

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin III

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gawaz

**Die Expression von Junctional Adhesion Molecule-A
auf humanen CD34⁺ Zellen fördert deren Adhäsion
und Differenzierung zu endothelialen
Progenitorzellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

**Stephan Matthias Gnerlich
aus Engen**

2011

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Gawaz

2. Berichterstatter: Professor Dr. L. Kanz

Für meine Eltern

„Die Dogmen wechseln, und unser Wissen ist trüglich,
aber die Natur irrt nicht.

Ihr Gang ist sicher, und sie verbirgt ihn nicht.

Jedes ist ganz in ihr, und sie ist ganz in jedem.“

Arthur Schopenhauer. Die Welt als Wille und Vorstellung. 1819.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Atherosklerose und ihre Konsequenzen.....	6
1.2 Akutintervention und Therapie.....	9
1.3 Die Rolle von Stammzellen	10
1.4 Junctional Adhesion Molecule-A.....	12
2. Material und Methodik	14
2.1 Herstellung löslicher Fc-Fusionsproteine.....	14
2.2 Klonen humaner, löslicher JAM-A-Fc und JAM-C-Fc Proteine	14
2.3 Generierung stabil Fc-exprimierender CHO Zellen.....	15
2.4 Isolierung der Control-Fc, JAM-A-Fc und JAM-C-Fc Proteine	15
2.5 Thrombozytenisolierung	16
2.6 Isolierung und Kultivierung humaner CD34 ⁺ Zellen	16
2.7 Isolierung und Kultivierung humaner arterieller Endothelzellen	17
2.8 Adhäsions Assays unter statischen und dynamischen Bedingungen ..	18
2.9 Durchflusszytometrie	19
2.10 Nachweis von JAM-A und JAM-C mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese und Western-Blot Analyse	20
2.11 Colony Forming Unit Assay	21
2.12 Immunfluoreszenz Mikroskopie	22
2.13 Reverse Transkription – Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).....	22
2.14 Scratch Assay.....	23
2.15 Datenpräsentation und statistische Analyse	24
3. Ergebnisse	24
3.1 Die Adhäsion humaner CD34 ⁺ Progenitorzellen an immobilisierten Thrombozyten wird unter statischen und dynamischen Bedingungen durch JAM-A Interaktion gefördert.....	24
3.2 Humane CD34 ⁺ Progenitorzellen exprimieren JAM-A	28
3.3 Die CD34 ⁺ Progenitorzell Adhäsion wird durch die Bindung von JAM-A an JAM-A sowie an LFA-1 vermittelt	30

3.4 Die Differenzierung von CD34 ⁺ Zellen zu endothelialen Progenitorzellen wird durch JAM-A vermittelt.....	33
3.5 JAM-A ist an dem CD34 ⁺ Zell-induzierten Reendothelialisierungsprozess <i>in vitro</i> beteiligt	40
4. Diskussion	43
5. Zusammenfassung	46
6. Literaturverzeichnis.....	49
7. Anhang	60
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	60
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	63
8. Danksagung	65
9. Publikationen	66
9.1 Publikationen mit Ergebnissen aus dieser Arbeit.....	66
9.2 Weitere Publikationen des Autors.....	67
10. Lebenslauf.....	69

1. Einleitung

1.1 Atherosklerose und ihre Konsequenzen

In den westlichen Industrienationen, darunter auch Deutschland, nimmt die Inzidenz und Prävalenz von Herz- und Gefäßerkrankungen immer weiter zu. Ein vermehrtes Auftreten von kardiovaskulären Risikofaktoren, in den Populationen dieser Länder, ist der Hauptverursacher für diese Entwicklung. Hierzu zählen LDL-Cholesterin-Erhöhung, HDL-Cholesterin-Minderung, Diabetes mellitus, Arterielle Hypertonie und der Nikotinkonsum. Diese sogenannten Klasse I Risikofaktoren, aber auch sekundäre Risikofaktoren wie Adipositas, Bewegungsmangel, vermehrter Stress und unbeeinflussbare Risikofaktoren wie Lebensalter, Geschlecht und eine genetische Disposition spielen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose [1-3]. Allein in Deutschland starben im Jahr 2006 laut Statistischem Jahrbuch 218.000 Menschen an einer ischämischen Herzkrankheit, davon 73.811 Frauen und 144.189 Männer. Die Chronisch Ischämische Herzkrankheit sowie der Akute Myokardinfarkt sind die beiden Haupttodesursachen bei Männern in der Bundesrepublik. Bei Frauen belegen sie die Plätze Eins und Drei [1].

Eine Arterienwand besteht aus drei Schichten. Diese sind, von Innen nach Außen: 1) die Intima, die Endothelzellen enthält und das Lumen des Gefäßes auskleidet, 2) die Media, die hauptsächlich glatte Muskelzellen enthält und für die Anpassung an den Kreislaufzustand verantwortlich ist und 3) die Adventitia, eine bindegewebige Stütze.

Atherosklerose leitet sich aus den griechischen Wörtern athero (griech. = Schleim) und skleros (griech. = hart) ab. Nach Definition der Weltgesundheitsorganisation WHO ist die Atherosklerose nun eine „variable Kombination von Intimaveränderungen (der Arterien), bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut, Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen (Kalkablagerungen), verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“ [3].

Sie betrifft vor allem die großen und mittelgroßen Arterien und führt zu relevanten Krankheitsbildern, wie z.B. der Koronaren Herzkrankheit (KHK), dem

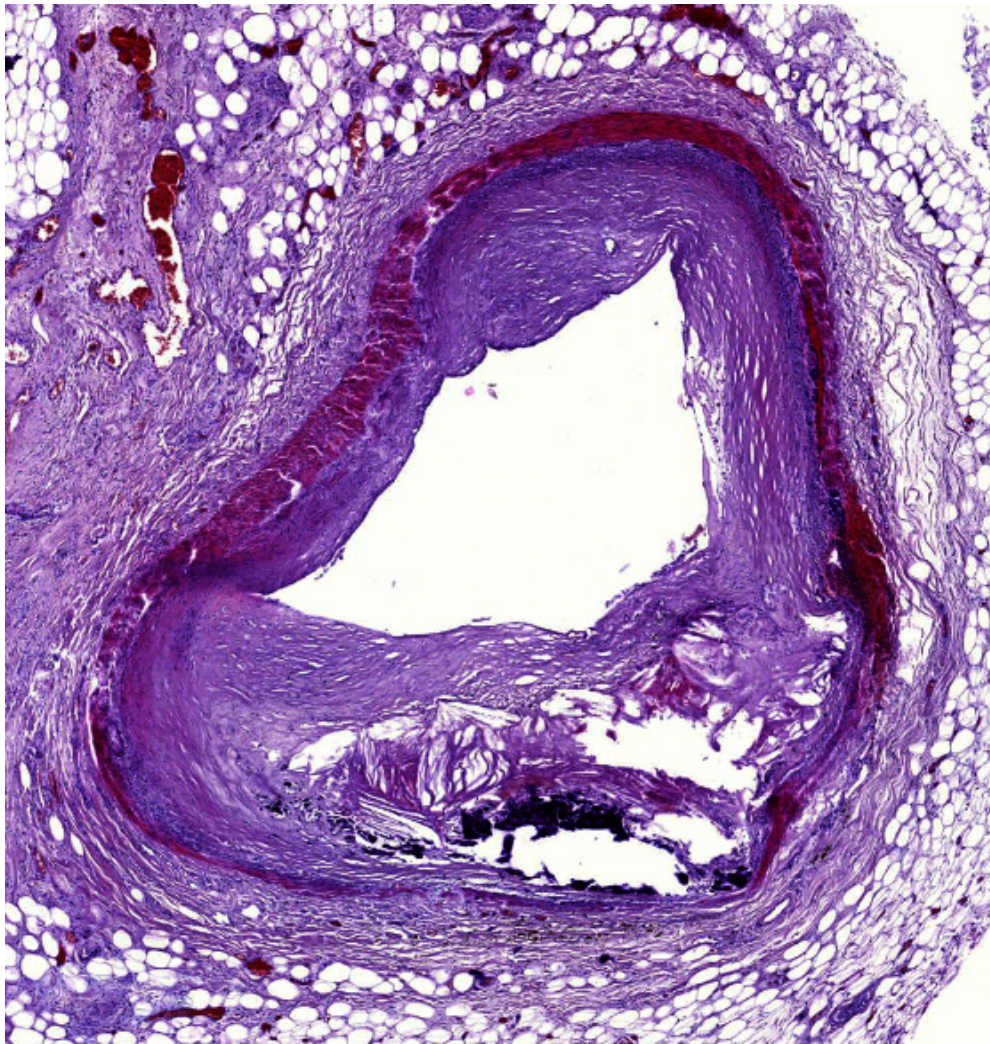


Abbildung 1 – Histologischer Schnitt: eines Ramus circumflexus mit stenosierender Koronararteriosklerose, in dem eine kalzifizierende Plaque erkennbar ist (mit freundlicher Genehmigung des Instituts für Pathologie, Universitätsklinikum Tübingen).

akuten Myokardinfarkt, der (peripheren) arteriellen Verschlusskrankung (pAVK), zerebrovaskulären Durchblutungsstörungen und anderen [4,5].

Genauer betrachtet führt eine initiale Läsion zu einem primären herdförmigen Endothelschaden der Intima: Response to Injury Hypothese, Ross 1977 [6]. Die Details dieser Initilläsion sind bis dato nicht nicht exakt verstanden. Diese endotheliale Dysfunktion führt jedoch dazu, dass durch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen nun Monozyten, Lymphozyten und Lipoproteine in die subendotheliale Intima gelangen. Darüber hinaus führt es zu einer Anlagerung von Thrombozyten, welche wiederum eine

Entzündungsreaktion durch die Sekretion von Prostaglandinen und Leukotrienen hervorrufen und durch den Platelet Derived Growth Factor (PDGF) zu einer lokalen Proliferation von Bindegewebe führen (Stadium I nach Stary). Die frühesten makroskopisch sichtbaren Veränderungen sind Fettstreifen (fatty streaks), welche vor allem von lipidbeladenen Muskelzellen hervorgerufen werden (Stadium II nach Stary). Eine kontinuierliche Einwanderung von Monozyten in die Arterienmedia und deren konsekutive Differenzierung zu Makrophagen induziert, zusammen mit dem umliegenden aktivierten Endothel, die Produktion aggressiver Sauerstoffradikale. Diese verursachen wiederum die Oxidation des nun in der Media befindlichen Low-Density-Lipoprotein (LDL). Der Versuch der Makrophagen dieses modifizierte, oxidierte LDL zu phagozytieren, führt zur Bildung aufgeblähter Schaumzellen, welche letzten Endes platzen und erneut Makrophagen anlocken. T-Lymphozyten verstärken den inflammatorischen Prozess zusätzlich durch die Sezernierung von TNF- α und INF- γ (Stadium III nach Stary). Durch weitere extrazelluläre Akkumulation der anfallenden Lipide entstehen schließlich Cholesterinkristallausfällungen und Kalksalzeinlagerungen. Aus dem reversiblen Präatherom ist somit ein manifestes Atherom geworden (Stadium IV nach Stary). Zusammen mit der vorangetriebenen Bindegewebs- und glatten Muskelzellproliferation entstehen so fibrinöse Plaques (Stadium V nach Stary). Es kommt zur fortschreitenden Lumeneinengung, Minderperfusion und Sauerstoffunterversorgung der distal der Läsion gelegenen Organe, insbesondere bei erhöhtem Sauerstoffbedarf. Ist diese atherosklerotische Engstelle beispielsweise in einer Koronararterie des Herzens lokalisiert, kommt es bei Anstrengung zu anfallsartigen, retrosternalen Beschwerden, der Angina pectoris. Ein anhaltender Entzündungsprozess kann zusätzlich zu lokalen und zentralen Nekrosen und Ulzerationen oder thrombohämorrhagischen Veränderungen, wie z.B. Fissuren, Hämatomen und Thromben führen [3, 7, 8-11].

Durch das Aufbrechen dieser instabilen Plaques und das Verschleppen von solidem Material in weiter distal gelegene, engere Gefäßabschnitte, droht

der plötzliche Totalverschluss von Versorgungsgebieten und damit der Myokardinfarkt.

1.2 Akutintervention und Therapie

Bei einem akuten, kompletten Gefäßverschluss eines Koronargefäßes, mit drohendem transmuralen Zelluntergang, ist neben den ärztlichen Sofortmaßnahmen wie Frequenzkontrolle, Sauerstoffzufuhr, Vasodilatation, Antikoagulation sowie gegebenenfalls Sedierung und Analgesie, vor allem eine schnelle Reperfusionstherapie bedeutsam [4, 5]. Goldstandard ist hier die Perkutane Transluminale Koronarangioplastie (PTCA) und Stentimplantation im Herzkatheterlabor. Alternativ kann konservativ mit Aktivator der Fibrinolyse behandelt werden. Patienten mit akutem Koronarsyndrom und erhöhtem Risiko, d.h. ischämischen ST-Strecken-Veränderungen im 12-Kanal EKG und/ oder erhöhten Nekrosemarkern, z.B. Troponin, profitieren zudem von einer dualen antithrombozytären Therapie mit ASS und Clopidogrel, wie in der CURE Studie gezeigt werden konnte [12].

