

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik I – Campus Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Professor Dr. med. Steffen Massberg

**Angiogenese in chronischer Ischämie
durch Rekrutierung vaskulärer Progenitorzellen
mittels des künstlichen Adhäsionsmoleküls SDF-1-Fractalkine-GPI**

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

vorgelegt von
Georg Maximilian Stachel
aus Saarbrücken

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter Prof. Dr. med. Christian Kupatt

Mitberichterstatter Prof. Dr. med. Marc Dellian
Priv.-Doz. Dr. med. Martin Eichhorn

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter

Dekan Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser FACR FRCR

Tag der mündlichen Prüfung 13.12.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Klinischer Hintergrund.....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Konventionelle Therapie	1
1.2	Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese	1
1.2.1	Vaskulogenese.....	1
1.2.2	Angiogenese	1
1.2.3	Arteriogenese	2
1.3	Neue Therapiestrategien.....	3
1.3.1	Allgemeines	3
1.3.2	Wachstumsfaktoren	3
1.3.3	Gentherapie.....	4
1.3.4	Applikation autologer Zellen	4
1.3.5	Mobilisierung von Zellen	5
1.4	Das künstliche Adhäsionsmolekül SDF-1-Fractalkine-GPI	7
1.4.1	Hintergrund	7
1.4.2	Mechanismen der Zellrekrutierung.....	8
1.4.3	Aufbau des künstlichen Adhäsionsmoleküls	9
1.4.4	Bisherige Ergebnisse.....	11
1.5	Hypothese und Zielsetzung	11
2	Material und Methoden.....	12
2.1	Plasmide	12
2.1.1	SDF-1-Fractalkine-GPI (S1FG)	12
2.1.2	Fractalkine	12
2.1.3	Amplifikation der Plasmide	12

2.2	Transfektion.....	14
2.2.1	Kationische Lipide.....	14
2.2.2	Adeno-assoziierte Viren	15
2.3	Verwendete Zellen	16
2.3.1	Embryonale Endothel-Progenitor-Zellen (eEPCs).....	16
2.3.2	Humane Mikrovaskuläre Endothelzellen (HMVECs)	17
2.3.3	Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVECs)	17
2.3.4	THP-1-Zellen	18
2.3.5	Polymorphkernige Leukozyten (PMN)	18
2.4	Adhäsion unter statischen Bedingungen.....	19
2.5	Adhäsion unter dynamischen Bedingungen.....	19
2.5.1	Vorbereitung	19
2.5.2	Versuchsdurchführung	20
2.5.3	Auswertung	21
2.6	Kaninchenmodell der chronischen Hinterlaufischämie (Kurzzeitversuche).....	22
2.6.1	Versuchstiere.....	22
2.6.2	Überblick.....	22
2.6.3	Induktion der Ischämie.....	23
2.6.4	Behandlung.....	25
2.6.5	Histologie.....	26
2.7	Kaninchenmodell der chronischen Hinterlaufischämie (Langzeitversuche).....	27
2.7.1	Überblick.....	27
2.7.2	Induktion der Ischämie	27
2.7.3	Baseline-Messung und Behandlung	28
2.7.4	Versuchsende	30
2.7.5	Histologie.....	30
2.7.6	Kollateralenwachstum.....	31
2.7.7	Messung der Flussgeschwindigkeit (Cinedensitometrie).....	31

2.7.8	Mikrosphärenaufbereitung	31
2.8	Statistische Auswertung	34
3	Ergebnisse.....	35
3.1	PMN-Adhäsion <i>in vitro</i>	35
3.2	Adhäsion unter Schubspannung.....	36
3.3	SDF-1-Expression <i>in vivo</i>	39
3.4	Monozytenadhäsion im Ischämiegebiet	40
3.5	Funktioneller Effekt von S1FG und AMD3100.....	41
3.5.1	Allgemeines	41
3.5.2	Kapillarwachstum	41
3.5.3	Kollateralenwachstum.....	43
3.5.4	Perfusion.....	45
3.6	Funktioneller Effekt einer Peptidase-resistenten S1FG-Variante	48
3.6.1	Allgemeines	48
3.6.2	Kapillarwachstum	48
3.6.3	Kollateralenwachstum.....	49
3.6.4	Perfusion.....	51
4	Diskussion.....	52
4.1	S1FG-vermittelte Adhäsion <i>in vitro</i>	52
4.2	Das Kaninchenmodell der chronischen Hinterlaufischämie.....	53
4.3	Funktioneller Effekt von S1FG und AMD3100.....	54
4.4	Mobilisierung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark	56
4.5	Das künstliche Adhäsionsmolekül SDF-1-Fractalkine-GPI	57
4.6	Offene Fragen.....	60
4.7	Ausblick und klinische Perspektive.....	62
5	Zusammenfassung.....	64
6	Abkürzungsverzeichnis	66
7	Literaturverzeichnis.....	69

8	Danksagung	86
9	Lebenslauf	87
10	Anhang.....	88
10.1	Sequenz des SDF-1-Fractalkine-GPI-Konstrukts	88
10.2	Primer	88

1 Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund

1.1.1 Epidemiologie

Die periphere arterielle Verschlusskrankheit ist eine häufige Erkrankung mit ernster Prognose. So wird die Prävalenz in Deutschland mit etwa 6% der Erwachsenen angegeben (Kroger *et al.*, 2006), bei Patienten über 70 Jahre sogar mit fast 20% (Espinola-Klein *et al.*, 2008). Dabei beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate für diese Patienten nur 75%, wobei Todesursache fast immer ein kardiovaskuläres oder zerebrovaskuläres Ereignis ist. Folge der paVK ist eine chronische Ischämie der betroffenen Extremitätenmuskulatur. Bei Vorliegen von Ruheschmerzen oder Ulzerationen beträgt die Wahrscheinlichkeit für eine Amputation innerhalb eines Jahres 30% (Espinola-Klein, 2011).

1.1.2 Konventionelle Therapie

Klassische therapeutische Ansätze umfassen interventionelle Methoden (Dattilo *et al.*, 2011) und die operative Anlage von Bypässen (Moxey *et al.*, 2011). Medikamentöse Therapien haben sich als nicht dauerhaft erfolgreich erwiesen (Hiatt, 2001). Neben einer nicht unerheblichen perioperativen Morbidität und Mortalität (Moxey *et al.*, 2011) bei Gefäßoperationen gibt es zudem zahlreiche „No-option“-Patienten mit schlechter Lebensqualität, bei denen es nicht möglich ist, mittels konventioneller Methoden die Gliedmaßen zu erhalten (Sprengers *et al.*, 2010). Daher ist die Entwicklung neuer Therapieansätze dringend notwendig, wobei die gezielte Förderung körpereigener Mechanismen des Gefäßwachstums, namentlich der Arteriogenese und der Angiogenese, in den Mittelpunkt des Interesses gerückt ist.

1.2 Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese

1.2.1 Vaskulogenese

Die *de novo* Bildung von Gefäßen wird als Vaskulogenese bezeichnet und findet während der Embryonalentwicklung statt. Dabei bilden endotheliale Progenitorzellen oder Angioblasten aus dem lateralen Mesoderm ein primitives Netzwerk aus, aus dem dann die Blutgefäße entstehen (Swift *et al.*, 2009). Ob Vaskulogenese auch im adulten Organismus möglich ist, wird kontrovers diskutiert (Lasala *et al.*, 2011) (s. Abb. 1: a)).

1.2.2 Angiogenese

Obwohl der Begriff „Angiogenese“ häufig als Sammelbegriff für alle Formen des postnatalen Gefäßwachstums verwendet wird, beschreibt er im engeren Sinne einzig das Aussprossen von

Gefäßen aus anderen, bereits bestehenden Gefäßen(Potente *et al.*, 2011). Triebfeder der Angiogenese ist die Gewebshypoxie(Heil *et al.*, 2007). Am Anfang steht die NO-vermittelte Vasodilatation und die VEGF-vermittelte Steigerung der Gefäßpermeabilität(Carmeliet, 2000). Proangiogene Signale führen auch zur Induktion neuer Phänotypen in lokalen Endothelzellen. Einzelne Zellen werden zu „tip cells“, bilden Fortsätze aus, degradieren die lokale extrazelluläre Matrix und geben die Richtung der Gefäßbildung vor. Hinter den „tip cells“ an der Spitze unterstützen „stalk cells“ die Aussprossung und bilden ein Gefäßlumen(Potente *et al.*, 2011). Nach der Aussprossung kommt es zur Gefäßreifung durch Rekrutierung unter anderem von Perizyten(Kupatt *et al.*, 2010) und SMCs(Carmeliet, 2000). Eine zentrale Rolle bei der Regulation dieser Vorgänge kommt dabei dem Notch-Signalweg zu(Phng *et al.*, 2009). Ein weiterer bedeutender Faktor zur Initiation und Regulation der Aussprossung ist VEGF (Eilken *et al.*, 2010). Als Quelle für die angiogenen Signale können endotheliale Progenitorzellen dienen(Rajantie *et al.*, 2004, Ziegelhoeffer *et al.*, 2004), welche durch Chemotaxis entlang eines SDF-1-Gradienten in das Ischämiegebiet rekrutiert werden(Segers *et al.*, 2011, Stellos *et al.*, 2007) (s. Abb. 1: b)).

1.2.3 Arteriogenese

Demgegenüber wird die Verstärkung und Vergrößerung bestehender Gefäße zu Kollateralarterien als Arteriogenese bezeichnet. Im Gegensatz zur Angiogenese ist dieser Vorgang nicht primär von Hypoxie abhängig, sondern hauptsächlich von Veränderungen der Schubspannung(Heil *et al.*, 2007). Da die Schubspannung am arteriellen Endothel mit der Flussgeschwindigkeit im Gefäß korreliert(Heide *et al.*, 2009), führt ein Gefäßverschluss zu einer Änderung der Schubspannung in korrespondierenden Gefäße(Heil *et al.*, 2007). Veränderungen der Schubspannung führen dabei zur Sekretion von NO und zu gesteigerter Expression zahlreicher Adhäsionsmoleküle und chemoattraktiver Stoffe(Lee *et al.*, 2004), darunter MCP-1(Ito *et al.*, 1997). Es kommt zur Rekrutierung von mononukleären Zellen(Schaper, 2009) und Lymphozyten(Hellingman *et al.*, 2011) in die Gefäßwand, welche Proteasen sezernieren, die die extrazelluläre Matrix auflösen. Die Zellen produzieren ebenso NO über iNOS. Vaskuläre SMCs ändern durch von mononukleären Zellen sezernierte Wachstumsfaktoren ihren Phänotyp und proliferieren, mit der Folge einer Zunahme des Gefäßdurchmessers und der möglichen Flussmenge führt. Man geht davon aus, dass Angiogenese nicht allein, sondern nur in Kombination mit Arteriogenese proximal des Ischämiegebietes zu einer klinisch relevanten Steigerung des Blutflusses im Ischämiegebiet führen kann(Schaper, 2009) (s. Abb. 1: c)).

In chronischer Ischämie scheinen die Mechanismen der Angiogenese und Arteriogenese durch Störungen der Endothelfunktion mit verringerter NO-Synthese(Aicher *et al.*, 2003, Schachinger *et al.*,

2000) und Störungen der Rekrutierung der Angiogenese und Arteriogenese vermittelnden Zellen(Heeschen *et al.*, 2004, Kissel *et al.*, 2007) erheblich beeinträchtigt zu sein.

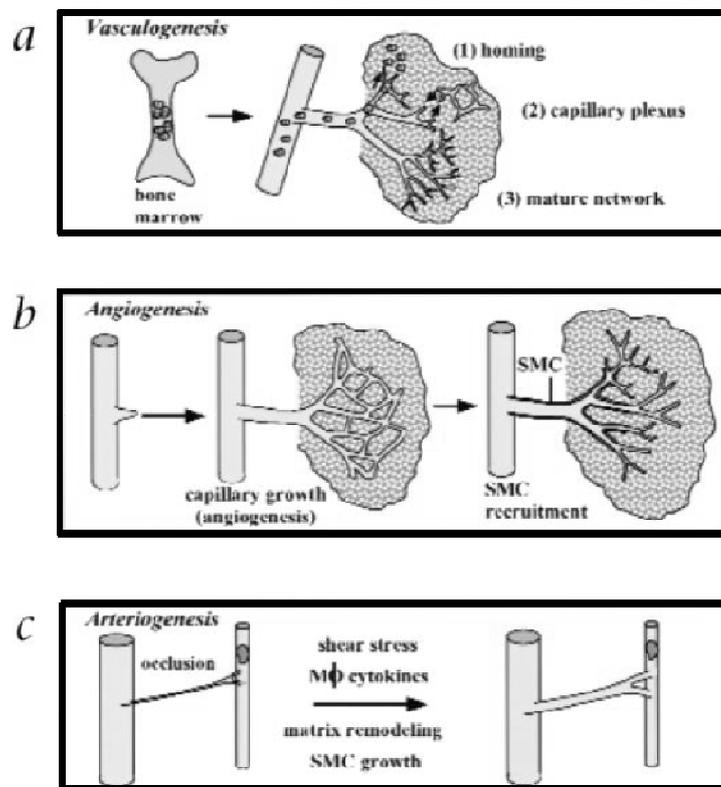


Abb. 1: Unterschiedliche Arten der Gefäßneubildung: a) Vaskulogenese, b) Angiogenese, c) Arteriogenese. (Aus (Carmeliet, 2000))

1.3 Neue Therapiestrategien

1.3.1 Allgemeines

Es wird ein erheblicher Forschungsaufwand betrieben um bei Patienten, bei denen eine konventionelle Therapie nicht erfolgreich ist, eine Revaskularisierung mittels Steigerung des Gefäßwachstums zu erreichen.

1.3.2 Wachstumsfaktoren

Am Anfang dieser Bemühungen stand die Therapie mit Wachstumsfaktoren(Folkman, 1971). Obwohl beispielsweise für MCP-1(Ito *et al.*, 1997), FGF-2(Leberherz *et al.*, 2003) oder VEGF(Zachary *et al.*, 2000) im Tiermodell durchaus vielversprechende Ergebnisse erzielt werden konnten, konnte in größeren klinischen Studien zur Applikation von beispielsweise FGF-2(Simons *et al.*, 2002) oder VEGF(Henry *et al.*, 2003) als Protein in myokardialer Ischämie kein therapeutischer Nutzen festgestellt werden.

1.3.3 Gentherapie

Um die lokale Konzentration und die Einwirkungsdauer von VEGF zu erhöhen, wurde als nächstes Gentransfer entweder mittels nackter Plasmide(Kusumanto *et al.*, 2006) oder viraler Vektoren wie Adenoviren(Makinen *et al.*, 2002, Rajagopalan *et al.*, 2003) oder AAVs(Hinkel *et al.*, 2011) versucht. Die Verwendung viraler Vektoren erwies sich dabei als erfolgreicher, wobei mit immunologischen Nebenwirkungen und einer schlechten Steuerbarkeit der Expression gerechnet werden muss(Hinkel *et al.*, 2011). Ein weiterer Ansatz ist die Transfektion von Thymosin β_4 , einem Wachstums- und Überlebensfaktor mit pleiotropem Effekt(Hinkel *et al.*, 2010). Neben guten Ergebnissen in einem Schweinemodell der myokardialen Ischämie(Hinkel *et al.*, 2008) scheint eine AAV-vermittelte Applikation auch in chronischer peripherer Ischämie im Kaninchenmodell sehr vielversprechend (Trenkwalder T., Hinkel R. et al., unpublizierte Befunde).

1.3.4 Applikation autologer Zellen

Da Angiogenese und Arteriogenese zu einem großen Teil von aus rekrutierten Zellen sezernierten, parakrinen Faktoren reguliert werden(Carmeliet, 2000), stellt die gezielte Applikation oder Mobilisierung verschiedener Zelltypen ebenso ein erfolgversprechendes Konzept dar.

Die am häufigsten verwendeten autologe Zellen sind mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark. Die Zellen werden in der Regel über Dichtegradientenzentrifugation aus chirurgisch akquiriertem Knochenmark gewonnen und üblicherweise über CD34-Expression(Durdu *et al.*, 2006, Motukuru *et al.*, 2008) oder auch acLDL-Aufnahme und Lectin-Anfärbbarkeit(Idei *et al.*, 2011) definiert. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass diese Zellen in ischämische Gebiete einwandern, und dort zahlreiche Angiogenesefaktoren wie FGF, VEGF und Angiopoetin-1, sowie Zytokine wie TNF- α oder IL-1 β sezernieren(Tateishi-Yuyama *et al.*, 2002). Dies führt zu einer Steigerung von Kollateralisierung und Kapillarwachstum(Shintani *et al.*, 2001, Tateishi-Yuyama *et al.*, 2002). Zahlreiche kleinere klinische Studien konnten einen positiven Effekt feststellen(Lasala *et al.*, 2011), in einigen Fällen waren Knochenmarks-MNCs auch signifikant besser als MNCs aus dem peripheren Blut(Tateishi-Yuyama *et al.*, 2002).

Ebenso wurde die Verwendung von aus dem peripheren Blut gewonnenen mononukleären Zellen untersucht. Dazu werden Zellen zunächst aus dem Knochenmark in das periphere Blut mobilisiert, üblicherweise mittels G-CSF, und mittels in der Hämatologie etablierter Verfahren aus dem peripheren Blut isoliert(Ishida *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2006, Zhou *et al.*, 2007). Die aufgereinigten Zellen werden dann lokal appliziert. In präklinischen(Li *et al.*, 2006, Zhou *et al.*, 2007) sowie kleinen, nichtrandomisierten klinischen Studien(Ishida *et al.*, 2005) konnte ein moderater Effekt festgestellt werden, der auf die CD34⁺-Zellen zurückgeführt wurde(Li *et al.*, 2006). Den CD34⁻-Zellen kommt

allerdings eine unterstützende Rolle zu (Tateishi-Yuyama *et al.*, 2002). Der Wirkungsmechanismus scheint ähnlich dem der BM-MNCs zu sein (Zhou *et al.*, 2007).

Die Menge sowie der genaue Applikationsweg wird noch kontrovers diskutiert (Lasala *et al.*, 2011).

1.3.5 Mobilisierung von Zellen

1.3.5.1 Hintergrund

Da proangiogenetisch und proarteriogenetisch wirksame Zellen auch physiologischerweise in das Ischämiegebiet rekrutiert werden (Asahara *et al.*, 1999, Kawamoto *et al.*, 2001, Zhou *et al.*, 2007), wird ebenso versucht, durch Mobilisierung von Zellen aus dem Knochenmark eine ausreichend gute Verfügbarkeit von z.B. CD34⁺-Zellen zu schaffen und so lokal ähnliche Zellmengen zu erreichen wie bei der exogenen Applikation.

1.3.5.2 Häufig verwendete Substanzen

Meistens wird das in der Hämatologie als Goldstandard angesehene (Broxmeyer *et al.*, 2005) G-CSF verwendet, das im Tiermodell zu relativ guten Ergebnissen führte (Capoccia *et al.*, 2006). In klinischen Studien zur Therapie der myokardialen Ischämie zeigte sich meist keine bis nur geringe Effekte (Kuethe *et al.*, 2005, Ripa *et al.*, 2006). Daher wurde versucht, G-CSF mit anderen Konzepten zu kombinieren, um den therapeutischen Effekt zu steigern. Ein Ansatz besteht beispielsweise darin, gleichzeitig den Abbau des für die Zellrekrutierung bedeutenden Chemokins SDF-1 (Liehn *et al.*, 2011) zu hemmen, beispielsweise über Sitagliptin (Theiss *et al.*, 2010) oder PTH (Huber *et al.*, 2010).

1.3.5.3 AMD3100

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Mobilisierung knochenmarksständiger Progenitorzellen AMD3100 (Plerixafor®) verwendet. AMD3100 ist ein sogenannter „small-molecule“-CXCR4-Antagonist. Er wurde ursprünglich für die HIV-Therapie entwickelt, da CXCR4 als Corezeptor einiger Stämme dient, und sollte das Eindringen der Viren in die Zellen verhindern (De Clercq, 2003, Dipersio *et al.*, 2009).

Strukturell ist AMD3100 ein Bicyclam mit einem Molekulargewicht von 502,8 g/mol (s. Abb. 2:), welches spezifisch an den CXCR4-Rezeptor bindet und die Aktivierung des Rezeptors sowie die Bindung anderer Liganden verhindert (De Clercq, 2003). In höheren Konzentrationen scheint AMD3100 jedoch einen schwach agonistischen Effekt zu haben (Zhang *et al.*, 2002).

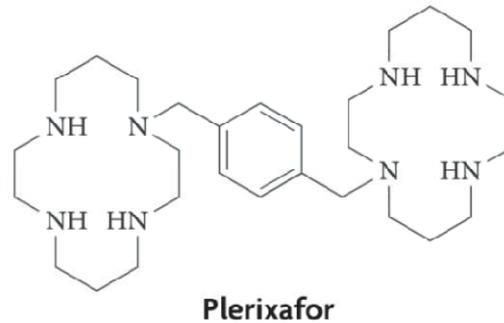


Abb. 2: Struktur von AMD3100/Plerixafor® (aus (Dipersio *et al.*, 2009))

Der Stoff erwies sich als für die HIV-Therapie ungeeignet (Hendrix *et al.*, 2004), es wurde jedoch festgestellt, dass er eine moderate Leukozytose hervorruft, und dosisabhängig CD34⁺-Zellen mobilisiert (Liles *et al.*, 2003). Die Plasmahalbwertszeit von AMD3100 beträgt nur etwa 30 Minuten (De Clercq, 2003), während die Zellmobilisierung binnen 6 Stunden beginnt und etwa 12-15 h anhält (De Clercq, 2003, Liles *et al.*, 2003) (s. Abb. 3:).

Durch AMD3100 mobilisierte Zellen unterscheiden sich dabei von Zellen, die z.B. von G-CSF mobilisiert worden sind: Es zeigen sich deutliche Unterschiede in den von den mobilisierten Zellen verstärkt exprimierten Genen. Bei AMD3100-mobilisierten Zellen ist vor allem CXCR4 stärker exprimiert. Eine ebenso deutlich gesteigerte FLT3-Expression wird als Hinweis auf Mobilisierung primitiverer Zellen durch AMD3100 interpretiert. Unter den KEGG-Pathways mit den am meisten hochregulierten Genen sind bei AMD3100-Mobilisierung „Cell adhesion molecules“ und „Leukocyte transendothelial migration“ (Donahue *et al.*, 2009). Die Migrationsantwort auf SDF-1 ist gesteigert (Broxmeyer *et al.*, 2005), und es konnte gezeigt werden, dass G-CSF verstärkt HSPCs aus dem Knochenmark mobilisiert, während bei AMD3100-Applikation verstärkt EPCs mobilisiert werden (Pitchford *et al.*, 2009).

Im Tiermodell wurden bereits etliche Studien zur Induktion therapeutischer Angiogenese bei peripherer Ischämie durchgeführt, die einen durchaus positiven, wenn auch ausbaufähigen funktionellen Effekt zeigten (Capoccia *et al.*, 2006, Shepherd *et al.*, 2006, Tan *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu G-CSF wurde AMD3100 zur Therapie bei chronischer Ischämie bis jetzt noch nicht klinisch erprobt.

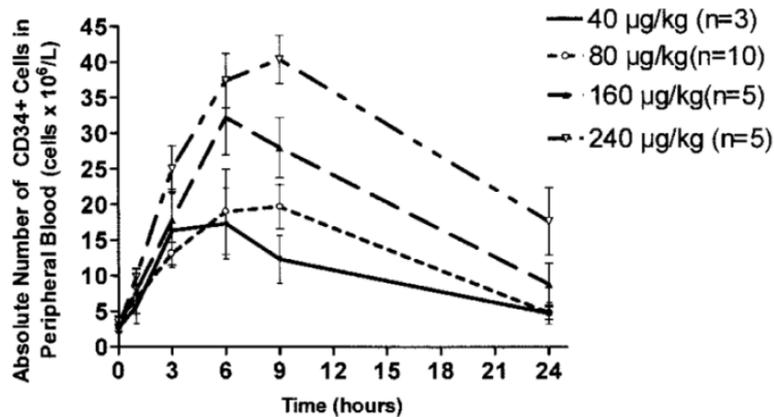


Abb. 3: Anzahl der durch AMD3100 in gesunden Probanden mobilisierten CD34⁺-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit seit s.c.-Applikation (aus (Liles *et al.*, 2003)).

1.4 Das künstliche Adhäsionsmolekül SDF-1-Fractalkine-GPI

1.4.1 Hintergrund

Zusätzlich zu den oben erwähnten Versuchen der Therapie mit autologen Zellen gab es tierexperimentelle Ansätze, die in der Embryonalperiode für die Vaskulogenese verantwortlichen Zellen zu isolieren und therapeutisch zu verwenden.

Mittels eines unter Einfluss des Thrombomodulin-Promotors stehenden lacZ-Gens gelang die Isolierung embryonaler endothelialer Progenitorzellen (eEPCs) aus Mäusen am Embryonaltag 7,5, und durch Aufreinigungsschritte die Etablierung einer entsprechenden Zelllinie. Diese Zellen sind positiv für endotheliale Marker wie tie-2, Thrombomodulin und vWF. Da sie kein MHC-I exprimieren, sind sie als immunprivilegiert anzusehen (Hatzopoulos *et al.*, 1998, Wei *et al.*, 2004). Diese Zellen differenzieren *ex vivo* zu Endothelzellen. *In vivo* werden sie in ischämische Gebiete rekrutiert und beteiligen sich an der Angiogenese (Vajkoczy *et al.*, 2003).

Unsere Arbeitsgruppe verwendete diese Zellen in einem Kaninchenmodell der chronischen Hinterlaufischämie. Dabei konnte durch Retroinfusion dieser Zellen in das Ischämiegebiet ein zufriedenstellender therapeutischer Effekt auf Angiogenese und Arteriogenese beobachtet werden (Kupatt *et al.*, 2005). Es wurde postuliert, dass der therapeutische Effekt von der Anzahl der in das Ischämiegebiet rekrutierten eEPCs abhängig ist. Da die Menge an applizierbarem Material in einem klinischen Setting häufig begrenzt ist, versuchten wir, die Rekrutierung dieser Zellen in das Ischämiegebiet zu verbessern. Eine Möglichkeit dazu war die Veränderung der eEPCs durch temporäre Induktion eines proinflammatorischen Phänotyps (Pfosser *et al.*, 2010). Ein anderer Ansatz mit dem gleichen Ziel ist die Veränderung des Zielendothels durch Einbringen eines künstlichen zusätzlichen Adhäsionsmoleküls.

1.4.2 Mechanismen der Zellrekrutierung

Die Rekrutierung von sich im Blut befindlichen Zellen über das Endothel in das umliegende Gewebe ist ein mehrstufiger Prozess, der mit einer Adhäsion der Zellen an das Endothel beginnt (s. Abb. 4:).

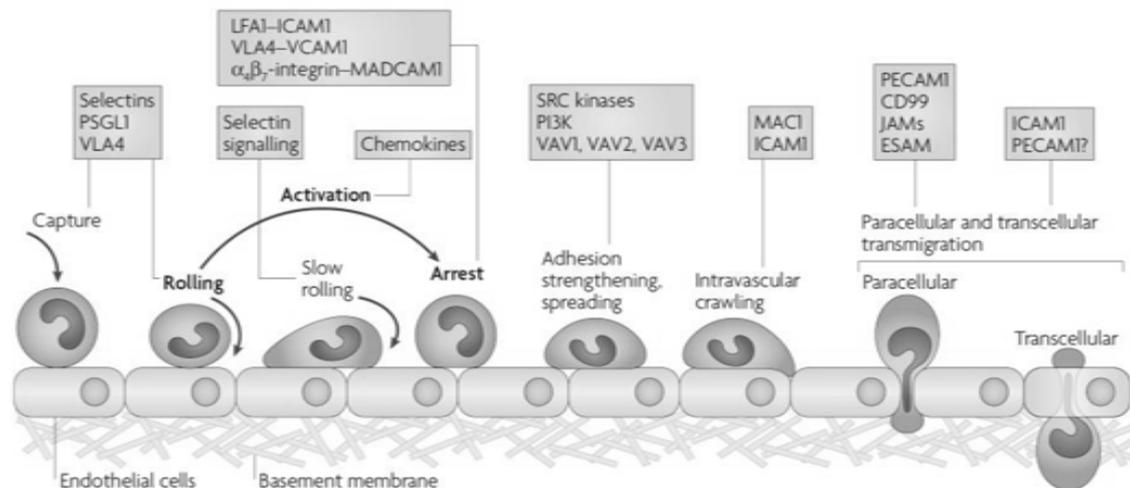


Abb. 4: Mehrstufiger Adhäsionsvorgang am Endothel. Die ursprünglich bekannten Schritte (Rollern, Aktivierung und Arrest) sind fettgedruckt, die in ihrer Signifikanz erst seit kurzem bekannten Schritte normal gedruckt (aus (Ley *et al.*, 2007))

Zunächst kommt es zu einem lockeren Kontakt der Zelle mit dem Endothel, und die Zelle beginnt über das Endothel zu rollen. Dieser Vorgang ist zum großen Teil Selektin-vermittelt, auch einige Integrine wie das VLA-4 spielen eine Rolle. Dabei bestehen Unterschiede zwischen den einzelnen Zelltypen (Ley *et al.*, 2007). Beim Rollen von Monozyten auf HUVECs *in vitro* beispielsweise spielt das auf den Monozyten exprimierte L-Selektin die Hauptrolle und P-Selektin ist in geringerem Maße beteiligt. VLA-4 und E-Selektin spielen dagegen fast keine Rolle (Luscinskas *et al.*, 1996).

Im nächsten Schritt aktivieren Chemokine, die sich unter anderem in der Glykokalix des Endothels befinden, die adhätierenden Zellen, und sorgen für die Induktion der für den Arrest benötigten Integrine, wie z.B. VLA-4 und LFA-1 auf den Leukozyten (Ley *et al.*, 2007). Auf CD34⁺-Zellen führt SDF-1 auf dem Gefäßendothel zu einer starken Erhöhung der Integrinavidität, und spielt so eine wichtige Rolle für die feste Anhaftung der zirkulierenden Zellen auf dem Endothel (Peled *et al.*, 1999).

Für die feste Adhäsion der zirkulierenden Zellen auf dem Gefäßendothel sind hauptsächlich die Integrine verantwortlich, auf Monozyten zuvorderst LFA-1 und VLA-4, die an ICAM-1 und VCAM-1 auf dem Gefäßendothel binden (Kamei *et al.*, 2010). Es folgt dann die Transmigration durch das Endothel in das perivaskuläre Gewebe (Ley *et al.*, 2007).

1.4.3 Aufbau des künstlichen Adhäsionsmoleküls

1.4.3.1 S1FG

Das Fusionsmolekül S1FG besteht aus einem SDF-1-Kopf, der Mucin-Domäne des Fractalkine als Rückgrat, sowie einem GPI-Teil zur Verankerung des Moleküls im Endothel des Ischämiegebietes (s. Abb. 5:). Die Basensequenzen wurden in ein Plasmid mit CMV-Promotor kloniert.

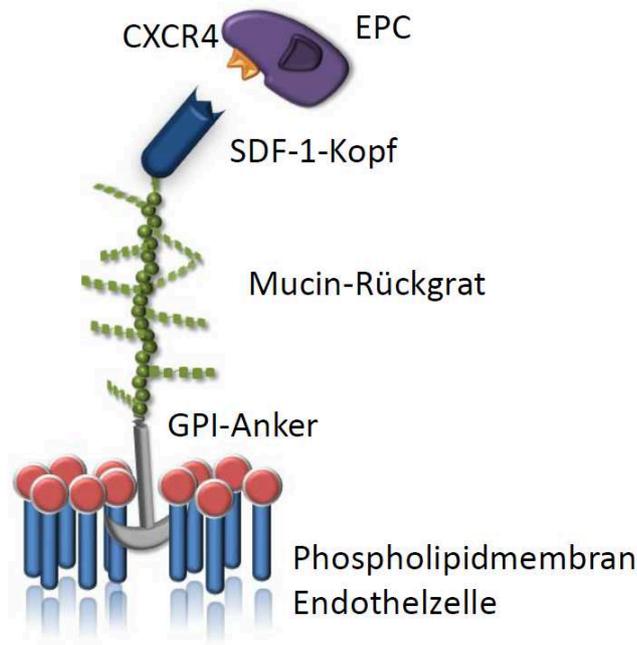


Abb. 5: Schema des S1FG-Fusionsmoleküls mit SDF-1-Kopf (dunkelblau), Fractalkine-Mucin-Rückgrat (grün) und GPI-Anker (grau) in der Membran des Endothels im Ischämiegebiet. Oben EPC (violett) mit CXCR4-Rezeptor (gelb). (Nicht maßstabsgetreu; SDF-1-Tertiärstruktur aus (Sadir *et al.*, 2001))

1.4.3.2 SDF-1

In Vorarbeiten wurden unterschiedliche Chemokine auf ihre Wirkung in der Zelladhäsion hin untersucht, wobei SDF-1/CXCL12 als rekrutierender Kopf des Moleküls herausgesucht wurde, da zahlreiche putative Effektorzellen wie CD34⁺-Zellen(Christopherson *et al.*, 2002) und monozytäre Zellen(Pucci *et al.*, 2009, Schmeisser *et al.*, 2001) den Rezeptor CXCR4 exprimieren, und es eine große Rolle bei der Adhäsion von Zellen am Endothel spielt(Peled *et al.*, 1999). Bei Ischämie wird vom Ischämiegebiet aus ein SDF-1-Gradient aufgebaut, der eine zentrale Bedeutung für das Homing von Progenitorzellen aus dem Knochenmark in das Ischämiegebiet hat(Zaruba *et al.*, 2009). Interessanterweise ist die SDF-1-CXCR4-Bindung ebenso wichtig für die Retention von Zellen im Knochenmark; eine Unterbrechung dieser Achse führt zur Mobilisierung CXCR4⁺-Zellen aus dem Knochenmark(Eash *et al.*, 2010, Eash *et al.*, 2009). SDF-1 wird hauptsächlich durch CD26/DPP-IV-vermittelte Abspaltung der N-terminalen Aminosäuren abgebaut(Zaruba *et al.*, 2009).

1.4.3.3 Fractalkine

Da der SDF-1-Kopf allein keine Zellen rekrutieren konnte, wurde ein Rückgrat zur Vermittlung biophysikalischer Stabilität benötigt. Hierfür wurde der Mucin-Teil des Fractalkine verwendet, welcher für die Festigkeit der Bindung an Fractalkine adhärerender Zellen essenziell ist (Imai *et al.*, 1997). Verwendung des kompletten Fractalkine hätte dazu geführt, dass hauptsächlich inflammatorische Zellen rekrutiert worden wären (Geissmann *et al.*, 2003). Fractalkine hat als einziges Chemokin eine Doppelfunktionalität: Es wird auf der Endothelzelloberfläche exprimiert vermittelt dort die Adhäsion von Leukozyten, nach Spaltung durch ADAM17 (Garton *et al.*, 2001) entsteht allerdings ein lösliches Fragment, welches chemotaktische Aktivität aufweist (White *et al.*, 2009) (s. Abb. 6:).

