Adamts15	597.9	—
matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	Mmp14	416.1	NM_008608
α disintegrin-like and metalloprotease motif 9	Adamts9	385.6	—
matrix metalloproteinase 24	Mmp24	333.5	NM_010808
matrix metalloproteinase 15	Mmp15	234.5	NM_008609
matrix metalloproteinase 2	Mmp2	172.5	NM_008610