Generell gilt, insbesondere bei transmuralen Infarkten, so schnell wie möglich zu intervenieren, um das funktionelle Outcome der Patienten bezüglich der Pumpleistung zu verbessern und dem Auftreten von Sekundärkomplikationen vorzubeugen („time is muscle“) [4, 5]. Durch die Ischämie kommt es zur Nekrose und zum Untergang sowohl von vaskulären Endothelzellen als auch von Myozyten. Es folgen strukturelle Umbauvorgänge und Anpassungsvorgänge am Herzen, das sogenannte Remodelling, die zu einer fibrotischen Defektheilung führen. Es kommt zu einer Infarkt Narbe, welche im ungünstigsten Fall hypertroph expandiert. Daraus können aneurysmatische Veränderungen, Dilatation, Erregungsbildungs- und Erregungsleitungsstörungen sowie unphysiologische, ektopische Herzrhythmusstörungen oder aber eine Herzinsuffizienz entstehen.

Das Limitierende an den derzeitigen Therapieverfahren ist, dass sie weder den bis zur Reperfusion entstandenen Schaden rückgängig machen noch Reperaturprozesse lenken können.

Die schnelle Wiedereröffnung von Gefäßabschnitten mittels PTCA/ Stentimplantation hat die Schadensbegrenzung als oberstes Ziel und ist unersetzlich in der Therapie des Myokardinfarkts geworden. Gleichwohl arbeitet man mit Hochdruck daran neue Wege zu finden die Gewebeheilung positiv beeinflussen zu können und beispielsweise das Wiederaussprossen von Gefäßen in infarzierte Gebiete oder aber die Regeneration von Herzmuskelgewebe selbst zu forcieren. In klinischen Studien wird aus diesem Grund vermehrt dazu übergegangen autologe Stammzellen nach einem Myokardinfarkt zu applizieren, beispielsweise aus dem Beckenkamm isoliert [13-17].

1.3 Die Rolle von Stammzellen

Bereits im Jahre 1997 berichteten Asahara und Kollegen zum ersten Mal, dass CD34-positive Progenitorzellen, isoliert aus peripherem Humanblut, zu Endothelzellen differenzieren und damit zur Neoangiogenese beitragen können [18]. Seit damals wurden zahlreiche Experimente und Studien unternommen, um die Rolle von CD34⁺ Stammzellen in der vaskulären Regeneration zu untersuchen [19-28]. Bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt wurde eine Mobilisierung von hämatopoetischen CD34⁺ Progenitorzellen in das Blut festgestellt, welche spezifisch endotheliale, muskuläre und früh-kardiale Marker exprimieren [29]. Diese Progenitorzellen werden, im Anschluss an eine Ischämie, aus dem Knochenmark oder aber aus ihren peripheren Nischen, in den Blutkreislauf mobilisiert, adhären an vaskulären Läsionen und differenzieren dort, je nach lokalem Milieu, zu einer Reihe verschiedener, ausgereifter Zelltypen [30-32]. Beeinträchtigungen in diesem pathophysiologischen Prozess, entweder durch eine pathologisch erniedrigte Anzahl oder durch dysfunktionale Progenitorzellen, führen zur inadäquaten Reparatur und bei vorbestehenden kardiovaskulären Risikofaktoren zu vermehrten Gefäßschäden und im weiteren Verlauf zur schnelleren Ausbildung von Atherosklerose [33, 34]. Die Anzahl zirkulierender CD34⁺ Progenitorzellen ist wiederum ein Prognosefaktor für kardiovaskuläre Ereignisse. Sie korreliert bei Patienten mit Koronarer Herzerkrankung beispielsweise positiv mit deren

kardiovaskulären Risikofaktoren [35-38]. Darum ist es nicht verwunderlich, dass bereits eine Fülle an *in vivo* Studien und klinischen Experimenten durchgeführt wurde, um den therapeutischen Nutzen einer Transplantation von CD34⁺ Zellen bei ischämischen Läsionen zu untersuchen [31, 39-41]. Eine autologe Transplantation von Progenitorzellen führt zur verbesserten Neovaskularisation, Kardiomyogenese, Neurogenese und funktionellen Regeneration nach Infarkt, *in vivo* [13-17]. Allerdings sind die molekularen Mechanismen, die dieser progenitorzellvermittelten Reparatur zugrunde liegen, noch immer nicht ausreichend verstanden und nur sehr wenige Stammzellen finden tatsächlich auch ihr Ziel [41].

Die Gefäßregeneration ist ein komplexer Prozess, der die Mobilisierung, Chemotaxis, Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von Progenitorzellen beinhaltet. Obgleich das sogenannte Homing von Progenitorzellen in das Knochenmark bereits ausgiebig erforscht wurde [42], bleibt die Ansiedlung von CD34⁺ Progenitorzellen in peripherem Gewebe und die anschließende Differenzierung zu Endothelzellen bis dato kaum verstanden [31, 41, 43]. Die wichtige Rolle von Thrombozyten bei der Adhäsion und anschließenden Differenzierung von Progenitorzellen wurde erst in letzter Zeit verstanden und in der Literatur hervorgehoben [44-49]. CD34⁺ Progenitorzellen haben per se keine Rezeptoren für Kollagen, der Hauptkomponente extrazellulärer Matrix, die beispielsweise nach ischämischem Endothelzelluntergang exponiert wird. Daher galt es heraus zu finden, wie diese Zellen an Orten vaskulärer Läsionen adhären. Adhärente Thrombozyten wiederum, die ersten Zellen an Ort und Stelle eines Gefäßschadens, sezernieren nach deren Adhäsion und Aktivierung Stammzell-Chemokine, wie beispielsweise den Stromal-Cell-Derived-Factor-1 (SDF-1), rekrutieren damit zirkulierende Progenitorzellen und induzieren anschließend, nach der Festadhäsion, deren Differenzierung zu Endothelzellen [44-47].

Die Mechanismen, die dieser thrombozyteninduzierten Rekrutierung und Differenzierung der CD34⁺ Zellen zugrunde liegen, wurden jedoch bislang noch nicht hinreichend erforscht. Sie könnten helfen neue Therapieformen, zum Beispiel nach abgeschlossener Reperfusion von Koronararterien, zu entwickeln.

1.4 Junctional Adhesion Molecule-A

Junctional Adhesion Molecules (JAMs) sind Zell-Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin Superfamilie mit einer V-C2 IgSF Struktur und weisen die höchste Übereinstimmung mit dem CTX-Protein, zuerst identifiziert als Cortical Thymocyte Marker bei *Xenopus laevis*, auf [50]. Phylogenetische Studien haben gezeigt, dass Vorfahren dieser Rezeptoren die Vorläufer für B-Zell und T-Zell Immunorezeptoren waren. Viele der CTX Proteine wurden ebenso als Rezeptoren für ein breites Spektrum an Viren identifiziert. Insbesondere die Bindung eines bestimmten Virus an JAM-A kann zur Apoptose der betreffenden Zelle führen. Dieser Mechanismus führte zur Vermutung, dass es sich hier um ein Relikt eines alten Suizidrezeptors handelt, der die Verbreitung einer Virusinfektion eindämmen sollte [51]. Die Junctional Adhesion Molecule Familie beinhaltet drei eng miteinander verwandte Proteine und vier weitere Proteine einer CTX-Unterfamilie. Die zentralen JAM Proteine sind JAM-A, JAM-B und JAM-C, des Weiteren sind hier ESAM, CAR, JAM-4 und JAML zu nennen [52]. Junctional Adhesion Molecule-A (JAM-A), auch bekannt als JAM-1 oder F11 Rezeptor, wird auf Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert. Er ist involviert in die Adhäsion, Sekretion und Aggregation von Thrombozyten sowie in die Initiierung inflammatorischer Thrombosen, ist am Aufbau und Remodelling von Tight-Junctions und an der Gefäßpermeabilität beteiligt und spielt eine wichtige Rolle bei der Leukozyten-Rekrutierung und deren polarisierter Transmigration [51, 53-55]. JAM-A ist ebenfalls ein Oberflächenmarker für murine hämatopoetische Precursorzellen [56]. In Studien fand man heraus, dass eine JAM-A Defizienz in einer signifikant reduzierten Leukozytenadhäsion an Gefäßläsionen resultiert [57]. In atherosklerotischen Läsionen wiederum scheint JAM-A hochreguliert zu sein [58].

Zusammengenommen weisen diese Resultate darauf hin, dass JAM-A auch für CD34-positive Progenitorzellen eine wichtige Rolle bei der Adhäsion und Transmigration spielen könnte.

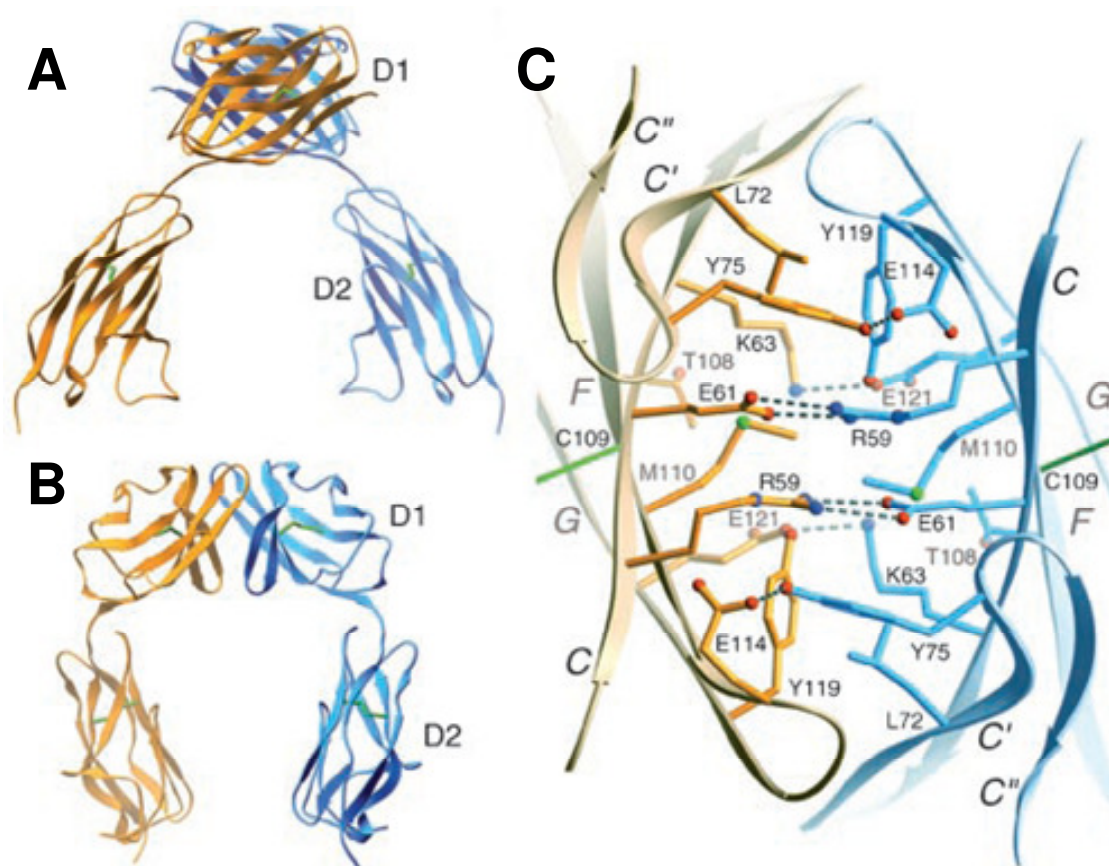


Abbildung 2 – Junctional Adhesion Molecule-A: A,B) Abbildungen des humanen JAM-A Dimers (ein Monomer in Blau, das andere in Orange). Die extrazelluläre Polypeptidkette faltet sich in zwei Ig-like Domänen, D1 und D2. C) Interaktion zwischen zwei D1 Domänen, zweier JAM-A Monomere (Prota et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2003, RCSB Protein Data Bank – open source).

In Tight Junctions interagiert JAM-A vor allem homophil mit JAM-A [59]. Es wird aber vermutet, dass während der Leukozytentransmigration diese homophile Interaktion durch eine heterophile Liganden-Interaktion abgelöst wird. Einer der Liganden für JAM-A ist LFA-1 ($\alpha(L)\beta(2)$, CD11a) [60], ein weiterer das Integrin $\alpha(v)\beta(3)$ [61].