1.4.3.4 GPI

Um das künstliche Adhäsionsmolekül auf dem Endothel zu exprimieren, wurde -wie bereits mit anderen Chemokinen etabliert- ein GPI-Anker verwendet (Notohamiprodjo *et al.*, 2006).

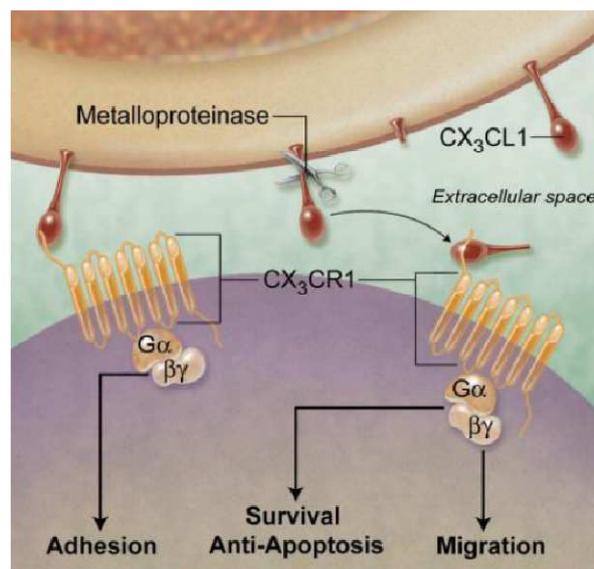


Abb. 6: Nach Spaltung durch ADAM17 wird aus dem auf der Zelloberfläche exprimierten Fractalkine (CX3CL1) ein löslicher Faktor, der Migrationsaktivität besitzt (aus (White *et al.*, 2009)).

1.4.3.5 S1FG-R

Da ein Abbau des SDF-1-Kopfes durch DPP-IV/CD26 das Adhäsionsmolekül inaktiveren würde, wurde ein weiteres Adhäsionsmolekül mit einem mutierten SDF-1 erstellt, bei dem das Serin in Position 4 durch ein Valin ersetzt wurde. Dieses als SSDF-1 bezeichnete Molekül wurde bereits eigenständig verwendet, und wies *in vitro* und *in vivo* Aktivität auf (Segers *et al.*, 2011). Das Adhäsionsmolekül SSDF-1-Fractalkine-GPI wird als S1FG-R für „resistant“ bezeichnet.

1.4.4 Bisherige Ergebnisse

In Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe wurde zunächst die korrekte Klonierung und die Expression des Adhäsionsmoleküls in U293-Zellen überprüft. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass in statischen Adhäsionsversuchen signifikant mehr eEPCs an S1FG adhären als an vergleichbaren Molekülen wie Fractalkine, SDF-1-GPI (ohne die Fractalkine-Mucin-Domäne) oder SDF-1 alleine.

Im Tiermodell der chronischen Hinterlaufischämie konnte zunächst gezeigt werden, dass in einem S1FG-transfizierten Hinterlauf signifikant mehr retroinfundierte eEPCs gefunden werden können, als in einer GFP-transfizierten Kontrolle. Die Steigerung der Adhäsion belief sich dabei auf etwa das 2,5-fache.

In 5 Wochen dauernden Langzeitversuchen im Kaninchenmodell der chronischen Hinterlaufischämie wurden funktionelle Daten erhoben. Da im klinischen Umfeld häufig die mögliche Menge an applizierbarem Material begrenzt ist, wurde eine Versuchsgruppe, die 5 Millionen eEPCs per Retroinfusion erhielt mit einer anderen Gruppe verglichen, die nur 2 Millionen eEPCs erhielt, 2 Tage vor der Zellapplikation allerdings regional mit S1FG transfiziert worden war. Durch Verwendung einer um den Faktor 2,5 geringeren Zellmenge sollte in Kombination mit der Vorbehandlung des ischämischen Endothels die gleiche Menge an letztlich im Ischämiegebiet wirkenden Zellen erreicht werden. Es zeigte sich, dass in Bezug auf die Kapillardichte bei beiden Gruppen ein gleich starkes Wachstum beobachtet wurde, während es bei Kollateralenwachstum und Perfusion zu einer weiteren signifikanten Steigerung der Werte in der mit S1FG vorbehandelten Gruppe kam (F. Götz, unpublizierte Befunde).

1.5 Hypothese und Zielsetzung

Wir stellten daher die Hypothese auf, dass S1FG in der Lage ist, endogene Zellen zu rekrutieren, die therapeutische Angiogenese und Arteriogenese ermöglichen. Da die klinische Anwendung exogener Zellen mit vielen Nachteilen behaftet ist, prüften wir zusätzlich, ob die exogene Applikation von Progenitorzellen durch die Mobilisierung endogener Zellen aus dem Knochenmark mittels AMD3100 ersetzt werden kann. Wir postulierten, dass mit der Kombination aus S1FG-Vorbehandlung des lokalen Endothels und AMD3100-vermittelter Progenitorzellmobilisierung eine signifikante Steigerung von Kollateralenwachstum und Perfusion zu erreichen ist.

Weiterhin waren die genauen Rekrutierungsmechanismen des S1FG zu überprüfen. Die Frage, ob die S1FG-vermittelte Rekrutierung eher durch eine Steigerung des Zellrollens auf dem Endothel oder durch eine Steigerung des Zellarrests vermittelt wird, wurde mit geeigneten *in vitro*-Assays analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Plasmide

2.1.1 SDF-1-Fractalkine-GPI (S1FG)

Das für das künstliche Adhäsionsmolekül S1FG codierende Fusionsplasmid wurde in Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe kloniert. Die dazu verwendeten Bestandteile wurden teilweise von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Peter Nelson (Medizinische Poliklinik Innenstadt, Klinikum der Universität München) zur Verfügung gestellt (ein Fusionsplasmid codierend für IL-8, die Mucindomäne des Fractalkine und einen GPI-Anker) und teilweise von kommerziellen Anbietern erworben (für humanes SDF-1 α codierendes Plasmid von RZPD, imaGenes GmbH, Berlin, Deutschland).

Das fertige Fusionsplasmid aus Sequenzen für SDF-1, der Fractalkine-Mucin-Domäne und dem GPI-Anker enthielt ein Kanamycin-Resistenzgen und einen CMV-Promotor. Es befand sich in einem pAAV 2.1 CMV eGFP3 Expressionsvektor und wurde vor der Verwendung durch einen kommerziellen Anbieter (MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) sequenziert (Sequenz s. Anhang).

In der Arbeitsgruppe von PD Dr. Nelson wurde ein ähnliches Fusionsplasmid hergestellt, welches zusätzlich noch eGFP als Reportergen enthielt. Dieses Plasmid wurde zu Nachweiszwecken verwendet.

Ebenfalls aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. Nelson stammt ein SDF-1-Fractalkine-GPI-Konstrukt, bei welchem die DPP-IV-Schnittstelle und die MMP-2-Schnittstelle des SDF-1 fehlt, und das als Peptidase-resistentes S1FG oder S1FG-R bezeichnet wird. Dieses Konstrukt enthielt zusätzlich noch eine myc-Sequenz und befand sich in einem pIRES-Expressionsvektor.

2.1.2 Fractalkine

Ein für Wildtyp-Fractalkine codierendes Plasmid wurde in *in vitro*-Adhäsionsexperimenten verwendet. Das Plasmid wurde von Christian Schulze aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Massberg (Deutsches Herzzentrum, München) bereitgestellt.

2.1.3 Amplifikation der Plasmide

Das Plasmid wurde mittels Schock-Transformation in *E. coli* (TOP10 *E. coli*, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) transformiert. Die Bakterien wurden aus dem -80°C-Kühlschrank kommend bei Raumtemperatur aufgetaut. Danach wurden 10 μ L DNA zu 60 μ L Bakterien gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert, dann 60 Sekunden lang auf 42°C erhitzt und danach weitere 2 Minuten auf Eis behalten. Nach Beigabe von 1 ml SOC-Medium wurde die Mischung 1 Stunde auf

einem Rüttler bei 37 °C und 225 U/min inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf Kanamycin-Agar-Platten (Seakem LE Agarose, Lonza, Rockland, ME, USA) ausgebracht und 24 h bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden entnommen und unter Glycerin (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) bei -80 °C gelagert.

SOC-Medium:

Bacto-Trypton-Pepton	20 g
(Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland)	
Bacto-Hefeextrakt	5 g
(Becton-Dickinson GmbH)	
NaCl	0,5 g
(Carl Roth GmbH & Co. KG)	
Aqua bidest.	ad 950 ml

Die Mischung wurde bis zur Auflösung der Zutaten geschüttelt. Dann wurden 10 ml 0,25 M KCl-Lösung (Carl Roth GmbH & Co. KG), 104 mmol MgCl₂ und 21 mmol Glucose hinzugefügt und der pH mit 5M NaOH auf 7,0 eingestellt. Schließlich wurde das Medium autoklaviert.

Die Korrektheit der Transformation wurde mittels Restriktionsenzymverdau überprüft. Dazu wurde ein Ansatz aus 1 µl zu untersuchender DNA, 1 µl Restriktionsenzym (xba oder bamH1), 2 µl des zum Enzym gehörenden Puffers und 16 µl Wasser (alle Zutaten invitrogen GmbH) hergestellt. Dieser Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 10 µl des Ansatzes mit 2 µl Loading Buffer (invitrogen GmbH) vermischt und auf ein Agarosegel (1% oder 2%) aufgetragen. Nach Durchführung der Gelelektrophorese wurde das Gel unter einer UV-Lampe betrachtet und das Bandenmuster mit dem nach der Plasmidkarte zu erwartenden Muster verglichen.

Zur Amplifikation wurde mit einer sterilen Plastik-Impföse etwas Flüssigkeit entnommen und in einen Erlenmeyer-Kolben mit LB-Medium, dem resistenzgemäß Antibiotika (Kanamycin oder Ampicillin, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) beigefügt waren, eingebracht. Die Bakterien konnten dann im Erlenmeyer-Kolben 24 h im Rüttler bei 37°C und 225 U/min wachsen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Inhalt des Erlenmeyer-Kolbens in Polyäthylen-Gefäße (500 ml) gefüllt und bei 4°C für 20 Minuten mit 6000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und mit dem verbleibenden Zellpellet die Plasmidpräparation durchgeführt. Dazu wurden Maxi- und Mega-Präp-Kits der Firma Macherey-Nagel (Nucleobond Ax 2000 und Nucleobond PC 2000 EF, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) verwendet. Das Verfahren wurde gemäß den Anweisungen

des Herstellers durchgeführt. Nach Fällung und Waschen der DNA wurde sie in Endotoxin-freiem Wasser resuspendiert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

LB-Medium:

Bacto-Trypton	10 g
(Becton-Dickinson GmbH)	
Bacto-Hefeextrakt	5 g
(Becton-Dickinson GmbH)	
NaCl	10 g
(Carl Roth GmbH & Co. KG)	
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Die Mischung wurde bis zur Auflösung der Zutaten geschüttelt. Dann wurde der pH mit 5M NaOH auf 7,0 eingestellt und das Medium autoklaviert

Die Bestimmung der präparierten Plasmidmenge erfolgte durch Absorptionsmessungen. Dazu wurden 10 µl der resuspendierten DNA in 990 µl Aqua dest. verdünnt und in eine Messküvette gegeben. Die Messung der Absorption (Photometer: Ultrospec plus, Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden) erfolgte bei 260 und 280 nm. Der Quotient $\frac{I(260\text{ nm})}{I(280\text{ nm})}$ wurde zur Bestimmung der Reinheit herangezogen und musste zwischen 1,8 und 2,2 liegen. Die Konzentration der DNA in µg/µl ergab sich aus der Multiplikation von Absorption bei 260 nm, Verdünnungsfaktor und dem konstanten Faktor 50.

2.2 Transfektion

2.2.1 Kationische Lipide

Zur *in vivo*-Transfektion wurden die Plasmide mithilfe des Effectene Transfection Reagent-Kits (Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland) gemäß der Anweisungen des Herstellers in Liposomen verpackt und retroinfundiert. 1 mg Plasmid wurde dazu in 4 ml steriler PBS-Dulbecco (Biochrom AG) aufgelöst.

Zur Transfektion der in den Adhäsionsversuchen verwendeten HMVECs wurde das Satisfaction® Transfection Reagent der Firma Agilent Technologies Deutschland GmbH (Böblingen, Deutschland) verwendet. Jeweils $2 \cdot 10^5$ Zellen wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers mit 1 µg DNA transfiziert.

2.2.2 Adeno-assoziierte Viren

Zur Transfektion der HUVECs *in vitro* musste ein adeno-assoziiertes viraler Vektor, der AAV6 verwendet werden. AAV sind nicht in der Lage, sich ohne die Hilfe von Adenoviren selbst zu replizieren (Hinkel *et al.*, 2011), und können –je nach Serotyp- Endothelzellen transfizieren (Zincarelli *et al.*, 2008).

2.2.2.1 Produktion

Zur Produktion war es nötig, das Plasmid, welches die relevanten Informationen des Helfervirus enthält, das Plasmid mit den Strukturgenen für das AAV und das Plasmid mit dem Zielgen in U293-Zellen zusammenzuführen (Khan *et al.*, 2011). Dazu wurden die U293-Zellen auf 50 250 mm-Zellkulturplatten (TPP AG, Trasadingen, Schweiz) bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert. 2 Stunden vor Transfektion wurde das Medium (DMEM + 10% FBS, Biochrom AG) gewechselt und dann die Zellen mittels der Polyethylinmethode transfiziert. Dazu wurden 1300 µg des Helferplasmids (pA ΔF6, Lot C17DEC10-A, Puresyn Inc., Malvern, PA, USA), 650 µg p600 trans-Plasmid (mit rep- und cap-Genen) sowie 650 µg cis-Plasmid (mit Zielgen, CMV-Promotor und ITRs) mit 100 ml serumfreiem DMEM (Biochrom AG) vermischt. Nach Zugabe von 5200 µl PEI (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim) und 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden auf jede Platte 2,1 ml des Gemisches aufgetragen. 4 h nach Transfektion wurden pro Platte 5 ml Medium (49,5% DMEM (Biochrom AG), 49,5% FBS (Biochrom AG), 1% PenStrep (Biochrom AG)) hinzugefügt. Nach 24 h wurde erneut ein Mediumwechsel durchgeführt. 72 h nach Transfektion wurde das Medium abgesaugt, die U293-Zellen per Zellschaber abgelöst und für 15 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde über Nacht bei -80 °C gelagert.

2.2.2.2 Aufreinigung

Das Zellpellet wurde über 10 min bei 37°C aufgetaut und in 35 ml TNM (50 mM TRIS, 1 mM MgCl₂, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) resuspendiert. Nach Sonifizierung des Zelllysates für 3x 30 s im Eiswasserbad wurde 3 µl Benzonase hinzugefügt und für 20 min bei 37 °C unter regelmäßiger Inversion inkubiert. Zur Lyse wurden 1,25 ml Desoxycholsäure (10%; Carl Roth GmbH & Co. KG) zugefügt und nach weiterer Inversion für 10 min bei 37°C und dann für 20 min bei 0°C inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, 4000 rpm, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und 0,454 g CsCl (Carl Roth GmbH & Co. KG) pro ml Überstand zugefügt. Die Aufreinigung erfolgte mittels Dichtegradientenultrazentrifugation (25000 rpm, 20 h, 15 °C, L-80 XP Ultrazentrifuge, Beckmann-Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland). Nach der Zentrifugation wurde aus jeder Fraktion 5 µl abgenommen und der Brechungsindex bestimmt. Fraktionen mit einem Brechungsindex zwischen 1,362 und 1,373 wurde vereinigt, in 70 Ti Quick-seal-Röhrchen (Beckmann-Coulter GmbH) überführt,

und diese gemäß den Anweisungen des Herstellers verschlossen. Die Suspensionen wurden erneut im passenden Rotor zentrifugiert (60000 rpm, 24h, 15 °C). Erneut wurde das Zentrifugat in einzelne Fraktionen aufgeteilt, der Brechungsindex bestimmt, und Fraktionen mit einem Brechungsindex zwischen 1,364 und 1,371 wiederum vereinigt und erneut mit den obigen Einstellungen zentrifugiert.

Zur Entfernung des Cäsiumchlorids wurden Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland). Die Filter wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers vorbereitet und das Virusgemisch bei 3000 rpm für 15 min zentrifugiert.

2.2.2.3 Quantifizierung der Viruskonzentration

Die Virusmenge wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR im Vergleich zu seriellen Verdünnung eines bekannten Standards bestimmt. Zunächst wurde mit 5 µl der fraglichen Virusmischung ein DNase-Verdau durchgeführt Dazu wurden 5 µl Viruslösung, 2 µl DNase, 5 µl DNase-Puffer und 38 µl H₂O (alle Invitrogen GmbH) 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde 1 µl 15 mM EDTA (Invitrogen GmbH) hinzugefügt und die Mischung für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Anschließend folgte die Realtime-PCR. Dazu wurde ein vorbereiteter Ansatz (FastStart TaqMan Probe Master, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland) gemäß der Anweisungen des Herstellers verwendet. Es wurden Primer für bgh verwendet, die bereits mit Farbstoff gemischt waren (MWG Biotech AG, Sequenz s. Anhang). Das PCR-Gerät (BioRad iCycler, BioRad Laboratories GmbH) wurde wie vom Hersteller empfohlen eingestellt. Die fragliche Probe wurde 1:100 und 1:1000 verdünnt und beide Verdünnungen sowie serielle Verdünnungen des Standards über 4 lg-Stufen von 1 ng bis 0,001 ng. Es wurde eine Standardkurve erstellt und so die Virenkonzentration in der fraglichen Probe abgelesen werden.

2.3 Verwendete Zellen

2.3.1 Embryonale Endothel-Progenitor-Zellen (eEPCs)

T17-eEPCs wurden von der Arbeitsgruppe von Antonis K. Hatzopoulos (Cardiovascular Research Unit, Vanderbilt University, Nashville, TN, USA) zur Verfügung gestellt (Hatzopoulos *et al.*, 1998). Die Zellen wurden in Medium (400 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium + L-Glutamin, 100 ml FBS, 5 ml non-essential amino acids, 5 ml Pen/Strep (alle Biochrom AG)) bei 37 °C kultiviert. Die Zellen wurden etwa alle 2-3 Tage gesplittet. Dazu wurde in jeder Zellkulturflasche (TPP AG) das Medium abgesaugt und 2,5 ml 5 mM EDTA hinzugegeben. Das EDTA wurde abgesaugt und erneut 2,5 ml 5 mM EDTA zum Ablösen der Zellen hinzugegeben, ca. 3 Minuten inkubiert und schließlich durch Zugabe von 5 ml Medium gestoppt. Der Inhalt der Zellkulturflasche wurde in ein 50 ml-Reagiergefäß gegeben und 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert. Das Medium wurde schließlich auf zwei Zellkulturflaschen aufgeteilt.

PBS:

NaCl	137 mmol
(Carl Roth GmbH & Co. KG)	
KCl	2,7 mmol
(Carl Roth GmbH & Co. KG)	
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	8,5 mmol
(Carl Roth GmbH & Co. KG)	
KH ₂ PO ₄	1,5 mmol
(Carl Roth GmbH & Co. KG)	
Aqua dest.	ad 1000 ml

Nach vollständiger Lösung aller Zutaten wurde der pH mit 2M HCl (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) auf 7,3 eingestellt

2.3.2 Humane Mikrovaskuläre Endothelzellen (HMVECs)

Als Basis für die statischen Adhäsionsversuche wurden HMVECs verwendet. Die Zellen wurden in DMEM (Biochrom AG) mit Zusatz von 10% FBS (Biochrom AG) kultiviert. Die Zellen wurden ebenfalls wie unter 2.3.1 beschrieben gesplittet, jedoch wurde statt EDTA Trypsin (Biochrom AG) verwendet.

2.3.3 Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVECs)

Für die Adhäsionsversuche unter Schubspannung wurden HUVECs (gepoolt, PromoCell GmbH) als Basis verwendet. Sie wurden in den üblichen Zellkulturflaschen (TPP AG) mit HUVEC-Medium, welches vor Verwendung mindestens 30 Minuten im Inkubator äquilibriert wurde, kultiviert.

HUVEC-Medium:

Medium199	40 %
(Biochrom AG)	
FBS	9,5%
(Biochrom AG)	
PenStrep	0,5%
(Biochrom AG)	
Endothelial Cell Growth	50%
Medium mit Supplement	
(PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany)	

2.3.4 THP-1-Zellen

Für die Adhäsionsversuche wurden monozytäre THP-1-Zellen verwendet (Tsuchiya *et al.*, 1980) und in 150 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert.

THP-1-Medium:

RPMI 1640 (Biochrom AG)	93 %
FBS (Biochrom AG)	5 %
PenStrep (Biochrom AG)	1 %
Glutamin (Biochrom AG)	1 %

2.3.5 Polymorphkernige Leukozyten (PMN)

PMN wurden, wie in unserer Arbeitsgruppe bereits beschrieben (Müller-Hartmann, 2007), aus Schweineblut isoliert. Dazu wurden jeweils 10 ml Vollblut mit 1 ml 0,1M EDTA (Biochrom AG) versetzt und bei 400g und 9°C für 15 Minuten ungebremst zentrifugiert. 2 ml der weißlichen Zwischenschicht („buffy coat“) wurden abgezogen und mit 2 ml PBS und 0,1% EDTA vermischt.

Perkoll-Mischung:

Perkoll-Reagenz (Biochrom AG)	25 ml
NaCl 1,5M (Carl Roth GmbH & Co. KG)	5 ml
Aqua bidest. (Carl Roth GmbH & Co. KG)	20 ml

Auf 5 ml der Perkoll-Mischung wurde der mit PBS versetzte buffy coat aufgeschichtet und bei 400g und 9°C für 25 min ungebremst zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10 ml PBS resuspendiert und erneut für 10 min zentrifugiert. Zur Lyse der verbliebenen Erythrozyten wurde 5 ml Aqua ad injectionem (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) hinzugegeben und die

Mischung anschließend mit 5 ml NaCl-Lösung retonisiert. Sodann erfolgte ein erneuter Waschschrift, das Zellpellet wurde in PBS gelöst, die Zellen gezählt und zügig weiterverwendet.

2.4 Adhäsion unter statischen Bedingungen

Die Adhäsion von PMN auf HMVECs wurde in statischen Adhäsionsassays untersucht. Dazu wurden 48 h vor Versuchsbeginn auf einer 12-well-Mikrotiterplatte (TPP AG) $2 \cdot 10^5$ HMVECs pro Kavität ausgebracht und, wie unter 2.2.1 beschrieben 24 h vor Versuchsbeginn mit S1FG, S1FG-GFP oder wt-Fractalkine transfiziert.

Am Tag des Versuchs wurden aus Schweineblut isolierte PMNs (s. 2.3.5) in sterilem PBS in einer Thoma-Zählkammer gezählt, mit 15 μ l vybrant®-Dil (invitrogen AG) pro 10^6 Zellen für 45 min bei 37 °C inkubiert, dann 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml sterilem PBS pro 10^6 Zellen resuspendiert.

In jede Kavität wurden dann 250000 gefärbte PMNs gegeben. Die Platte wurde bei 2000 U/min für 15 min zentrifugiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Mit einem Zeiss AxioVert 100-Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Jena, Deutschland) mit 10x Okularvergrößerung und 32x (Zeiss Achrostigmat 32x/0,40 Ph1, Carl Zeiss) oder 40x (Zeiss Achroplan 40x/0,60, Carl Zeiss AG) Objektivvergrößerung wurde die Platte dann betrachtet. Zur Anregung des Dil-Farbstoffes wurde eine Quecksilberdampfampe (HBO 50AC, Carl Zeiss AG) und mit dem Filtersatz Nr. 15 (Carl Zeiss AG) verwendet.

Die Bilder wurden mit einer CCD-Kamera (AxioCam MRc, Carl Zeiss AG) und der dazugehörigen Software (AxioVision Version 4.7.1.0, Carl Zeiss AG) aufgenommen und gespeichert. Es wurde darauf geachtet, die Bilder in einer mittleren Entfernung vom Mittelpunkt der jeweiligen Vertiefungen aufzunehmen, um Messfehler durch am Rand passiv aufliegende Zellen zu vermeiden. Die Anzahl der PMNs wurde in 10 repräsentativen Bildern pro Kavität bestimmt.

2.5 Adhäsion unter dynamischen Bedingungen

2.5.1 Vorbereitung

Zur genaueren Untersuchung des Rekrutierungsmechanismus des S1FG wurden transfizierte HUVECs mit THP-1-Zellen unter definierter Schubspannung superfundiert.

HUVECs wurden an Tag 0 wie unter 2.3.1 beschrieben in 12-well-Mikrotiterplatten ausgesät.

An Tag 1 hatten die Zellen ca. 90% Konfluenz erreicht. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und 900 μ l neues HUVEC-Medium, welches kurz zuvor mit $7 \cdot 10^{11}$ AAV6-GFP bzw. $7 \cdot 10^{11}$ AAV6-S1FG vermischt worden war, hinzugegeben.

Etwa 24 h später, an Tag 2, wurden die Zellen wie unter 2.3.1 beschrieben abgelöst, wobei jedoch statt EDTA Trypsin (Biochrom AG) verwendet wurde. Nach Quantifizierung der Zellen in einer Zählkammer wurden die Zellen so in HUVEC-Medium resuspendiert, dass 30 μl Medium 5-6 \cdot 10⁵ Zellen enthielt. Vorgewärmte Mikroslices der Firma ibidi (VI^{0,4}, ibiTreat, Kanalvolumen 30 μl , ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland) wurden gemäß der Anweisungen des Herstellers mit 30 μl Zellsuspension beschickt. Nach Anwachsen der Zellen 2 Stunden später wurden die Reservoirs der Kanäle mit insgesamt 150 μl Medium aufgefüllt, und die Kanäle bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

An Tag 3 wurde die Expression des GFP mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht und das Medium vorsichtig nach Anweisungen des Herstellers ersetzt. Dem neuen Medium wurden dabei 15 ng/ml TNF- α (Agilent Technologies Deutschland GmbH) zur Stimulation der Zellen zugesetzt.

2.5.2 Versuchsdurchführung

An Tag 4 wurden die verwendeten Gerätschaften wie in Abb. 7: gezeigt aufgebaut. Jedes Mikroslice wurde 16-18 h nach Stimulationsbeginn zum Versuch verwendet. Dabei wurde das Slide unmittelbar vor Verwendung aus dem Inkubator entnommen und auch während des Versuches auf einer Temperatur von 37 °C gehalten. Es wurden immer abwechselnd die Kanäle mit S1FG- und GFP-transfizierten Zellen verwendet, um Effekte durch längeres Stehen oder längere Stimulation auszugleichen.

Versuchsgruppe	Transfektion HUVECs	Behandlung THP-1	Detachment	n=
GFP	AAV6-GFP	Medium	Ja	12
S1FG	AAV6-S1FG	Medium	Ja	12
GFP+L-Sel-Ab	AAV6-GFP	Medium + L-Selectin-Ab	Nein	3
S1FG+L-Sel-Ab	AAV6-S1FG	Medium + L-Selectin-Ab	Nein	3
GFP+AMD	AAV6-GFP	Medium + AMD3100	Ja	6
S1FG+AMD	AAV6-S1FG	Medium + AMD3100	Ja	6

Tab. 1: Versuchsgruppen Adhäsionsversuche unter dynamischen Bedingungen

THP-1-Zellen wurden wie unter 2.3.1 beschrieben zentrifugiert und mit einer Konzentration von 750000 Zellen/ml in Superfusionsmedium (THP-1-Medium wie unter 2.3.4 + 2 mM CaCl₂ + 2 mM MgCl₂) resuspendiert. Die Videoaufnahme wurde gestartet, der jeweilige Kanal wurde kurz mit Superfusionsmedium gespült und dann die Zellsuspension mit einer Flussrate von 0,57 ml/min (entspricht laut Herstellerangaben 1 dyn/cm²) superfundiert. Zur Superfusion wurde eine Pumpe der Firma Harvard Apparatus (South Natick, USA) verwendet. Der Fluss wurde für 8 Minuten pro Slide aufrechterhalten, danach die Aufnahme gestoppt und der Versuch mit dem nächsten Kanal weitergeführt. Für einige Versuche wurde den THP-1-Zellen nach Resuspendierung in einer

Konzentration von 750000 Zellen/ml der L-Selektin-blockierende Antikörper DREG-56 (Becton-Dickinson GmbH, Konzentration 13,5 µg/ml, Inkubation 10 Minuten bei 37 °C) oder der CXCR4-Antagonist AMD3100 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Konzentration 10 µg/ml, Inkubation 30 Minuten bei 37 °C) hinzugegeben. Die Zellen wurden dann gleich weiterverwendet (Anderson *et al.*, 1991, Kishimoto *et al.*, 1991, Patel *et al.*, 1995). In jeweils 3 Kanälen der Gruppen ohne Antikörperbehandlung sowie der Gruppen mit AMD3100-behandelten THP-1-Zellen wurde nach Ende der Zell-Superfusion Medium mit einer Flussrate von 4,56 ml/min (laut Herstellerangaben 8 dyn/cm²) für weitere 2 Minuten superfundiert, um das Detachment adhärerender Zellen und damit die Festigkeit der Interaktion zwischen THP-1-Zellen und Endothel zu prüfen. Dazu wurde die Anzahl adhärerender Zellen im Sichtfeld vor und nach Superfusion des Mediums gezählt und der prozentuale Anteil abgelöster Zellen an den ursprünglich adhärerenden Zellen bestimmt.

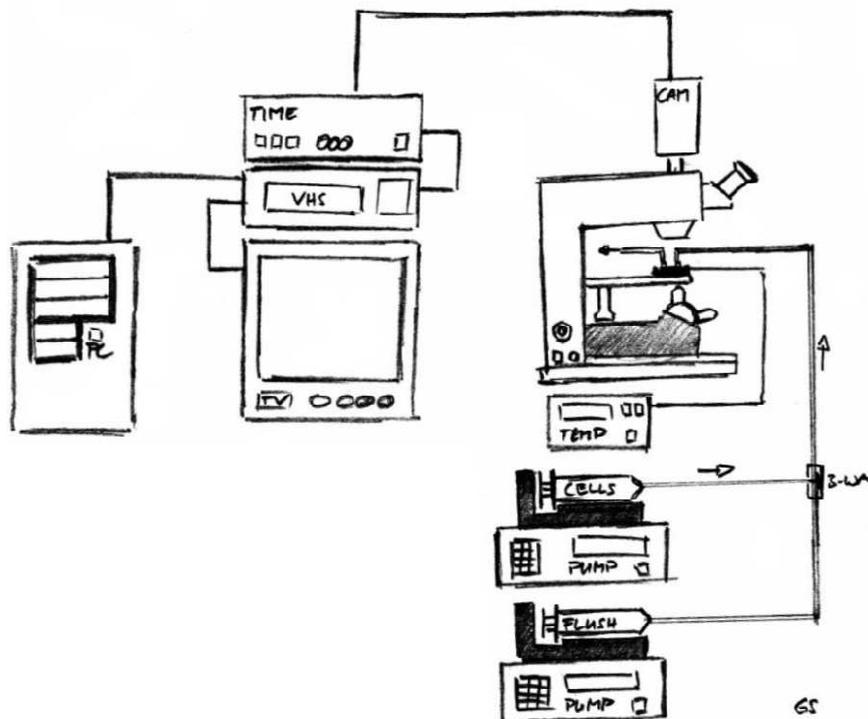


Abb. 7: Schema zum Aufbau der Anlage für die Adhäsionsversuche unter Schubspannung. Je eine Pumpe mit Superfusionslösung mit und ohne Zellen ist über einen Dreiweghahn mit dem µ-Slide verbunden, der Ausfluss des µ-Slides geht in einen Abfallbehälter. Die µ-Slides werden mit einer Wärmeplatte auf Temperatur gehalten. Die Kamera ist über ein Gerät zur Einblendung eines Zeitsignals mit Videorecorder und Computer verbunden.

2.5.3 Auswertung

Die Adhäsionsvorgänge wurden mittels eines mit einer Videokamera verbundenen Polarisationsmikroskops (Carl Zeiss AG) bei 20x Vergrößerung beobachtet und sowohl auf VHS-Kassetten als auch digital gespeichert. Bei der Auswertung wurden rollende als auch fest

adhärierende Zellen gezählt. Eine Zelle wurde dabei als fest haftend betrachtet, wenn sie länger als 10 Sekunden ihre Position nicht veränderte (Kucik, 2009). Für die Analyse der Geschwindigkeit wurde mittels des Programms VirtualDub (v 1.9.11, Avery Lee) nur jeder fünfundzwanzigste Frame verwendet und zu einem neuen Video zusammengefügt. In diesem wurde die Geschwindigkeit zufällig ausgewählter, rollender Zellen mittels des Programmes Kinovea (v 0.8.15, Joan Charmant & Contributors) untersucht.

2.6 Kaninchenmodell der chronischen Hinterlaufischämie (Kurzzeitversuche)

2.6.1 Versuchstiere

Das Kaninchenmodell der chronischen Hinterlaufischämie war in unserer Arbeitsgruppe bereits wiederholt zur Anwendung gekommen (Kupatt *et al.*, 2005, Pfosser *et al.*, 2005). Es wurden New-Zealand-White-Kaninchen (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Körpergewicht von 2,5 bis 3 kg verwendet. Die Kaninchen wurden in Einzelkäfigen bei kontrolliertem Tag-Nacht-Zyklus gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter (Ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland). Die Tierhaltung sowie die Operationssäle befanden sich im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin.

2.6.2 Überblick

Zum Nachweis der Adhäsion von Monozyten im Ischämiegebiet sowie der Transfektion mit S1FG-Plasmid wurde ein Kaninchenmodell der chronischen Hinterlaufischämie verwendet. Zu Versuchsbeginn wurde die rechte Femoralarterie exzidiert. Nachdem sich 7 Tage später eine stabile chronisch-ischämische Situation eingestellt hatte, wurde die Behandlung durchgeführt (Versuchsgruppen s. Tab. 2:). Weitere 5 Tage später wurde der Versuch beendet und die Muskulatur beider Hinterläufe sowie Leber, Milz, Nieren, Herz und Lunge für die histologische Aufarbeitung entnommen.

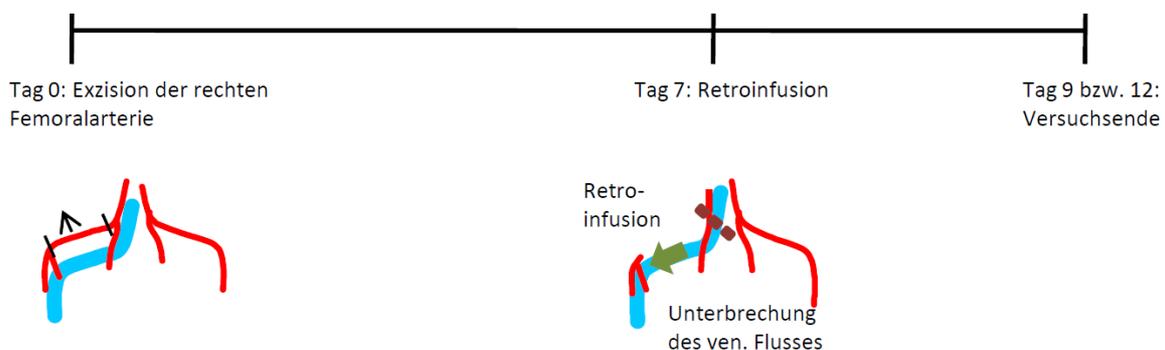


Abb. 8: Versuchsablauf der Kaninchen-Kurzzeitversuche

In den entnommenen Geweben wurden SDF-1-Expression und Anzahl der Monozyten untersucht.

Versuchsgruppe	Behandlung				n=
	Tag 7	Tag 9	Tag 10	Tag 11	
Kontrolle(K)	NaCl	-	-	-	3
S1FG+AMD(K)	1 mg S1FG	1 mg AMD3100	1 mg AMD3100	1 mg AMD3100	2
S1FG(K)	1 mg S1FG	-	-	-	1
AMD(K)	-	1 mg AMD3100	1 mg AMD3100	1 mg AMD3100	2

Tab. 2: Versuchsgruppen Kurzzeitversuche Kaninchen

2.6.3 Induktion der Ischämie

An Tag 0 des Versuchs wurde die Ischämie durch Exzision der Femoralarterie induziert. Die Einleitung der Narkose erfolgte im Tierstall mittels gemeinsamer intramuskulärer Injektion von 100 mg Ketaminhydrochlorid (Fa. Inresa, Freiburg, Deutschland), 20 mg Xylazinhydrochlorid (Rompun 2%, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) sowie 0,05 mg Atropin (B. Braun Melsungen AG) in den linken Oberschenkel. Das Tier wurde in den OP verbracht, wo die Anlage einer 24G-PVK (BD Neoflon 24G*0,75“, Becton-Dickinson GmbH) in eine Ohrvene erfolgte. Daran wurde eine TIVA mit 128 mg/h Ketaminhydrochlorid und 32 mg/h Xylazinhydrochlorid angeschlossen. Die konstante Applikationsrate wurde durch einen Perfusor (Perfusor segura, B. Braun Melsungen AG) sichergestellt. Zur Vermeidung von Hornhautschäden wurde eine mit NaCl 0,9% (B. Braun Melsungen AG) befeuchtete Kompresse (NOBA Verbandmittel Danz GmbH, Wetter, Deutschland) über beide Augen gelegt. Der rechte Hinterlauf wurde rasiert.

Nach gründlicher Desinfektion der Haut (Cutasept F, Bode Chemie, Hamburg, Deutschland) erfolgte unter sterilen Kautelen ein nach lateral konvexer, bogenförmiger Hautschnitt etwa von Höhe des Lig. Inguinale bis zum Kniegelenk (Skalpell No. 22 von Feather Safety Razor Co. LTD., Osaka, Japan). Sodann erfolgte mit Overholt-Klemmen die stumpfe Präparation bis zu den unmittelbar kaudal des Leistenbandes liegenden Gefäßen. Die A. femoralis sowie ihre Abgänge in der Region wurden dargestellt und in der in Abb. 9: dargestellten Reihenfolge unterbunden (Ligaturen: Perma-Hand Seide geflochten, Gr. 1 (4 Ph. Eur.), Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland). Zunächst wurden die Abgänge der Nummern 1 bis 5 ligiert. Danach wurde der kaudale Drittelpunkt der Verbindungslinie zwischen Lig. Inguinale und Kniegelenksspalt aufgesucht, von dort entlang der Muskulatur stumpf in die Tiefe präpariert, der Abgang Nr. 7 aufgesucht und die Ligaturen Nr. 6, 7 und 8 gesetzt. Schließlich wurde auf Höhe des Kniegelenksspalt die A. femoralis von den begleitenden Venen stumpf getrennt und unterbunden. Während der gesamten Prozedur wurde das OP-Gebiet wiederholt durch Spülung mit NaCl befeuchtet, um Austrocknung zu vermeiden. Die wiederverwendbaren OP-Instrumente waren zuvor durch Autoklavieren sterilisiert worden.

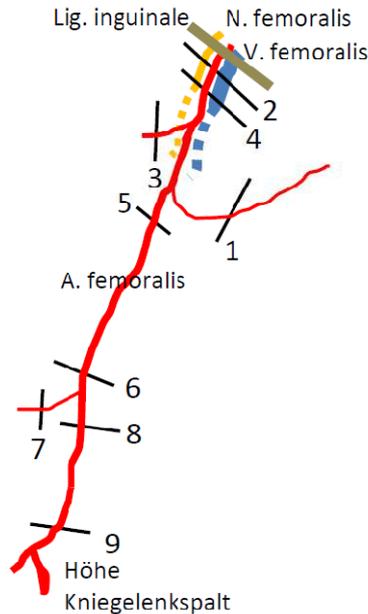


Abb. 9: Schema der Anatomie der A. femoralis beim Kaninchen. Die einzelnen Abgänge wurden in der der Nummerierung entsprechenden Reihenfolge unterbunden. Nr. 1 wurde zusammen mit der begleitenden Vene ligiert.

Danach wurde die A. femoralis zunächst proximal der Ligatur Nr.9 angeklemt und die Arterie zwischen Ligatur und Klemme mit einer Schere durchtrennt. Der nächste Schnitt erfolgte unmittelbar distal der Ligatur Nr. 8. Sodann wurde der distale Anteil der Femoralarterie unter vorsichtigen, konstanten Zug- und Drehbewegungen an der angelegten Klemme aus dem Bein entfernt. Danach wurde die Arterie proximal der Ligatur Nr. 6 angeklemt, wiederum zwischen Klemme und Ligatur sowie unmittelbar distal der Ligatur Nr. 5 durchschnitten und in derselben Art und Weise entfernt.

Schließlich erfolgte eine Kontrolle auf Blutrockenheit und ein Ausspülen der Wunde mit NaCl. Der Wundverschluss wurde mittels Einzelknopf- oder Donatinähten (Supolene DS40, 3.5 metric, Resorba, Nürnberg, Deutschland) durchgeführt. Nach Beendigung der Naht wurde die TIVA ausgeschaltet. Die Wunde wurde mit Povidon-Iod (B. Braun Melsungen AG) desinfiziert und das Bein verbunden (NOBA Verbandmittel Danz GmbH). Dabei wurde der Verband auch um den Rumpf geführt. Es wurde auf einen nicht zu straffen Sitz des Verbandes geachtet. Der Verband wurde zur Stabilisierung mit Rollenpflaster (Leukoplast Hospital 5 cm x 9,2 m, SSN medical, Hamburg, Deutschland) überklebt. Hierbei wurde ebenfalls auf einen nicht zu straffen Sitz geachtet und eine zirkuläre Umklebung des Beines vermieden. Zur Infektionsprophylaxe wurden 4 mg Gentamycin (Gencin®, DeltaSelect, Dreieich, Deutschland) intramuskulär in den linken Oberschenkel injiziert.

Nach Aufwachen des Tieres wurde es zurück in den Stall verbracht. Postoperativ wurde dem Trinkwasser 3 Tage lang 62,5 mg/d Tramadolhydrochlorid (Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland) zur Analgesie zugegeben.

2.6.4 Behandlung

Am Tag 7 nach Exzision der Femoralarterie wurde das entsprechende Plasmid appliziert. Einleitung und Führung der Anästhesie sowie die Vorbereitungen zur Operation erfolgten wie in 2.6.3 beschrieben.

Nach Rasur und Desinfektion des OP-Gebiets wurde lateral der OP-Wunde von Tag 0 etwas kaudal des Leistenbandes ein zweiter, ca. 2 cm langer Schnitt getätigt. Die V. femoralis wurde ca. 1 cm kaudal des Leistenbandes durch stumpfe Präparation mit der Overholt-Klemme dargestellt und umschlungen. Auf die Vene wurde der sterile, auf die Hälfte gekürzte Köcher einer PVK aufgelegt und auf dieser „Polsterung“ die Ligatur zugezogen und verknotet, um den Fluss in der V. femoralis zu unterbrechen. Durch den Köcher zwischen Knoten und Vene konnte nach Beendigung der Retroinfusion der Knoten gefahrlos mit einem Skalpell durchtrennt werden. Zusätzlich wurde ein aus einer Mullbinde bestehendes Tourniquet um den proximalen Oberschenkel angelegt und mit einer großen Klemme fixiert.

Danach wurde die Haut über dem proximalen Teil der V. tibialis ant. rasiert und desinfiziert. Mit einer Schere wurde ein ca. 1 cm langer Hautschnitt durchgeführt, so dass die Vene frei lag. Die Vene wurde nach distal hin mit einer PVK der Größe 24G punktiert. Danach erfolgte die langsame Retroinfusion des inzwischen vorbereiteten, liposomal verpackten S1FG-Plasmids (vorbereitet wie unter 2.2.1 beschrieben) oder eines äquivalenten Volumens NaCl. Während der Retroinfusion erfolgte eine ständige Sichtkontrolle auf eventuell entstehende Schwellungen oder Paravasate.

Nach Beendigung der Retroinfusion wurde mit ca. 1 ml NaCl nachgespült, der PVK entfernt und die Punktionsstelle für mindestens 15 Minuten fest komprimiert. 30 Minuten nach Abschluss der Retroinfusion wurde das Tourniquet gelöst und die Ligatur der V. femoralis entfernt. Nach Spülung der Wunde erfolgte der Wundverschluss mit Einzelknopf- oder Donatinähten. Desinfektion der Wunde, Verband. Antibiotikaphylaxe sowie postoperative Schmerztherapie wurden wie unter 2.6.3 beschrieben durchgeführt.

In den Versuchsgruppen S1FG+AMD(K) und AMD(K) wurde an den Tagen 9, 10 und 11 nach Exzision 1 mg AMD3100 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) intraperitoneal injiziert.

In Versuchsgruppe S1FG-GFP+eEPCs(K) wurden am Tag 9 nach Exzision $5 \cdot 10^6$ Dil-gefärbte eEPCs in sterilem PBS-Dulbecco (Biochrom AG) wie oben beschrieben retroinfundiert. Zur Kultivierung und Färbung der Zellen s. 2.3.1.

Am Tag 11 nach Exzision, 6 Stunden nach Applikation der letzten AMD3100-Dosis, erfolgte die Narkoseeinleitung wie unter 2.6.3 beschrieben. Danach wurde das Tier durch intrakardiale Injektion

von 10 ml gesättigter KCl-Lösung (ca. 255 g KCl gelöst in 1 l Aqua bidest.) getötet. Es folgte die Entnahme der Mm. tibialis ant. (abgekürzt „TA“), gastrocnemius („GC“), fibularis longus („Fib“), adductor („AD“) und vastus medialis („VM“) beider Seiten sowie die Entnahme von Teilen beider Nieren, der Milz, der Leber, des Herzens und der Lungen. Von den jeweiligen Geweben wurde ein Teil (bei Muskeln etwa die distalen 3-4 cm) in Plastikkästchen gelegt und für ca. 15-20 Minuten in einem Tiegel mit 2-Methylbutan (Carl Roth GmbH & Co. KG) untergetaucht. Dieser Tiegel befand sich in einem Bad aus flüssigem Stickstoff, so dass die Proben unter Verdrängung von Wasser eingefroren wurden.

Die Proben wurden dann auf Trockeneis in einen Kühlschrank zur langfristigen Lagerung bei -80°C transportiert. Teile der Proben wurden auch direkt in 1,5 ml-Reagiergefäßen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und später ebenfalls bei -80°C langfristig gelagert.

2.6.5 Histologie

Die entnommenen Materialien wurden zur Bewertung der Kapillardichte in den Muskeln histologisch aufgearbeitet. Sie wurden bei -20°C mit TissueTek (Sakura Finetek Europe, Zoeterswoude, Niederlande) auf Trägern befestigt und mit einem Kryotom (CM3050, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) in 5 µm dicke Scheiben geschnitten und auf Objektträger (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) gebracht. Die Schnitte wurden bei 4°C gelagert.

2.6.5.1 SDF-1-PECAM-1-Doppelfärbung

Die Expression von SDF-1 in Relation zu PECAM-1 als Marker des Kapillarendothels (Page *et al.*, 1992) wurde durch Immunfluoreszenz untersucht. Die Schnitte wurden bei 37 °C für 20 Minuten in 2 M HCl (Merck KgaA) fixiert und 3x 2 min in PBS + 0,2% Tween (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gewaschen. Unspezifische Proteinbindung wurde durch Aufbringen von Antibody Diluent (Dako Denmark, Glostrup, Dänemark) nach Umfahren der einzelnen Schnitte mit hydrophobem Stift (Dako Pen, Dako Denmark) reduziert und nach einem erneuten Waschschrift der primäre Antikörper (mouse-anti-human-SDF-1, Best.-Nr. MAB350, R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland; Konzentration 1:62) auf die Schnitte pipettiert. Die Schnitte wurden für 24 h bei 4 °C inkubiert und erneut in PBS + Tween gewaschen. Danach wurde der sekundäre Antikörper (goat anti-mouse IgG-FITC, Best.-Nr. sc-2099, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA; Konzentration 1:50) aufgebracht und die Schnitte für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach einem erneuten Waschschrift (3x 2 min PBS + 0,2% Tween) wurde der Antikörper gegen PECAM-1 zugefügt (PECAM-1, goat polyclonal, Best.-Nr. sc-1506, Santa Cruz Biotechnology Inc.,

verdünnt 1:20 in Antibody Diluent) und wiederum für 24 h bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Die Schnitte wurden wiederum gewaschen (3x 2 min PBS + 0,2% Tween) und der zweite sekundäre Antikörper (donkey anti-goat IgG, Rhodamin-konjugiert, Best.-Nr. sc-2094, Santa Cruz Biotechnology Inc., verdünnt 1:50 in Antibody Diluent) für 2 h bei Raumtemperatur zugegeben. Nach abschließendem Abwaschen der Antikörper (3x 2 min PBS + 0,2% Tween) wurden die Schnitte abgedeckt und lichtgeschützt bei 4 °C bis zur baldigen Analyse aufbewahrt.

Die Schnitte wurden mit einem Axiovert 200M-Mikroskop mit einer HBO50/AC-Lichtquelle und den Filtersätzen Nr. 20 und 44 untersucht. Ein Fluar 40x/1.3 Ölimmersionsobjektiv wurde verwendet. Mit einer AxioCam MRm und der zugehörigen Software wurden die Bilder aufgenommen und betrachtet (Alle Geräte Carl Zeiss AG).

2.6.5.2 Monozytennachweis

Die Anfärbung der Monozyten erfolgte in Gefrierschnitten durch Nachweis der α -Naphthylacetatesterase. Hierzu wurde ein fertiges Kit mit Hämatoxylinlösung zur Gegenfärbung (Best.-Nr. 91A-1KT, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Die Schnitte wurden im oben beschriebenen Mikroskop betrachtet und fotografiert, es wurden je Muskel 10 repräsentative Bilder angefertigt und das Verhältnis von Monozyten zu Muskelfasern ausgewertet.

2.7 Kaninchenmodell der chronischen Hinterlaufischämie (Langzeitversuche)

2.7.1 Überblick

Die funktionellen Effekte der gesteigerten Mobilisierung und Rekrutierung der EPCs auf die Durchblutung des Hinterlaufs wurden durch insgesamt 35 Tage dauernde Langzeitversuche überprüft. Die Versuche waren ähnlich aufgebaut wie die beschriebenen Kurzzeitversuche, liefen aber nach Behandlung 4 Wochen. An Tag 7 und 35 wurden Angiographien der Hinterläufe durchgeführt. Zur Bewertung der Arteriogenese wurden die Verbesserung der Kollateralisierung sowie die Zunahme der Flussgeschwindigkeit gemessen. Weiterhin wurden zur Perfusionsbestimmung an Tag 7 und 35 fluoreszierende Mikrosphären appliziert. Als Parameter der Angiogenese wurde die Kapillardichte in der Hinterlaufmuskulatur untersucht.

2.7.2 Induktion der Ischämie

Die chronische Ischämie wurde wie unter 2.6.3 beschrieben durch Exzision der rechten Femoralarterie induziert.

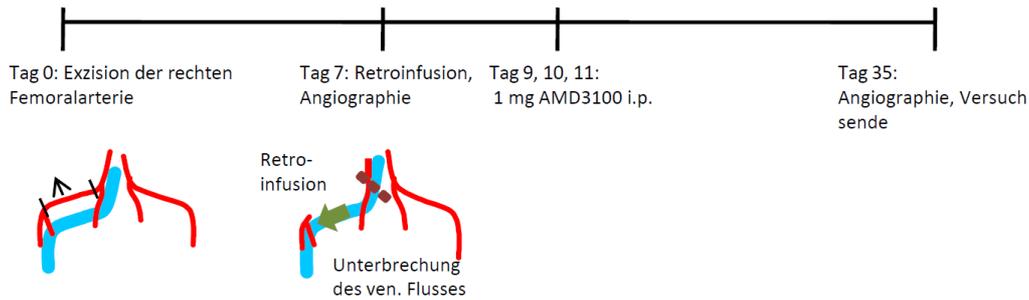


Abb. 10: Versuchsablauf der Kaninchen-Langzeitversuche

Versuchsgruppe	Behandlung				n=
	Tag 7	Tag 9	Tag 10	Tag 11	
Kontrolle	NaCl	-	-	-	5
S1FG+eEPCs	1 mg S1FG	2*10 ⁶ eEPCs	-	-	5
S1FG+AMD	1 mg S1FG	1 mg AMD3100	1 mg AMD3100	1 mg AMD3100	5
S1FG-R+AMD	1 mg S1FG-R	1 mg AMD3100	1 mg AMD3100	1 mg AMD3100	5
S1FG	1 mg S1FG	-	-	-	4
AMD	NaCl	1 mg AMD3100	1 mg AMD3100	1 mg AMD3100	4

Tab. 3: Versuchsgruppen Langzeitversuche Kaninchen

Die Versuche in der Kontrollgruppe und der S1FG+eEPCs-Gruppe wurden in früheren Projekten der Arbeitsgruppe nach demselben Protokoll durchgeführt.

2.7.3 Baseline-Messung und Behandlung

Am Tag 7 nach Exzision wurden zunächst Mikrosphären appliziert und eine Angiographie der Hinterläufe zur Dokumentation der Ausgangssituation von Kollateralisierung und Flussgeschwindigkeit durchgeführt. Danach wurde gegebenenfalls S1FG oder NaCl retroinfundiert.

Die Vorbereitungen für die Operation in Bezug auf Narkoseeinleitung und Herstellung steriler Kautelen waren wie unter 2.6.3 beschrieben. Zusätzlich wurde zum Referenzabzug für die Mikrosphärenmessung eine PVK (Introcan Safety W, 22G*1“, B. Braun Melsungen AG) in die Arterie des Ohres, an dem sich nicht der venöse Zugang befand, gelegt. Das Kaninchen wurde in Rückenlage über einer Stütze gelagert. Der Halsbereich wurde rasiert und sorgfältig desinfiziert.

Sodann erfolgte unter sterilen Kautelen mit der Metzenbaumschere ein Hautschnitt etwa über der linken A. carotis. Mit anatomischer Pinzette und Overholt-Klemme wurde durch die verschiedenen Schichten stumpf zur A. carotis communis präpariert, die Arterie auf einer Strecke von ca. 2 cm dargestellt und mit zwei Ligaturen umschlungen. Die kraniale Ligatur wurde verschlossen und nach kranial hin unter leichten Zug gesetzt. Die Arterie wurde an der kaudalen Ligatur angehoben, um den Blutzufluss zu unterbrechen, und mit einer anatomischen Pinzette zwischen beiden Ligaturen gefasst.

Unmittelbar über der Pinzette wurde mit einer Mikro-Federschere ein ca. 1-2 mm durchmessendes Loch in die Arterie geschnitten, durch welches zügig mit Mandrin und Führungsdraht eine Schleuse (Radifocus Introducer II, 4F, Terumo Europe N.V., Leuven; Belgien) eingeführt wurde.

Nach Fixierung der Schleuse wurde unter Durchleuchtung mit einem C-Bogen (Exposcop 800, Fa. Ziehm, Nürnberg, Deutschland) ein 4F-Katheter (Cordis Corp., Miami, FL, USA) eingeführt. Über einen steuerbaren Führungsdraht mit flexibler Spitze (Größe 0,014", Cordis Corp.) wurde zunächst unter Durchleuchtung der linke Ventrikel aufgesucht und der Katheter in den Ventrikel vorgeschoben. Während des Versuchs wurden zur Vermeidung von Thromben Führungsdrähte und Katheter wiederholt mit verdünntem Heparin-Natrium (500 I.E./ml, B. Braun Melsungen AG) gespült und benetzt. Mittels Druckmessung erfolgte eine Verifizierung der Katheterlage. Währenddessen wurden die fluoreszierenden Mikrosphären („FluoSpheres“, $1 \cdot 10^6$ beads/ml, Fa. Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 3 Minuten aufgeschüttelt, dann 5 Minuten im Ultraschallbad belassen und erneut 3 Minuten auf dem Vortex-Gerät geschüttelt. 3 ml Mikrosphären wurden dann über 2 Minuten kontinuierlich intraventrikulär appliziert. Für 3 Minuten ab Beginn der Applikation wurde aus der arteriellen Kanüle mit einer Flussrate von 2,06 ml/min (Abzugsgerät der Firma Harvard Apparatus, South Natick, USA) Blut als Referenz für die Mikrosphärenmessung in eine Spritze mit 3 ml 3,13% Natriumcitrat-Lösung (Fa. Eifelfango, Bad Neuenahr-Ahrweiler, Deutschland) abgezogen. Nach Ende der Applikation wurde der Katheter aus dem Ventrikel entfernt. Das Blut wurde unverzüglich durch ein Filtersystem wie in 2.7.8 beschrieben abgesaugt, um die fluoreszierenden Mikrosphären im Filter aufzufangen. Die Filter wurden stehend und gegen Licht geschützt bei 4°C gelagert.

Nun wurde der Führungsdraht unter Durchleuchtung in eine A. iliaca externa vorgeschoben, und der Katheter über den Draht an dieser Stelle positioniert. Es erfolgte die Applikation von 3 mg Adenosin (Carl Roth GmbH & Co. KG) und nach Spülung des Katheters mit 0,9% NaCl-Lösung die Angiographie durch Injektion von 2 ml Iopamidol (Solustrast 370, Bracco Altana Pharma GmbH, Konstanz, Deutschland) unter Durchleuchtung. Danach wurde die Angiographie in gleicher Weise auf der Gegenseite durchgeführt.

Nach Ende der Angiographien und Wundverschluss am Hals mit Donati- oder Einzelknopfnähten wurde je nach Versuchsgruppe in Liposomen verpacktes S1FG-Plasmid, S1FG-R-Plasmid oder NaCl wie unter 2.6.4 beschrieben retroinfundiert.

Nach Abschluss der Retroinfusion erfolgten Wundverschluss, lokale Desinfektion, Verband, Antibiotikaphylaxe und postoperative Schmerztherapie in der in 2.6.3 beschriebenen Weise. Die Wunde am Hals wurde nicht verbunden, sondern nur desinfiziert.

In der Gruppe S1FG+eEPCs wurden an Tag 9 nach Exzision 5 bzw. 2 Millionen Dil-gefärbte eEPCs in sterilem PBS wie oben beschrieben retroinfundiert.

In den Gruppen S1FG+AMD und AMD wurde an den Tagen 9, 10 und 11 jeweils 1 mg AMD3100 intraperitoneal injiziert.

2.7.4 Versuchsende

35 Tage nach Exzision wurde der Versuch nach nochmaliger Angiographie und Mikrosphärenapplikation beendet. Vorbereitung der Operation, Schleusenanlage, Mikrosphärenapplikation und Angiographie der Hinterläufe erfolgte wie oben beschrieben. Dann wurde das Tier durch intrakardiale Injektion von 10 ml gesättigter KCl-Lösung getötet und Hinterlaufmuskeln und Organe wie unter 2.6.4 beschrieben entnommen. Zusätzlich wurden, um später die Fluoreszenz der applizierten Mikrosphären messen zu können, Teile der Muskeln in 5%-Formalin-Lösung (Carl Roth GmbH & Co. KG) eingelegt und gegen Licht geschützt aufbewahrt.

2.7.5 Histologie

Die Schnitte wurden wie unter 2.6.5 beschrieben aufgearbeitet und unter dem Mikroskop betrachtet.

Für Proben, in denen AP angefärbt war, wurde Durchlicht verwendet. Zur Betrachtung der PECAM-1-gefärbten Schnitte wurde das unter 2.6.5.1 beschriebene Mikroskop verwendet. Von jedem Muskel wurden ca. 8 Fotografien betrachtet, in jeder davon Kapillaren und Muskelfasern gezählt und das Verhältnis gebildet. Dabei wurden von jedem Muskel mindestens 100 Muskelfasern betrachtet. Zur Auswertung wurde der Durchschnitt der Kapillardichte in der Unterschenkelmuskulatur herangezogen.

2.7.5.1 Alkalische Phosphatase-Färbung

Die Färbung wurde auf der Basis des von Ziada et al. beschriebenen Verfahrens (Ziada *et al.*, 1984) durchgeführt. In 30 ml Pufferlösung wurden 6 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat-p-toluidin-Salz (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) sowie 30 mg Nitrotetrazolium blue chloride (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gelöst. Die Pufferlösung enthielt 6,9 mmol/l MgSO_4 (Merck KGaA) und 27,5 mmol/l $\text{B}_4\text{Na}_2\text{O}_7$ (Merck KGaA) gelöst in Aqua dest.. Die Objektträger wurden mit jeweils ca. 1 ml der Lösung überschichtet und in einer Feuchtkammer für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Färbelösung wurde danach abgeklopft, die Objektträger zum Waschen drei Mal in PBS geschwenkt und danach 5 Minuten in 4% Formalin-Lösung fixiert. Dann wurden die Objektträger 1 Minute in Aqua dest. gewaschen, 1 Minute in 0,1% Kernechtrot-Lösung (Apotheke Innenstadt des Klinikums der Universität München, München, Deutschland) gegengefärbt und noch mal 1 Minute in Aqua dest. gewaschen. Danach wurden die Objektträger luftgetrocknet und bei 4°C bis zur Analyse aufbewahrt.

2.7.5.2 PECAM-1-Färbung

Zur Immunhistochemie wurden ebenfalls Gefrierschnitte verwendet. Die Schnitte wurden 20 min bei 37°C in 2M HCl (Merck KGaA) fixiert, dann 3x 5 min in PBS gewaschen. Danach wurden die einzelnen Schnitte mit einem hydrophoben Stift umfahren (DakoPen, Dako Denmark) und für 30 min bei Raumtemperatur mit Antibody Diluent (Dako Denmark) inkubiert, um unspezifische Proteinbindung zu verringern. Nach erneutem Waschen (3x 5min PBS) wurde der primäre Antikörper gegen PECAM-1 aufgetragen (PECAM-1, goat polyclonal, Best.-Nr. sc-1506, Santa Cruz Biotechnology Inc., verdünnt 1:20 in Antibody Diluent) und für 24 h bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Schnitte wieder 3x 5 min in PBS gewaschen und bei Raumtemperatur 2 h mit dem sekundären Antikörper (donkey anti-goat IgG, Rhodamin-konjugiert, Best.-Nr. sc-2094, Santa Cruz Biotechnology Inc., verdünnt 1:50 in Antibody Diluent) inkubiert. Danach wurde wieder 3x 5 min mit PBS und kurz mit Aqua dest. gewaschen und die Schnitte gegen Licht geschützt bei 4°C aufbewahrt.

2.7.6 Kollateralenwachstum

Die Beurteilung des Kollateralenwachstums wurde wie in (Witzenbichler *et al.*, 1998) beschrieben vorgenommen. Aus den an Tag 7 und Tag 35 aufgenommenen Angiographien wurde rechts und links jeweils das Bild ausgewählt, das die Beinarterien vollständig gefüllt zeigt. Über dieses Bild wurde ein standardisiertes Gitter zwischen Leistenband und Kniegelenkspalt gelegt und die Kreuzungspunkte der zu sehenden Kollateralen mit dem Gitter gezählt (Witzenbichler *et al.*, 1998). Es wurde das Verhältnis deren Anzahl an Tag 35 zur Anzahl an Tag 7 gebildet und zur Interpretation verwendet (Asahara *et al.*, 1995).

2.7.7 Messung der Flussgeschwindigkeit (Cinedensitometrie)

Um die Perfusion des Hinterlaufs zu bestimmen, wurde in jeder Angiographie die Anzahl der Einzelbilder bestimmt, die zwischen Beginn der Kontrastmittelperfusion auf der Höhe des Leistenbandes und Erreichen des Kniegelenkspaltes lagen. Aufgrund einer konstanten Injektionsgeschwindigkeit und der konstanten Bildaufnahmezeit des C-Bogens (25 Bilder pro Sekunde) war diese Anzahl der Perfusionen direkt proportional (Gibson *et al.*, 1996). Für Tag 7 und Tag 35 wurde jeweils das Verhältnis von linker zu rechter Seite bestimmt. Es wurde der Quotient aus diesem Verhältnis an Tag 35 und an Tag 7 gebildet und angegeben.

2.7.8 Mikrosphärenaufbereitung

Als Goldstandard zur Flussmessung wird die Verwendung fluoreszierender Mikrosphären angesehen. Wir applizierten wie beschrieben jeweils 3 ml Mikrosphären verschiedener Farben an Tag 7 und Tag

35 und asservierten Teile der Hinterlaufmuskeln in Formalin, die gegen Licht geschützt gelagert wurden.

Die Aufbereitung der Proben zur Durchführung der Messungen erfolgte abgewandelt nach (Raab *et al.*, 1999).

Stücke der Muskeln sowie beider Nieren mit einem Gewicht zwischen 1,5 und 2,5 g wurden in Polypropylen-Filtersystemen (s. Abb. 11:) verpackt.

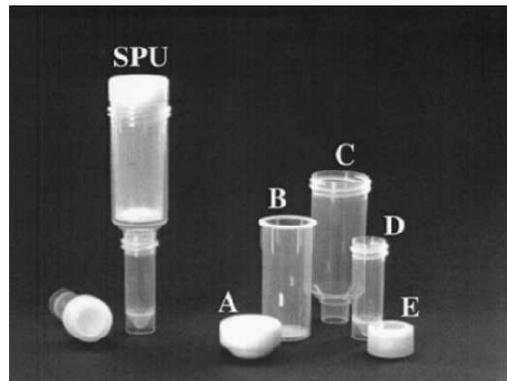


Abb. 11: Das Filtersystem. „B“ ist ein Polypropylen-Röhrchen mit einem Filter (8 μm Porengröße) am Boden, in das die Proben gelegt wurden. Die Röhrchen „C“ und „D“ wurden zusammengesteckt, „B“ hineingesteckt und die Konstruktion mit dem Deckel „A“ verschlossen. Der Durchmesser der Röhrchen „B“ und „C“ betrug etwa 2,5 cm. Das zusammengebaute System ist mit „SPU“ bezeichnet (Aus (Raab *et al.*, 1999))

Der Filter („B“ in Abb. 11:) wurde in einen genau passenden Metallbecher eingesetzt. 15 ml Verdauungslösung (4M KOH (Merck KGaA) zur Zersetzung der Muskeln mit Zusatz von 2% Tween 80 (Carl Roth GmbH & Co. KG) um ein Anhaften der Mikrosphären an den Wänden zu verhindern) wurden hinzugefügt. Die Lösung wurde mit 3 ml absolutem Ethanol (Apotheke Innenstadt des Klinikums der Universität München) überschichtet und mit einem Kunststoffdeckel verschlossen. Die Proben wurden dann 24 Stunden bei 60°C in einem Wärmeblock (Fa. Perkin-Elmer, Überlingen, Deutschland) verdaut.

Danach wurde das KOH durch den Filter abgesaugt (s. Abb. 12:) und Reste der Lösung durch sorgfältiges Spülen mit phosphatgepufferter Salzlösung (29,8 g di-Kaliumhydrogenphosphat-trihydrat und 5,55 g Kaliumhydrogenphosphat, in 1000 ml Aqua dest. gelöst; Apotheke Innenstadt des Klinikums der Universität München) neutralisiert. Die fluoreszierenden Mikrosphären (Durchmesser ca. 15 μm) befanden sich nun in dem Filter. Diese Filter sowie die Filter, durch die die Referenzblutprobe (s. 2.7.3) abgezogen wurde, wurden in 50 ml-Zentrifugenröhrchen (TPP AG) eingesetzt und je Filter 2 ml 2-Ethoxyethylacetat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) zugegeben. Durch

das 2-Ethoxyethylacetat wurde der fluoreszierende Farbstoff aus den Mikrosphären herausgelöst und konnte durch den Filter abzentrifugiert werden.

Das 2-Ethoxyethylacetat mit Farbstoff wurde 3 min bei 3000 rpm durch den Filter zentrifugiert. Aus jedem Röhrchen wurden 100 µl des darin befindlichen 2-Ethoxyethylacetat in eine 96-Well-Mikrotiterplatte (TPP AG) pipettiert.

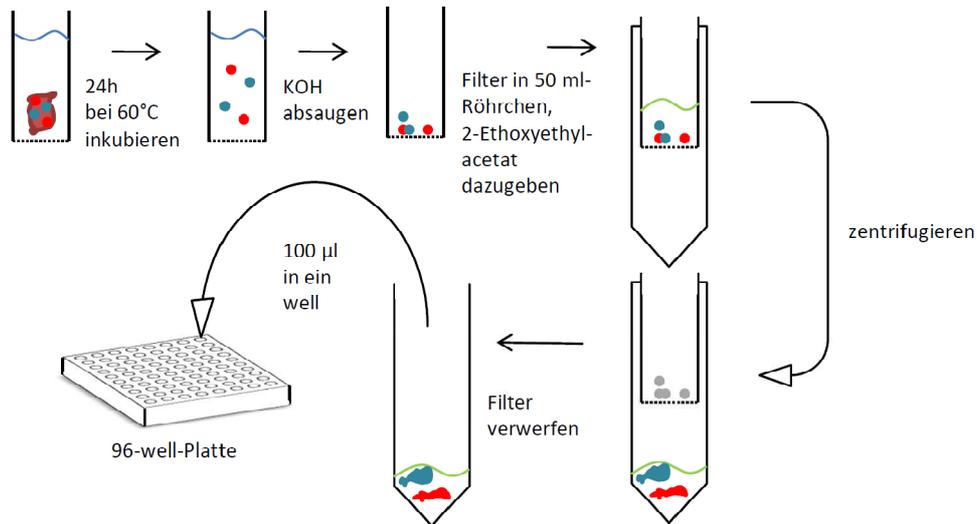


Abb. 12: Schema zur Aufbereitung der Mikrosphären

Die Fluoreszenz in den einzelnen Kavitäten der Platte wurde automatisch in einem Mikroplattenlesegerät (Safire 2, Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich) gemessen. Die Platte wurde in das Gerät hineingeschoben, alles weitere erfolgte automatisch gemäß der angegebenen Einstellungen. Exzitations- und Emissionswellenlängen für die einzelnen Fluoreszenzfarben sind in Tab. 4.; weitere Geräteeinstellungen in Tab. 5: angegeben.