Die Rolle von JAM-A bei der thrombozytenvermittelten Adhäsion und Differenzierung von humanen CD34⁺ Zellen, z.B. an Orten vaskulärer Läsionen, wurde bislang noch nicht erforscht. Das Ziel dieser Arbeit war es, diese Rolle

von JAM-A, bei der Adhäsion und anschließenden Differenzierung von CD34⁺ Zellen zu endothelialen Progenitorzellen *in vitro*, zu analysieren.

2. Material und Methodik

2.1 Herstellung löslicher Fc-Fusionsproteine

Fc Fusionsproteine wurden, wie bereits zuvor durch unsere Arbeitsgruppe beschrieben und publiziert, generiert [62].

2.2 Klonen humaner, löslicher JAM-A-Fc und JAM-C-Fc Proteine

Um eine lösliche Form von JAM-A und JAM-C zu generieren, fusionierten wir die extrazellulären Domänen dieser Proteine mit humanen Fc-Domänen. Im Detail replizierten wir zuallererst den Fc Teil aus einer humanen, kardialen cDNA Bibliothek (Clontech, Palo Alto, USA). Diese PCR Fragmente wurden in das Plasmid pcDNA-FRT (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) integriert. Hierfür benutzten wir die Restriktionsenzyme NotI/XhoI. Für die Klonierung der extrazellulären Domänen wurde die vollständige RNA von kultivierten Megakaryozyten, entsprechend den Empfehlungen des Herstellers, isoliert (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland). Anschließend wurde über Nacht mit 2 µg RNA bei 37° C eine reverse Transkription durchgeführt (Omniscript RT Kit; Qiagen, Hilden, Deutschland). 100 ng dieser cDNA wurden als Matrize für die PCR Amplifikation der cDNA der humanen extrazellulären Domänen mit dem Expand High Fidelity PCR System (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland) benutzt. Für JAM-A wurden die PCR Fragmente BglII/NotI in das Plasmid pcDNA-FRT-Fc (BamHI/NotI) kloniert. Für JAM-C wurden die Restriktionsstellen KpnI/NotI verwendet. Hergestellt wurde ein Plasmid, welches für das jeweilige humane Protein kodiert, fusioniert an eine humane Fc Domäne, inklusive einer spezifischen Hinge-Region. Für die Klonierung löslicher Fc Kontrollproteine (Fc-Control) wurde das Leader-Peptid von CD40 aus einer humanen, kardialen cDNA Bibliothek vervielfältigt (Clontech, Palo Alto, USA). Das PCR Fragment wurde mit KpnI/NotI in das

Plasmid pcDNA-FRT-Fc geklont. Die Fehlerfreiheit aller Plasmide wurde durch jeweilige Sequenzierung bestätigt (MediGenomix, Martinsried, Deutschland).

2.3 Generierung stabil Fc-exprimierender CHO Zellen

Flp-In™-CHO Zellen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurden im Verhältnis 9:1 mit dem Plasmid pOG44 kotransfiziert: jedes pcDNA-FRT-Fc rekombinant (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), bei einer Konfluenz von 70%. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen gewaschen und frisches Medium wurde hinzugegeben. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen 1:20 aufgesplittet und in frischem Medium, welches 500 µg/ml Hygromycin enthielt, kultiviert. Hygromycin-resistente Zellen wurden isoliert, kultiviert und mittels Western Blot auf die Expression von löslichem, rekombinatem Fc Fusionsprotein hin untersucht.

2.4 Isolierung der Control-Fc, JAM-A-Fc und JAM-C-Fc Proteine

Der Überstand kultivierter, stabiler, transfizierter CHO Zellen wurde gesammelt, zentrifugiert (3800 g, 30 min, 4° C) und filtriert (0,2 µm Porengröße). Lösliches Control-Fc oder lösliches rekombinantes humanes Protein (JAM-A-Fc oder JAM-C-Fc) wurde durch die Addition von 1,2 Vol. Ammoniumsulfatlösung (761 g/L) bei 4° C unter Rühren über Nacht ausgefällt. Diese Proteine wurden anschließend zentrifugiert (3000 g, 30 min, 4° C), in 0,1 Vol. PBS gelöst und über Nacht bei 4° C in PBS dialysiert. Die Proteinlösung wurde durch Zentrifugation (14000 g, 30 min, 4° C) und Filtration (0,2 µm) gereinigt und anschließend auf Protein A Säulen (HiTrap™ Protein A HP, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) aufgetragen, gepuffert mit Natriumphosphat (20 mM Natriumphosphat Puffer pH 7,0; 0,02 % NaN₃). Die Säulen wurden mit Bindungspuffer gewaschen, bis die OD₂₈₀ < 0,01 war und mit Lösungspuffer herausgelöst (100 mM Glycin pH 2,7). Die gelöste Fraktion (900 µl) wurde mit 100 µl Neutralisationspuffer (1 M Tris/HCl pH 9,0; 0,02 % NaN₃) neutralisiert und durchmischt. Anschliessend wurden sie bei 4° C über Nacht in PBS dialysiert, aliquotiert und bei -20° C eingefroren.

Die Säulen wurden mit Bindungspuffer neutralisiert und mit 20 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach SDS-PAGE wurden die Proteine durch Coomassie-Färbung oder durch Peroxidase-konjugierte anti-humane Ziegen IgG Antikörper detektiert (Fc γ fragment specific; 109-035-098; Dianova, Hamburg, Deutschland).

Darüber hinaus, als weitere Quelle unserer Fusionsproteine und zur Verifizierung unserer Ergebnisse, erwarben wir käuflich JAM-A-Fc (10 μ g/ml, R&D Systems, Minneapolis, USA) und JAM-C-Fc (10 μ g/ml, R&D Systems, Minneapolis, USA). Experimente mit den erworbenen Fusionsproteinen lieferten identische Ergebnisse wie Experimente mit unseren selbst generierten JAM-A und JAM-C Proteinen.

2.5 Thrombozytenisolierung

Humane Thrombozyten wurden, wie bereits vorausgehend durch uns beschrieben, isoliert [45, 47].

Wir verwendeten venöses Blut, entnommen aus den Ellenbeugen gesunder Freiwilliger und sammelten es in Acid-Citrate-Dextrose (ACD)-Puffer. Nach Zentrifugation bei 430 g für 20 Minuten ohne Bremse, wurde das Thrombozytenreiche Plasma (PRP) mit Transferpipetten in Falcons überführt und mit Tyrodes-HEPES Puffer vermischt (HEPES 2,5 mM/L [Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Gemrnay], NaCl 150 mM/L, KCl 1 mM/L, NaHCO₃ 2,5 mM/L, NaH₂PO₄ 0,36 mM/L, Glucose 5,5 mM/L [Sigma, Steinheim, Deutschland], BSA 1 mg/ml, pH 6,5). Danach folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 900 g für 10 Minuten mit Bremse. Nach Entfernen des Überstandes wurde das am Boden haftende Thrombozyten-Pellet in Tyrodes-HEPES Puffer resuspendiert (pH 7,4 ergänzt mit 1 mM/L CaCl₂ und 1 mM/L MgCl₂) und auf die entsprechende Konzentration eingestellt.

2.6 Isolierung und Kultivierung humaner CD34⁺ Zellen

Humane CD34⁺ Zellen wurden entweder aus humanem Nabelschnurblut oder aus dem Knochenmarkt isoliert und, wie bereits durch uns publiziert, kultiviert [46, 47]. Humane Mononukleäre Zellen wurden aus Nabelschnurblut,

peripherem Blut oder aus dem Knochenmark gewonnen. Wir benutzten hierfür die Dichtegradient-Zentrifugation auf Biocoll Auftrennungslösung (Biochrom, Berlin, Deutschland) bei 600 g für 15 Minuten. CD34⁺ Zellen wurden durch immunoaffine Selektion angereichert (CD34-Progenitor Cell Isolation Kit; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland). Das Verfahren wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für Zellkulturen wurde IMDM Medium mit Glutamax verwendet, zusätzlich mit 5 % kardialem, inaktiviertem, fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin-Streptomycin, 1 % MEM Vitaminen und 1 % nichtessentiellen Aminosäuren supplementiert (allesamt erworben von Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Die isolierten Zellen waren ≥ 95 % positiv für CD34 wie wir nach jedem Isolationsschritt durch durchflusszytometrische Bestimmungen verifizierten.

Alle Populationen von CD34⁺ Zellen, ob von humanem Nabelschnurblut, peripherem Blut oder aus dem Knochenmark, zeigten identische Ergebnisse in unseren *in vitro* Ergebnissen.

2.7 Isolierung und Kultivierung humaner arterieller Endothelzellen

Humane arterielle Endothelzellen (haECs) wurden isoliert und mit Methoden weiterbehandelt, die wir bereits veröffentlichten [47]. HaECs wurden durch immunzytochemische Färbung gegen den Von-Willebrand Faktor (Boehringer, Mannheim, Deutschland) und durch deren charakteristisches „Pflasterstein“-Wachstumsmuster, mittels Kontaktinhibition zwischen den Zellen, identifiziert. Routinefärbungen mit dem DNA Farbstoff DAPI (4', 6-Diamino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid; Boehringer, Mannheim, Deutschland) wurden dazu verwendet, eine Kontamination durch Mycoplasmen auszuschließen. Die Kultivierung wurde mittels eines speziellen endothelialen Wachstumsmediums durchgeführt (Endothelial Cell Growth Medium MV2, PromoCell, Heidelberg, Deutschland), supplementiert mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin-Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland).

2.8 Adhäsions Assays unter statischen und dynamischen Bedingungen

Die Auswertung der Adhäsion von CD34⁺ Zellen an immobilisierten Thrombozyten und an immobilisierten Proteinen (JAM-A-Fc oder JAM-C-Fc), unter statischen sowie dynamischen Bedingungen (Flusskammer), wurde wie bereits vorausgehend durch uns beschrieben, durchgeführt [47].

Für statische Adhäsions-Assays wurden isolierte Thrombozyten (2×10^8 /ml) auf eine 96-Well Platte gegeben, die mit Kollagen Typ I (20 µg/ml, BD Biosciences, San Jose, USA) vorbeschichtet war. Wir ließen die Thrombozyten während einer zweistündigen Inkubationszeit auf dem Kollagenboden adhären. Anschließend wurden die überschüssigen Blutplättchen vorsichtig mit Tyrodes-Hepes Puffer (pH 7,4 ergänzt mit 1 mM/L CaCl₂ und 1 mM/L MgCl₂) abgewaschen, sodass wir einen Monolayer immobilisierter Thrombozyten erhielten. JAM-A-Fc (10 µg/ml) und JAM-C-Fc (10 µg/ml) wurden auf die gleiche Weise, während einer zweistündigen Inkubationszeit, auf 96-Well Platten immobilisiert. Unspezifischer Adhäsion wurde durch die Blockierung der respektiven 96-Well Platten mit Bovinem Serum-Albumin (BSA 2%) für 30 Minuten im Anschluss vorgebeugt. Diese Thrombozytenmonolayer, bzw. Proteinmonolayer dienten uns als Grundlage unserer Adhäsionsexperimente. Danach wurden die in IMDM Medium resuspendierten isolierten CD34⁺ Zellen hinzugegeben und für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur in den Wells inkubiert. Nach zwei vorsichtigen Waschschritten mit PBS wurden die verbliebenen adhären CD34⁺ Zellen mittels direkter Phasenkontrast-Mikroskopie ausgezählt. Als Negativkontrolle wurden ähnliche Adhäsions-Experimente mit CD34⁺ Zellen auf Kollagen (20 µg/ml) oder Control-Fc (10 µg/ml) durchgeführt. Wo indiziert, wurden die adhären Thrombozyten oder aber die CD34⁺ Zellen, für 30 Minuten mit JAM-A-Fc (10 µg/ml, R&D Systems, Minneapolis, USA), JAM-C-Fc (10 µg/ml, R&D Systems, Minneapolis, USA), anti-JAM-A (10 µg/ml, R&D Systems, Minneapolis, USA), anti-JAM-C (10 µg/ml, R&D Systems, Minneapolis, USA), anti-CD11a (10 µg/ml, BioLegend, San Diego, USA), anti-CD11b (10 µg/ml, BioLegend, San Diego, USA) oder anti-CD18 (10 µg/ml, BioLegend, San Diego, USA) vorinkubiert. Als weitere

Negativkontrolle wurden adhärenz Thrombozyten oder isolierte CD34⁺ Zellen mit Control-Fc (10 µg/ml), anti-CD14 (10 µg/ml, R&D Systems, Minneapolis, USA; clone134603) oder isotypem Kontroll IgG1 (20 µg/ml, R&D Systems, Minneapolis, USA; clone11711) vorinkubiert.