Farbe	Exzitation	Bandbreite	Emission	Bandbreite
Scarlett	651 nm	6 nm	680 nm	14 nm
Crimson	612 nm	6 nm	638 nm	12 nm
Red	570 nm	6 nm	598 nm	14 nm
Orange	534 nm	6 nm	554 nm	10 nm
Yellow-Green	490 nm	6 nm	515 nm	12 nm
Blue-Green	427 nm	6 nm	468 nm	14 nm
Blue	356 nm	6 nm	424 nm	16 nm

Tab. 4: Exzitations- und Emissionswellenlängen mit den jeweiligen Bandbreiten.

Temperature	25 °C
Z-Position	Automatisch angepasst
Integration time	40 µs
Lag time	0 µs
Measurement mode	Fluorescence
Number of reads	3
Shake duration	5 s

Tab. 5: Weitere Geräteeinstellungen

Die akquirierten Daten wurden von der XFluor4-Software (Version 4.62, Fa. Tecan Austria GmbH), einem Makro für Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, Seattle, USA) im .xls-Format gespeichert und in Microsoft Excel 2003 ausgewertet. Der regionale Blutfluss (RBF) wurde als Verhältnis der Perfusion eines Beines im Verhältnis zum anderen zwischen Tag 7 und Tag 35 gemäß folgender Formeln bestimmt.

$$a_{T35} = \sum_{\text{Muskeln rechts T35}} \frac{\text{Fluoreszenz}_{\text{Muskel}}}{\text{Gewicht}_{\text{Muskel}}} \quad (1) \quad b_{T35} = \sum_{\text{Muskeln links T35}} \frac{\text{Fluoreszenz}_{\text{Muskel}}}{\text{Gewicht}_{\text{Muskel}}} \quad (2)$$

$$a_{T7} = \sum_{\text{Muskeln rechts T7}} \frac{\text{Fluoreszenz}_{\text{Muskel}}}{\text{Gewicht}_{\text{Muskel}}} \quad (3) \quad b_{T7} = \sum_{\text{Muskeln links T7}} \frac{\text{Fluoreszenz}_{\text{Muskel}}}{\text{Gewicht}_{\text{Muskel}}} \quad (4)$$

$$RBF = \frac{\frac{a_{T35}}{b_{T35}}}{\frac{a_{T7}}{b_{T7}}} \quad (5)$$

2.8 Statistische Auswertung

Analyse der Daten erfolgte mittels Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation) und SPSS v 19.0.0.1 (SPSS Inc., Chicago, USA). Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt.

Zur Prüfung der Signifikanz von Effekten wurden zunächst mittels des Levene-Tests die Varianzen der einzelnen Gruppen auf Homogenität geprüft. Konnte die Nullhypothese des Tests nicht abgelehnt werden (Ergebnisse in Abb. 14.; Abb. 23.; Abb. 29.; Abb. 16.; Abb. 17.; Abb. 18.; Abb. 19:9), wurden die Daten mittels des Tamhane T2-Tests oder des Games-Howell-Tests untersucht. Ergab sich Varianzenhomogenität, wurden der einfaktorielle ANOVA-Test und das Student-Newman-Keul-Verfahren als Post-Hoc-Analyse angewendet.

3 Ergebnisse

3.1 PMN-Adhäsion *in vitro*

Versuche zur Adhäsion von eEPCs auf S1FG und anderen Molekülen transfizierten Endothelzellen wurden bereits vorher in der Arbeitsgruppe durchgeführt.

Da in einem klinischen Zusammenhang die Rekrutierung verschiedener Arten zirkulierender Zellen von Bedeutung ist, wurde hier die Adhäsion von PMNs am S1FG-Konstrukt mit der an anderen Adhäsionsmolekülen verglichen.

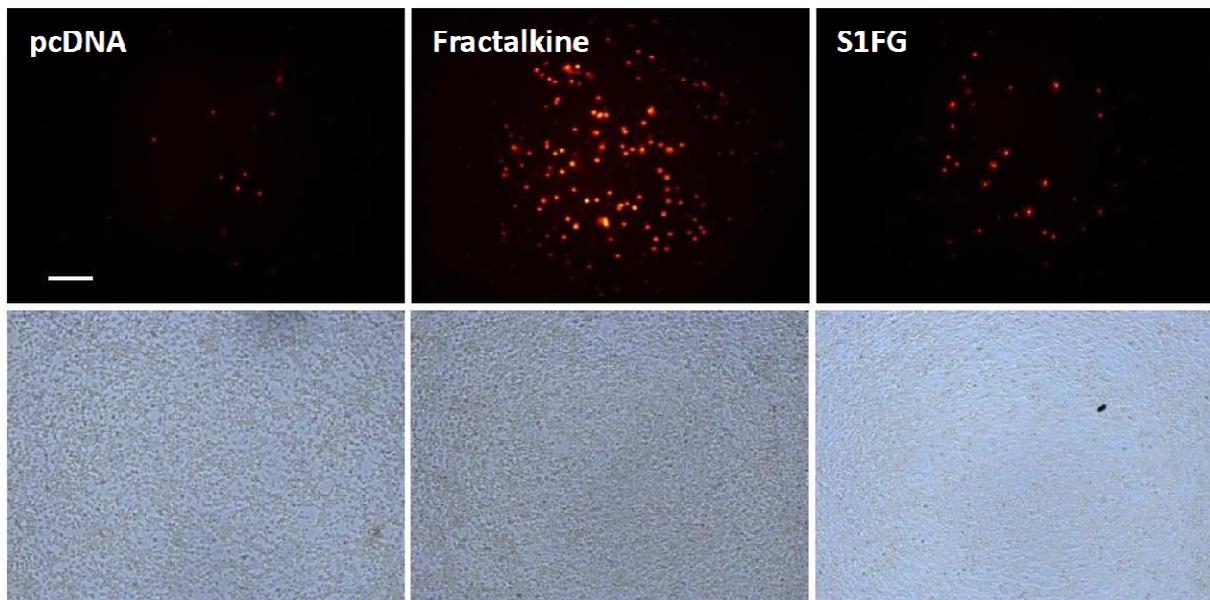


Abb. 13: *In vitro*-Adhäsion von Dil-gefärbten PMNs auf transfizierten HMVECs unter statischen Bedingungen. Obere Reihe: PMNs(rot), untere Reihe: Endothelzellrasen (Phasenkontrastaufnahme). Deutlich höhere Adhäsion inflammatorischer Zellen an Fractalkine als an S1FG. Der Endothelzellrasen war in allen Experimenten ungefähr gleich dicht. (Länge des Striches: 50 μ m)

Zunächst wurde die PMN-Adhäsion an verschiedenen Adhäsionsmolekülen in Mikrotiterplatten ohne Schubspannung untersucht. Hierbei zeigte sich, dass auf mit S1FG transfizierten Endothelzellen mehr PMNs adhären als an mock-transfizierten Kontrollen. Dennoch war die Zahl adhärrierender PMNs immer noch signifikant geringer als an dem vergleichbaren Adhäsionsmolekül Fractalkine (17,9 cells/lpf \pm 1,5 (pcDNA) vs. 67,9 cells/lpf \pm 8,1 (Fractalkine) vs. 42,6 cells/lpf \pm 3,6, $p < 0$ (S1FG); $p < 0,01$ für S1FG vs. pcDNA und wt-Fractalkine; s. Abb. 13.; Abb. 14:)

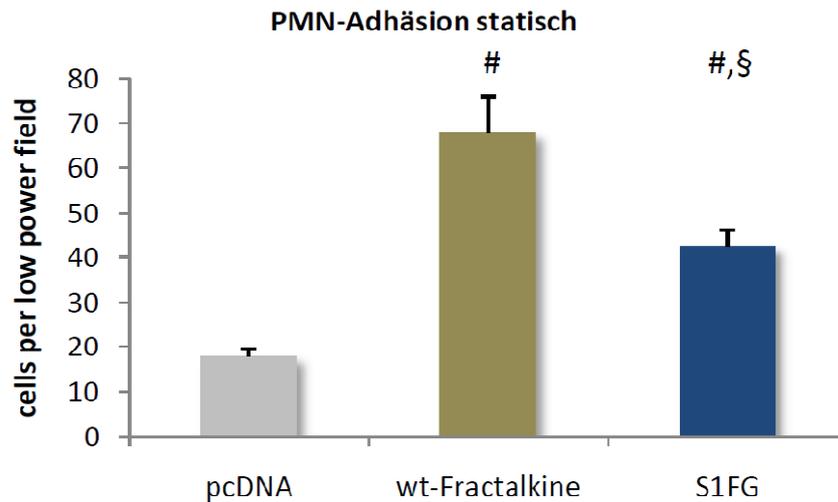


Abb. 14: Adhärierende PMNs an transfizierten HMECs unter statischen Bedingungen. Es zeigte sich zwar eine höhere Adhäsion von PMNs an S1FG, die allerdings immer noch signifikant geringer war als die PMN-Adhäsion an Fractalkine (Daten als Mittelwert \pm SEM; #: $p < 0.01$ vs. pcDNA; §: $p < 0.01$ vs. wt-Fractalkine)

3.2 Adhäsion unter Schubspannung

Um zu untersuchen, über welchen Teil des Rekrutierungsmechanismus die S1FG-vermittelte Adhäsion von Zellen *in vitro* und *in vivo* genau wirkt, wurden Adhäsionsversuche unter einer Schubspannung von 1 dyn/cm^2 durchgeführt, bei denen THP-1-Zellen über S1FG- oder GFP-transfizierte HUVECs superfundiert wurden. Dabei wurden rollende und fest anhaftende Zellen gezählt (Beispielbilder aus den Videos s. Abb. 15:).

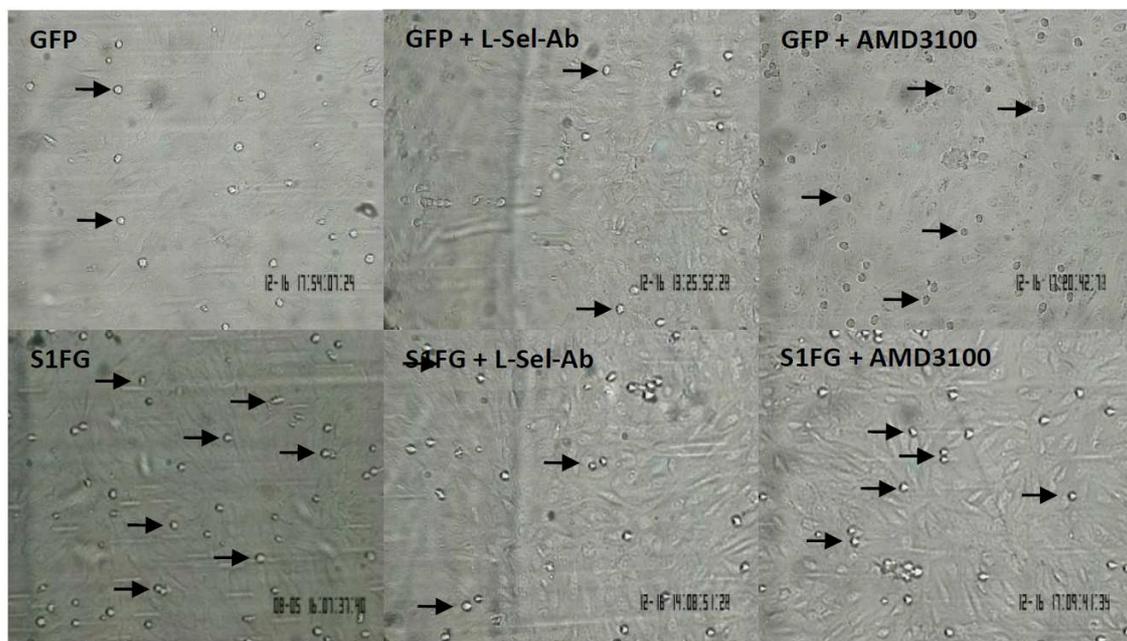


Abb. 15: Repräsentative Beispielbilder aus den Videoaufnahmen der Adhäsionsversuche unter Schubspannung (Schwarze Pfeile: Beispiele für adhärierende THP-1-Zellen).

Es zeigte sich, dass die Anzahlen rollender Zellen auf jeweils GFP- oder S1FG-transfizierten HUVECs vergleichbar waren, auf S1FG-transfizierten HUVECs jedoch signifikant mehr THP-1-Zellen fest haften blieben.

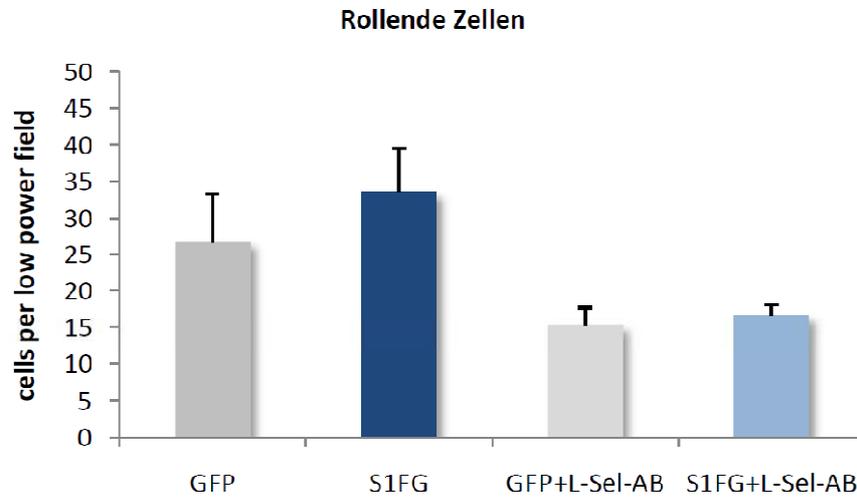


Abb. 16: Rollende THP-1-Zellen auf GFP- oder S1FG-transfizierten HUVECs. Wo angegeben, Zugabe von blockierendem Antikörper gegen L-Selektin (Daten als Mittelwert \pm SEM; keine signifikanten Unterschiede).

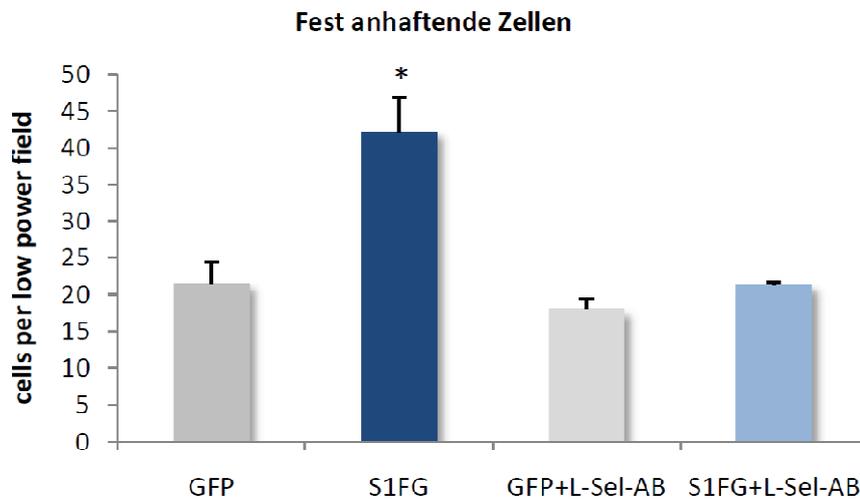


Abb. 17: Festhaftende THP-1-Zellen auf GFP- oder S1FG-transfizierten HUVECs. Wo angegeben, Zugabe von blockierendem Antikörper gegen L-Selektin (Daten als Mittelwert \pm SEM; *: $p < 0.05$ für S1FG gegen alle anderen Gruppen).

Zur Untersuchung der Ursachen dieses Effekts wurde den THP-1-Zellen ein blockierender Antikörper gegen L-Selektin zugegeben. Zugabe des Antikörpers reduzierte die Anzahl auf S1FG-transfizierten HUVECs haftenden Zellen auf Kontrollniveau. Die Anzahl rollender Zellen war in beiden Gruppen gleich, tendenziell leicht unterhalb des Niveaus der Kontrolle ohne Antikörper (Rollende Zellen: 26,7 cells/lpf \pm 6,45 (GFP) vs. 33,5 cells/lpf \pm 6,01 (S1FG) vs. 15,3 cells/lpf \pm 2,42 (GFP+L-Sel-AB) vs. 16,7 cells/lpf \pm 1,44 (S1FG+L-Sel-AB), $p = n.s.$, s. Abb. 16.; Anhaftende Zellen: 21,5 cells/lpf \pm 2,80 (GFP) vs.

42,3 cells/lpf \pm 4,64 (S1FG) vs. 18,0 cells/lpf \pm 1,41 (GFP+ L-Sel-AB) vs. 21,3 cells/lpf \pm 0,27 (S1FG+L-Sel-AB), $p < 0.05$ für S1FG vs. alle anderen Gruppen, s. Abb. 17:).

Ebenso wurden die THP-1-Zellen vor Superfusion mit AMD3100 inkubiert.

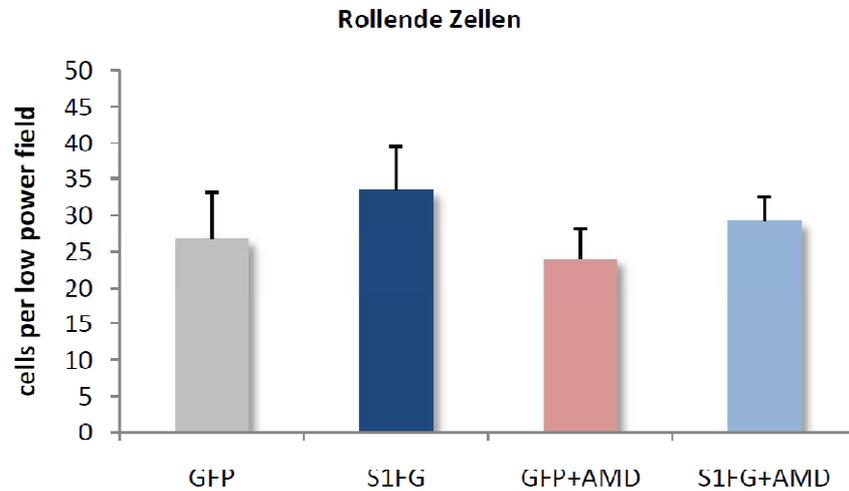


Abb. 18: Rollende THP-1-Zellen auf S1FG- oder GFP-transfiziertem Endothel. Wo angegeben, Vorinkubation der THP-1-Zellen mit AMD3100 (Daten als Mittelwert \pm SEM; keine signifikanten Unterschiede).

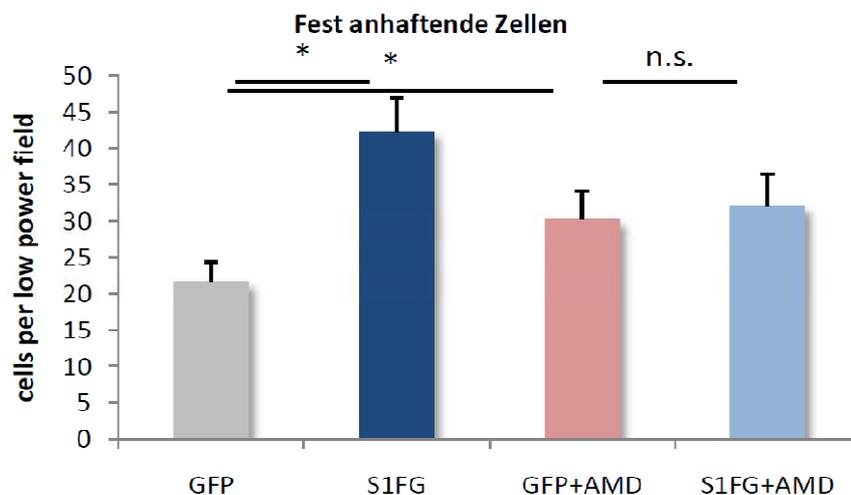


Abb. 19: Fest haftende THP-1-Zellen auf S1FG- oder GFP-transfiziertem Endothel. Wo angegeben, Präinkubation der THP-1-Zellen mit AMD3100 (Daten als Mittelwert \pm SEM; *: $p < 0,05$; n.s.: kein signifikanter Unterschied).

Die Anzahl nach dieser Vorbehandlung auf S1FG-transfiziertem Endothel haftender Zellen reduzierte sich tendenziell, ohne dass eine statistische Signifikanz des Unterschieds erreicht wurde. Der Unterschied zur Anzahl auf untransfiziertem Endothel haftender Zellen verlor allerdings ebenfalls seine Signifikanz. (Rollende Zellen: 26,7 cells/lpf \pm 6,45 (GFP) vs. 33,5 cells/lpf \pm 6,01 (S1FG) vs. 24,0 cells/lpf \pm 4,23 (GFP+AMD) vs. 29,2 cells/lpf \pm 3,44 (S1FG+AMD), $p = n.s.$, s. Abb. 18.; Anhaftende Zellen:

21,5 cells/lpf \pm 2,80 (GFP) vs. 42,3 cells/lpf \pm 4,64 (S1FG) vs. 30,2 cells/lpf \pm 3,84 (GFP+AMD) vs. 32,0 cells/lpf \pm 4,44 (S1FG+AMD), $p < 0,05$ für S1FG vs. GFP und $p < 0,05$ für GFP vs. GFP+AMD, s. Abb. 19:)

Nach Superfusion mit AMD3100-präinkubierter THP-1-Zellen wurden jedoch die Kanäle mit Medium unter relativ hohem Fluss gespült, was dazu führte, dass eine relativ hohe Schubspannung auf das Endothel und die bereits anhaftenden THP-1-Zellen ausgeübt wurde. Die Anzahl der sich darunter ablösenden THP-1-Zellen wurde als Anteil der vor Applikation der hohen Schubspannung anhaftenden Zellen ausgedrückt und verglichen.

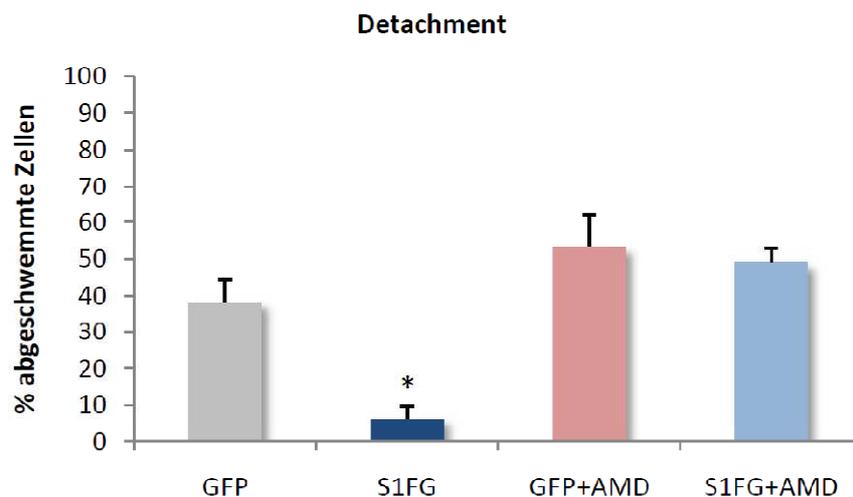


Abb. 20: Prozentualer Anteil nach 2 Minuten anhaltender Schubspannung von 8 dyn/cm² abgeschwemmter THP-1-Zellen an allen vorher fest anhaftenden Zellen im jeweiligen Bildausschnitt (Daten als Mittelwert \pm SEM; *: $p < 0,05$ für S1FG vs. alle anderen Gruppen).

Hierbei zeigte sich, dass auf S1FG-transfiziertem Endothel ein signifikant höherer Anteil der haftenden Zellen in der Lage ist, dem hohen Fluss zu widerstehen, als auf GFP-transfiziertem Endothel. Wurden die superfundierten Zellen zuvor mit AMD3100 behandelt, führte dies zur Aufhebung des Effekts. (Anteil abgelöster Zellen nach 2 Minuten 8 dyn/cm² Schubspannung: 38,3% \pm 5,97 (GFP) vs. 6,3% \pm 3,26 (S1FG) vs. 53,2% \pm 8,70 (GFP+AMD) vs. 49,0% \pm 3,96 (S1FG+AMD), $p < 0,05$ für S1FG vs. alle anderen Gruppen, s. Abb. 20:)

3.3 SDF-1-Expression *in vivo*

Zum Nachweis der *in vivo* Expression des S1FG-Konstruktes wurde die Verteilung der SDF-1-Expression in der Muskulatur anhand immunhistochemischer Färbungen untersucht.

Obwohl sich das endogene SDF-1 auch im unbehandelten Tier anfärbte, zeigte sich nach S1FG-Transfektion eine deutliche Gruppierung der Fluoreszenz um das mit PECAM-1 markierte Kapillarendothel welche mit der S1FG-Expression korrelieren würde (s. Abb. 21:).

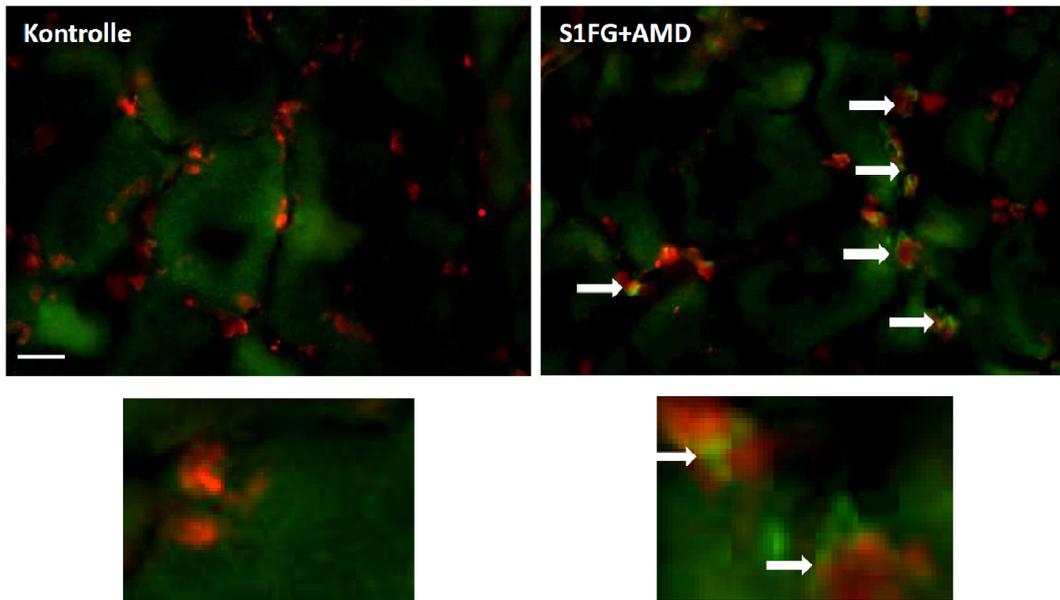


Abb. 21: Immunhistochemischer Nachweis von SDF-1 (grün) und PECAM-1 (rot). Im mit S1FG vorbehandelten Tier war SDF-1 in der Nähe des PECAM-1 lokalisiert (Pfeile), im Kontrolltier zeigte sich eine eher diffuse Anfärbung (Länge des Striches: 20 μ m). Untere Reihe: Ausschnittsvergrößerung.

3.4 Monozytenadhäsion im Ischämiegebiet

In Kurzzeitversuchen wurde die Anzahl der Monozyten im Ischämiegebiet untersucht. Die Muskeln wurden dazu mit der α -Naphthylacetat-Esterase-Methode angefärbt (s. Abb. 22:).

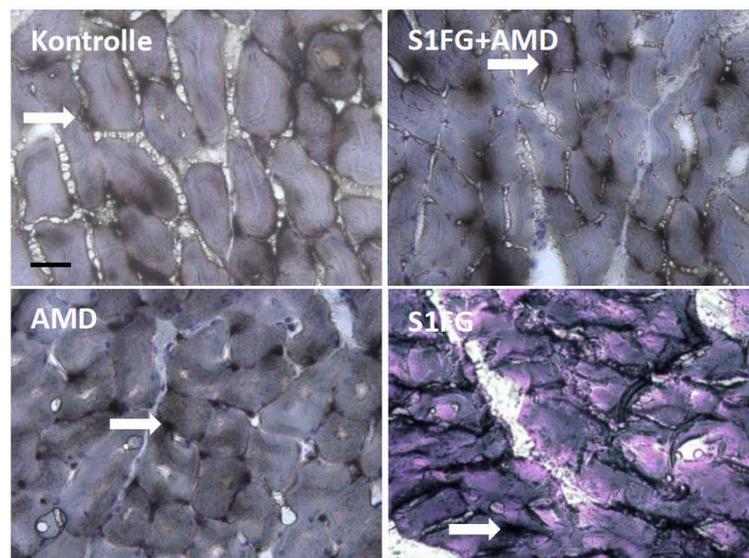


Abb. 22: Repräsentative Beispiele für die α -Naphthylacetat-Esterase-Färbung. Monozyten sind braun-schwarz (weiße Pfeile: Beispiele), Muskelfasern bläulich angefärbt. (Länge des Striches: 50 μ m)

Hier zeigten sich in der S1FG+AMD-Gruppe signifikant mehr Monozyten als in der Kontrollgruppe. Ebenso bestand ein signifikanter Unterschied zur S1FG-Gruppe (26,5 Mono/hpf \pm 0,87 (Kontrolle(K)) vs. 33,9 Mono/hpf \pm 1,80 (S1FG+AMD(K)) vs. 31,8 Mono/hpf \pm 1,80 (AMD(K)) vs. 25,6 Mono/hpf \pm 1,48 (S1FG(K)); $p < 0,01$ für S1FG+AMD(K) vs. Kontrolle(K) und S1FG(K); s. Abb. 23:).

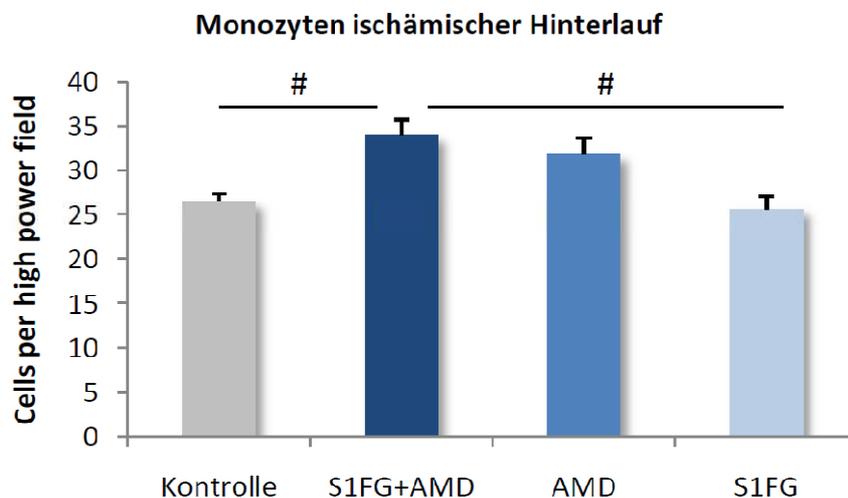


Abb. 23: Quantifizierung der Monozyten im ischämischen Hinterlauf mittels α -Naphthylacetat-Esterase-Färbung: Zwar geringe, aber dennoch signifikante Unterschiede zeigten sich zwischen S1FG+AMD(K) und der Kontrollgruppe bzw. S1FG(K). (Daten als Mittelwert \pm SEM; #: $p < 0,01$)

3.5 Funktioneller Effekt von S1FG und AMD3100

3.5.1 Allgemeines

Der funktionelle Effekt der jeweiligen Behandlung wurde in Langzeitversuchen anhand von Kapillarwachstum, Kollateralenwachstum und Perfusionsmessungen untersucht und verglichen.

3.5.2 Kapillarwachstum

Das Wachstum der Kapillargefäße als Parameter der Angiogenese wurde mittels Alkalische-Phosphatase-Färbung und PECAM-1-Färbung untersucht (s. Abb. 24.; Abb. 25:). Verglichen wurde die durchschnittliche Anzahl der Kapillaren pro Muskelfaser im ischämischen Unterschenkel.

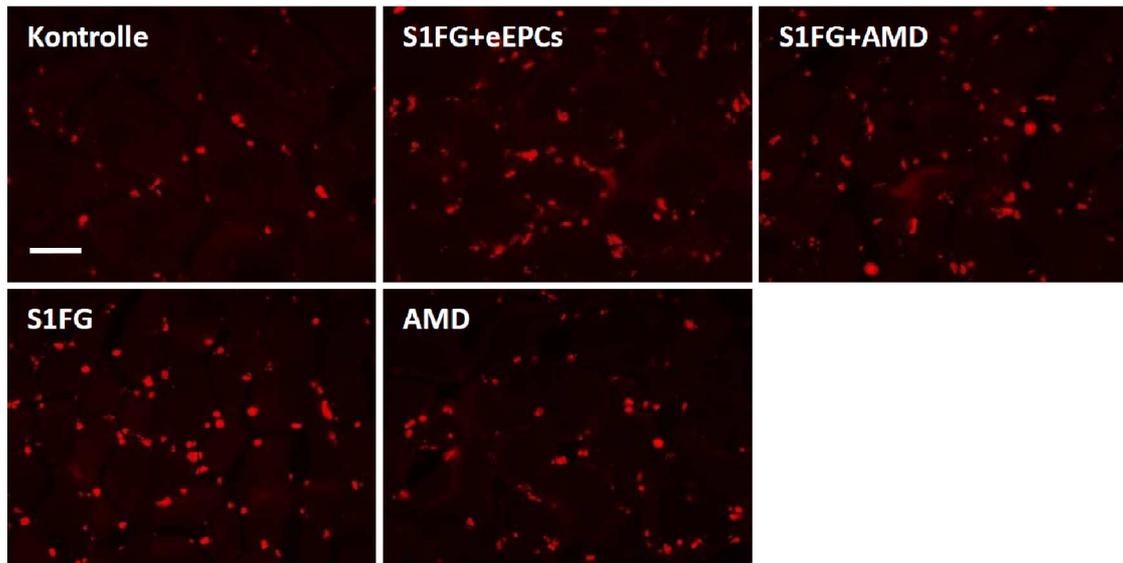


Abb. 24: Repräsentative Beispiele für Kapillarwachstum in der Unterschenkelmuskulatur (PECAM-1-Färbung; Länge des Striches: 50 μ m)

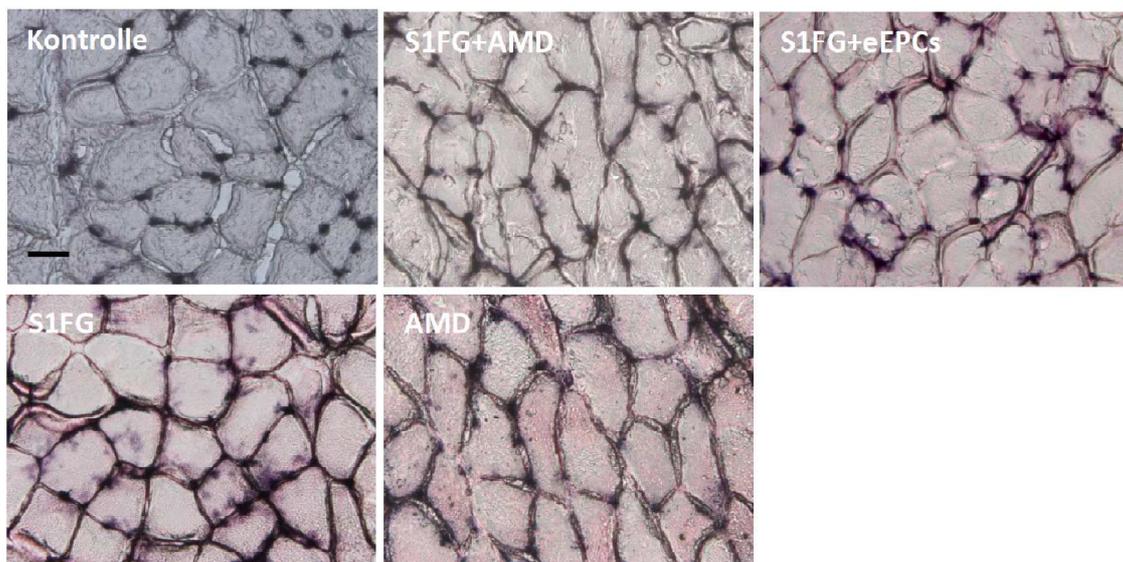


Abb. 25: Repräsentative Beispiele für Kapillarwachstum in der Unterschenkelmuskulatur. Kapillaren sind schwarz-braun, Muskelfasern rötlich angefärbt (AP-Färbung; Länge des Striches: 50 μ m)

Hier lag die Kapillardichte in der S1FG+AMD-Gruppe auf dem Niveau der S1FG+eEPCs und signifikant über Kontrollniveau (1,30 K/Mf \pm 0,08 (Kontrolle) vs. 1,87 K/Mf \pm 0,11 (S1FG+eEPCs) vs. 1,88 K/Mf \pm 0,09 (S1FG+AMD); $p < 0.01$ für Kontrolle vs. S1FG+eEPCs und S1FG+AMD; s. Abb. 26:). Applikation von S1FG oder AMD3100 alleine führte zu keinem signifikanten Effekt, weder gegenüber der Kontrollgruppe, noch gegenüber S1FG+AMD. (1,88 K/Mf \pm 0,09 (S1FG+AMD) vs. 1,75 K/Mf \pm 0,19 (S1FG) vs. 1,52 K/Mf \pm 0,12 (AMD); Abb. 27:)

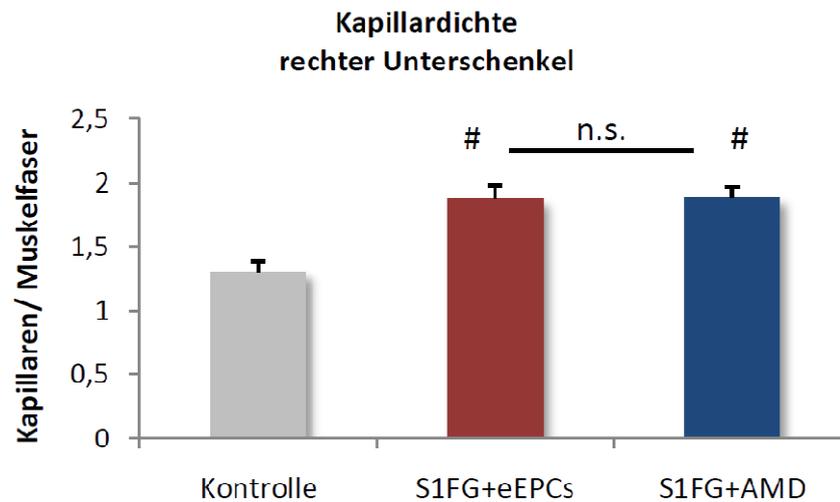


Abb. 26: Durchschnittliche Kapillardichte im Unterschenkel des ischämischen Hinterlaufs. S1FG+AMD führte zu einer signifikanten Steigerung des Kapillarwachstums. Dieses lag auf dem gleichen Niveau wie in der S1FG+eEPCs-Gruppe (Daten als Mittelwert \pm Standardfehler; #: $p < 0.01$ vs. Kontrolle).

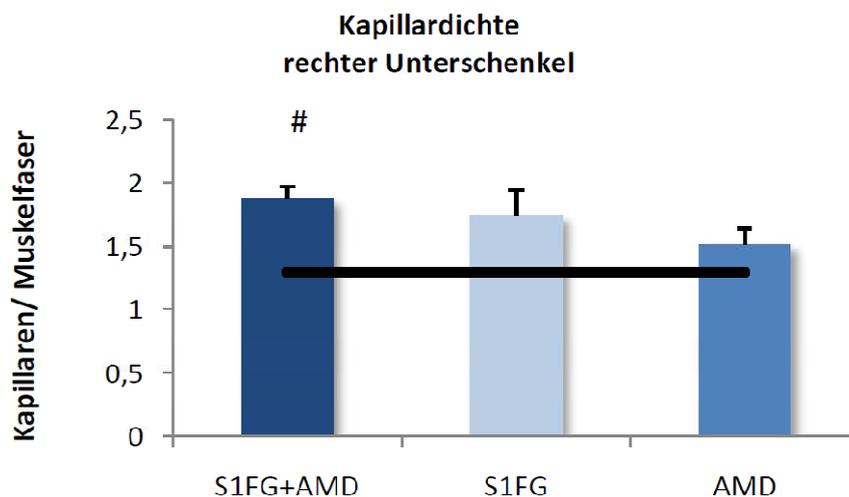


Abb. 27: Durchschnittliches Verhältnis von Kapillaren zu Muskelfasern im Unterschenkel des ischämischen Hinterlaufs. Im Vergleich zwischen Anwendung von S1FG oder AMD3100 alleine zeigten sich nur leichte Tendenzen im Vergleich zur Kombination beider Agenzien. (Schwarze Querlinie: Kontrollniveau; Daten als Mittelwert \pm Standardfehler; #: $p < 0.01$ vs. Kontrolle)

3.5.3 Kollateralenwachstum

Als Parameter der Arteriogenese wurde das Kollateralwachstum während der Versuchsdauer bestimmt. Dazu wurden an Tag 7 und Tag 35 Angiographien durchgeführt (s. Abb. 28:), ein vordefiniertes Gitter über die jeweils besten Bilder beider Angiographien gelegt und die Kreuzungspunkte der in der Angiographie sichtbaren Kollateralen mit dem Gitter gezählt. Die prozentuale Zunahme der Kreuzungspunkte wurde ausgewertet.

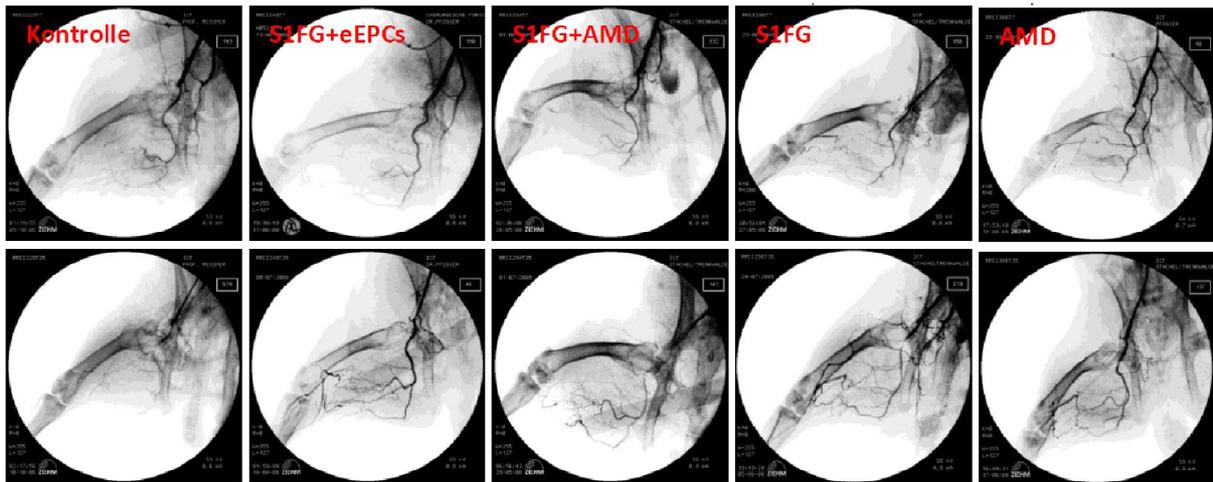


Abb. 28: Repräsentative Angiographiebilder; Obere Reihe Tag 7, untere Reihe jeweils Tag 35 des gleichen Tieres.

Bei Kontrolltieren kam es nach Tag 7 zu fast keinem Wachstum von Kollateralen mehr. Die Applikation von S1FG und AMD3100 jedoch führte zu signifikant gesteigerter Kollateralenbildung. Der durch Gabe von AMD3100 nach Vorbehandlung des Ischämiegebietes mit S1FG erzielte Effekt war dabei genauso stark wie der Effekt einer Applikation von eEPCs nach entsprechender Vorbehandlung ($104,5\% \pm 4,88$ (Kontrolle) vs. $200,6\% \pm 12,72$ (S1FG+eEPCs) vs. $195,1\% \pm 6,0$ (S1FG+AMD); $p < 0,01$ für Kontrolle vs. S1FG+AMD und S1FG+eEPCs; s. Abb. 29).

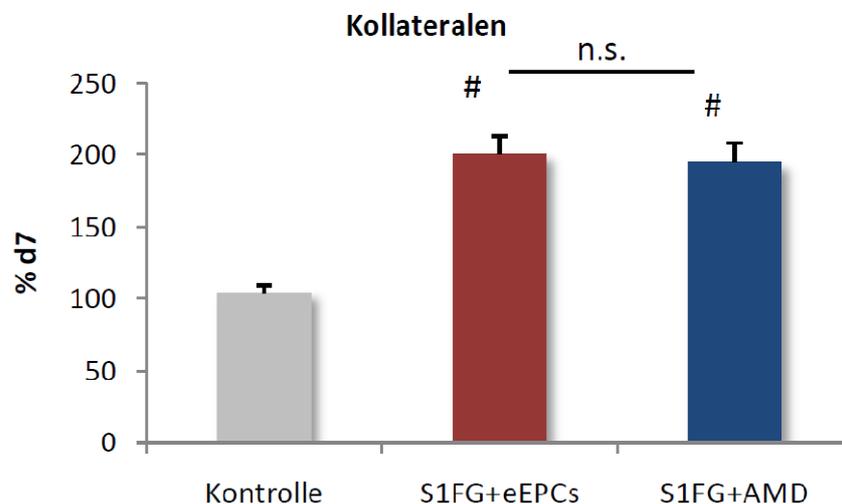


Abb. 29: Kollateralenwachstum im ischämischen Hinterlauf. Die Kombination von S1FG und AMD3100 führte zu einer signifikanten Steigerung des Kollateralwachstums im Vergleich zur Kontrolle. Der Effekt war dabei ähnlich stark wie bei Applikation von eEPCs nach S1FG-Transfektion. (Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM; #: $p < 0,01$ vs. Kontrolle)

Im Gegensatz dazu hatte die alleinige Transfektion des Ischämiegebietes mit S1FG ohne weitergehende Behandlung keinen signifikanten Einfluss auf das Kollateralenwachstum. Die Gabe von AMD3100 ohne Vorbehandlung führte zwar zu gegenüber der Kontrolle signifikant stärkerem

Wachstum, der Effekt war jedoch immer noch signifikant geringer als bei einer Kombination von S1FG und AMD3100 (104,5 %d7 ±4,88 (Kontrolle) vs. 195,1 %d7 ±6,0 (S1FG+AMD) vs. 122,3 %d7 ±3,35 (S1FG) vs. 146,1 %d7 ±10,56 (AMD); p<0,01 für S1FG+AMD vs. Kontrolle und AMD vs. Kontrolle, p<0,05 für S1FG und AMD; s. Abb. 30:).

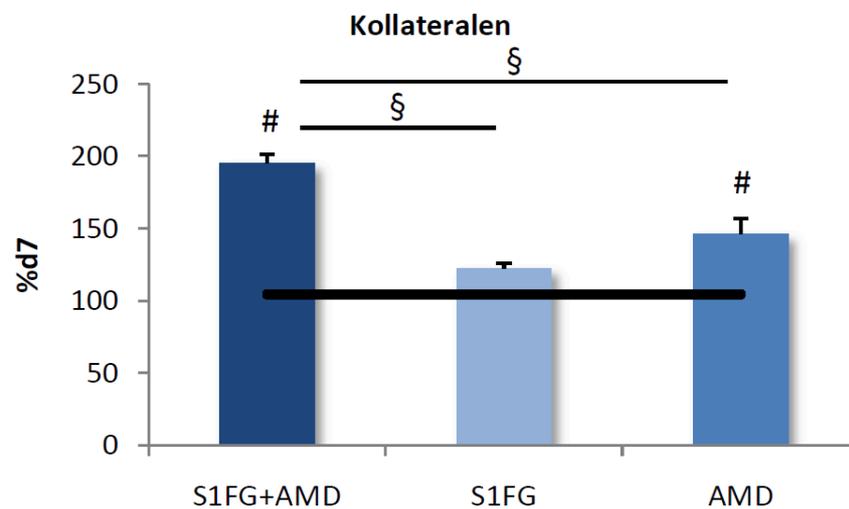


Abb. 30: Kollateralenwachstum im ischämischen Hinterlauf. Die Kombination von S1FG mit AMD3100 führte zu signifikant stärkerem Kollateralwachstum als die Applikation eines der Kombinationspartner alleine. (Schwarze Querlinie: Kontrollwert; Daten dargestellt als Mittelwert ± SEM; #: p<0.01 vs. Kontrolle; §: p<0.05).

3.5.4 Perfusion

3.5.4.1 Cinedensitometrie

Zur Beurteilung der Durchblutung der ischämischen Extremität wurde zunächst die Cinedensitometrie herangezogen. Dabei wurde in den Angiographiefilmen die Anzahl der Einzelbilder bestimmt, die das Kontrastmittel benötigte, um –bei konstanter Injektionsgeschwindigkeit- vom Leistenband zum Kniespalt zu gelangen. Die prozentuale Verbesserung dieser Zahl zwischen den Angiographien an Tag 7 und Tag 35 wurde zur Beurteilung des Blutflusses im Bein verwendet.

Auch hier kam es in der Kontrollgruppe nach Tag 7 zu keiner weiteren Steigerung der Durchblutung. Die Kombination aus S1FG-Transfektion und anschließender AMD3100-Applikation führte dagegen zu einer signifikanten Steigerung der Durchblutung im Vergleich zur Kontrolle. Der erzielte Wert war dabei wieder mit der durch die Applikation exogener eEPCs nach S1FG-Transfektion vergleichbar (102,1 %d7 ±10,4 (Kontrolle) vs. 217,2 %d7 ±7,3 (S1FG+eEPCs) vs. 193,4 %d7 ±9,8 (S1FG+AMD); p<0,01 für Kontrolle vs. S1FG+eEPCs und S1FG+AMD; s. Abb. 31:).

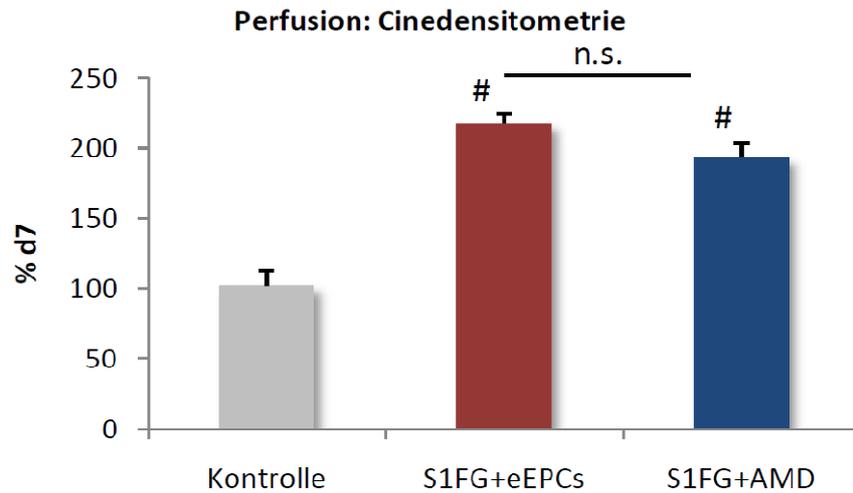


Abb. 31: Perfusion des ischämischen Hinterlaufs am Versuchsende, bestimmt mittels Cinedensitometrie. Transfektion des Ischämiegebietes mit S1FG und nachfolgende Applikation von AMD3100 führte zu signifikanter Steigerung der Durchblutung. Der Effekt der Applikation exogener Zellen nach S1FG-Transfektion war der Ausprägung nach vergleichbar. (Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung; #: $p < 0.01$ vs. Kontrolle)

Anwendung von AMD3100 oder S1FG alleine führte zu einer schwachen, jedoch signifikanten Steigerung der Perfusion im Vergleich zur Kontrolle. Kombination von S1FG und AMD3100 führte zu einer erheblichen Steigerung, dabei waren die Unterschiede sowohl zur Kontrolle als auch zu den Einzelstoffen signifikant. (102,1 %d7 \pm 10,4 (Kontrolle) vs. 193,4 %d7 \pm 9,8 (S1FG+AMD) vs. 138,8 %d7 \pm 5,81 (S1FG) vs. 130,3 %d7 \pm 3,52 (AMD); $p < 0.01$ für S1FG+AMD vs. Kontrolle, S1FG und AMD, $p < 0,05$ für Kontrolle vs. S1FG und AMD; s. Abb. 32:)

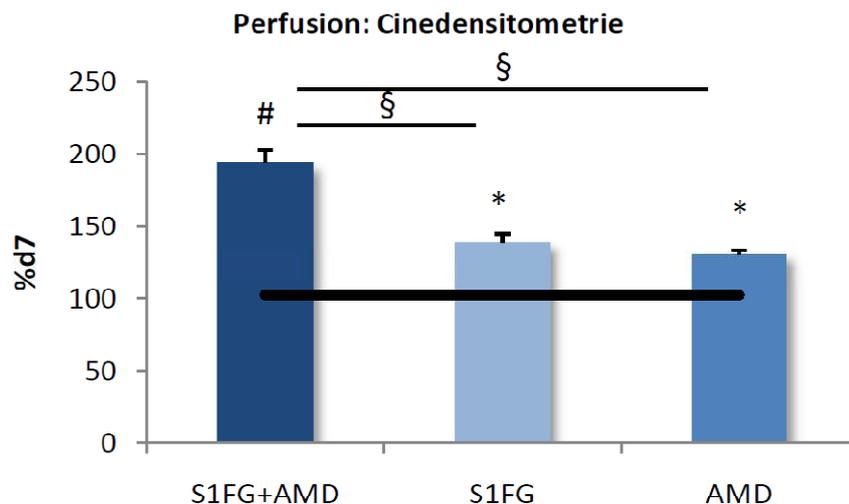


Abb. 32: Perfusion des ischämischen Hinterlaufs am Versuchsende. Einzelapplikation von S1FG oder AMD3100 führte zu bereits zu signifikanten Verbesserung, Kombination von S1FG und AMD3100 führte zu einer weiteren signifikanten Steigerung sowohl gegenüber der Kontrolle als auch gegenüber den Einzelstoffen

(Schwarze Querlinie: Kontrollwert; Daten dargestellt als Mittelwert Standardfehler; #: $p < 0.01$ vs. Kontrolle; §: $p < 0.01$, *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle).

3.5.4.2 Mikrosphärenmessung

Eine weitere zur Messung des Blutflusses verwendete Methode war die Mikrosphärenmessung. Dabei wurde das Verhältnis der Fluoreszenz zwischen ischämischem und nichtischämischen Hinterlauf jeweils an Tag 7 und an Tag 35 bestimmt und erneut die prozentuale Veränderung dieses Verhältnisses im Verlauf des Versuchs als Maß für die Durchblutung des Hinterlaufs verwendet.

Die Durchblutungsmessung mittels Mikrosphären konnte den obigen Befund, dass die kombinierte Anwendung von S1FG und AMD3100 im Vergleich zur Kontrolle zu einer signifikanten Verbesserung der Perfusionssituation im ischämischen Hinterlauf führt, klar bestätigen. Auch hier führte die Applikation von AMD3100 nach S1FG-Transfektion zu einem ähnlich starken Effekt wie die exogene Zugabe von eEPCs nach gleicher Vorbehandlung des Ischämiegebietes (120,4 %d7 ±13,9 (Kontrolle) vs. 226,2 %d7 ±40,6 (S1FG+eEPCs) vs. 213,7 %d7 ±19,3 (S1FG+AMD); $p < 0,05$ für Kontrolle vs. S1FG+eEPCs und S1FG+AMD; s. Abb. 33:).

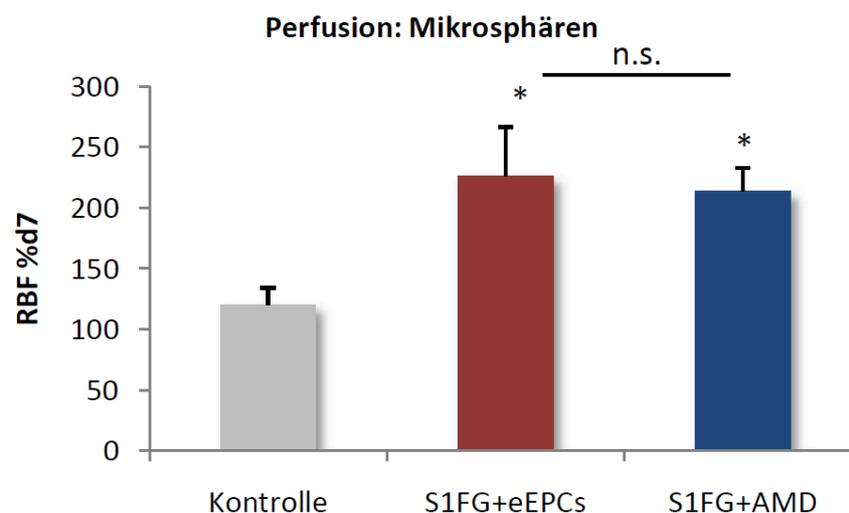


Abb. 33: Durchblutung des ischämischen Hinterlaufs, bestimmt als regionaler Blutfluss mittels fluoreszierenden Mikrosphären. Hier zeigten sich die gleichen Befunde wie bereits in der Durchblutungsmessung mittels Cinedensitometrie. (Daten als Mittelwert ± SEM; *: $p < 0.05$ vs. Kontrolle)

Ebenso zeigte sich eine erhebliche, signifikante Verbesserung der Perfusion durch kombinierte Verwendung von S1FG und AMD im Vergleich zu den Einzelgaben. Ein signifikanter Effekt der Einzelapplikation von AMD3100 oder S1FG konnte mit diesem Verfahren nicht nachgewiesen werden (120,4 %d7 ±13,9 (Kontrolle) vs. 213,7 %d7 ±19,3 (S1FG+AMD) vs. 129,3 %d7 ±25,6 (S1FG) vs. 124,3 %d7 ±27,4 (AMD); $p < 0,05$ für S1FG+AMD vs. Kontrolle, S1FG und AMD; s. Abb. 34:).

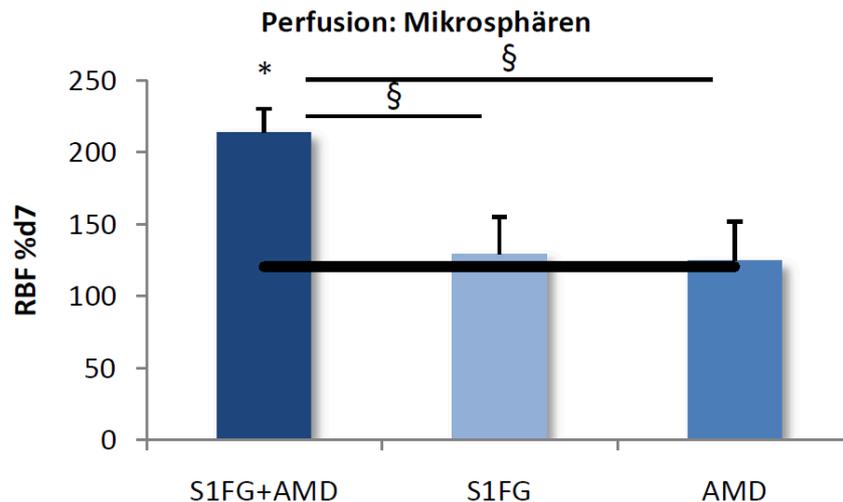


Abb. 34: Regionaler Blutfluss im ischämischen Hinterlauf, bestimmt mittels fluoreszierender Mikrosphären. Hier zeigten sich im Wesentlichen die gleichen Befunde wie in der Messung mittels Cinedensitometrie, lediglich eine sig. Steigerung von AMD und S1FG zur Kontrolle war nicht festzustellen. (Schwarze Querlinie: Kontrollwert; Daten als Mittelwert \pm SEM; *:p<0.05 vs. Kontrolle, §:p<0,05)

3.6 Funktioneller Effekt einer Peptidase-resistenten S1FG-Variante

3.6.1 Allgemeines

Um die Bedeutung von DPP-IV- oder MMP-2- vermittelter Spaltung des künstlichen Adhäsionsmoleküls zu untersuchen, wurden auch Versuche mit einer Variante des S1FG durchgeführt, die durch Änderung der Aminosäuresequenz gegen Spaltung durch DPP-IV oder MMP-2 resistent ist. Diese Variante wurde als S1FG-R bezeichnet und wurde in Versuchen anstelle von S1FG vor AMD3100-Applikation in den ischämischen Hinterlauf transfiziert.

3.6.2 Kapillarwachstum

Bei Verwendung von S1FG-R anstelle von S1FG kam es nicht zu einer signifikanten Änderung des Kapillarwachstums.

Die Kapillardichte in der S1FG-R+AMD-Gruppe war zwar ebenso signifikant höher als die in der Kontrollgruppe, zu S1FG+AMD zeigte sich allerdings kein signifikanter Unterschied (1,30 K/Mf \pm 0,08 (Kontrolle) vs. 1,88 K/Mf \pm 0,09 (S1FG+AMD) vs. 1,72 K/Mf \pm 0,12 (S1FG-R+AMD); p<0.01 für S1FG+AMD vs. Kontrolle, p<0,05 für S1FG-R+AMD vs. Kontrolle, p=0,244 für S1FG+AMD vs. S1FG-R+AMD; s. Abb. 36:).

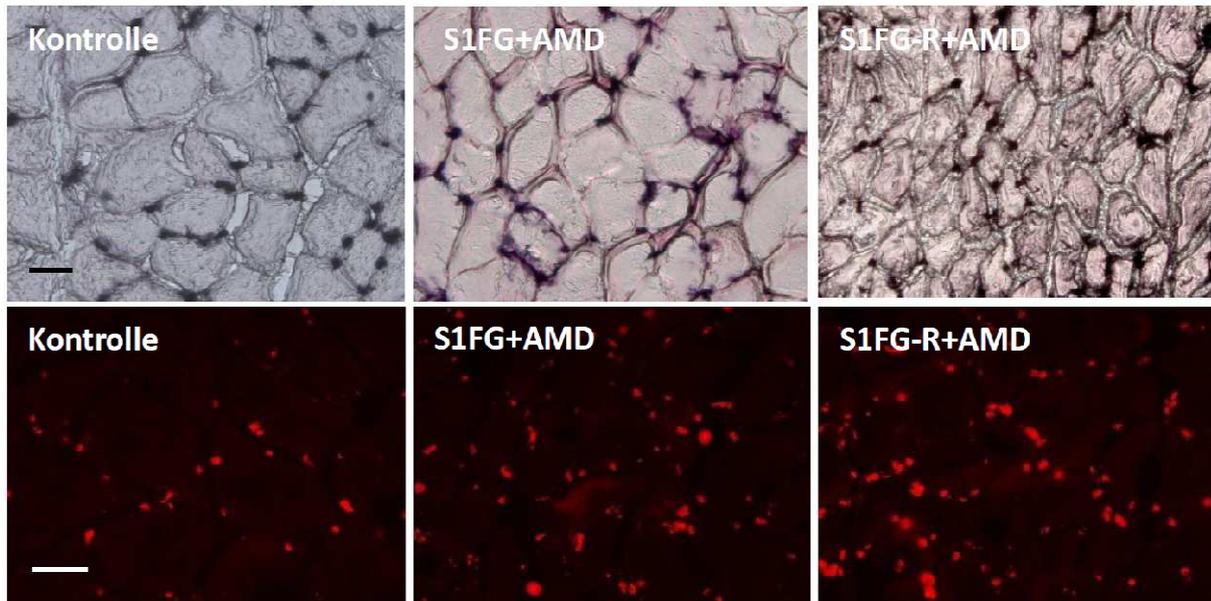


Abb. 35: Repräsentative Bilder zum Kapillarwachstum (Obere Reihe: AP-Färbung; Untere Reihe: PECAM-1-Färbung; Länge des Striches 50 μ m).

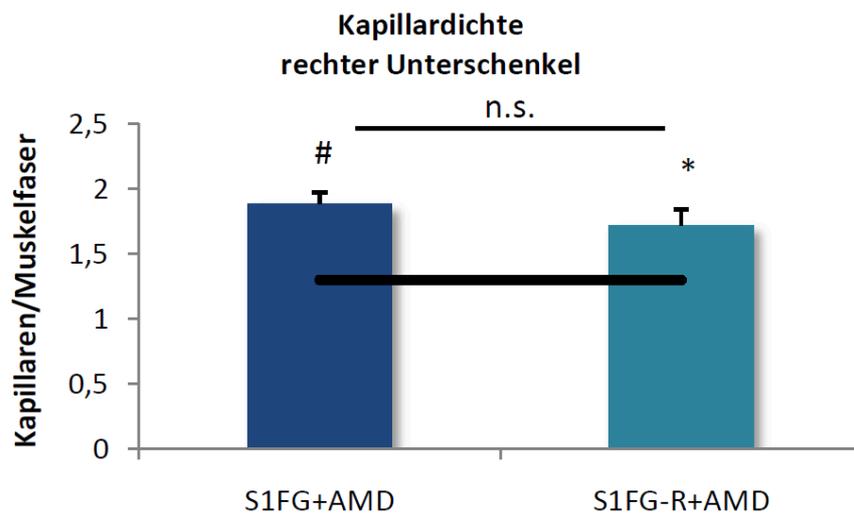


Abb. 36: Durchschnittliches Verhältnis von Kapillaren zu Muskelfasern im rechten Unterschenkel. In beiden Behandlungsgruppen fanden sich signifikant bessere Werte als in der Kontrollgruppe, zwischen S1FG und S1FG-R bestand jedoch kein signifikanter Unterschied. (schwarze Querlinie: Kontrollwert; Daten als Mittelwert \pm SEM; #: p < 0.01 vs. Kontrolle; *: p < 0.05 vs. Kontrolle)

3.6.3 Kollateralenwachstum

Das durch Transfektion von S1FG-R vor AMD3100-Applikation hervorgerufene Kollateralenwachstum war signifikant höher als in der Kontrollgruppe, jedoch geringer als nach Verwendung von nicht-resistentem S1FG+AMD3100 (104,5 % \pm 4,9 (Kontrolle) vs. 195,1 % \pm 6,0 (S1FG+AMD) vs. 178,5 % \pm 5,1 (S1FG-R+AMD); p < 0,01 für Kontrolle vs. S1FG+AMD und S1FG-R+AMD, p < 0,05 für S1FG+AMD vs. S1FG-R+AMD; s. Abb. 37:)

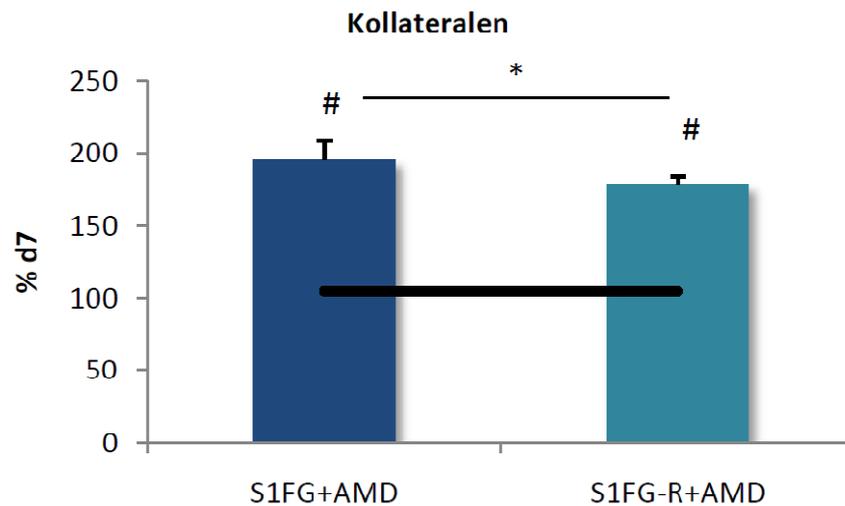


Abb. 37: Kollateralenwachstum im ischämischen Hinterlauf. In beiden Gruppen fanden sich signifikant stärkere Kollateralisierung als in der Kontrolle. Verwendung von S1FG-R statt S1FG führte zu zwar signifikant, aber quantitativ eher gering reduziertem Kollateralenwachstum. (Schwarze Querlinie: Kontrollwert; Daten als Mittelwert \pm SEM; #: $p < 0.01$ vs. Kontrolle; *: $p < 0.05$)

Repräsentative Bilder der Angiografie zeigt Abb. 38:

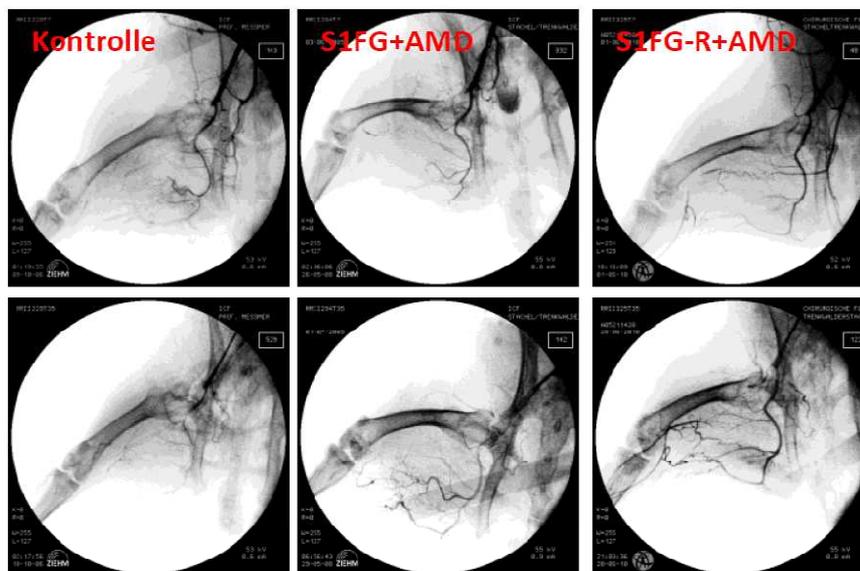


Abb. 38: Exemplarische Angiografiebilder, obere Reihe jeweils Tag 7, untere Reihe Tag 35 desselben Tieres.