Um nun die Progenitorzelladhäsion an immobilisierten Thrombozyten unter Flussbedingungen zu beurteilen, beschichteten wir in gleicher Weise wie bereits oben beschrieben Deckgläser mit Kollagen und ließen anschließend Thrombozyten darauf adhärenz. Diese Deckgläser wurden im Anschluss jedoch in einer Flusskammer (Oligene, Berlin, Deutschland) verwendet. Diese Methode wurde bereits durch unsere AG beschrieben [47]. Unspezifische Adhäsion wurde durch die Blockierung mit zweiprozentigem BSA verhindert. Die adhärenz Thrombozyten wurden für 60 Minuten mit Control-Fc, JAM-A-Fc oder JAM-C-Fc (jeweils 20 µg/ml) vorinkubiert, bevor der Flusskammer-Versuch begann. Die Perfusionsexperimente wurden unter Schergeschwindigkeiten von 2000 s⁻¹ durchgeführt (hohe Scherspannung). Alle Experimente wurden in Echtzeit auf Video-CD aufgenommen und anschließend ausgewertet.

2.9 Durchflusszytometrie

Um die Expression von JAM-A und JAM-C auf isolierten CD34⁺ Zellen sowie auf ruhenden und aktivierten isolierten Thrombozyten zu bestimmen, wurde eine Einfarben-Analyse mittels Durchflusszytometrie durchgeführt wie bereits durch uns beschrieben wurde [47]. Die Thrombozyten wurden entweder mit ADP (20 µM, Chrono-Par, Havertown, USA) oder TRAP (25 µM, Sigma, Steinheim, Deutschland) aktiviert.

Zusammengefasst wurden konjugierte, monoklonale Antikörper dazu benutzt die Oberflächenexpression von JAM-A (PE gelabelte anti-humane F11 Rezeptoren, BD Biosciences, San Jose, USA) und JAM-C (anti-JAM-C-PE, R&D Systems, Minneapolis, USA) auf CD34⁺ Zellen und ruhenden bzw. aktivierten Thrombozyten zu bestimmen. Der Status der Thrombozytenaktivierung wurde durch die Mitbestimmung der Oberflächenexpression von P-Selektin bestimmt (anti-CD62P-FITC,

Immunotec, Marseille, Frankreich). Als Positivkontrolle für die CD34⁺ Zellen diente anti-CD18-FITC (BD Biosciences, San Jose, USA). Monoklonale Immunglobuline, murines IgG1-PE, IgG2b-PE und IgG1-FITC (alle von BD Biosciences, San Jose, USA), wurden als isotype Kontrollantikörper appliziert.

Um die Differenzierung von CD34⁺ Zellen zu endothelialen Progenitorzellen zu bestätigen, wurden weitere Oberflächenantigene von uns untersucht. Die Expression von CD146 (anti-humanMCAM/CD146-FITC, R&D Systems, Minneapolis, USA), CD31 (anti-CD31-FITC, Immunotec, Marseille, Frankreich), CD34 (anti-CD34-FITC, BD Biosciences, San Jose, USA) und CD45 (anti-CD45-PE, Immunotec, Marseille, Frankreich) wurde auf isolierten CD34⁺ Zellen, humanen arteriellen Endothelzellen und auf aus Colony Forming Unit Assays hervorgegangenen endothelialen Progenitorzellen (entweder durch Thrombozyten induziert oder durch JAM-A-induziert) bestimmt. Die Oberflächenantigene von CD34⁺ Zellen dienten als Negativkontrolle und jene von humanen arteriellen Endothelzellen als Positivkontrolle.

Um nun die Fähigkeit aktiviert werden zu können bei unseren jüngst differenzierten endothelialen Progenitorzellen zu verifizieren, wurde die Expression von CD54 und CD106 gemessen. Dies geschah auf ruhenden (nicht aktivierten) und aktivierten, von CD34⁺ Zellen abstammenden endothelialen Progenitorzellen sowie auf primären humanen arteriellen Endothelzellen. Für die Aktivierung wurde entweder TNF- α (50 ng/ml) oder INF- γ (20 ng/ml) verwendet (Peprotech Inc., New Jersey, USA). Nach der Färbung von CD54 (anti-CD54-FITC, Immunotec, Marseille, Frankreich) und CD106 (anti-CD106-PE, BD Biosciences, San Jose, USA) wurden die Zellen im Durchflusszytometer (FACS-Calibur, BD Biosciences, San Jose, USA) gemessen. Monoklonale Immunglobuline, murines IgG1-FITC und IgG1-PE (BD Biosciences, San Jose, USA), dienten als isotype Kontrollantikörper.

2.10 Nachweis von JAM-A und JAM-C mittels SDS-PAGE

Gelelektrophorese und Western-Blot Analyse

Die jeweiligen Zellen wurden für 30 Minuten auf Eis mittels eines Lyse-Puffers, der 10 mM Tris-HCL pH7,2, 100 mM NaCl, 0,1 % NP-40, Protease Inhibitor

Cocktail (Roche, Mannheim, Deutschland) und 0,1 mM PMSF enthielt, lysiert. Die Zelltrümmer wurden bei 1400 rpm für 5 Minuten bei 4° C zentrifugiert. Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte mittels Bradford Test (BioRad, München, Deutschland), der nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Die Proteinexpression wurde durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot ermittelt. Gleiche Mengen Protein (25 µg) von humanen Endothelzellen (ECs), von CD34⁺ Progenitorzellen aus humanem Nabelschnurblut und von Thrombozyten wurden auf einem 10 % Gel separiert, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Hybond, Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK) und in Blockierungspuffer (5 %-iges Milchpulver) bei 37° C für eine Stunde inkubiert.

Dann wurden die Membranen über Nacht bei 4° C mit primären, murinen Antikörpern inkubiert, entweder mit anti-humanem JAM-A (1:50, Hycult Biotechnology, Uden, Niederlande) oder mit anti-humanem JAM-C (1:250, R&D Systems, Minneapolis, USA). Als sekundärer Antikörper diente ein anti-Maus IgG-HRP (1:5000, GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK). Es folgte eine weitere Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Proteindetektion erfolgte mittels ECL-Plus Western-Blotting Detektionssystem (Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK).

2.11 Colony Forming Unit Assay

Um die Effekte von JAM-A und JAM-C auf die Differenzierung von CD34⁺ Zellen zu endothelialen Progenitorzellen zu analysieren, wurden CD34⁺ Zellen entweder auf einen Monolayer Thrombozyten, auf eine Kollagenmatrix (10 µg/ml) oder aber auf immobilisiertes JAM-A-Fc oder JAM-C-Fc appliziert, wie bereits durch unsere AG beschrieben wurde [47]. Immobilisiertes Kollagen Typ I (BD Biosciences, San Jose, USA) und immobilisiertes Control-Fc dienten als Negativkontrolle, immobilisiertes Fibronectin als Positivkontrolle. Wo indiziert wurden die adhärenenten Thrombozyten mit Control-Fc, JAM-A-Fc oder JAM-C-Fc (jeweils 20 µg/ml) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für mehrere Tage in Endothelial Cell Growth Medium MV2 kultiviert, welches 5 % kardiales

inaktiviertes fetales Kälberserum, 5 ng/ml Epidermal Growth Factor, 0,2 µg/ml Hydrocortison, 0,5 µg/ml Vascular Endothelial Growth Factor, 10 ng/ml Basic Fibroblast Factor, 20 ng/ml R3 Insulin-like Growth Factor-1 und 1 µg/ml Ascorbinsäure (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) enthielt. Endotheliale Colony Forming Units aus den Progenitorzellen wurden zwischen den Tagen 5 und 10 gezählt (Anzahl der endothelialen Kolonien). Um die Expression endothelialer Oberflächenantigene zu beweisen, wurden die Zellen anschließend abgelöst und in PBS resuspendiert, mit Polyglobin (Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) für 15 Minuten inkubiert wiederum gewaschen und mit den respektiven gelabelten Antikörpern für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wie bereits unter „Durchflusszytometrie“ in „Material und Methoden“ beschrieben. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen an einem FACS-Calibur Durchflusszytometer analysiert (BD Biosciences, San Jose, USA).

2.12 Immunfluoreszenz Mikroskopie

Um die Differenzierung von CD34⁺ Zellen zu endothelialen Progenitorzellen zu untersuchen, benutzten wir unter Anderem eine Immunfluoreszenz-Färbung. Wir nahmen anti-humane monoklonale Antikörper (Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland) vom Kaninchen gegen den Von-Willebrand Faktor (vWF) und weiterführend einen sekundären anti-Kaninchen Antikörper vom Schaf (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), der fluoreszenzgelabelt war. Jedem Inkubationsschritt folgte ein behutsamer Waschschrift mit PBS. Die CD34⁺ Zellen wurden entweder mit JAM-A oder Thrombozyten für 10 Tage auf Objektträgern co-inkubiert und unter dem Immunfluoreszenz Mikroskop analysiert. Als Positivkontrolle dienten humane arterielle Endothelzellen (haECs).

2.13 Reverse Transkription – Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Nach der Differenzierung von CD34⁺ Zellen zu Kolonien endothelialer Progenitorzellen, wurden diese in Kulturflaschen weiterkultiviert und auf die

mRNA Expression von eNOS, CD45, CD31 (PECAM-1), tie-2, flk-1 (VEGFR-2) und β -Aktin hin untersucht. Wir benutzten dazu RT-PCR wie bereits durch unsere AG beschrieben wurde [47]. Es wurde mRNA durch das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben extrahiert. RT-PCR wurde mit dem ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, Mannheim, Deutschland) und der aTaq Polymerase (Promega, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Die Anlagerungstemperatur betrug 68,4° C für 30 Sekunden, gefolgt von der Extension bei 72° C für 45 Sekunden und einer abschließenden Extension bei 72° C für weitere 5 Minuten. Die Primer Sequenz war wie folgt:

eNOS forward 5`-GGA AAA GGC CAG GGC TCT GCT GGA GC-3`, reverse 5`-GAA CAC CAG CTC GCT CTC CCT AAG CTG-3`, CD45 forward 5`-GAG GAG GAA ATT GTT CCT CGT CTG ATA AGA-3`, reverse 5`-CTG GCA GGT AAG GCA GCA GAG CTG TGG-3`, CD31 forward 5`-GTT GTA TGA GGT CCA GAT TAT CCT GTC-3`, reverse 5`-GCT GAG GAC ACT TGA ACT TCC GTG TAC TGC`; tie-2 forward 5`-GAC GTA GTA GGA CGA TGC TAA TGG AAA GTC-3`, reverse 5`-GTG TAC TTC TAG AAT ATC AGG TAC TTC ATG C-3`, flk-1 forward 5`-CTT CTC TAG ACA GGC GCT GGG AGA AAG AAC-3`, reverse 5`-CAC GTT GAG ATT TGA AAT GGA CCC GAG ACA TG-3`, β -Aktin (interne Kontrolle), forward 5`-ACC TTC AAC ACC CCA GCC ATG-3`, reverse 5`-GCT CGG TCA GGA TCT TCA TGA GG-3`.

2.14 Scratch Assay

Ein wundinduzierter Reendothelialisierungs-Versuch (Scratch Assay) wurde, wie bereits in der Literatur beschrieben, durchgeführt [63]. Es wurden humane arterielle Endothelzellen auf eine Wellplatte gegeben und bis zur Konfluenz kultiviert. Auf diesem Monolayer aus Endothelzellen verursachten wir mit einer sterilen, gelben Pipettenspitze eine Läsion (Scratch) in der Mitte des Wells. Die so abgetrennten Zellen wurden abgewaschen und entfernt und die verbleibenden adhärennten Zellen wurden mit a) lediglich Medium als Kontrolle, b) zusätzlich Control-Fc als weitere Kontrolle, c) CD34⁺ Progenitorzellen und d)

CD34⁺ Progenitorzellen plus isolierten Thrombozyten ($0,5 \times 10^8$ /ml) inkubiert. Die Läsionen wurden für 17 Stunden überwacht und Photos wurden direkt nach der Verletzung (Stunde 0) und nach Ablauf der 17 Stunden aufgenommen.

2.15 Datenpräsentation und statistische Analyse

Alle Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben, soweit nichts Anderes vermerkt ist. Für paarweise Vergleiche wurde ein zweiseitiger, unpaariger T-Test verwendet. Für multiple Vergleiche, zwischen drei oder mehr Gruppen, wurde eine univariante Varianzanalyse (Analysis of variance, ANOVA) mit anschließendem Scheffé-Test angewandt. Alle statistischen Analysen waren zweiseitig und statistische Signifikanz wurde für P-Werte kleiner 0,05 angenommen. Alle statistischen Analysen wurden mit SPSS[®] Version 15 für Windows[®] durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Die Adhäsion humaner CD34⁺ Progenitorzellen an immobilisierten Thrombozyten wird unter statischen und dynamischen Bedingungen durch JAM-A Interaktion gefördert

Unsere Arbeitsgruppe hat bereits zuvor beschrieben, dass murine und humane Progenitorzellen an immobilisierten Thrombozyten *in vitro* adhären [45-47] und an arteriellen Thromben *in vivo* durch das Chemokin Stromal Cell Derived Factor-1 (SDF-1) und seinen Rezeptor CXCR4 rekrutiert werden [47]. Außerdem sind die Adhäsionsrezeptoren P-Selektin/ P-Selektin Glycoprotein Ligand-1 [44-46] und das Beta-2-Integrin [46] an diesem Vorgang beteiligt. Jedoch blieb der Rezeptor für das Beta-2-Integrin auf der Oberfläche der Thrombozyten bislang unerforscht.