3.6.4 Perfusion

Bei der Messung der Perfusion mittels Cinedensitometrie zeigte sich wiederum kein signifikanter Unterschied zwischen der Verwendung von S1FG+AMD oder S1FG-R+AMD. Die Perfusion war jedoch in beiden Gruppen immer noch signifikant besser als in der Kontrollgruppe (102,1 %d7 ±10,4 (Kontrolle) vs. 193,4 %d7 ±9,8 (S1FG+AMD) vs. 178,7 %d7 ±7,7 (S1FG-R+AMD); $p < 0,01$ für Kontrolle vs. S1FG+AMD und S1FG-R+AMD; $p = 0,1$ für S1FG+AMD vs. S1FG-R+AMD; s. Abb. 39:).

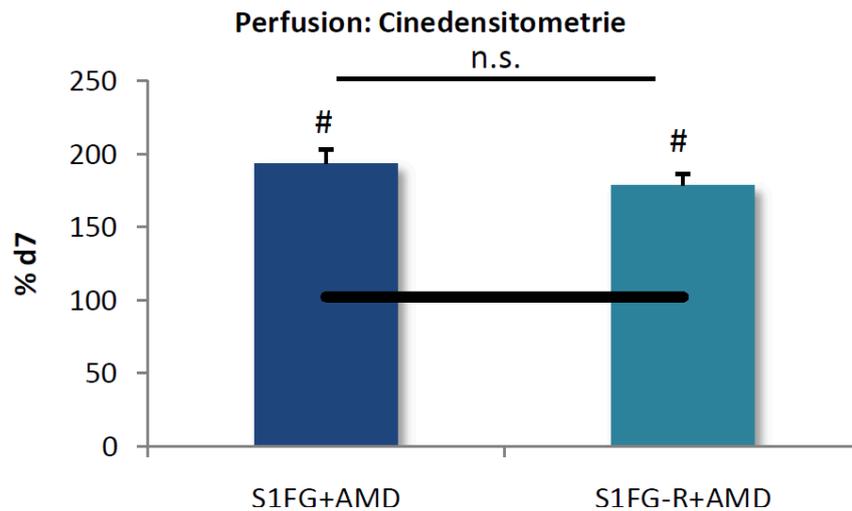


Abb. 39: Durchblutung des ischämischen Hinterlaufes bei Versuchsende. Sowohl S1FG+AMD als auch S1FG-R+AMD führten zu signifikant besserer Durchblutung als nach Kontrollbehandlung, zwischen den beiden Gruppen bestand jedoch kein Unterschied. (Schwarze Querlinie: Kontrollwert; Daten dargestellt als Mittelwert ± SEM; #: $p < 0.01$ vs. Kontrolle).

4 Diskussion

4.1 S1FG-vermittelte Adhäsion *in vitro*

Unsere Hypothese, dass S1FG aufgrund des SDF-1-Kopfes weniger inflammatorische Zellen rekrutiert als vergleichbare, natürlich vorkommende Adhäsionsmoleküle, testeten wir mit Adhäsionsversuchen unter statischen Bedingungen. Da bei diesen Versuchen das Endothel nicht zusätzlich aktiviert wird, und die für das Rollen der Zellen notwendige Schubspannung(Ley *et al.*, 2007) fehlt, wird eine recht artifizielle Situation geschaffen, in der große Teile der physiologischerweise vorkommenden Adhäsionskaskade keine große Rolle spielen.

In Vorversuchen dieser Art konnten wir beobachten, dass an S1FG signifikant mehr Zellen adhären als an Fractalkine, SDF-1-GPI, oder löslichem SDF-1, wobei dieser Befund sowohl für embryonale eEPCs als auch für adulte THP-1-Zellen galt (Götz F. *et al.*, unpublizierte Befunde). Hier konnten wir nun feststellen, dass die Anzahl an S1FG adhärerender PMNs signifikant unter der der an Fractalkine adhärerenden Zellen liegt. Dieser Befund unterstützt die therapeutische Tauglichkeit des Moleküls, da bekannt ist, dass die Rekrutierung von PMNs in Plaques eine bedeutende Rolle beim Progress der Atherosklerose spielt(Baetta *et al.*, 2010). Beispielsweise sezernieren die rekrutierten PMNs Matrix-degradierende Faktoren, die die fibröse Abdeckung stabiler Plaques ausdünnen und so dazu führen, dass die Wahrscheinlichkeit einer Plaqueruptur zunimmt(Drechsler *et al.*, 2011).

Um den genauen Wirkungsmechanismus des S1FG auch unter Schubspannung zu beobachten, führten wir Adhäsionsversuche in Flusskammern durch. Dabei wurden HUVECs in kommerziell verfügbaren Kammern mit S1FG oder GFP transfiziert, mit TNF- α stimuliert, und schließlich mit THP-1-Zellen bei einer Schubspannung von 1 dyn/cm² superfundiert. Diese Art von Versuchen wird schon seit langem durchgeführt(Moore *et al.*, 1995, Ostrovsky *et al.*, 1998, Patel *et al.*, 1995), und die Induktion von Selektinen und Integrinen auf HUVECs durch TNF- α ist ebenfalls gut untersucht(Daxecker *et al.*, 2002, Mako *et al.*, 2010). Die monozytären THP-1-Zellen sind ebenfalls als Modell geeignet, da sie CXCR4 exprimieren(Apostolakis *et al.*, 2010, Gul *et al.*, 2010, Konopka *et al.*, 2002), und Monozyten eine bedeutende Rolle in der Angiogenese und Arteriogenese spielen (s. Kap. 4.6). Die recht geringe Schubspannung ist zwar eher in kleinen postkapillären Venulen zu finden, die jedoch für die Adhäsion zirkulierender Blutzellen der wahrscheinlichste Ort sind. Daher kann das Modell durchaus geeignet erscheinen, Adhäsionsvorgänge zu beobachten(Luscinskas *et al.*, 1996).

Es zeigte sich, dass auf S1FG-transfizierten HUVECs im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant mehr THP-1-Monozyten fest adhärerten, während die Anzahl rollender Zellen in beiden Gruppen in etwa gleich war (s. Kap. 3.2). Um festzustellen, ob S1FG direkt feste Adhäsion vermittelt, oder das Rollen so stark steigert, dass darüber mehr Zellen haften, wurde ein Antikörper gegen L-Selektin zugegeben, um das Selektin-vermittelte Rollen zu reduzieren (Luscinskas *et al.*, 1996). Hierdurch wurde die Anzahl fest adhärrender Zellen auf S1FG-transfiziertem Endothel auf Kontrollniveau gesenkt (s. Kap. 3.2).

Ebenso wurde durch Zugabe von AMD3100 zu den superfundierten Zellen spezifisch die SDF-1-CXCR4-Interaktion im Adhäsionsprozess unterbrochen. Interessanterweise führte dies nicht zu einer wesentlichen Veränderung der Anzahl rollender oder fest haftender Zellen (s. Kap. 3.2). In einem nächsten Schritt wurde daher die Festigkeit der THP-1-Endothel-Interaktion überprüft, indem bereits adhärrende Zellen einer hohen Schubspannung ausgesetzt wurden, und die Anzahl der dadurch abgeschwemmten, bzw. der danach verbleibenden Zellen bestimmt wurde (Dillmann *et al.*, 2009). Hier zeigte sich, dass auf S1FG-transfiziertem Endothel die Interaktion wesentlich widerstandsfähiger als auf untransfiziertem Endothel erscheint, ein Effekt, der durch spezifische Hemmung der SDF-1-CXCR-4-Achse komplett aufgehoben wird (s. Kap. 3.2).

Die S1FG-Wirkung kann also durch eine Unterbrechung des Rollens, welches eine Voraussetzung für Zellarrest ist (Ley *et al.*, 2007), aufgehoben werden. Zusätzlich führt eine Ausschaltung des SDF-1 zwar zu einer qualitativen Änderung der Adhäsion, nicht jedoch zu einer quantitativen, was eine Beteiligung des SDF-1-Kopfes an der initialen THP-1-Endothel-Interaktion unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Ein funktionierendes Zellrollen mit adäquatem Abbremsen der zirkulierenden Zellen scheint also Voraussetzung für die S1FG-vermittelte Adhäsion zu sein. Es kommt dann durch eine SDF-1-CXCR4-Interaktion zu einer Festigung der Adhäsion, welche für eine Rekrutierung der Zellen ins Gewebe ebenfalls von großer Bedeutung ist (Ley *et al.*, 2007). Eine denkbare Grundlage für diesen Effekt wäre beispielsweise eine Steigerung der Intergrinavidität durch CXCR4-Aktivierung (Peled *et al.*, 1999). Unberücksichtigt bleibt in diesem Modell allerdings die Rolle der Thrombozyten, die *in vivo* in bedeutendem Maße an der Zellrekrutierung beteiligt sind (Langer *et al.*, 2006, Massberg *et al.*, 2006, Stellos *et al.*, 2007).

4.2 Das Kaninchenmodell der chronischen Hinterlaufischämie

Zur Untersuchung des funktionellen Effekts der Behandlung wurde das in unserer Arbeitsgruppe seit langem etablierte Kaninchenmodell der chronischen Hinterlaufischämie verwendet (Kupatt *et al.*, 2005, Pfosser *et al.*, 2009, Pfosser *et al.*, 2005).

Dabei wird ein Zustand der chronischen Ischämie dadurch erreicht, dass eine Femoralarterie exzidiert wird und sieben Tage später die Behandlung vorgenommen wird. Der Zustand der Ischämie kann als chronisch bezeichnet werden, da ohne therapeutische Intervention keine weitere Verbesserung der Kollateralisierung und Perfusion mehr erreicht wird (s. z.B. Kontrollwerte in Abb. 29.; Abb. 31.; Abb. 32:). Weiterhin kann von einer Störung der Progenitorzellfunktion ausgegangen werden, da eine alleinige Steigerung der Zellrekrutierung mittels S1FG zu keiner signifikanten funktionellen Verbesserung führt (s. Abb. 32.; Abb. 34:). Störungen der Progenitorzellfunktion sind ebenfalls ein Kennzeichen chronischer Ischämie (Heeschen *et al.*, 2004, Hill *et al.*, 2003, Kissel *et al.*, 2007, Vasa *et al.*, 2001).

Im Vergleich zum üblichen Mausmodell (Limbourg *et al.*, 2009) bietet das hier verwendete Modell den Vorteil einer bedeutend stärkeren und chronischen Ischämie. Zusätzlich ist die lokale Applikation größerer Volumina therapeutischer Agenzien in den Hinterlauf sowie die Betrachtung des Kollateralenwachstums und der Hinterlaufperfusion allein aus technischen Gründen bedeutend einfacher. Nachteilig wirkt sich der höhere Zeit- und Materialaufwand aus, ebenso wie die im Vergleich zum Mausmodell schlechtere Beschreibung molekularer Abläufe und die schlechtere kommerzielle Verfügbarkeit entsprechender Antikörper.

Zur Evaluierung der Angiogenese wurde die Kapillardichte im ischämischen Unterschenkel mittels PECAM-1-(Page *et al.*, 1992) und AP-(Ziada *et al.*, 1984) Färbung bestimmt. Das Kollateralenwachstum als Parameter der Arteriogenese wurde mittels der Anzahl der Kreuzungspunkte mit einem standardisierten Gitter bestimmt (Asahara *et al.*, 1995). Die Änderung der Hinterlaufdurchblutung wurde sowohl mittels Cinedensitometrie (Gibson *et al.*, 1996) als auch mittels fluoreszierender Mikrosphären gemessen. Letzteres Verfahren stellt hierbei den anerkannten Goldstandard dar (Raab *et al.*, 1999), wobei wir allerdings eine sehr hohe Korrelation zwischen beiden Verfahren feststellen konnten (s. Abb. 31.; Abb. 32.; Abb. 33.; Abb. 34.; vgl. (Leberherz *et al.*, 2003)).

4.3 Funktioneller Effekt von S1FG und AMD3100

Um eine therapeutische Steigerung der Durchblutung im Ischämiegebiet zu erzielen, wurde ein künstliches Progenitorzell-Adhäsionsmolekül mittels kationischer Lipide in den ischämischen Hinterlauf transfiziert. In Vorarbeiten konnten wir zeigen, dass diese regionale Vorbehandlung des Ischämiegebietes zu einer signifikanten Steigerung der Rekrutierung retroinfundierter muriner eEPCs und darüber zu einer signifikanten Steigerung der Angiogenese, der Arteriogenese und der Perfusion des Hinterlaufs führt (Stachel G, Götz F *et al.*; unpublizierte Befunde). Hier wurde nun überprüft, ob sich die aus immunologischen wie aus logistischen (Schachinger *et al.*, 2006, Tateishi-Yuyama *et al.*, 2002) Gründen mit Schwierigkeiten behaftete Verwendung exogener Zellen durch eine Mobilisierung

knochenmarksständiger Progenitorzellen ersetzen lässt. Dabei wurde pulsatile AMD3100-Applikation als Stimulus zur Mobilisierung gewählt.

Wir konnten zeigen, dass in Bezug auf Angiogenese (s. Abb. 26:) und Arteriogenese (s. Abb. 29:), sowie konsekutiv auch im Hinblick auf Perfusion der ischämischen Gliedmaße (s. Abb. 31:, Abb. 33:) die Kombination aus S1FG und AMD3100 sich als nicht-inferior zur Verwendung von S1FG und eEPC-Retroinfusion erwiesen hat. Der durch beide Alternativen verursachte therapeutische Effekt war dabei bei Kollateralenwachstum und Perfusionssteigerung außerordentlich stark. Er übertraf auch frühere Ansätze therapeutischer Vaskulogenese, die in unserer Gruppe am gleichen Modell unter gleichen Bedingungen durchgeführt worden waren, wie Verwendung von Hsp90 (Pfosser *et al.*, 2005) oder Applikation von eEPCs ohne (Kupatt *et al.*, 2005) oder mit Vorbehandlung (Pfosser *et al.*, 2009). Interessanterweise erreichte in Bezug auf Kapillardichte die hier untersuchte Therapie zwar eine signifikante Steigerung gegenüber der Kontrolle, das bei Arteriogenese und Perfusion vorhandene Ausmaß der Verbesserung im Vergleich zu anderen Therapieregimes konnte hierbei jedoch nicht beobachtet werden.

Nach alleiniger Applikation von S1FG waren keine signifikanten Effekte auf Angiogenese oder Arteriogenese festzustellen. In Bezug auf die Perfusion zeigten sich signifikante Unterschiede in der Cinedensitometrie, in der Goldstandard-Methode der Messung mittels Mikrosphären zeigten sich zwar ähnliche Tendenzen, eine Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht. Verwendung von AMD3100 ohne Adhäsionsmolekül hingegen führte zu keiner Angiogeneseinduktion, jedoch zu einer Steigerung der Arteriogenese und der Perfusion, ein Ansatz, den auch andere Autoren verfolgten (Ohki *et al.*, 2005, Tan *et al.*, 2009). Hintergrund ist vermutlich, dass insbesondere die durch AMD3100 verstärkt mobilisierten mononukleären und monozytären Zellen (Capoccia *et al.*, 2006) die Arteriogenese befördern (Ito *et al.*, 1997). Auch hier wurde konnte mittels Cinedensitometrie die Signifikanz des Perfusionsunterschieds nachgewiesen werden, in der Mikrosphärenmessung zeigten sich immerhin klare Tendenzen. Die Vorbehandlung des Ischämiegebietes mit S1FG vor AMD-Applikation führte stets zu einer weiteren signifikanten Verbesserung der Effekte (s. Abb. 27:7, Abb. 30:, Abb. 32:, Abb. 34:).

In anderen Projekten unserer Arbeitsgruppe scheint sich dagegen zu zeigen, dass Arteriogenese im Oberschenkel des Hinterlaufs eine Folge der Angiogenese im eigentlich ischämischen Unterschenkel ist. So führt eine regionale Induktion der Angiogenese im Unterschenkel zu Arteriogenese im Oberschenkel, während umgekehrt eine Blockade der Angiogenese im Unterschenkel zum fast vollständigen Ausfall der Arteriogenese führte (Trenkwalder T, Hinkel R *et al.*; unpublizierte Befunde).

Eine Erklärung hierfür wäre, dass Angiogenese ein Faktor ist, der vorhanden sein muss um Arteriogenese anzustoßen, wobei auch ein zeitlicher Ablauf nachgewiesen wurde (Hershey *et al.*, 2001). Ab einer bestimmten Kapillardichte könnte jedoch auch das Wachstum größerer Gefäße proximal des eigentlichen Ischämiegebietes über andere Mechanismen, wie beispielsweise Monozytenrekrutierung (Ito *et al.*, 1997), wobei eine überhaupt maximal mögliche Kapillardichte in einem Muskel denkbar wäre. Ein ähnlicher Wirkmechanismus wäre auch für das hier verwendete Konzept S1FG + AMD3100 denkbar.

4.4 Mobilisierung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark

In unseren Versuchen wurde zur Mobilisierung der letztendlich therapeutisch wirksamen Progenitorzellen der CXCR4-Antagonist AMD3100 verwendet. Dabei wurde jeweils 1 mg AMD3100 an drei aufeinanderfolgenden Tagen beginnend 48 h nach S1FG-Transfektion des Hinterlaufs intraperitoneal appliziert.

Unsere Überlegung war, dass aufgrund der kurzen Wirkdauer des Stoffes (Liles *et al.*, 2003) und der pulsatischen Applikation es zu einer transienten CXCR4-Blockade kommt, die ausreichend für eine Mobilisierung der Zellen ist, ohne die –bei uns ebenfalls CXCR4-vermittelte- Rekrutierung der Zellen zu beeinträchtigen. Prinzipiell beeinträchtigt AMD3100 die CXCR4-vermittelte Funktionalität der Progenitorzellen nicht, es bestehen im Gegenteil sogar Hinweise, dass AMD3100-vermittelte Mobilisierung sogar zu einer verbesserten Migration entlang eines SDF-1-Gradienten führt (Broxmeyer *et al.*, 2005). Eine andere Studie in einem Mausmodell der akuten Hinterlaufischämie konnte jedoch keine funktionellen Unterschiede zwischen der Applikation exogener Monozyten, die mit AMD3100 und G-CSF mobilisiert worden waren, und solchen, die nicht mobilisiert worden waren, erkennen (Capoccia *et al.*, 2006). Bei kontinuierlicher Gabe kommt es jedoch zur kompletten Blockade der SDF-1-CXCR4-Achse und einer Aufhebung des angiogenetischen Effekt bis hin zur Verschlechterung der Angiogenese gegenüber der Kontrollgruppe (Jin *et al.*, 2006, Tan *et al.*, 2009). Die Verwendung einer relativ niedrigen Dosis (3x 0,4 mg/kg KG) in unseren Versuchen diente ebenfalls der Vermeidung einer komplette Blockade, wie sie andere Autoren auch bei pulsatischer Gabe ab einer bestimmten Dosierung beschrieben (Voloshin *et al.*, 2011). Zur Verwendung von AMD3100 in chronischer Ischämie oder im Kaninchenmodell wurden bisher keine Daten veröffentlicht.

Obwohl AMD3100 klinisch bereits relativ regelmäßig in der Vorbereitung zur autologen Stammzelltransplantation (Brave *et al.*, 2010) im Rahmen aggressiver zytostatischer Behandlungsschemata verwendet wird, und eine Mobilisierung CD34⁺-Zellen auch im Menschen gut

belegt ist (Lemery *et al.*, 2011, Liles *et al.*, 2003, Macfarland *et al.*, 2010), wurde der Effekt in chronischer oder akuter Ischämie in klinischen Studien bisher nicht untersucht.

Die Verwendung von G-CSF (Capoccia *et al.*, 2006) oder GM-CSF (Takahashi *et al.*, 1999) erbrachte zwar im Tiermodell ebenfalls vielversprechende Ergebnisse, bei ersten klinischen Studien bot sich jedoch ein bestenfalls uneinheitliches Bild. Es wurde erfolglos versucht, chronische myokardiale Ischämie (Hill *et al.*, 2005) zu therapieren. Bei akuter myokardialer Ischämie zeigten sich teilweise keine (Ripa *et al.*, 2006), teilweise nicht signifikante (Kueth *et al.*, 2005) und nur selten positive Ergebnisse (Ince, Petzsch, Kleine, Eckard, *et al.*, 2005, Ince, Petzsch, Kleine, Schmidt, *et al.*, 2005). Eine mögliche Ursache für die Unterschiede könnte das genaue Timing der Therapie sein (s. auch (Ripa *et al.*, 2006)), da Anhaltspunkte für einen eng regulierten zeitlichen Ablauf der Rekrutierung von Progenitorzellen bestehen (Nahrendorf *et al.*, 2007). In der Therapie der chronischen peripheren Ischämie erbrachte GM-CSF ebenso keine Erfolge (Van Royen *et al.*, 2005). Allerdings wurde im Tiermodell ein synergistischer Effekt zwischen AMD3100 und G-CSF beobachtet (Capoccia *et al.*, 2006).

Wir entschieden uns für AMD3100 aufgrund der eher zwiespältigen klinischen Ergebnisse anderer mobilisierender Agenzien. G-CSF könnte trotz effektiver Mobilisierung von CD34⁺-Zellen zu einer Inaktivierung des CXCR4 in diesen Zellen führen (Levesque *et al.*, 2003), und damit unsere Therapiestrategie konterkarieren. Ebenso scheint G-CSF die CXCR4-Expression auf mobilisierten Zellen zu verringern (Eash *et al.*, 2010). Demgegenüber stehen allerdings gute funktionelle Ergebnisse in myokardialer Ischämie bei G-CSF-Mobilisierung gemeinsam mit DPP-IV-Inhibition (Zaruba *et al.*, 2009). Ebenso gab es Anhalt für eine verstärkte inflammatorische Antwort in akuter myokardialer Ischämie durch Verwendung von GM-CSF (Naito *et al.*, 2008). Dieser Effekt könnte sowohl durch Mobilisierung von Zellen als auch durch direkte Effekte des GM-CSF auf monozytäre Zellen zustande kommen (Swirski *et al.*, 2009).

Neuere Ansätze umfassen die Verwendung einer SDF-1 β -Mutante (Tan *et al.*, 2009) als CXCR4-Antagonisten sowie eines Pepducins mit CXCR4-agonistischer Aktivität (Tchernychev *et al.*, 2010). Bei ersterem konnte bereits ein funktioneller Effekt in einem Mausmodell der akuten Hinterlaufischämie festgestellt werden, während bei letzterem nur die mobilisierten Zellpopulationen untersucht wurden.

4.5 Das künstliche Adhäsionsmolekül SDF-1-Fractalkine-GPI

Zur Steigerung der Rekrutierung der vaskulären Progenitorzellen wurde das Endothel des Ischämiegebietes lokal mit dem künstlichen Adhäsionsmolekül SDF-1-Fractalkine-GPI transfiziert. Die Transfektion wurde durch Retroinfusion eines an ein kationisches Lipid gekoppelten Plasmids

erreicht. Alleinige S1FG-Transfektion führte dabei nicht zu signifikanten funktionellen Effekten (s. Kap. 4.3).

Mittels Immunfluoreszenz konnten wir S1FG im Kapillarendothel nachweisen (s. Abb. 21; s. Kap. 3.3). In früheren Arbeiten konnten wir bereits zeigen, dass die Retroinfusion von venöser Seite her effektiv ist (Lebherz *et al.*, 2003). Interessanterweise konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die embryonale Entwicklung der Koronararterien ebenfalls vom Sinus venosus ausgeht (Red-Horse *et al.*, 2010). Die mangelnde Spezifität der hier verwendeten kationischen Lipide für Endothelzellen dürfte allerdings zu Streuverlusten führen. Eine Alternative dazu könnte die Verwendung von weitgehend endothelspezifischer AAV-Subtypen sein (Zincarelli *et al.*, 2008), oder eine Kopplung an endotheliale Antigene, wie bereits für die Lungengefäße beschrieben (Reynolds *et al.*, 2001). Weiterhin besteht die Möglichkeit modifizierter AAVs mit endotheliale Tropismus (Varadi *et al.*, 2011). Ebenso wäre es denkbar, statt einem Gentransfer eine gewisse Dosis an S1FG-Protein in das Endothel zu bringen, wobei hier in der klinischen Anwendung die Möglichkeit anaphylaktischer Reaktionen zu beachten wäre. Generell wäre eine strikt regionale Applikation durch Abflussblock einerseits und eine Absaugung des restlichen Trägermediums andererseits notwendig, was man im Großtiermodell auf Praktikabilität überprüfen müsste.

Eine gezielte Transfektion des Adhäsionsmoleküls in die ischämische Region ist allerdings unbedingt notwendig: Da auch beim Wachstum solider Tumoren Angiogenese von zentraler Bedeutung ist (Folkens *et al.*, 2009), und die Rekrutierung endothelialer Progenitorzellen eine bedeutende Rolle zu spielen scheint (Ding *et al.*, 2008, Le Bourhis *et al.*, 2010), muss die Rekrutierung der Zellen aus Sicherheitsgründen nach Möglichkeit auf das chronisch-ischämische Gebiet begrenzt werden. Im klinischen Setting könnte man malignes Wachstum als Kontraindikation für unseren Therapieansatz ansehen, um eine Verschlimmerung durch Rekrutierung von Progenitorzellen zu vermeiden (Voloshin *et al.*, 2011).

Interessanterweise gibt es auf der anderen Seite Hinweise, dass die Induktion des Wachstums funktioneller Gefäße im Primärtumor Metastasierung und infiltratives Wachstum verringern kann (Mazzone *et al.*, 2009).

Ein Problem, was sich auch durch regional begrenzte Transfektion nicht lösen lässt, wäre die S1FG-vermittelte Rekrutierung CXCR4-positiver inflammatorischer Zellen wie PMNs (Eash *et al.*, 2010, Eash *et al.*, 2009) oder proinflammatorischer Monozyten (Bernhagen *et al.*, 2007, Sanchez-Martin *et al.*, 2011) in atherosklerotische Plaques. Atherosklerose dürfte in praktisch allen Patienten, die von unserer Therapiestrategie profitieren könnten, ein relevantes Problem sein. Die Rekrutierung inflammatorischer Zellen in atherosklerotische Plaques könnte jedoch die Wahrscheinlichkeit von

Plaquerupturen(Baetta *et al.*, 2010, Moore *et al.*, 2011, Virmani *et al.*, 2002) und damit Wahrscheinlichkeit akuter thrombembolischer Komplikationen(Böcker *et al.*, 2004, Virmani *et al.*, 2002) erhöhen. Hier könnte allerdings die zeitlich eng begrenzte Expression bei Transfektion des Adhäsionsmoleküls mittels kationischer Lipide von Vorteil sein, und die proatherosklerotische Wirkung im Vergleich zu dauerhafteren Vektoren wie den AAVs begrenzen. Weiterhin zeigte S1FG *in vitro* eine im Vergleich zu alternativen Rekrutierungsmolekülen deutlich herabgesetzte Rekrutierung proinflammatorischer Zellen bei gleicher oder besserer Rekrutierung von eEPCs (s. Kap. 3.1, s. Abb. 13:).

Dass die SDF-1-CXCR4-Achse bei ischämischen Geschehen eine bedeutende Rolle spielt, ist schon seit längerem bekannt(Askari *et al.*, 2003). Der Aufbau eines Gradienten zum ischämischen Areal hin und eine verstärkte Expression von SDF-1 in den ischämischen Myozyten scheinen zentral für die Progenitorzell-vermittelte Revaskularisierung zu sein(Aiuti *et al.*, 1997, Ceradini *et al.*, 2004, Hiasa *et al.*, 2004). SDF-1 wird dabei durch DPP-IV(Christopherson *et al.*, 2002), MMP-2 und MMP-9(Mcquibban *et al.*, 2001) abgebaut, wobei letztere insbesondere in ischämischem Gewebe hochreguliert sind(Muhs *et al.*, 2003). Durch Hemmung des SDF-1-Abbaus konnte ein besseres funktionelles Ergebnis nach myokardialer Ischämie erreicht werden (Zaruba *et al.*, 2009), was auch bereits in einer klinische Studie überprüft wird(Theiss *et al.*, 2010). Demgegenüber wäre eine systemische Hemmung von MMP-2 und MMP-9 kontraproduktiv, da Matrixmetalloproteinasen eine zentrale Rolle in der Degradation der extrazellulären Matrix beim Gefäßwachstum spielen(Huang *et al.*, 2009). Eine Alternative zur systemischen DPP-IV-Hemmung ist die lokale Applikation einer retardierten SDF-1-Mutante, die resistent gegen DPP-IV und MMP-2 ist(Segers *et al.*, 2011). In dieser Studie konnten die Autoren durch das mutierte SDF-1, was als SSDF-1(S4V) bezeichnet wurde, signifikant bessere Durchblutung bei Hinterlaufischämie im Mausmodell erreichen.

Wir überprüften mittels der Verwendung des S1FG-R, bei dem der SDF-1-Kopf durch die S4V-SSDF-1-Mutante ersetzt worden war, ob diese Reduktion der S1FG-Spaltung eine Auswirkung auf den funktionellen Effekt unserer Therapie hat. Bei Angiogenese und Perfusion bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Molekülen(s. Kap. 3.6; Abb. 36: u. Abb. 39:), bei der Kollateralisierung war das resistente Molekül sogar zwar geringfügig, aber dennoch signifikant schlechter(s. Abb. 37:), was teilweise im Widerspruch zu den Erfolgen einer DPP-IV-Inhibition(Theiss *et al.*, 2010, Zaruba *et al.*, 2009) steht. Eine mögliche Erklärung wäre, dass der bisher postulierte Wirkungsmechanismus der DPP-IV-Inhibition über verstärkte Bereitstellung des SDF-1 im Ischämiegebiet wenig bedeutsam ist, was sich aber schlecht mit den therapeutischen Erfolgen einer lokalen SDF-1-Gentherapie(Hiasa *et al.*, 2004) vereinbaren ließe. Ebenso wäre denkbar, dass DPP-IV und MMP-2 das auf der luminalen Endothelzellmembran fixierte S1FG aus sterischen Gründen nicht

spalten. Eine andere Erklärung wäre eine schnellere oder quantitativ wesentlich bedeutsamere Spaltung über andere Mechanismen, beispielsweise die ADAM17-vermittelte Spaltung des Fractalkine(Garton *et al.*, 2001). In diesem Fall wäre der Effekt der Verwendung eines ADAM17-resistenten Mucin-Rückgrats interessant.

4.6 Offene Fragen

Noch zu überprüfen bleibt die Bedeutung des „endogen“ aus Muskeln und Endothel(De Falco *et al.*, 2004) sezernierten SDF-1, welches sich zum Teil in der Glykokalix des Endothels einlagert und dort indirekt die Rekrutierung von Progenitorzellen fördert(Handel *et al.*, 2005, Peled *et al.*, 1999, Weber *et al.*, 2006). Zum Anderen bildet sich auch ein SDF-1-Gradient zum Ischämiegebiet hin(Ceradini *et al.*, 2004, De Falco *et al.*, 2004), welcher zur Mobilisierung(Jin *et al.*, 2006) und Chemotaxis(Aiuti *et al.*, 1997, Askari *et al.*, 2003) von Progenitorzellen benötigt wird. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Untersuchung, ob ein Synergismus zwischen S1FG-Transfektion, AMD3100-vermittelter Mobilisierung und systemischer DPP-IV-Inhibition besteht.

Ebenfalls offen bleibt die Frage, welche Zellen genau durch S1FG rekrutiert werden und auf welche Weise der funktionelle Effekt verursacht wird. Die postulierten endothelialen Progenitorzellen stellen eine unscharf definierte Population dar, in einem Review(Timmermans *et al.*, 2009) werden über 20 unterschiedliche Immunphänotypen aufgeführt. Die zunächst *in vitro*(Asahara *et al.*, 1997, Hatzopoulos *et al.*, 1998) und *in vivo*(Asahara *et al.*, 1999, Kawamoto *et al.*, 2001, Shi *et al.*, 1998) bestehenden Hinweise, dass diese aus dem Knochenmark stammenden Zellen sich zu Endothelzellen der neugebildeten Gefäße differenzieren, ließen sich allerdings vielfach nicht bestätigen(Grunewald *et al.*, 2006, Purhonen *et al.*, 2008, Rajantie *et al.*, 2004, Timmermans *et al.*, 2009, Ziegelhoeffer *et al.*, 2004). Dabei ist allerdings wohl die relative Seltenheit und die unklare Definition der zirkulierenden endothelialen Progenitorzelle in Betracht zu ziehen(Timmermans *et al.*, 2009), sowie die Veränderungen, die Zellen während der Kultur durchlaufen(Urbich *et al.*, 2003). Von den Autoren wird die Position vertreten, dass Zellen aus dem Knochenmark in das Ischämiegebiet rekrutiert werden, und dort parakrin die Angiogenese und Arteriogenese regulieren. Endothelwachstum findet diesen Autoren nach ausschließlich über die bereits ortsständigen Endothelzellen statt. Es besteht dabei generell Konsens, dass mehrere Zelltypen am Prozess der postnatalen Vaskulogenese teilhaben, von denen einige sich nur im direkten Umfeld des Gefäßes befinden(Timmermans *et al.*, 2009).