Die Bindung des Beta-2-Integrins LFA-1 ($\alpha(L)\beta(2)$) an Junctional Adhesion Molecule-A (JAM-A) sowie die Bindung des Beta-2-Integrins Mac-1 ($\alpha(M)\beta(2)$) an Junctional Adhesion Molecule-C (JAM-C), resultiert in

einer Steigerung der Leukozyteninteraktion mit Thrombozyten und Endothelzellen, wie in der Literatur beschrieben wird [64, 65]. Da JAM Proteine eine zentrale Rolle bei der Zelladhäsion und Transmigration spielen, untersuchten wir, ob JAM-A auf der Oberfläche von Thrombozyten eine Rolle bei der Rekrutierung zirkulierender CD34⁺ Progenitorzellen spielt. Zu Beginn testeten wir die Adhäsion von CD34⁺ Zellen an immobilisierten Thrombozyten unter statischen Bedingungen.

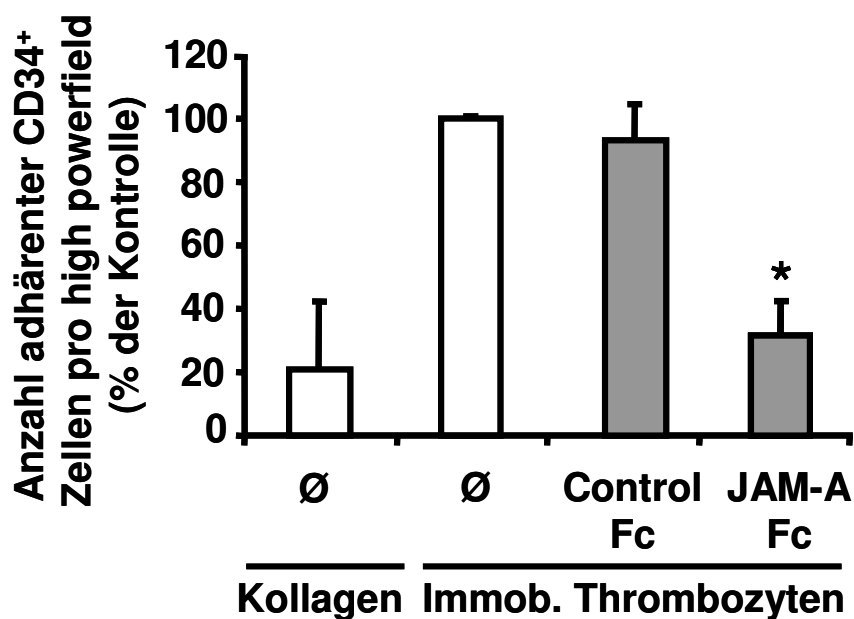


Abbildung 3 - Statischer Adhäsions Assay: Weiß: CD34⁺ Progenitorzellen adhäreren an immobilisierten Thrombozyten, jedoch nicht an Kollagen Typ I alleine. Grau: Diese Adhäsion kann durch Zugabe von löslichem JAM-A-Fc, nicht jedoch durch eine Negativkontrolle (lösliches Control-Fc) reduziert werden.

Wie bereits vorausgehend durch unsere Arbeitsgruppe beschrieben [45, 47], adhäreren humane CD34⁺ Progenitorzellen auf immobilisierten Thrombozyten, jedoch nicht auf immobilisiertem Kollagen Typ I alleine, was die Hauptkomponente der extrazellulären Matrix, z.B. an einer verletzten Gefäßwand, darstellt (P<0,05; Abbildung 3).

Die Adhäsion von CD34⁺ Zellen an immobilisierten Thrombozyten war wiederum in der Anwesenheit von löslichem JAM-A-Fc signifikant erniedrigt,

nicht jedoch bei Zugabe von löslichem Control-Fc ($P < 0,05$; Abbildung 3). In ähnlicher Weise inhibierten neutralisierende monoklonale Antikörper (mAb) gegen Beta-2-Integrin (CD18), gegen LFA-1 (alpha(L)beta(2); CD11a) und gegen JAM-A, jedoch nicht eine zugehörige isotype IgG Kontrolle oder anti-CD14, die Adhäsion der Progenitorzellen an immobilisierten Thrombozyten ($P < 0,05$; Abbildung 4).

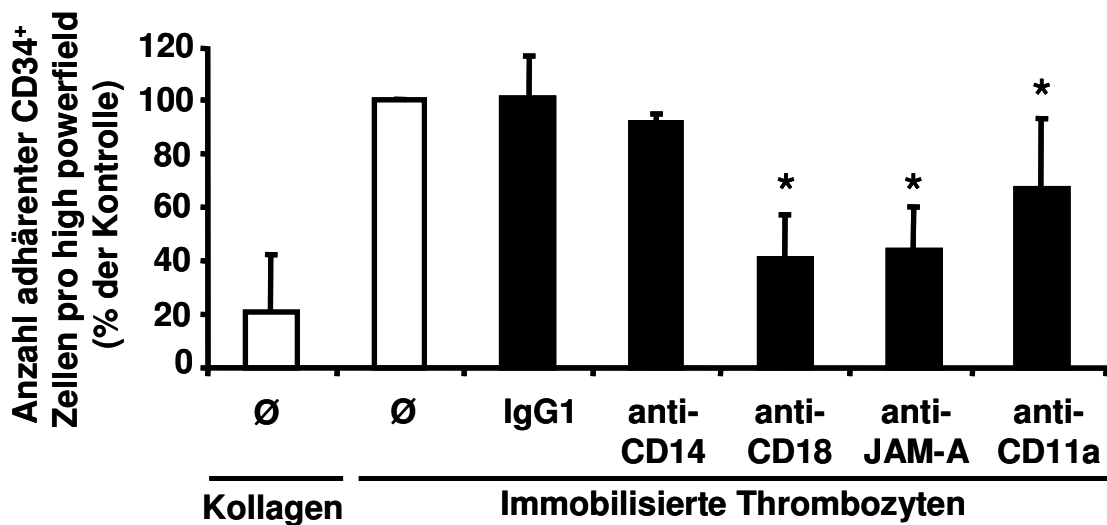


Abbildung 4 - Statischer Adhäsions Assay: Weiß: CD34⁺ Progenitorzellen adhäreren an immobilisierten Thrombozyten, jedoch nicht an Kollagen Typ I alleine. Schwarz: Diese Adhäsion kann wiederum durch Antikörper gegen JAM-A, CD11a und gegen CD18 reduziert werden, nicht jedoch mit Antikörpern gegen CD14 oder mit einer isotypen IgG1 Kontrolle.

Um unsere Ergebnisse unter hoher Scherspannung, ähnlich denen eines arteriellen Stroms, zu verifizieren, führten wir Perfusionsexperimente in einer Flusskammer durch. Wir perfundierten CD34⁺ Zellen über adhärenenten Thrombozyten in einer Parallelplatten-Flusskammer, bei einer Schergeschwindigkeit von 2000^s (Abbildungen 5, 6).

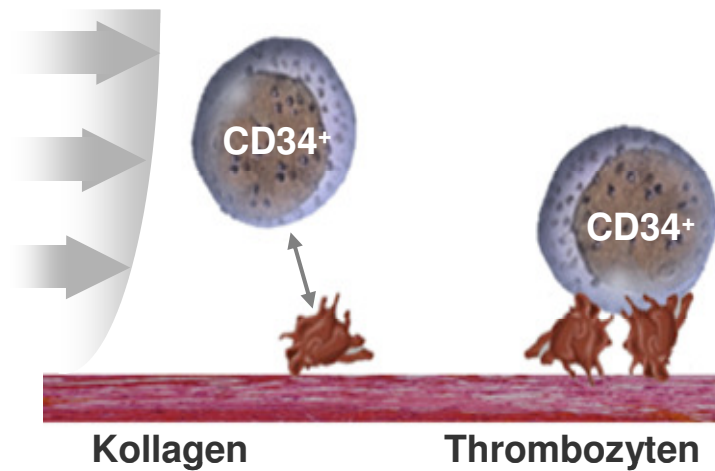


Abbildung 5 - Flusskammer: CD34⁺ Zellen wurden bei hoher Schergeschwindigkeit (2000^s) über einen Monolayer adhärenter Thrombozyten perfundiert, um arterielle Verhältnisse zu simulieren.

Eine beträchtliche Anzahl der perfundierten Progenitorzellen fing schon bald an zu rollen, der erste Schritt bei der Festadhäsion, um später dann zu adhären (Abbildung 6, ergänzend Video 1). Eine Präinkubation der immobilisierten Thrombozyten mit löslichem JAM-A-Fc, jedoch nicht mit löslichem Control-Fc, verringerte wiederum das Rollen der CD34⁺ Zellen unter den gegebenen Bedingungen (Control-Fc vs. JAM-A-Fc: Mittelwert \pm SD: 137,67 \pm 6,98 vs. 110,17 \pm 8,72; P<0,05; n=3; Abbildung 6, ergänzend Video 1).

Außerdem konnten wir nach der Vorinkubation mit JAM-A-Fc einen signifikanten Abfall der Adhäsion von CD34⁺ Zellen an immobilisierten Thrombozyten feststellen (Control-Fc vs. JAM-A-Fc: Mittelwert \pm SD: 90 \pm 8,69 vs. 37,22 \pm 6,2; P<0,05; n=3; Abbildung 6, ergänzend Video 1). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass JAM-A die Adhäsion von CD34⁺ Zellen an immobilisierten Thrombozyten fördert (Abbildungen 3-6, ergänzend Video 1).

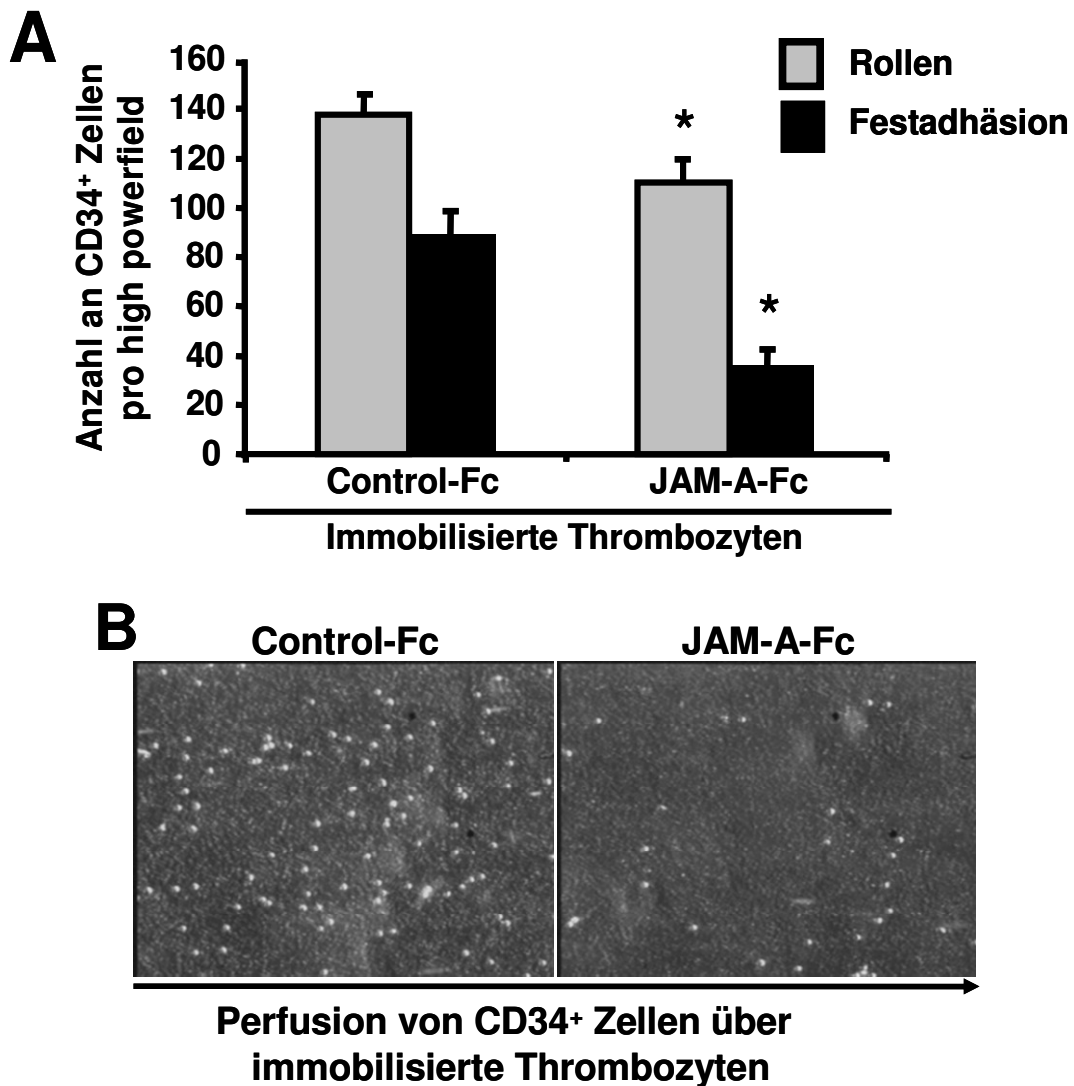


Abbildung 6 - Flusskammer: A) CD34⁺ Zellen adhären auch unter hoher Scherspannung an immobilisierten Thrombozyten. Diese Adhäsion kann unter Flussbedingungen, durch eine Vorinkubation der immobilisierten Thrombozyten mit JAM-A-Fc, inhibiert werden. B) Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen. – Vgl. hierzu Video 1

3.2 Humane CD34⁺ Progenitorzellen exprimieren JAM-A

Erst kürzlich wurde beschrieben, dass JAM-A auf murinen hämatopoetischen Precursorzellen exprimiert wird [56]. Jedoch wurde die Expression von JAM-A und deren funktionelle Rolle auf humanen CD34⁺ Progenitorzellen noch nicht

beschrieben, was uns dazu veranlasste deren mögliche Expression auf humanen CD34⁺ Zellen zu untersuchen.