Eine andere Möglichkeit ist die Rekrutierung monozytärer Zellen durch S1FG. Monozyten werden im Allgemeinen proinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben werden(Welsch, 2005), womit eine gesteigerte Rekrutierung zunächst nicht wünschenswert erscheint, insbesondere nicht in chronisch

geschädigte Gefäße(Moore *et al.*, 2011, Swirski *et al.*, 2009). Arteriogenetische und angiogenetische Eigenschaften von Monozyten sind jedoch schon seit langem beschrieben(Arras *et al.*, 1998, Ito *et al.*, 1997). Ebenso wurde die Entwicklung eines endothelialen Phänotyps zumindest *in vitro* beobachtet(Schmeisser *et al.*, 2001). In neuerer Zeit konnten im Mausmodell die Ly6C^{hi}-CX3CR1^{lo}-Monozyten von den Ly6C^{lo}-CX3CR1^{hi}-Monozyten unterschieden werden(Geissmann *et al.*, 2003, Palframan *et al.*, 2001). In einem Mausmodell des akuten Myokardinfarkts wurde beobachtet, dass in den ersten Tagen nach dem Ereignis Ly6C^{hi}-Zellen mit eher inflammatorischen Eigenschaften dominieren, während später Ly6C^{lo}-Zellen in das geschädigte Gebiet rekrutiert werden und Muskelregeneration sowie Angiogenese fördern(Nahrendorf *et al.*, 2007). In einem Mausmodell des nichtischämischen Muskelschadens wurde ein ähnlicher Vorgang beobachtet, wobei hier gezeigt wurde, dass die Ly6C^{lo}-Zellen aus den Ly6C^{hi}-Zellen entstehen. Die Angiogenese wurde in dieser Arbeit allerdings nicht untersucht(Arnold *et al.*, 2007). Ebenso gibt es Hinweise, dass Ly6C^{hi}-Monozyten zu Orten migrieren, an denen Angiogenese vonstatten geht, dort zu Ly6C^{lo}-Monozyten werden, und die Angiogenese über parakrine Mechanismen koordinieren(Yona *et al.*, 2010).

Eine andere bedeutsame Subpopulation könnten tie-2⁺-Monozyten sein, die in Tumore rekrutiert werden und über parakrine Mechanismen die Angiogenese steuern(De Palma *et al.*, 2005). Obwohl deren Bedeutung in der Tumorangiogenese sicher scheint(De Palma *et al.*, 2005, Ribatti, 2009), und eine Relevanz in der physiologischen Vaskulogenese postuliert wurde(Pucci *et al.*, 2009), konnte eine entsprechende Beteiligung noch nicht nachgewiesen werden.

Eine Rekrutierung von Monozytensubpopulationen, die über parakrine Effekte die Gefäßbildung regulieren, erscheint also wahrscheinlich. Monozyten exprimieren CXCR4(Bernhagen *et al.*, 2007), und bei Behandlung mit S1FG+AMD3100 fanden sich signifikant mehr Monozyten im Ischämiegebiet als in der Kontrollgruppe(s. Abb. 23; Kap. 3.4). Eine weitere Differenzierung der Antigenexpression wurde nicht unternommen, da die einzelnen Subpopulationen bereits zwischen Maus und Mensch stark differieren, und für das Kaninchenmodell nicht beschrieben sind.

Zusätzlich dazu konnte Jin *et al.* in der Hinterlaufischämie im Mausmodell die Existenz nichtendothelialer VEGFR1⁺-CXCR4⁺-„Hämangiozyten“ nachweisen, die SDF-1-vermittelt in das ischämische Gebiet einwandern und dort zum Kapillarwachstum und zur Steigerung der Perfusion beitragen(Jin *et al.*, 2006).

Es ist gut denkbar, das S1FG zur Rekrutierung mehrerer funktionell unterschiedlicher Zellpopulationen beiträgt. Dabei könnten unterschiedliche Populationen Angiogenese auf der einen und Arteriogenese auf der anderen Seite vermitteln, was die funktionellen Ergebnisse(s. Kap. 4.3) ohne die Notwendigkeit eines „Backward Signalling“ erklären würde.

Nicht Teil dieser Arbeit war die Rolle der Thrombozyten in der Rekrutierung von vaskulären Progenitorzellen. Thrombozyten adhären an freiliegenden subendothelialen Strukturen (Kavanagh *et al.*, 2011), aber auch an aktiviertem Endothel (Rafii *et al.*, 2008), und exprimieren den CXCR4-Rezeptor (Panicot-Dubois *et al.*, 2007). Es wurde gezeigt, dass aus Thrombozyten sezerniertes SDF-1 bedeutend für die Rekrutierung hämatopoetischer Stammzellen in Ischämiegebiete ist (Stellos *et al.*, 2007), und dass SDF-1-vermittelte Aktivierung der Thrombozyten selbst die durch sie vermittelte Rekrutierung hämatopoetischer Progenitorzellen steigert (Zernecke *et al.*, 2005). Daher wäre es denkbar, dass eine verstärkte Rekrutierung oder Aktivierung von Thrombozyten durch S1FG für den beobachteten funktionellen Effekt eine Rolle spielt.

4.7 Ausblick und klinische Perspektive

Wir konnten zeigen, dass die Kombination von gesteigerter Rekrutierung durch ein künstliches Adhäsionsmolekül und gesteigerter Mobilisierung von Progenitorzellen in das periphere Blut im Tiermodell einen starken funktionellen Effekt hervorruft. Nichtsdestotrotz sollte die Methode im Hinblick auf eine klinische Anwendung noch in anderen Modellen überprüft werden: Aufgrund der häufigen Komorbiditäten des angepeilten Patientengutes sollte noch untersucht werden, wie sicher und effektiv die Methode bei den unterschiedlichen Schweregraden endothelialer Dysfunktion bis hin zur schweren Atherosklerose ist. Zum einen könnte man ein Kaninchenmodell mit entsprechender Fütterung wählen (Yanni *et al.*, 2003). Außerdem böte sich das ApoE^{-/-}-Mausmodell (Plump *et al.*, 1992, Zhang *et al.*, 1992) oder das LDL-Rezeptor-KO-Mausmodell (Veniant *et al.*, 1998) an.

Wichtig wäre auch, zu evaluieren ob bei einem gleichzeitigen malignen Prozess dessen Wachstum unverhältnismäßig gesteigert werden würde.

Ein weiteres zentrales Problem wäre die adäquate Applikation des Adhäsionsmoleküls. In der Tumorthherapie existieren vielversprechende Ansätze, bei humanen Zellen *in vivo* passager eine Genexpression zu erreichen (Chen *et al.*, 2011, Huang *et al.*, 2011). Weiterhin existieren Versuche zur rezeptorgesteuerten Transfektion humaner Zellen (Gopal *et al.*, 2011). Alternativ käme die Isolation und Applikation des Moleküls als Protein infrage, wobei zum einen die Gefahr einer anaphylaktischen Reaktion besteht, und zum anderen eine gezielte Transfektion der Endothelzellen nicht sichergestellt werden kann. Es wäre denkbar, dass sich eine größere Menge des Proteins in die Zellmembran von Erythrozyten einlagert.

Eine weitere Einsatzmöglichkeit der Methode könnte neben der chronischen peripheren Ischämie auch die chronische myokardiale Ischämie sein, die in Ätiologie und Pathogenese zahlreiche

Ähnlichkeiten zur chronischen peripheren Ischämie aufweist, in der Konsequenz jedoch zur ischämischen Kardiomyopathie mit ernster Prognose führt (Libby *et al.*, 2011).

Ein weiteres Einsatzgebiet neben der Therapie der chronischen Ischämie könnte auch der Versuch einer Verbesserung der Langzeitprognose nach akuter Ischämie sein, mittels eines Protokolls ähnlich dem der Zelltherapie nach akutem Infarkt (Mills *et al.*, 2007, Schachinger *et al.*, 2006).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unser Konzept einen vielversprechenden Therapieansatz darstellt, zu dessen klinischer Anwendung allerdings noch etliche weitere Untersuchungen notwendig sind.

5 Zusammenfassung

Chronische Extremitätenischämien stellen eine sowohl subjektiv belastende als auch volkswirtschaftlich bedeutende Krankheitsentität dar. Dabei können etliche Patienten mit den zur Verfügung stehenden konventionellen Verfahren nicht befriedigend therapiert werden. Neuere Konzepte zur Zelltherapie der chronischen Therapie führten in der klinischen Erprobung dabei zu eher ausbaufähigen Resultaten. Unsere Gruppe konnte in Vorarbeiten zeigen, dass die exogene Applikation embryonaler Endothelprogenitorzellen (eEPCs) im Tiermodell zu einem deutlichen Effekt auf die chronische Ischämie führt. Um diesen Effekt weiter zu steigern, wurde ein künstliches Fusionsmolekül aus dem Chemokin SDF-1 als Kopf, der Mucindomäne des Fractalkine als Rückgrat und einem GPI-Teil zur Verankerung im Endothel (SDF-Fractalkine-GPI oder S1FG) kloniert. Wir konnten ebenfalls in Vorarbeiten zeigen, dass dieses S1FG eEPCs *in vitro* und *in vivo* rekrutiert, und dass eine Vortransfektion des Endothels des Ischämiegebietes vor Applikation der eEPCs zu einer Steigerung des funktionellen Effekts führt.

Wir stellten die Hypothese auf, dass ein Ersatz der exogenen Applikation der eEPCs durch eine Mobilisierung endogener vaskulärer Progenitorzellen ebenfalls zu einem guten funktionellen Effekt führt. Weiterhin sollte der genaue Rekrutierungsmechanismus des S1FG untersucht werden.

Zur Untersuchung des funktionellen Effekts wurde wie in den Vorarbeiten ein Kaninchenmodell der chronischen Hinterlaufischämie gewählt, bei dem an Tag 0 die rechte Femoralarterie entfernt wurde. Nach Entwicklung eines chronischen Zustandes wurde am Tag 7 eine Angiographie beider Femoralisstromgebiete durchgeführt und entweder S1FG oder eGFP liposomal per Retroinfusion transfiziert. An den Tagen 9, 10 und 11 wurde jeweils 1 mg des kurzwirksamen CXCR4-Antagonisten AMD3100 oder 1 ml NaCl intraperitoneal injiziert. An Tag 35 wurde eine erneute Angiographie durchgeführt, das Tier getötet und die Hinterlaufmuskulatur entnommen. Die Angiogenese wurde über die mittels PECAM-1-Färbung bestimmte Kapillardichte gemessen, die Arteriogenese über die Mengenzunahme der in der Angiografie sichtbaren Kollateralen. Zur Messung der Perfusion wurden die Flussgeschwindigkeit in der Angiographie sowie fluoreszierende Mikrosphären verwendet. Um das Rekrutierungsprofil des S1FG *in vitro* zu eruieren, wurden statische Adhäsionsversuche mit PMNs auf transfizierten HMECs sowie Adhäsionsversuche in Flusskammern von THP-1-Zellen auf transfizierten HUVECs verwendet.

Es zeigte sich, dass signifikant weniger PMNs auf S1FG-transfiziertem Endothel adhäreren, als auf Fractalkine-transfizierten HMECs, während die eEPC-Adhäsion signifikant besser war. Bei den Versuchen unter Schubspannung ergab sich durch S1FG-Transfektion keine signifikante Änderung der

Anzahl rollender Zellen, während die Anzahl fest haftender Zellen signifikant höher war. Durch Zugabe eines L-Selektin-Antikörpers zu den THP-1-Zellen vor Superfusion konnte die Anzahl fest haftender Zellen wieder auf Kontrollniveau reduziert werden, während die Anzahl rollender Zellen leicht reduziert wurde. Zugabe von AMD3100 führte dort nicht zu einer signifikanten Änderung der Anzahl adhätierender Zellen, jedoch wurde durch AMD3100 die Stärke der Interaktion, gemessen als Anzahl nach Applikation hoher Flüsse noch adhätierender Zellen, wieder auf Kontrollniveau reduziert. Ein über andere Adhäsionsmoleküle vermitteltes Zellrollen ist also vermutlich eine Voraussetzung für eine adäquate S1FG-Funktion. Dabei würde es über SDF-1-CXCR4-Interaktion zu einer Erhöhung der Festigkeit der Bindung kommen. In Bezug auf den funktionellen Effekt im Tiermodell führte Verwendung von S1FG und AMD3100 zu einer signifikanten Steigerung von Kapillardichte, Kollateralenwachstum und Perfusion gegenüber der Kontrolle. Die Werte lagen dabei im selben Bereich wie durch Verwendung von S1FG und eEPCs erzielte Ergebnisse. Transfektion von S1FG ohne weitere Behandlung führte nicht zu einer signifikanten Änderung eines Parameters zur Kontrolle, während die Verwendung von AMD3100 zu moderaten Steigerungen bei Kapillardichte, und Kollateralenwachstum führte. Die Werte waren jedoch immer noch signifikant geringer als die nach Kombination von S1FG und AMD3100 erreichten Werte. Verwendung einer proteaseresistenten, funktionell jedoch aktiven Mutante für das SDF-1 im S1FG-Molekül führte nicht zu signifikanten Änderungen bei funktionellen Parametern, bis auf eine zwar signifikante, quantitativ jedoch geringe Verringerung des Kollateralwachstums.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die lokale Applikation eines künstlichen Adhäsionsmoleküls gemeinsam mit einer Mobilisierung knochenmarksständiger endothelialer oder vaskulärer Progenitorzellen zu einem deutlichen funktionellen Effekt führt, der den der Zellmobilisierung ohne Adhäsionssteigerung übertrifft. Dennoch birgt der Ansatz einige Risiken, wie die versehentliche Förderung von Tumorangio-genese oder die Beschleunigung des Wachstums atherosklerotischer Plaques. Zusätzlich bleibt unklar, welche Zellen genau durch das Adhäsionsmolekül rekrutiert werden, und ob es sich überhaupt um eine homogene Zellpopulation handelt. Weiterhin bleibt zu überprüfen, in welcher Weise die Wirksamkeit der Therapie durch chronische Defekte der Progenitorzellmobilisierung und -funktion, wie sie beispielsweise bei Diabetes oder Nikotinabusus auftreten, beeinträchtigt wird, und ob gegebenenfalls Optimierungsmöglichkeiten in Bezug auf das Mobilisierungsregime, den Aufbau des Adhäsionsmoleküls oder die Applikationsart bestehen.

Nichtsdestotrotz stellt diese Methode einen vielversprechenden neuen Ansatz zur Verbesserung der bisher eher zwiespältigen Ergebnisse der Zelltherapie dar.

6 Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AD	M. adductor magnus
ADAM17	A Disintegrin And Metalloproteinase 17
α -NAE	α -Naphthylacetatesterase
AP	Alkalische Phosphatase
ApoE	Apolipoprotein E
CD	Cluster of Differentiation
CMV	Cytomegalievirus
d	Tag
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DPP-IV	Dipeptidylpeptidase IV
d7	Versuchstag 7
d35	Versuchstag 35
E.	Escherichia
eEPC	Embryonic Endothelial Progenitor Cell
EPC	Endothelial Progenitor Cell
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetales Bovines Serum
Fib	M. fibularis
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GC	M. Gastrocnemius
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HMVECs	Human Microvascular Endothelial Cells
HUVECs	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
hpf	high power field, Starke Mikroskopvergrößerung
HSPCs	Hematopoetic Stem/ Progenitor Cells
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1

IL-1 β	Interleukin 1 β
iNOS	Induzible Stickstoffmonoxidsynthase
ITR	Inverted Terminal Repeat
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
kg KG	Kilogramm Körpergewicht
K/Mf	Kapillaren pro Muskelfaser
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LFA-1	Lymphocyte Function-associated Antigen 1
lg	Dekadischer Logarithmus
li	Links
lpf	low power field, Schwache Vergrößerung
L-Sel-AB	L-Selektin-Antikörper
M	mol/l
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein 1
MHC-I	Major Histocompatibility Complex 1
min	Minute
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MSC	Mesenchymal Stem Cell
M. tibialis ant.	M. tibialis anterior
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
paVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerase Chain Reaction
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule - 1
PEI	Polyethylinin
PMN	Polymorphonuclear cell
PTH	Parathormon
PVK	Peripherer Venenkatheter
RBF	Regionaler Blutfluss
re	Rechts
rpm	rotations per minute
RT-PCR	Real Time PCR
SDF-1	Stromal Derived Factor 1
SEM	Standard Error of Mean, Standardfehler
SMCs	Smooth Muscle Cells

S1FG	SDF-1-Fractalkine-GPI Fusionsmolekül
S1FG-GFP	S1FG-Fusionsmolekül konjugiert mit GFP
S1FG-R	Peptidase-resistente S1FG-Mutante
TA	M. tibialis anterior
THP-1	Tamm-Horsefall-Protein-1, eine monozytäre Zelllinie
TIVA	Total-intravenöse Anästhesie
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
U/min	Umdrehungen pro Minute
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLA-4	Very Late Antigen 4
VM	M. vastus medialis
vWF	von Willebrand-Faktor
WBX	Walter-Brendel-Zentrum für exp. Medizin
wt	Wildtyp

7 Literaturverzeichnis

Aicher, A., C. Heeschen, C. Mildner-Rihm, C. Urbich, C. Ihling, K. Technau-Ihling, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2003): "Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells." *Nat Med* 9(11): 1370-6.

Aiuti, A., I. J. Webb, C. Bleul, T. Springer and J. C. Gutierrez-Ramos (1997): "The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood." *J Exp Med* 185(1): 111-20.

Anderson, D. C., O. Abbassi, T. K. Kishimoto, J. M. Koenig, L. V. McIntire and C. W. Smith (1991): "Diminished lectin-, epidermal growth factor-, complement binding domain-cell adhesion molecule-1 on neonatal neutrophils underlies their impaired CD18-independent adhesion to endothelial cells in vitro." *J Immunol* 146(10): 3372-9.

Apostolakis, S., Z. Vlata, K. Vogiatzi, E. Krambovitis and D. A. Spandidos (2010): "Angiotensin II up-regulates CX3CR1 expression in THP-1 monocytes: impact on vascular inflammation and atherogenesis." *Journal of thrombosis and thrombolysis* 29(4): 443-8.

Arnold, L., A. Henry, F. Poron, Y. Baba-Amer, N. Van Rooijen, A. Plonquet, R. K. Gherardi and B. Chazaud (2007): "Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis." *J Exp Med* 204(5): 1057-69.

Arras, M., W. D. Ito, D. Scholz, B. Winkler, J. Schaper and W. Schaper (1998): "Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb." *J Clin Invest* 101(1): 40-50.

Asahara, T., C. Bauters, L. P. Zheng, S. Takeshita, S. Bunting, N. Ferrara, J. F. Symes and J. M. Isner (1995): "Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo." *Circulation* 92(9 Suppl): II365-71.

Asahara, T., H. Masuda, T. Takahashi, C. Kalka, C. Pastore, M. Silver, M. Kearne, M. Magner and J. M. Isner (1999): "Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization." *Circ Res* 85(3): 221-8.

Asahara, T., T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. Van Der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schatteman and J. M. Isner (1997): "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis." *Science* 275(5302): 964-7.

Askari, A. T., S. Unzek, Z. B. Popovic, C. K. Goldman, F. Forudi, M. Kiedrowski, A. Rovner, S. G. Ellis, J. D. Thomas, P. E. Dicorleto, E. J. Topol and M. S. Penn (2003): "Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy." *Lancet* 362(9385): 697-703.

Baetta, R. and A. Corsini (2010): "Role of polymorphonuclear neutrophils in atherosclerosis: current state and future perspectives." *Atherosclerosis* 210(1): 1-13.

Bernhagen, J., R. Krohn, H. Lue, J. L. Gregory, A. Zernecke, R. R. Koenen, M. Dewor, I. Georgiev, A. Schober, L. Leng, T. Kooistra, G. Fingerle-Rowson, P. Ghezzi, R. Kleemann, S. R. Mccoll, R. Bucala, M. J. Hickey and C. Weber (2007): "MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment." *Nat Med* 13(5): 587-96.

Böcker, W., H. Denk and P. U. Heitz: "Pathologie." Elsevier GmbH München, 3. Auflage 2004.

Brave, M., A. Farrell, S. Ching Lin, T. Ocheltree, S. Pope Miksinski, S. L. Lee, H. Saber, J. Fourie, C. Tornoe, B. Booth, W. Yuan, K. He, R. Justice and R. Pazdur (2010): "FDA review summary: Mozobil in combination with granulocyte colony-stimulating factor to mobilize hematopoietic stem cells to the peripheral blood for collection and subsequent autologous transplantation." *Oncology* 78(3-4): 282-8.

Broxmeyer, H. E., C. M. Orschell, D. W. Clapp, G. Hangoc, S. Cooper, P. A. Plett, W. C. Liles, X. Li, B. Graham-Evans, T. B. Campbell, G. Calandra, G. Bridger, D. C. Dale and E. F. Srouf (2005): "Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist." *J Exp Med* 201(8): 1307-18.

Capoccia, B. J., R. M. Shepherd and D. C. Link (2006): "G-CSF and AMD3100 mobilize monocytes into the blood that stimulate angiogenesis in vivo through a paracrine mechanism." *Blood* 108(7): 2438-45.

Carmeliet, P. (2000): "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." *Nat Med* 6(4): 389-95.

Ceradini, D. J., A. R. Kulkarni, M. J. Callaghan, O. M. Tepper, N. Bastidas, M. E. Kleinman, J. M. Capla, R. D. Galiano, J. P. Levine and G. C. Gurtner (2004): "Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1." *Nat Med* 10(8): 858-64.

Chen, J., X. Sun, Z. Yu, J. Gao and W. Liang (2011): "Influence of lipid components on gene delivery by polycation liposomes: Transfection efficiency, intracellular kinetics and in vivo tumor inhibition." *International journal of pharmaceutics*

Christopherson, K. W., 2nd, G. Hangoc and H. E. Broxmeyer (2002): "Cell surface peptidase CD26/dipeptidylpeptidase IV regulates CXCL12/stromal cell-derived factor-1 alpha-mediated chemotaxis of human cord blood CD34+ progenitor cells." *J Immunol* 169(12): 7000-8.

Dattilo, P. B. and I. P. Casserly (2011): "Critical limb ischemia: endovascular strategies for limb salvage." *Progress in cardiovascular diseases* 54(1): 47-60.

Daxecker, H., M. Raab, S. Markovic, A. Karimi, A. Griesmacher and M. M. Mueller (2002): "Endothelial adhesion molecule expression in an in vitro model of inflammation." *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 325(1-2): 171-5.

De Clercq, E. (2003): "The bicyclam AMD3100 story." *Nature reviews Drug discovery* 2(7): 581-7.

De Falco, E., D. Porcelli, A. R. Torella, S. Straino, M. G. Iachininoto, A. Orlandi, S. Truffa, P. Biglioli, M. Napolitano, M. C. Capogrossi and M. Pesce (2004): "SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells." *Blood* 104(12): 3472-82.

De Palma, M., M. A. Venneri, R. Galli, L. Sergi Sergi, L. S. Politi, M. Sampaolesi and L. Naldini (2005): "Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors." *Cancer cell* 8(3): 211-26.

Dillmann, F., M. R. Veldwijk, S. Laufs, M. Sperandio, G. Calandra, F. Wenz, J. Zeller and S. Fruehauf (2009): "Plerixafor inhibits chemotaxis toward SDF-1 and CXCR4-mediated stroma contact in a dose-dependent manner resulting in increased susceptibility of BCR-ABL+ cell to Imatinib and Nilotinib." *Leukemia & lymphoma* 50(10): 1676-86.

Ding, Y. T., S. Kumar and D. C. Yu (2008): "The role of endothelial progenitor cells in tumour vasculogenesis." *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 75(5): 265-73.

Dipersio, J. F., G. L. Uy, U. Yasothan and P. Kirkpatrick (2009): "Plerixafor." *Nature reviews Drug discovery* 8(2): 105-6.

Donahue, R. E., P. Jin, A. C. Bonifacino, M. E. Metzger, J. Ren, E. Wang and D. F. Stroncek (2009): "Plerixafor (AMD3100) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilize different CD34+ cell populations based on global gene and microRNA expression signatures." *Blood* 114(12): 2530-41.

Drechsler, M., Y. Doring, R. T. Megens and O. Soehnlein (2011): "Neutrophilic granulocytes - promiscuous accelerators of atherosclerosis." *Thromb Haemost* 106(5): 839-48.

Durdu, S., A. R. Akar, M. Arat, T. Sancak, N. T. Eren and U. Ozyurda (2006): "Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation for patients with Rutherford grade II-III thromboangiitis obliterans." *J Vasc Surg* 44(4): 732-9.

Eash, K. J., A. M. Greenbaum, P. K. Gopalan and D. C. Link (2010): "CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow." *J Clin Invest* 120(7): 2423-31.

Eash, K. J., J. M. Means, D. W. White and D. C. Link (2009): "CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions." *Blood* 113(19): 4711-9.

Eilken, H. M. and R. H. Adams (2010): "Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis." *Current opinion in cell biology* 22(5): 617-25.

Espinola-Klein, C. (2011): "Periphere arterielle Verschlusskrankheit." *Internist* 52): 549-61.

Espinola-Klein, C., H. J. Rupprecht, C. Bickel, K. Lackner, S. Savvidis, C. M. Messow, T. Munzel and S. Blankenberg (2008): "Different calculations of ankle-brachial index and their impact on cardiovascular risk prediction." *Circulation* 118(9): 961-7.

Folkins, C., Y. Shaked, S. Man, T. Tang, C. R. Lee, Z. Zhu, R. M. Hoffman and R. S. Kerbel (2009): "Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1." *Cancer research* 69(18): 7243-51.

Folkman, J. (1971): "Tumor angiogenesis: therapeutic implications." *N Engl J Med* 285(21): 1182-6.

Garton, K. J., P. J. Gough, C. P. Blobel, G. Murphy, D. R. Greaves, P. J. Dempsey and E. W. Raines (2001): "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1)." *J Biol Chem* 276(41): 37993-8001.

Geissmann, F., S. Jung and D. R. Littman (2003): "Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties." *Immunity* 19(1): 71-82.

Gibson, C. M., C. P. Cannon, W. L. Daley, J. T. Dodge, Jr., B. Alexander, Jr., S. J. Marble, C. H. McCabe, L. Raymond, T. Fortin, W. K. Poole and E. Braunwald (1996): "TIMI frame count: a quantitative method of assessing coronary artery flow." *Circulation* 93(5): 879-88.

Gopal, V., J. Xavier, G. H. Dar, M. Jafurulla, A. Chattopadhyay and N. M. Rao (2011): "Targeted liposomes to deliver DNA to cells expressing 5-HT receptors." *International journal of pharmaceutics* 419(1-2): 347-54.

Grunewald, M., I. Avraham, Y. Dor, E. Bachar-Lustig, A. Itin, S. Jung, S. Chimenti, L. Landsman, R. Abramovitch and E. Keshet (2006): "VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells." *Cell* 124(1): 175-89.

Gul, H., L. A. Marquez-Curtis, N. Jahroudi, L. M. Larratt and A. Janowska-Wieczorek (2010): "Valproic acid exerts differential effects on CXCR4 expression in leukemic cells." *Leuk Res* 34(2): 235-42.

Handel, T. M., Z. Johnson, S. E. Crown, E. K. Lau and A. E. Proudfoot (2005): "Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines." *Annual review of biochemistry* 74(385-410).

Hatzopoulos, A. K., J. Folkman, E. Vasile, G. K. Eiselen and R. D. Rosenberg (1998): "Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from mouse embryos." *Development* 125(8): 1457-68.

Heeschen, C., R. Lehmann, J. Honold, B. Assmus, A. Aicher, D. H. Walter, H. Martin, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2004): "Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease." *Circulation* 109(13): 1615-22.

Heide, T. and G. Stachel: "BASICS Physik." Elsevier GmbH München, 1. Auflage 2009.

Heil, M. and W. Schaper (2007): "Insights into pathways of arteriogenesis." *Curr Pharm Biotechnol* 8(1): 35-42.

Hellingman, A. A., L. Seghers, P. H. A. Quax and V. Van Weel: "Bone Marrow Derived Cells in Arteriogenesis: a Crucial Role for Leukocytes." in: Deindl, E. und W. Schaper (Hrsg.), *Arteriogenesis - Molecular Regulation, Pathophysiology and Therapeutics* I, Auflage, Shaker Verlag Aachen 2011, S. 145-54.

Hendrix, C. W., A. C. Collier, M. M. Lederman, D. Schols, R. B. Pollard, S. Brown, J. B. Jackson, R. W. Coombs, M. J. Glesby, C. W. Flexner, G. J. Bridger, K. Badel, R. T. Macfarland, G. W. Henson and G. Calandra (2004): "Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of AMD3100, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in HIV-1 infection." *J Acquir Immune Defic Syndr* 37(2): 1253-62.

Henry, T. D., B. H. Annex, G. R. Mckendall, M. A. Azrin, J. J. Lopez, F. J. Giordano, P. K. Shah, J. T. Willerson, R. L. Benza, D. S. Berman, C. M. Gibson, A. Bajamonde, A. C. Rundie, J. Fine and E. R. Mccluskey (2003): "The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis." *Circulation* 107(10): 1359-65.

Hershey, J. C., E. P. Baskin, J. D. Glass, H. A. Hartman, D. B. Gilberto, I. T. Rogers and J. J. Cook (2001): "Revascularization in the rabbit hindlimb: dissociation between capillary sprouting and arteriogenesis." *Cardiovasc Res* 49(3): 618-25.

Hiasa, K., M. Ishibashi, K. Ohtani, S. Inoue, Q. Zhao, S. Kitamoto, M. Sata, T. Ichiki, A. Takeshita and K. Egashira (2004): "Gene transfer of stromal cell-derived factor-1alpha enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway: next-generation chemokine therapy for therapeutic neovascularization." *Circulation* 109(20): 2454-61.

Hiatt, W. R. (2001): "Medical treatment of peripheral arterial disease and claudication." *N Engl J Med* 344(21): 1608-21.

Hill, J. M., M. A. Syed, A. E. Arai, T. M. Powell, J. D. Paul, G. Zalos, E. J. Read, H. M. Khuu, S. F. Leitman, M. Horne, G. Csako, C. E. Dunbar, M. A. Waclawiw and R. O. Cannon, 3rd (2005): "Outcomes and risks of granulocyte colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease." *J Am Coll Cardiol* 46(9): 1643-8.

Hill, J. M., G. Zalos, J. P. Halcox, W. H. Schenke, M. A. Waclawiw, A. A. Quyyumi and T. Finkel (2003): "Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk." *N Engl J Med* 348(7): 593-600.

Hinkel, R., I. Bock-Marquette, A. K. Hatzopoulos and C. Kupatt (2010): "Thymosin beta4: a key factor for protective effects of eEPCs in acute and chronic ischemia." *Ann N Y Acad Sci* 1194(105-11).

Hinkel, R., C. El-Aouni, T. Olson, J. Horstkotte, S. Mayer, S. Muller, M. Willhauck, C. Spitzweg, F. J. Gildehaus, W. Munzing, E. Hannappel, I. Bock-Marquette, J. M. Dimaio, A. K. Hatzopoulos, P. Boekstegers and C. Kupatt (2008): "Thymosin beta4 is an essential paracrine factor of embryonic endothelial progenitor cell-mediated cardioprotection." *Circulation* 117(17): 2232-40.

Hinkel, R., T. Trenkwalder and C. Kupatt (2011): "Gene therapy for ischemic heart disease." *Expert opinion on biological therapy* 11(6): 723-37.

Huang, P. H., Y. H. Chen, C. H. Wang, J. S. Chen, H. Y. Tsai, F. Y. Lin, W. Y. Lo, T. C. Wu, M. Sata, J. W. Chen and S. J. Lin (2009): "Matrix metalloproteinase-9 is essential for ischemia-induced neovascularization by modulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29(8): 1179-84.

Huang, Q. D., G. X. Zhong, Y. Zhang, J. Ren, Y. Fu, J. Zhang, W. Zhu and X. Q. Yu (2011): "Cyclen-based cationic lipids for highly efficient gene delivery towards tumor cells." *PLoS One* 6(8): e23134.

Huber, B. C., R. Fischer, S. Brunner, M. Groebner, C. Rischpler, A. Segeth, M. M. Zaruba, T. Wollenweber, M. Hacker and W. M. Franz (2010): "Comparison of parathyroid hormone and G-CSF treatment after myocardial infarction on perfusion and stem cell homing." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298(5): H1466-71.

Idei, N., K. Nishioka, J. Soga, T. Hidaka, T. Hata, Y. Fujii, N. Fujimura, T. Maruhashi, S. Mikami, H. Teragawa, Y. Kihara, K. Noma, K. Chayama and Y. Higashi (2011): "Vascular function and circulating progenitor cells in thromboangitis obliterans (Buerger's disease) and atherosclerosis obliterans." *Hypertension* 57(1): 70-8.

Imai, T., K. Hieshima, C. Haskell, M. Baba, M. Nagira, M. Nishimura, M. Kakizaki, S. Takagi, H. Nomiya, T. J. Schall and O. Yoshie (1997): "Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion." *Cell* 91(4): 521-30.

Ince, H., M. Petzsch, H. D. Kleine, H. Eckard, T. Rehders, D. Burska, S. Kische, M. Freund and C. A. Nienaber (2005): "Prevention of left ventricular remodeling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction: final 1-year results of the Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Granulocyte Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINE-AMI) Trial." *Circulation* 112(9 Suppl): I73-80.

Ince, H., M. Petzsch, H. D. Kleine, H. Schmidt, T. Rehders, T. Korber, C. Schumichen, M. Freund and C. A. Nienaber (2005): "Preservation from left ventricular remodeling by front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by use of granulocyte-colony-stimulating factor (FIRSTLINE-AMI)." *Circulation* 112(20): 3097-106.

Ishida, A., Y. Ohya, H. Sakuda, K. Ohshiro, Y. Higashiuesato, M. Nakaema, S. Matsubara, S. Yakabi, A. Kakihana, M. Ueda, C. Miyagi, N. Yamane, K. Koja, K. Komori and S. Takishita (2005): "Autologous peripheral blood mononuclear cell implantation for patients with peripheral arterial disease improves limb ischemia." *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 69(10): 1260-5.

Ito, W. D., M. Arras, B. Winkler, D. Scholz, J. Schaper and W. Schaper (1997): "Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion." *Circ Res* 80(6): 829-37.

Jin, D. K., K. Shido, H. G. Kopp, I. Petit, S. V. Shmelkov, L. M. Young, A. T. Hooper, H. Amano, S. T. AVECILLA, B. Heissig, K. Hattori, F. Zhang, D. J. Hicklin, Y. Wu, Z. Zhu, A. Dunn, H. Salari, Z. Werb, N. R. Hackett, R. G. Crystal, D. Lyden and S. Rafii (2006): "Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4+ hemangiocytes." *Nat Med* 12(5): 557-67.

Kamei, M. and C. V. Carman (2010): "New observations on the trafficking and diapedesis of monocytes." *Current opinion in hematology* 17(1): 43-52.

Kavanagh, D. P. and N. Kalia (2011): "Hematopoietic stem cell homing to injured tissues." *Stem cell reviews* 7(3): 672-82.

Kawamoto, A., H. C. Gwon, H. Iwaguro, J. I. Yamaguchi, S. Uchida, H. Masuda, M. Silver, H. Ma, M. Kearney, J. M. Isner and T. Asahara (2001): "Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia." *Circulation* 103(5): 634-7.

Khan, I. F., R. K. Hirata and D. W. Russell (2011): "AAV-mediated gene targeting methods for human cells." *Nature protocols* 6(4): 482-501.