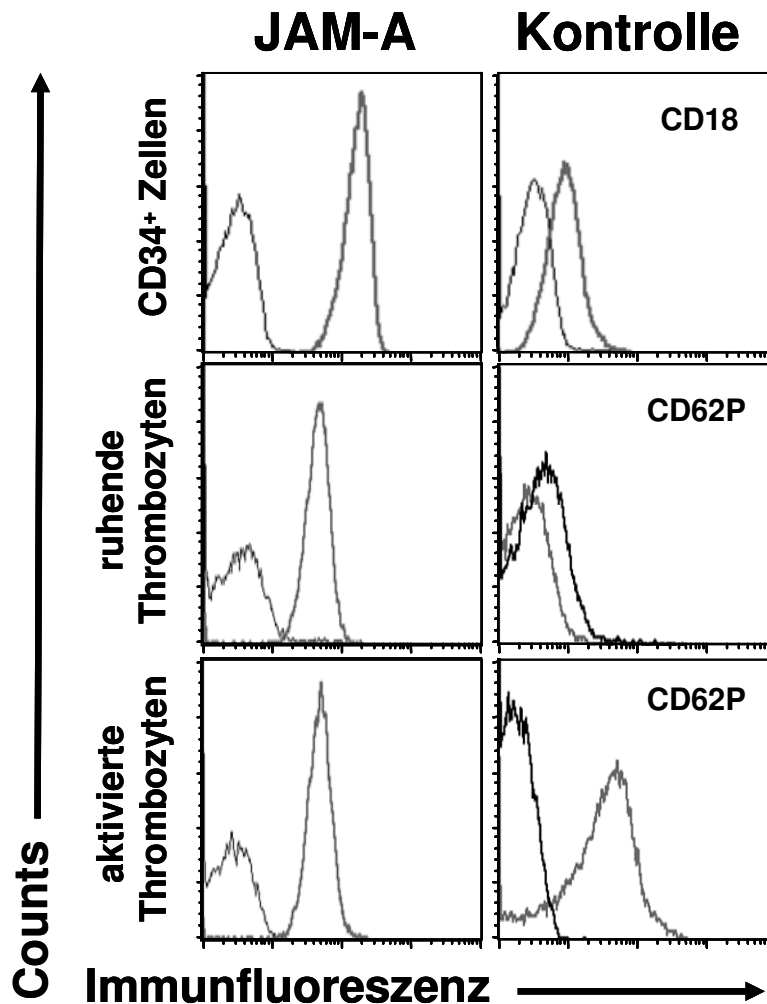


Abbildung 7 – Durchflusszytometrie: CD34⁺ Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche JAM-A. Die thrombozytäre Expression von JAM-A ist dabei unabhängig von deren Aktivierungszustand. Als Aktivierungsmarker diente CD62P (P-Selectin).

Thrombozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche konstitutiv JAM-A wie bereits in der Literatur beschrieben wird [53, 66-70]. Diese Expression ist unabhängig vom Aktivierungszustand des Thrombozyten (Abbildung 7). Durchflusszytometrische Analysen der JAM-A Expression auf CD34⁺ Zellen

zeigten, dass JAM-A ebenfalls in hohem Maße auf deren Oberfläche exprimiert wird (Abbildung 7). Die Expression von JAM-A auf CD34⁺ Zellen und Thrombozyten wurde ebenso durch Immunoblotting durch uns verifiziert (Abbildung 8).



Abbildung 8 – Immunoblot: CD34⁺ Zellen sowie Thrombozyten exprimieren JAM-A wie bereits durch die Durchflusszytometrie gezeigt werden konnte.

3.3 Die CD34⁺ Progenitorzell Adhäsion wird durch die Bindung von JAM-A an JAM-A sowie an LFA-1 vermittelt

JAM-A Proteine interagieren sowohl homophil mit JAM-A [54] als auch heterophil mit dem Integrin „Lymphocyte function-associated antigen-1“ (auch LFA-1 oder CD11a). In dieser Studie zeigen wir, dass JAM-A ebenfalls auf humanen CD34⁺ Progenitorzellen exprimiert wird. Da JAM-A nun sowohl homophile als auch heterophile Bindungspartner hat, fragten wir uns ob nun die homophile JAM-A - JAM-A Bindung oder aber die heterophile JAM-A - LFA-1 Bindung primär die CD34⁺ Zell Adhäsion reguliert.

Wir benutzten hierfür einen weiteren statischen Adhäsions Assay und beobachteten, dass CD34⁺ Zellen fest an immobilisiertem JAM-A-Fc, jedoch nicht an immobilisiertem Control-Fc adhärirten (immobilisiertes Control-Fc vs. immobilisiertes JAM-A-Fc: Mittelwert der adhärenenten Zellen \pm SD: 100 ± 50 vs. 590 ± 400 ; $P < 0,05$; $n=3$; Abbildung 9).

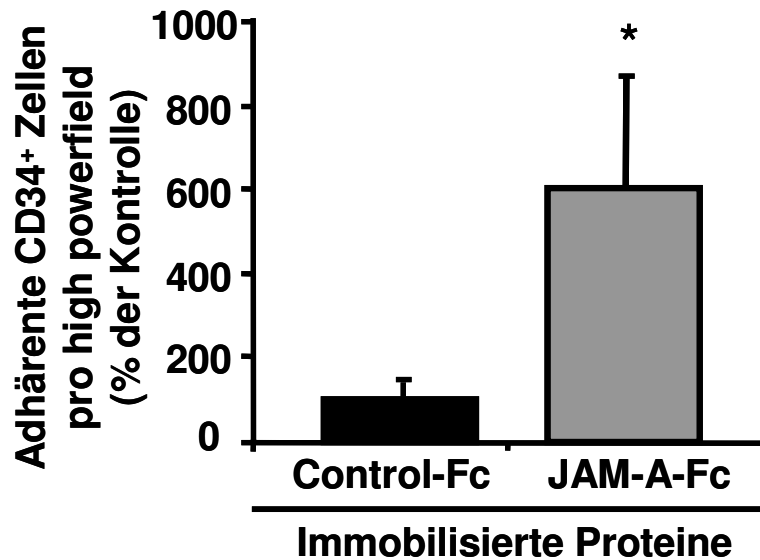


Abbildung 9 – Statischer Adhäsions Assay: CD34⁺ Zellen adhären fest an immobilisiertes JAM-A-Fc, jedoch nicht an Control-Fc .

Diese Adhäsion der CD34⁺ Zellen an immobilisiertem JAM-A-Fc wurde jedoch wesentlich durch die Zugabe von löslichem JAM-A-Fc oder aber einem neutralisierenden monoklonalen Antikörper gegen JAM-A (anti-JAM-A), reduziert ($P < 0,05$; Abbildungen 10,11).

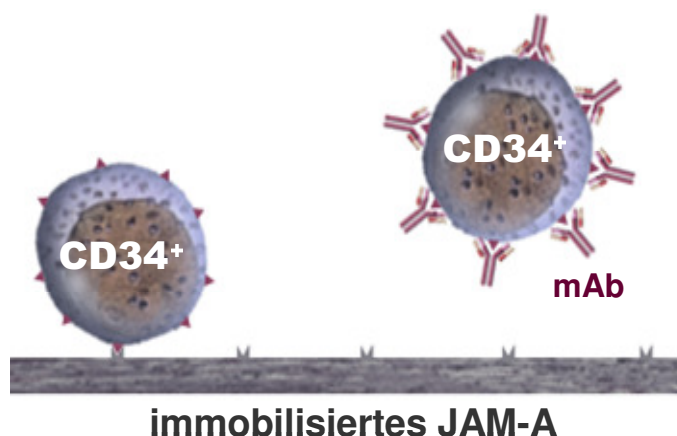


Abbildung 10 – Statischer Adhäsions Assay: Schematische Darstellung der Blockierung der Progenitorzelladhäsion.

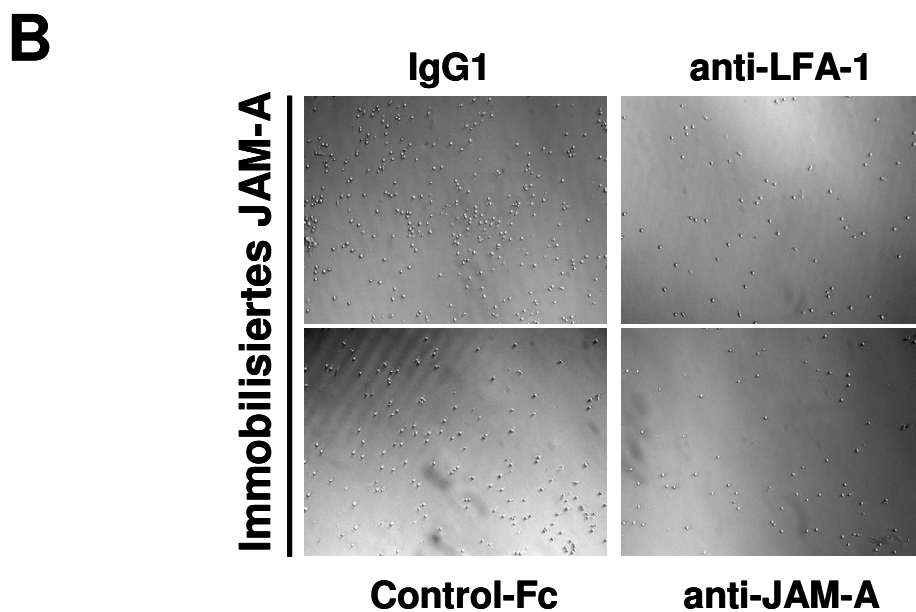
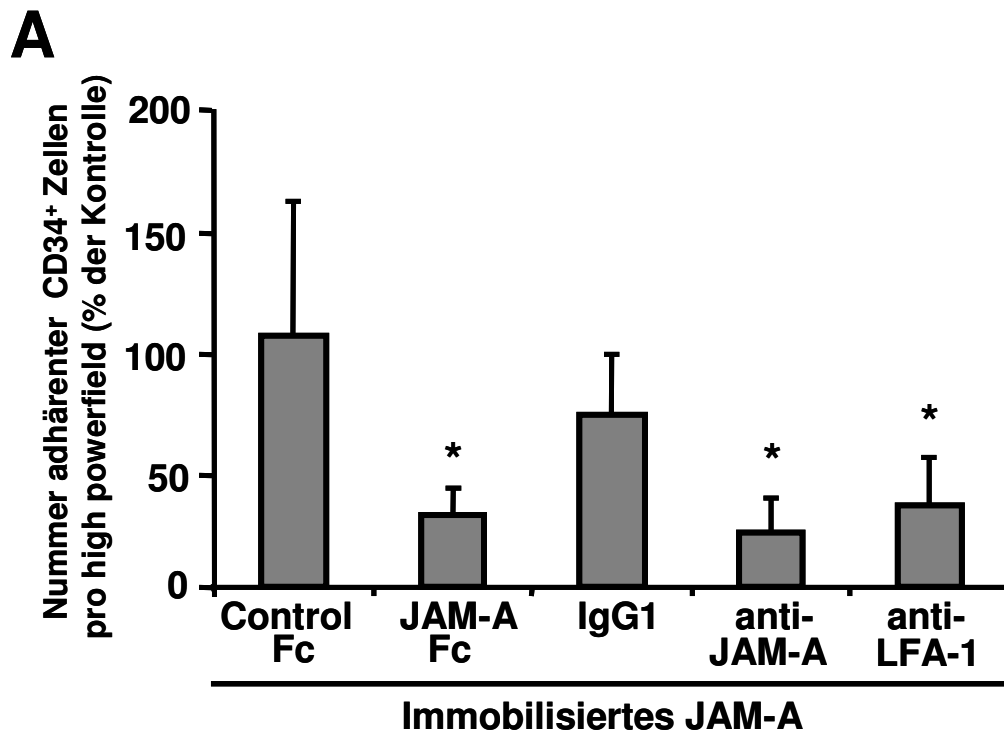


Abbildung 11 – Statischer Adhäsions Assay: A) Sowohl lösliches JAM-A-Fc, als auch anti-JAM-A oder aber anti-LFA-1 verringern die Adhäsion der CD34⁺ Zellen an immobilisiertem JAM-A, im Vergleich zu den Negativkontrollen Control-Fc und IgG1. B) Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen.

In ähnlicher Weise resultierte eine Vorinkubation der CD34⁺ Zellen mit einem blockierenden anti-LFA-1 Antikörper in einer verringerten Adhäsion (Control-Fc vs. JAM-A-Fc: Mittelwert adhärenter Zellen \pm SD: $100 \pm 53,78$ vs. $28,08 \pm 10,84$; $P < 0,05$; IgG1 Kontrolle vs. anti-JAM-A vs. anti-LFA-1: $68,7 \pm 24,56$ vs. $21,75 \pm 13,65$ vs. $32,42 \pm 19,9$; $P < 0,05$; $n=3$; Abbildung 11). Dies zeigt, dass beide, sowohl homophile (JAM-A – JAM-A) als auch heterophile (JAM-A – Integrin) Interaktionen, die CD34⁺ Zell Adhäsion regulieren.

3.4 Die Differenzierung von CD34⁺ Zellen zu endothelialen Progenitorzellen wird durch JAM-A vermittelt

Unsere Arbeitsgruppe hat bereits in vorangehenden Arbeiten berichtet, dass adhärenente Thrombozyten die Differenzierung von CD34⁺ Zellen zu endothelialen Zellen bewirken [45, 47]. Um nun weiterführend die molekularen Mechanismen der thrombozytenvermittelten Differenzierung von Progenitorzellen zu untersuchen, wurden CD34⁺ Zellen auf immobilisierten Thrombozyten (Positivkontrolle) oder aber auf immobilisiertem Kollagen (Negativkontrolle) bis zur Festadhärenz inkubiert und anschließend mit Endothelial Cell Growth Medium kultiviert. Diese Methode wurde bereits durch unsere Arbeitsgruppe publiziert [47]. In bestimmten Versuchsreihen wurde zusätzlich lösliches JAM-A-Fc, lösliches JAM-C-Fc oder aber lösliches Control-Fc in das Zellkultursystem gegeben. Die thrombozytenvermittelte Formation endothelialer Kolonien aus CD34⁺ Zellen war signifikant erniedrigt in Anwesenheit von löslichem JAM-A-Fc (sJAM-A-Fc), jedoch nicht in der Anwesenheit von sJAM-C-Fc oder sControl-Fc (sControl-Fc vs. sJAM-A-Fc vs. sJAM-C-Fc: Mittelwert der Kolonien \pm SD: $11 \pm 1,4$ vs. $3,5 \pm 0,7$ vs. $10,5 \pm 2,1$; $P < 0,05$; $n=3$; Abbildung 12).

Um nun die Rolle von JAM-A bei der Differenzierung der CD34⁺ Progenitorzellen zu endothelialen Progenitorzellen näher zu untersuchen, wurden weiterführende Colony Forming Unit Assays durchgeführt. Genauer gesagt wurden nun CD34⁺ Zellen auf immobilisiertem Fibronectin (Positivkontrolle), Control-Fc (Negativkontrolle) und immobilisiertem JAM-A-Fc

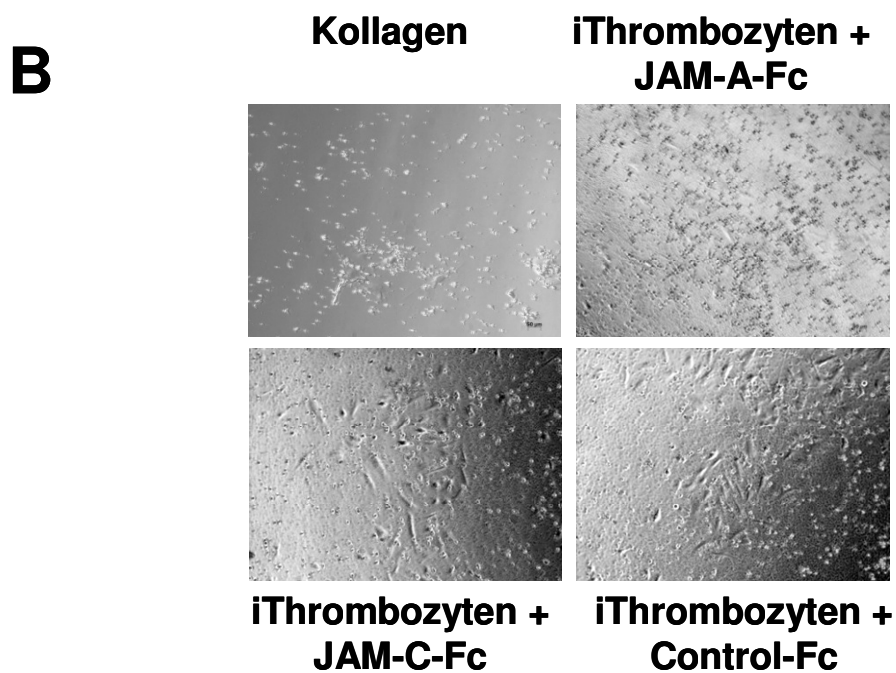
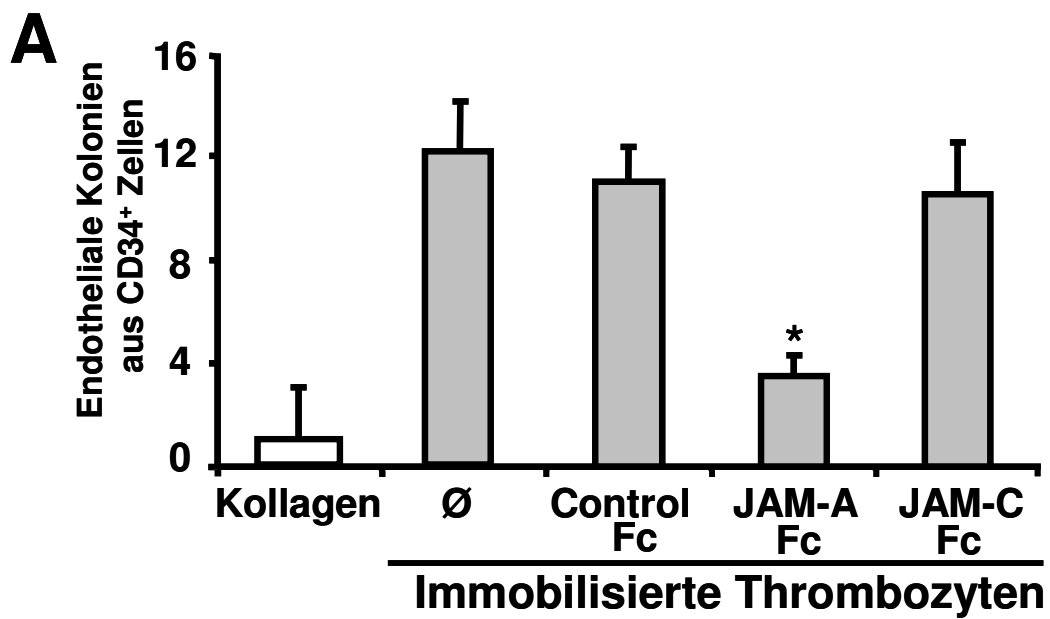


Abbildung 12 – Colony Forming Unit Assay: A) CD34⁺ Zellen differenzieren auf Thrombozyten, nicht jedoch auf Kollagen, zu endothelialen Progenitorzellen und bilden Kolonien. Diese Differenzierung kann durch lösliches JAM-A-Fc, nicht jedoch durch JAM-C-Fc oder eine Negativkontrolle (Control-Fc) verringert werden. B) Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen.

bzw. JAM-C-Fc kultiviert und die Bildung endothelialer Kolonien wurde wie bereits durch unsere Arbeitsgruppe beschrieben, verfolgt und ausgezählt [47].

Immobilisiertes JAM-A-Fc und weniger JAM-C-Fc förderten die Bildung endothelialer Kolonien aus CD34⁺ Zellen, verglichen mit Control-Fc (Immobilisiertes Control-Fc vs. Immobilisiertes JAM-A-Fc vs. Immobilisiertes JAM-C-Fc: Mittelwert endothelialer Kolonien \pm SD: $0,3 \pm 0,6$ vs. 8 ± 2 vs. $2,3 \pm 0,6$; $P < 0,05$; $n=3$; Abbildung 13).

Interessanterweise induzierte immobilisiertes JAM-A-Fc die Differenzierung der CD34⁺ Zellen zu endothelialen Kolonien in etwa gleichem Maße wie immobilisiertes Fibronectin (immobilisiertes Fibronectin vs. immobilisiertes JAM-A-Fc: Mittelwert der Kolonien \pm SD: $8,5 \pm 2,1$ vs. 8 ± 2 ; P nicht signifikant; Abbildung 13).

Die Verifizierung der aus den CD34⁺ Zellen entstandenen endothelialen Progenitorzellen wurde darüber hinaus mittels Durchflusszytometrie und der Bestimmung spezifischer mRNA durchgeführt.

Im Einzelnen, wurde die Oberflächenexpression von CD146, PECAM-1 (CD31), CD34 und CD45 auf CD34⁺ Zellen, auf primären, humanen, arteriellen Endothelzellen und auf thrombozyten-induzierten oder aber JAM-A-induzierten, endothelialen Kolonien gemessen wie in „Material und Methoden“ beschrieben. Wurden CD34⁺ Zellen kultiviert um Colony Forming Units zu bilden, exprimierten sie nach einiger Zeit, sowohl auf JAM-A als auch auf Thrombozyten, die gleichen Oberflächenantigene wie primäre Endothelzellen aus humanen Arterien. So zum Beispiel CD146 und CD31. Dafür verloren sie die für CD34⁺ Zellen typischen Antigene (Abbildung 14).

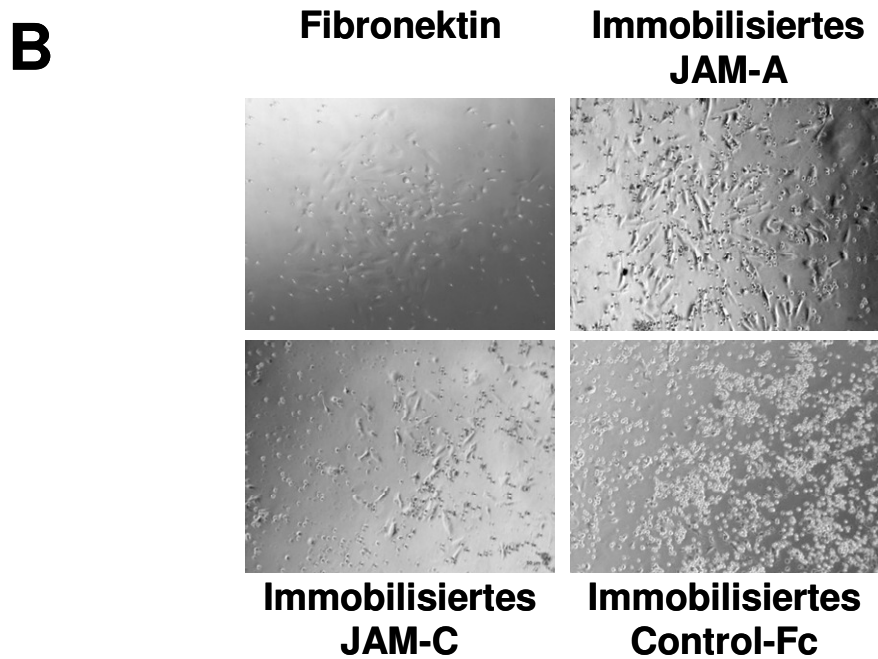
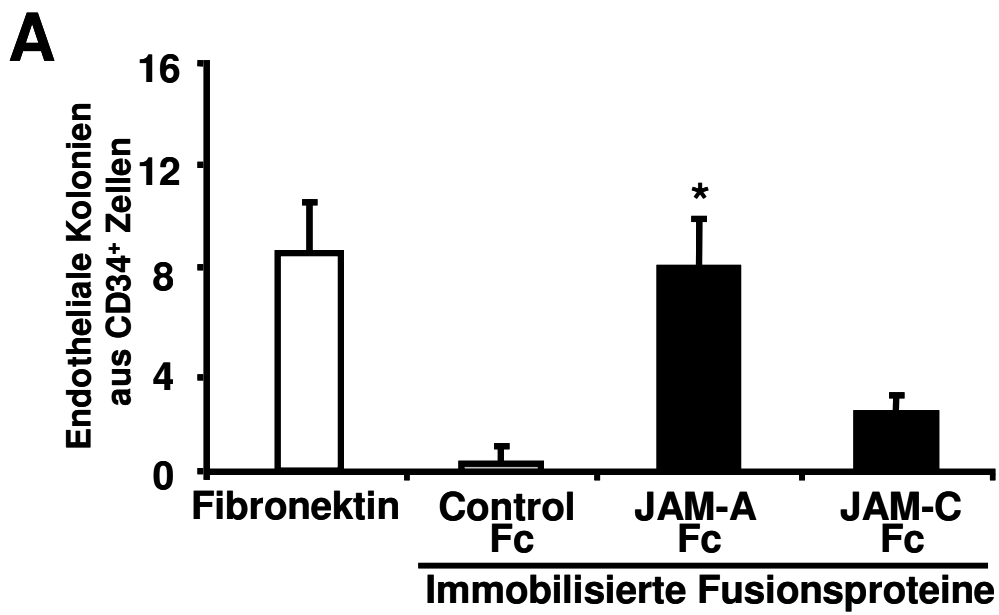


Abbildung 13 – Colony Forming Unit Assay: A) CD34⁺ Zellen differenzieren auf Fibronectin (Positivkontrolle) und JAM-A zu endothelialen Kolonien. Keine Differenzierung wurde auf der Negativkontrolle (immobilisiertes Control-Fc) und nur wenig auf immobilisiertem JAM-C-Fc festgestellt. B) Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen.