Kishimoto, T. K., R. A. Warnock, M. A. Jutila, E. C. Butcher, C. Lane, D. C. Anderson and C. W. Smith (1991): "Antibodies against human neutrophil LECAM-1 (LAM-1/Leu-8/DREG-56 antigen) and endothelial cell ELAM-1 inhibit a common CD18-independent adhesion pathway in vitro." *Blood* 78(3): 805-11.

Kissel, C. K., R. Lehmann, B. Assmus, A. Aicher, J. Honold, U. Fischer-Rasokat, C. Heeschen, I. Spyridopoulos, S. Dimmeler and A. M. Zeiher (2007): "Selective functional exhaustion of hematopoietic progenitor cells in the bone marrow of patients with postinfarction heart failure." *J Am Coll Cardiol* 49(24): 2341-9.

Konopka, K. and N. Duzgunes (2002): "Expression of CD4 controls the susceptibility of THP-1 cells to infection by R5 and X4 HIV type 1 isolates." *AIDS research and human retroviruses* 18(2): 123-31.

Kroger, K., A. Stang, J. Kondratieva, S. Moebus, E. Beck, A. Schmermund, S. Mohlenkamp, N. Dragano, J. Siegrist, K. H. Jockel and R. Erbel (2006): "Prevalence of peripheral arterial disease - results of the Heinz Nixdorf recall study." *European journal of epidemiology* 21(4): 279-85.

Kucik, D. F. (2009): "Measurement of adhesion under flow conditions." Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacino [et al] Chapter 9(Unit 9 6.

Kuethé, F., H. R. Figulla, M. Herzau, M. Voth, M. Fritzenwanger, T. Opfermann, K. Pachmann, A. Krack, H. G. Sayer, D. Gottschild and G. S. Werner (2005): "Treatment with granulocyte colony-stimulating factor for mobilization of bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction." American heart journal 150(1): 115.

Kupatt, C., R. Hinkel, A. Pfosser, C. El-Aouni, A. Wuchrer, A. Fritz, F. Globisch, M. Thormann, J. Horstkotte, C. Lebherz, E. Thein, A. Banfi and P. Boekstegers (2010): "Cotransfection of vascular endothelial growth factor-A and platelet-derived growth factor-B via recombinant adeno-associated virus resolves chronic ischemic malperfusion role of vessel maturation." J Am Coll Cardiol 56(5): 414-22.

Kupatt, C., J. Horstkotte, G. A. Vlastos, A. Pfosser, C. Lebherz, M. Semisch, M. Thalgott, K. Buttner, C. Browarzyk, J. Mages, R. Hoffmann, A. Deten, M. Lamparter, F. Müller, H. Beck, H. Buning, P. Boekstegers and A. K. Hatzopoulos (2005): "Embryonic endothelial progenitor cells expressing a broad range of proangiogenic and remodeling factors enhance vascularization and tissue recovery in acute and chronic ischemia." FASEB J 19(11): 1576-8.

Kusumanto, Y. H., V. Van Weel, N. H. Mulder, A. J. Smit, J. J. Van Den Dungen, J. M. Hooymans, W. J. Sluiter, R. A. Tio, P. H. Quax, R. O. Gans, R. P. Dullaart and G. A. Hospers (2006): "Treatment with intramuscular vascular endothelial growth factor gene compared with placebo for patients with diabetes mellitus and critical limb ischemia: a double-blind randomized trial." Hum Gene Ther 17(6): 683-91.

Langer, H., A. E. May, K. Daub, U. Heinzmann, P. Lang, M. Schumm, D. Vestweber, S. Massberg, T. Schonberger, I. Pfisterer, A. K. Hatzopoulos and M. Gawaz (2006): "Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro." Circ Res 98(2): e2-10.

Lasala, G. P. and J. J. Minguell (2011): "Vascular disease and stem cell therapies." British medical bulletin 98(187-97.

Le Bourhis, X., R. Romon and H. Hondermarck (2010): "Role of endothelial progenitor cells in breast cancer angiogenesis: from fundamental research to clinical ramifications." Breast cancer research and treatment 120(1): 17-24.

Lebherz, C., G. Von Degenfeld, A. Karl, A. Pfosser, P. Raake, F. Pachmayr, D. Scholz, C. Kupatt and P. Boekstegers (2003): "Therapeutic angiogenesis/arteriogenesis in the chronic ischemic rabbit hindlimb: effect of venous basic fibroblast growth factor retroinfusion." Endothelium 10(4-5): 257-65.

Lee, C. W., E. Stabile, T. Kinnaird, M. Shou, J. M. Devaney, S. E. Epstein and M. S. Burnett (2004): "Temporal patterns of gene expression after acute hindlimb ischemia in mice: insights into the genomic program for collateral vessel development." J Am Coll Cardiol 43(3): 474-82.

Lemery, S. J., M. M. Hsieh, A. Smith, S. Rao, H. M. Khuu, D. Theresa, J. M. Viano, L. Cook, R. Goodwin, C. Boss, G. Calandra, N. Geller, J. Tisdale and R. Childs (2011): "A pilot study evaluating the safety and CD34+ cell mobilizing activity of escalating doses of plerixafor in healthy volunteers." *Br J Haematol* 153(1): 66-75.

Levesque, J. P., J. Hendy, Y. Takamatsu, P. J. Simmons and L. J. Bendall (2003): "Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide." *J Clin Invest* 111(2): 187-96.

Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky and S. Nourshargh (2007): "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated." *Nat Rev Immunol* 7(9): 678-89.

Li, S., B. Zhou and Z. C. Han (2006): "Therapeutic neovascularization by transplantation of mobilized peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. A comparison between CD34+ and CD34- mononuclear cells." *Thromb Haemost* 95(2): 301-11.

Libby, P., R. O. Bonow, D. L. Mann and D. P. Zipes: "Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine." Elsevier Saunders Philadelphia, PA, 9th Auflage 2011.

Liehn, E. A., N. Tuchscheerer, I. Kanzler, M. Drechsler, L. Fraemohs, A. Schuh, R. R. Koenen, S. Zander, O. Soehnlein, M. Hristov, G. Grigorescu, A. O. Urs, M. Leabu, I. Bucur, M. W. Merx, A. Zerneck, J. Ehling, F. Gremse, T. Lammers, F. Kiessling, J. Bernhagen, A. Schober and C. Weber (2011): "Double-Edged Role of the CXCL12/CXCR4 Axis in Experimental Myocardial Infarction." *J Am Coll Cardiol* 58(23): 2415-23.

Liles, W. C., H. E. Broxmeyer, E. Rodger, B. Wood, K. Hubel, S. Cooper, G. Hangoc, G. J. Bridger, G. W. Henson, G. Calandra and D. C. Dale (2003): "Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist." *Blood* 102(8): 2728-30.

Limbourg, A., T. Korff, L. C. Napp, W. Schaper, H. Drexler and F. P. Limbourg (2009): "Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia." *Nature protocols* 4(12): 1737-46.

Luscinskas, F. W., H. Ding, P. Tan, D. Cumming, T. F. Tedder and M. E. Gerritsen (1996): "L- and P-selectins, but not CD49d (VLA-4) integrins, mediate monocyte initial attachment to TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow in vitro." *J Immunol* 157(1): 326-35.

Macfarland, R., M. L. Hard, R. Scarborough, K. Badel and G. Calandra (2010): "A pharmacokinetic study of plerixafor in subjects with varying degrees of renal impairment." *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 16(1): 95-101.

Makinen, K., H. Manninen, M. Hedman, P. Matsi, H. Mussalo, E. Alhava and S. Yla-Herttuala (2002): "Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to

human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study." *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 6(1): 127-33.

Mako, V., J. Czucz, Z. Weiszhar, E. Herczenik, J. Matko, Z. Prohaszka and L. Cervenak (2010): "Proinflammatory activation pattern of human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1beta, TNF-alpha, and LPS." *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 77(10): 962-70.

Massberg, S., I. Konrad, K. Schurzinger, M. Lorenz, S. Schneider, D. Zohlnhoefer, K. Hoppe, M. Schiemann, E. Kennerknecht, S. Sauer, C. Schulz, S. Kerstan, M. Rudelius, S. Seidl, F. Sorge, H. Langer, M. Peluso, P. Goyal, D. Vestweber, N. R. Emambokus, D. H. Busch, J. Frampton and M. Gawaz (2006): "Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo." *J Exp Med* 203(5): 1221-33.

Mazzone, M., D. Dettori, R. Leite De Oliveira, S. Loges, T. Schmidt, B. Jonckx, Y. M. Tian, A. A. Lanahan, P. Pollard, C. Ruiz De Almodovar, F. De Smet, S. Vinckier, J. Aragones, K. Debackere, A. Luttun, S. Wyns, B. Jordan, A. Pisacane, B. Gallez, M. G. Lampugnani, E. Dejana, M. Simons, P. Ratcliffe, P. Maxwell and P. Carmeliet (2009): "Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization." *Cell* 136(5): 839-51.

Mcquibban, G. A., G. S. Butler, J. H. Gong, L. Bendall, C. Power, I. Clark-Lewis and C. M. Overall (2001): "Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1." *J Biol Chem* 276(47): 43503-8.

Mills, J. S. and S. V. Rao (2007): "REPAIR-AMI: stem cells for acute myocardial infarction." *Future cardiology* 3(2): 137-40.

Moore, K. J. and I. Tabas (2011): "Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis." *Cell* 145(3): 341-55.

Moore, K. L., K. D. Patel, R. E. Bruehl, F. Li, D. A. Johnson, H. S. Lichenstein, R. D. Cummings, D. F. Bainton and R. P. McEver (1995): "P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin." *J Cell Biol* 128(4): 661-71.

Motukuru, V., K. R. Suresh, V. Vivekanand, S. Raj and K. R. Girija (2008): "Therapeutic angiogenesis in Buerger's disease (thromboangiitis obliterans) patients with critical limb ischemia by autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells." *J Vasc Surg* 48(6 Suppl): 53S-60S; discussion S.

Moxey, P. W., D. Hofman, R. J. Hinchliffe, K. Jones, M. M. Thompson and P. J. Holt (2011): "Trends and outcomes after surgical lower limb revascularization in England." *The British journal of surgery* 98(10): 1373-82.

Muhs, B. E., G. Plitas, Y. Delgado, I. Ianus, J. P. Shaw, M. A. Adelman, P. Lamparello, P. Shamamian and P. Gagne (2003): "Temporal expression and activation of matrix metalloproteinases-2, -9, and

membrane type 1-matrix metalloproteinase following acute hindlimb ischemia." *J Surg Res* 111(1): 8-15.

Müller-Hartmann, F. (2007): "Die Endothelaktivierung nach Hypoxie und Reoxgenierung - Hemmstrategien in vitro." Dissertation, München.

Nahrendorf, M., F. K. Swirski, E. Aikawa, L. Stangenberg, T. Wurdinger, J. L. Figueiredo, P. Libby, R. Weissleder and M. J. Pittet (2007): "The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions." *J Exp Med* 204(12): 3037-47.

Naito, K., T. Anzai, Y. Sugano, Y. Maekawa, T. Kohno, T. Yoshikawa, K. Matsuno and S. Ogawa (2008): "Differential effects of GM-CSF and G-CSF on infiltration of dendritic cells during early left ventricular remodeling after myocardial infarction." *J Immunol* 181(8): 5691-701.

Notohamiprodjo, M., R. Djafarzadeh, A. Mojaat, I. Von Lutichau, H. J. Grone and P. J. Nelson (2006): "Generation of GPI-linked CCL5 based chemokine receptor antagonists for the suppression of acute vascular damage during allograft transplantation." *Protein engineering, design & selection : PEDS* 19(1): 27-35.

Ohki, Y., B. Heissig, Y. Sato, H. Akiyama, Z. Zhu, D. J. Hicklin, K. Shimada, H. Ogawa, H. Daida, K. Hattori and A. Ohsaka (2005): "Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils." *FASEB J* 19(14): 2005-7.

Ostrovsky, L., A. J. King, S. Bond, D. Mitchell, D. E. Lorant, G. A. Zimmerman, R. Larsen, X. F. Niu and P. Kubes (1998): "A juxtacrine mechanism for neutrophil adhesion on platelets involves platelet-activating factor and a selectin-dependent activation process." *Blood* 91(8): 3028-36.

Page, C., M. Rose, M. Yacoub and R. Pigott (1992): "Antigenic heterogeneity of vascular endothelium." *Am J Pathol* 141(3): 673-83.

Palframan, R. T., S. Jung, G. Cheng, W. Weninger, Y. Luo, M. Dorf, D. R. Littman, B. J. Rollins, H. Zweerink, A. Rot and U. H. Von Andrian (2001): "Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues." *J Exp Med* 194(9): 1361-73.

Panicot-Dubois, L., G. M. Thomas, B. C. Furie, B. Furie, D. Lombardo and C. Dubois (2007): "Bile salt-dependent lipase interacts with platelet CXCR4 and modulates thrombus formation in mice and humans." *J Clin Invest* 117(12): 3708-19.

Patel, K. D., K. L. Moore, M. U. Nollert and R. P. McEver (1995): "Neutrophils use both shared and distinct mechanisms to adhere to selectins under static and flow conditions." *J Clin Invest* 96(4): 1887-96.

Peled, A., V. Grabovsky, L. Habler, J. Sandbank, F. Arenzana-Seisdedos, I. Petit, H. Ben-Hur, T. Lapidot and R. Alon (1999): "The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow." *J Clin Invest* 104(9): 1199-211.

Pfossier, A., C. El-Aouni, I. Pfisterer, M. Dietz, F. Globisch, G. Stachel, T. Trenkwalder, O. Pinkenburg, J. Horstkotte, R. Hinkel, M. Sperandio, A. K. Hatzopoulos, P. Boekstegers, R. Bals and C. Kupatt (2009): "NF kappaB Activation in Embryonic Endothelial Progenitor Cells Enhances Neovascularization Via PSGL-1 Mediated Recruitment: Novel Role for LL37." *Stem Cells* 28(2): 376-85.

Pfossier, A., C. El-Aouni, I. Pfisterer, M. Dietz, F. Globisch, G. Stachel, T. Trenkwalder, O. Pinkenburg, J. Horstkotte, R. Hinkel, M. Sperandio, A. K. Hatzopoulos, P. Boekstegers, R. Bals and C. Kupatt (2010): "NF kappaB activation in embryonic endothelial progenitor cells enhances neovascularization via PSGL-1 mediated recruitment: novel role for LL37." *Stem Cells* 28(2): 376-85.

Pfossier, A., M. Thalgott, K. Buttner, A. Brouet, O. Feron, P. Boekstegers and C. Kupatt (2005): "Liposomal Hsp90 cDNA induces neovascularization via nitric oxide in chronic ischemia." *Cardiovasc Res* 65(3): 728-36.

Phng, L. K. and H. Gerhardt (2009): "Angiogenesis: a team effort coordinated by notch." *Developmental cell* 16(2): 196-208.

Pitchford, S. C., R. C. Furze, C. P. Jones, A. M. Wengner and S. M. Rankin (2009): "Differential mobilization of subsets of progenitor cells from the bone marrow." *Cell Stem Cell* 4(1): 62-72.

Plump, A. S., J. D. Smith, T. Hayek, K. Aalto-Setälä, A. Walsh, J. G. Verstuyft, E. M. Rubin and J. L. Breslow (1992): "Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells." *Cell* 71(2): 343-53.

Potente, M., H. Gerhardt and P. Carmeliet (2011): "Basic and therapeutic aspects of angiogenesis." *Cell* 146(6): 873-87.

Pucci, F., M. A. Venneri, D. Biziato, A. Nonis, D. Moi, A. Sica, C. Di Serio, L. Naldini and M. De Palma (2009): "A distinguishing gene signature shared by tumor-infiltrating Tie2-expressing monocytes, blood "resident" monocytes, and embryonic macrophages suggests common functions and developmental relationships." *Blood* 114(4): 901-14.

Purhonen, S., J. Palm, D. Rossi, N. Kaskenpää, I. Rajantie, S. Ylä-Herttuala, K. Alitalo, I. L. Weissman and P. Salven (2008): "Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(18): 6620-5.

Raab, S., E. Thein, A. G. Harris and K. Messmer (1999): "A new sample-processing unit for the fluorescent microsphere method." *Am J Physiol* 276(5 Pt 2): H1801-6.

Rafii, D. C., B. Psaila, J. Butler, D. K. Jin and D. Lyden (2008): "Regulation of vasculogenesis by platelet-mediated recruitment of bone marrow-derived cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(2): 217-22.

Rajagopalan, S., E. R. Mohler, 3rd, R. J. Lederman, F. O. Mendelsohn, J. F. Saucedo, C. K. Goldman, J. Blebea, J. Macko, P. D. Kessler, H. S. Rasmussen and B. H. Annex (2003): "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* 108(16): 1933-8.

Rajantie, I., M. Ilmonen, A. Alminaitė, U. Ozerdem, K. Alitalo and P. Salven (2004): "Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells." *Blood* 104(7): 2084-6.

Red-Horse, K., H. Ueno, I. L. Weissman and M. A. Krasnow (2010): "Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells." *Nature* 464(7288): 549-53.

Reynolds, P. N., S. A. Nicklin, L. Kaliberova, B. G. Boatman, W. E. Grizzle, I. V. Balyasnikova, A. H. Baker, S. M. Danilov and D. T. Curiel (2001): "Combined transductional and transcriptional targeting improves the specificity of transgene expression in vivo." *Nature biotechnology* 19(9): 838-42.

Ribatti, D. (2009): "The paracrine role of Tie-2-expressing monocytes in tumor angiogenesis." *Stem Cells Dev* 18(5): 703-6.

Ripa, R. S., E. Jorgensen, Y. Wang, J. J. Thune, J. C. Nilsson, L. Sondergaard, H. E. Johnsen, L. Kober, P. Grande and J. Kastrup (2006): "Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte-colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute ST-elevation myocardial infarction: result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial." *Circulation* 113(16): 1983-92.

Sadir, R., F. Baleux, A. Grosdidier, A. Imberty and H. Lortat-Jacob (2001): "Characterization of the stromal cell-derived factor-1alpha-heparin complex." *J Biol Chem* 276(11): 8288-96.

Sanchez-Martin, L., A. Estecha, R. Samaniego, S. Sanchez-Ramon, M. A. Vega and P. Sanchez-Mateos (2011): "The chemokine CXCL12 regulates monocyte-macrophage differentiation and RUNX3 expression." *Blood* 117(1): 88-97.

Schachinger, V., M. B. Britten and A. M. Zeiher (2000): "Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease." *Circulation* 101(16): 1899-906.

Schachinger, V., S. Erbs, A. Elsasser, W. Haberbosch, R. Hambrecht, H. Holschermann, J. Yu, R. Corti, D. G. Mathey, C. W. Hamm, T. Suselbeck, N. Werner, J. Haase, J. Neuzner, A. Germing, B. Mark, B. Assmus, T. Tonn, S. Dimmeler and A. M. Zeiher (2006): "Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial." *Eur Heart J* 27(23): 2775-83.

Schaper, W. (2009): "Collateral circulation: past and present." *Basic Res Cardiol* 104(1): 5-21.

Schmeisser, A., C. D. Garlichts, H. Zhang, S. Eskafi, C. Graffy, J. Ludwig, R. H. Strasser and W. G. Daniel (2001): "Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions." *Cardiovasc Res* 49(3): 671-80.

Segers, V. F., V. Revin, W. Wu, H. Qiu, Z. Yan, R. T. Lee and A. Sandrasagra (2011): "Protease-resistant stromal cell-derived factor-1 for the treatment of experimental peripheral artery disease." *Circulation* 123(12): 1306-15.

Shepherd, R. M., B. J. Capoccia, S. M. Devine, J. Dipersio, K. M. Trinkaus, D. Ingram and D. C. Link (2006): "Angiogenic cells can be rapidly mobilized and efficiently harvested from the blood following treatment with AMD3100." *Blood* 108(12): 3662-7.

Shi, Q., S. Rafii, M. H. Wu, E. S. Wijelath, C. Yu, A. Ishida, Y. Fujita, S. Kothari, R. Mohle, L. R. Sauvage, M. A. Moore, R. F. Storb and W. P. Hammond (1998): "Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells." *Blood* 92(2): 362-7.

Shintani, S., T. Murohara, H. Ikeda, T. Ueno, K. Sasaki, J. Duan and T. Imaizumi (2001): "Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation." *Circulation* 103(6): 897-903.

Simons, M., B. H. Annex, R. J. Laham, N. Kleiman, T. Henry, H. Dauerman, J. E. Udelson, E. V. Gervino, M. Pike, M. J. Whitehouse, T. Moon and N. A. Chronos (2002): "Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial." *Circulation* 105(7): 788-93.

Sprengers, R. W., M. Teraa, F. L. Moll, G. A. De Wit, Y. Van Der Graaf and M. C. Verhaar (2010): "Quality of life in patients with no-option critical limb ischemia underlines the need for new effective treatment." *J Vasc Surg* 52(4): 843-9, 9 e1.

Stellos, K. and M. Gawaz (2007): "Platelets and stromal cell-derived factor-1 in progenitor cell recruitment." *Seminars in thrombosis and hemostasis* 33(2): 159-64.

Swift, M. R. and B. M. Weinstein (2009): "Arterial-venous specification during development." *Circ Res* 104(5): 576-88.

Swirski, F. K., R. Weissleder and M. J. Pittet (2009): "Heterogeneous in vivo behavior of monocyte subsets in atherosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29(10): 1424-32.

Takahashi, T., C. Kalka, H. Masuda, D. Chen, M. Silver, M. Kearney, M. Magner, J. M. Isner and T. Asahara (1999): "Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization." *Nat Med* 5(4): 434-8.

- Tan, Y., Y. Li, J. Xiao, H. Shao, C. Ding, G. E. Arteel, K. A. Webster, J. Yan, H. Yu, L. Cai and X. Li (2009): "A novel CXCR4 antagonist derived from human SDF-1beta enhances angiogenesis in ischaemic mice." *Cardiovasc Res* 82(3): 513-21.
- Tateishi-Yuyama, E., H. Matsubara, T. Murohara, U. Ikeda, S. Shintani, H. Masaki, K. Amano, Y. Kishimoto, K. Yoshimoto, H. Akashi, K. Shimada, T. Iwasaka and T. Imaizumi (2002): "Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial." *Lancet* 360(9331): 427-35.
- Tchernychev, B., Y. Ren, P. Sachdev, J. M. Janz, L. Haggis, A. O'shea, E. McBride, R. Looby, Q. Deng, T. McMurry, M. A. Kazmi, T. P. Sakmar, S. Hunt, 3rd and K. E. Carlson (2010): "Discovery of a CXCR4 agonist pepducin that mobilizes bone marrow hematopoietic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(51): 22255-9.
- Theiss, H. D., C. Brenner, M. G. Engelmann, M. M. Zaruba, B. Huber, V. Henschel, U. Mansmann, B. Wintersperger, M. Reiser, G. Steinbeck and W. M. Franz (2010): "Safety and efficacy of SITAglipitin plus GRanulocyte-colony-stimulating factor in patients suffering from Acute Myocardial Infarction (SITAGRAMI-Trial)--rationale, design and first interim analysis." *International journal of cardiology* 145(2): 282-4.
- Timmermans, F., J. Plum, M. C. Yoder, D. A. Ingram, B. Vandekerckhove and J. Case (2009): "Endothelial progenitor cells: identity defined?" *J Cell Mol Med* 13(1): 87-102.
- Tsuchiya, S., M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno and K. Tada (1980): "Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)." *Int J Cancer* 26(2): 171-6.
- Urbich, C., C. Heeschen, A. Aicher, E. Dernbach, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2003): "Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells." *Circulation* 108(20): 2511-6.
- Vajkoczy, P., S. Blum, M. Lamparter, R. Mailhammer, R. Erber, B. Engelhardt, D. Vestweber and A. K. Hatzopoulos (2003): "Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis." *J Exp Med* 197(12): 1755-65.
- Van Royen, N., S. H. Schirmer, B. Atasever, C. Y. Behrens, D. Ubbink, E. E. Buschmann, M. Voskuil, P. Bot, I. Hofer, R. O. Schlingemann, B. J. Biemond, J. G. Tijssen, C. Bode, W. Schaper, J. Oskam, D. A. Legemate, J. J. Piek and I. Buschmann (2005): "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* 112(7): 1040-6.
- Varadi, K., S. Michelfelder, T. Korff, M. Hecker, M. Trepel, H. A. Katus, J. A. Kleinschmidt and O. J. Muller (2011): "Novel random peptide libraries displayed on AAV serotype 9 for selection of endothelial cell-directed gene transfer vectors." *Gene Ther*

Vasa, M., S. Fichtlscherer, A. Aicher, K. Adler, C. Urbich, H. Martin, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2001): "Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease." *Circ Res* 89(1): E1-7.

Veniant, M. M., C. H. Zlot, R. L. Walzem, V. Pierotti, R. Driscoll, D. Dichek, J. Herz and S. G. Young (1998): "Lipoprotein clearance mechanisms in LDL receptor-deficient "Apo-B48-only" and "Apo-B100-only" mice." *J Clin Invest* 102(8): 1559-68.

Virmani, R., A. P. Burke, F. D. Kolodgie and A. Farb (2002): "Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions." *Journal of interventional cardiology* 15(6): 439-46.

Voloshin, T., S. Gingis-Velitski, R. Bril, L. Benayoun, M. Munster, C. Milsom, S. Man, R. S. Kerbel and Y. Shaked (2011): "G-CSF supplementation with chemotherapy can promote revascularization and subsequent tumor regrowth: prevention by a CXCR4 antagonist." *Blood* 118(12): 3426-35.

Weber, C. and R. R. Koenen (2006): "Fine-tuning leukocyte responses: towards a chemokine 'interactome'." *Trends in immunology* 27(6): 268-73.

Wei, J., S. Blum, M. Unger, G. Jarmy, M. Lamparter, A. Geishauser, G. A. Vlastos, G. Chan, K. D. Fischer, D. Rattat, K. M. Debatin, A. K. Hatzopoulos and C. Beltinger (2004): "Embryonic endothelial progenitor cells armed with a suicide gene target hypoxic lung metastases after intravenous delivery." *Cancer cell* 5(5): 477-88.

Welsch, U.: "Histologie." Elsevier GmbH München, 2nd Auflage 2005.

White, G. E. and D. R. Greaves (2009): "Fractalkine: one chemokine, many functions." *Blood* 113(4): 767-8.

Witzenbichler, B., T. Asahara, T. Murohara, M. Silver, I. Spyridopoulos, M. Magner, N. Principe, M. Kearney, J. S. Hu and J. M. Isner (1998): "Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia." *Am J Pathol* 153(2): 381-94.

Yanni, A. E., H. A. Yatzidis, N. G. Kavantzias, E. V. Agapitos, D. N. Perrea and P. E. Karayannacos (2003): "Dietary L-aspartate and L-glutamate inhibit fatty streak initiation in cholesterol-fed rabbit." *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* 13(2): 80-6.

Yona, S. and S. Jung (2010): "Monocytes: subsets, origins, fates and functions." *Current opinion in hematology* 17(1): 53-9.

Zachary, I., A. Mathur, S. Yla-Herttuala and J. Martin (2000): "Vascular protection: A novel nonangiogenic cardiovascular role for vascular endothelial growth factor." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(6): 1512-20.

Zaruba, M. M., H. D. Theiss, M. Vallaster, U. Mehl, S. Brunner, R. David, R. Fischer, L. Krieg, E. Hirsch, B. Huber, P. Nathan, L. Israel, A. Imhof, N. Herbach, G. Assmann, R. Wanke, J. Mueller-Hoecker, G. Steinbeck and W. M. Franz (2009): "Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction." *Cell Stem Cell* 4(4): 313-23.

Zernecke, A., A. Schober, I. Bot, P. Von Hundelshausen, E. A. Liehn, B. Mopps, M. Mericskay, P. Gierschik, E. A. Biessen and C. Weber (2005): "SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells." *Circ Res* 96(7): 784-91.

Zhang, S. H., R. L. Reddick, J. A. Piedrahita and N. Maeda (1992): "Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E." *Science* 258(5081): 468-71.

Zhang, W. B., J. M. Navenot, B. Haribabu, H. Tamamura, K. Hiramatu, A. Omagari, G. Pei, J. P. Manfredi, N. Fujii, J. R. Broach and S. C. Peiper (2002): "A point mutation that confers constitutive activity to CXCR4 reveals that T140 is an inverse agonist and that AMD3100 and ALX40-4C are weak partial agonists." *J Biol Chem* 277(27): 24515-21.

Zhou, B., P. X. Liu, H. F. Lan, Z. H. Fang, Z. B. Han, H. Ren, M. C. Poon and Z. C. Han (2007): "Enhancement of neovascularization with mobilized blood cells transplantaion: supply of angioblasts and angiogenic cytokines." *J Cell Biochem* 102(1): 183-95.

Ziada, A. M., O. Hudlicka, K. R. Tyler and A. J. Wright (1984): "The effect of long-term vasodilatation on capillary growth and performance in rabbit heart and skeletal muscle." *Cardiovasc Res* 18(12): 724-32.

Ziegelhoeffer, T., B. Fernandez, S. Kostin, M. Heil, R. Voswinckel, A. Helisch and W. Schaper (2004): "Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature." *Circ Res* 94(2): 230-8.

Zincarelli, C., S. Soltys, G. Rengo and J. E. Rabinowitz (2008): "Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection." *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16(6): 1073-80.

8 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Reincke und Herrn Prof. Dr. J. Heesemann als Organisatoren des Promotionsstudiengangs „Molekulare und Systembiologische Medizin“, an dem ich teilnahm, für die Förderung bedanken, von der ich für meine Arbeit sehr profitiert habe.

Mein Dank gilt außerdem meinem Doktorvater, Prof. Dr. Christian Kupatt für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, sein großes Interesse an dem Thema, welches sich in vielen fruchtbaren Diskussionen zeigte, und darin, dass er es stets verstand, mich zu motivieren. Dank gebührt ihm auch für seine große Unterstützung, welche sich nicht nur auf das Forschungsprojekt beschränkte.

Ebenso möchte ich mich bei Dr. Rabea Hinkel für ihre Unterstützung bei den Versuchen, bei der Verfeinerung der Methoden und bei der Darstellung der Ergebnisse des Projektes bedanken.

Bei Susanne Helbig, Elisabeth Raatz und Tien-Cuong Kieu möchte ich mich herzlich für ihre exzellente technische Assistenz und ihre große Hilfe bei der Vorbereitung der Experimente bedanken. Herzlichen Dank auch an Dr. Chiraz El-Aouni für ihre Hilfe, mich in der Arbeitsgruppe zurechtzufinden, und ihre Betreuung in der Anfangsphase des Projektes. Dr. Achim Pfosser gebührt Dank für seine Einführung in die Tierversuche, für die Unterstützung bei deren Durchführung und nicht zuletzt für die ausgezeichneten Steaks.

Susanne Bierschenk, Dr. Claudia Nußbaum und Prof. Dr. Markus Sperandio vom Walter-Brendel-Zentrum bin ich für ihre Hilfe, ihre Geduld und ihre konstruktiven Diskussionen bei der Etablierung und Interpretation der Adhäsionsversuche zu Dank verpflichtet. Ebenso gilt mein Dank Dr. Niklas Münchmeier und Herrn PD Dr. Peter Nelson aus der Medizinischen Klinik Innenstadt für die Unterstützung bei den Adhäsionsversuchen sowie für die Bereitstellung etlicher benötigter Plasmide.

Bei Franziska Götz möchte ich mich für die Einführung in die zahlreichen Methoden sowie für die gute Vorarbeit bedanken. Herzlichen Dank auch an Tilman Ziegler für die Durchführung der konfokalmikroskopischen Untersuchungen und für die moralische Unterstützung.

Ein besonderer Dank gebührt meiner Mitdoktorandin Teresa Trenkwalder für ihre wirklich außerordentliche Unterstützung.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Verwandten und Bekannten, insbesondere meinen Eltern, meinem Bruder und Theresa Tumewu herzlich für ihr Verständnis und ihre große Unterstützung in der gesamten Zeit danken.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Georg Maximilian Stachel
Geburtsdatum	13.07.1985
Geburtsort	Saarbrücken
Nationalität	Deutsch
Familienstand	Ledig

Schulische Ausbildung

09/1995-06/2004 06/2004	Robert-Schuman-Gymnasium Saarlouis Abitur; Leistungsfächer: Physik, Mathematik, Englisch
----------------------------	---

Zivildienst

08/2004-04/2005	Zivildienst als Rettungssanitäter, DRK-Kreisverband Saarlouis
-----------------	---

Universitäre Ausbildung

10/2005-11/2011	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
11/2011	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2010-07/2011	Praktisches Jahr in den Fächern Chirurgie, Anästhesie und Innere Medizin
08/2007	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Wissenschaftliche Tätigkeit

10/2007-01/2012	Im Rahmen des Promotionsstudiengangs „Molekulare und Systembiologische Medizin“ Doktorarbeit bei Prof. Dr. C. Kupatt, Medizinische Klinik und Poliklinik I, Klinikum der Universität München
-----------------	--

10 Anhang

10.1 Sequenz des SDF-1-Fractalkine-GPI-Konstrukts

ATGaacgccaaaggtcgtgggtcgtgctgggtcctcgtgctgaccgcgctctgcctcagcgacgggaagcc
 cgtcagcctgagctacagatgcccatgccgattcttcgaaagccatggtgccagagccaacgtcaagc
 atctcaaaattctcaacactccaaactgtgcccttcagattgtagcccggctgaagaacaacaacaga
 caagtgtgcatcgaccgaagctaaagtggattcaggagtagctgggaaagctttaacaag

TCTAGAggcggcaccttcgagaagcagatcggcgaggtgaagcccaggaccaccctgccgcggggg
 aatggacgagctctgtggctcctggagcccgaagccacaggcgaaagcagtagcctggagccgactcctt
 ctcccaggaagcacagagggccctggggacctcccagagctgccgacgggtgtgactggttcctca
 gggaccaggctcccccgacgccaaaggctcaggatggagggcctgtgggcacggagcttttccgagt
 gcctcccgtctccactgccgccacgtggcagagttctgctcccaccaacctgggcccagcctctggg
 ctgaggcaaagacctctgaggccccgtccaccaggaccctccaccaggcctccactgcgtcctcc
 ccagcccagaggagaatgctccgtctgaaggccagcgtgtgtggggtcaggacagagcccaggcc
 agagaactctctggagcgggaggagatgggtcccgtgccagcgcacacggatgcctccaggactggg
 ggctggcagcatggcccagctctctgtggctcctgtctcctcagaagggacccccagcagggagcca
 gtggcttcaggcagctggaccctaaaggctgaggaaccatccatgccaccatggacccccagaggct
 gggcgtccttatcactcctgtccctgacgcccaggctgccaccggaggcag**GCTAG**

aacaacctgtatcccaagcagcggctcattcaagacacagatatgcacttatacccataccattagcag
 taattacaacatgtattgtgctgta **TAT**

10.2 Primer

bgh	fw	5' TCT AGT TGC CAG CCA TCT GTT GT 3'
	rev	5' TGG GAG TGG CAC CTT CCA 3'