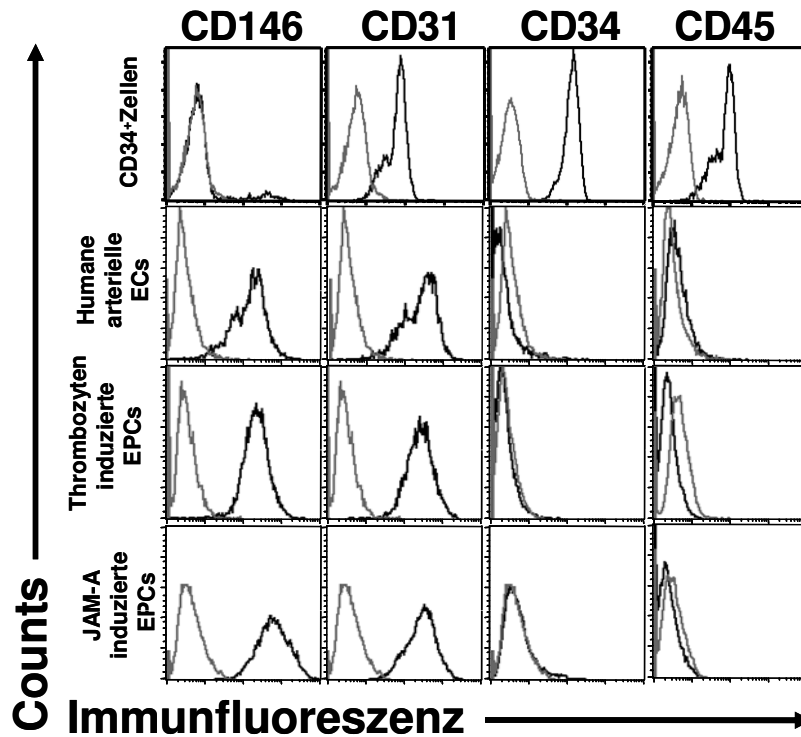


Abbildung 14 – Durchflusszytometrie: CD34⁺ Zellen die auf Thrombozyten oder aber auf JAM-A zu endothelialen Progenitorzellen (EPCs) differenziert sind, exprimieren CD146 und CD31 wie primäre humane arterielle Endothelzellen (haECs) und verlieren die für CD34⁺ Zellen typischen Oberflächenantigene.

Nach 5 Tagen änderte sich die Morphologie der initial runden CD34⁺ Zellen sowohl auf JAM-A als auch auf Thrombozyten, in adhärenzte, spindelförmige Zellen, die positiv für den Von-Willebrand Faktor (vWF) waren wie wir durch eine Immunfluoreszenzfärbung beweisen konnten (Abbildung 15).

Von-Willebrand Faktor

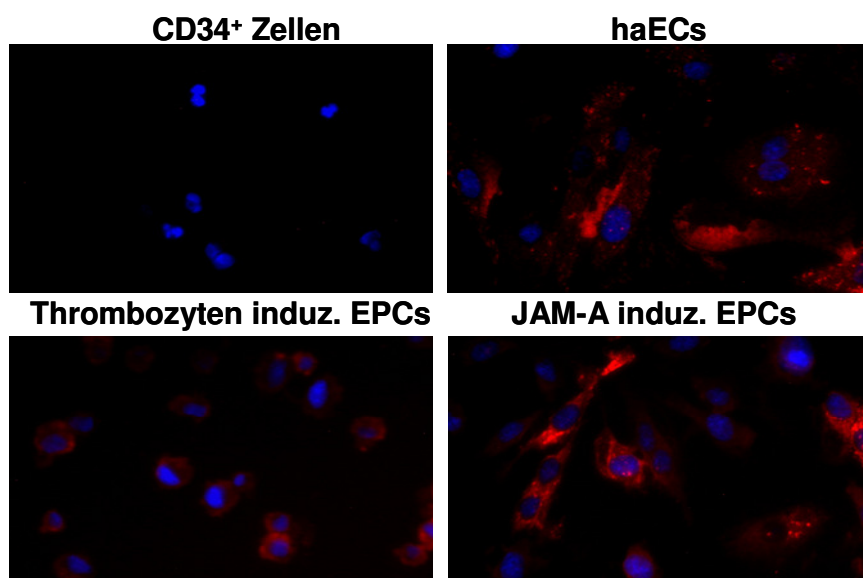


Abbildung 15 – Immunfluoreszenzmikroskopie: Nachdem die CD34-positiven Zellen 5 Tage auf Thrombozyten oder JAM-A kultiviert wurden, änderten sie ihre Form zu adhärenenten, spindelförmigen Zellen und wurden positiv für den von-Willebrand Faktor (vWF) wie primäre humane arterielle Endothelzellen (haECs). Blau: Nukleusfärbung, Rot: vWF.

Als nächstes analysierten wir, ob aus CD34⁺ Zellen entstandene endotheliale Progenitorzellen aktiviert werden können und aktivierungsabhängige Oberflächenantigene exprimieren wie ICAM-1 (CD54) und CD106. Wir fanden, dass die Stimulation JAM-A-induzierter aus CD34⁺ Zellen stammender endothelialer Kolonien, mit TNF- α /INF- γ Zytokinen, eine vermehrte Expression von CD54 und CD106 zur Folge hatte. Diese Expression ist ähnlich primärer humaner arterieller Endothelzellen nach Aktivierung oder aber thrombozyteninduzierter endothelialer Kolonien aus CD34⁺ Zellen (Abbildung 16).

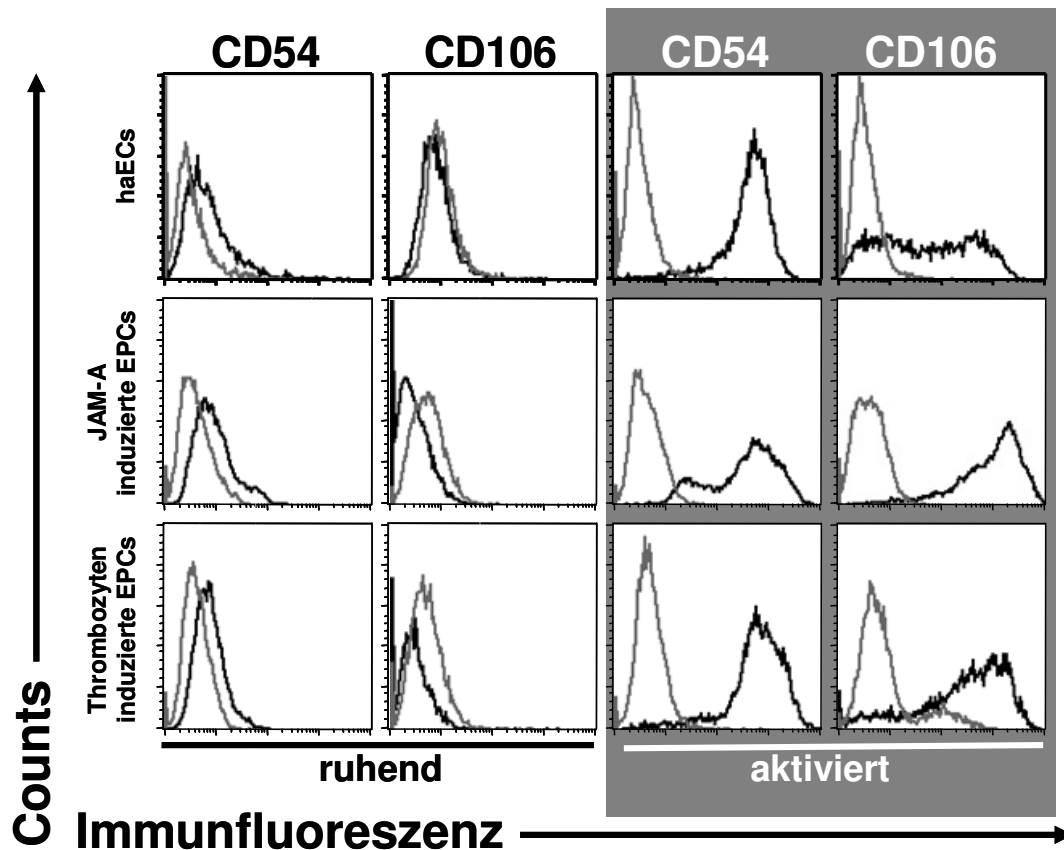


Abbildung 16 – Durchflusszytometrie: Die durch Thrombozyten oder aber JAM-A induzierten, aus CD34⁺ Zellen stammenden, endothelialen Progenitorzellen (EPCs) verhielten sich nach Zytokin-Aktivierung wie primäre humane arterielle Endothelzellen (haECs) und exprimierten vermehrt CD54 und CD106.

PCR-Analysen zeigten für, aus CD34⁺ Zellen stammenden, durch JAM-A-induzierten, endothelialen Progenitorzellen, positive Resultate für Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS), Endothelial Angiotensin Receptor (Tie-2) und Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 (VEGFR-2 oder Flk-1). Dies entspricht den Resultaten, die wir von humanen arteriellen Endothelzellen oder thrombozyteninduzierten Endothelkolonien erhielten (Abbildung 17).

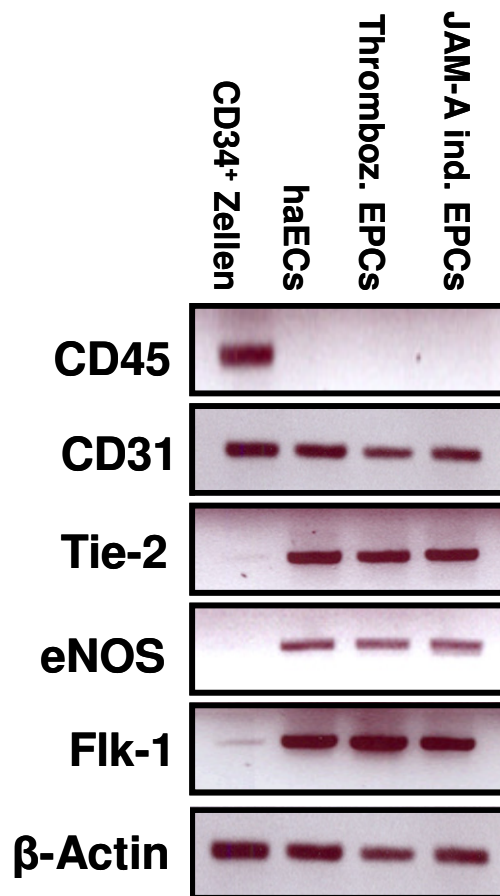


Abbildung 17 – PCR Analyse: JAM-A induzierte oder thrombozyteninduzierte, kultivierte endotheliale Progenitorzellen (EPCs) sind positiv für CD31, Tie-2, eNOS, Flk-1 und beta-Aktin, gleich primärer humaner arterieller Endothelzellen (haECs).

3.5 JAM-A ist an dem CD34⁺ Zell-induzierten Reendothelialisierungsprozess *in vitro* beteiligt

Endotheliale Progenitorzellen treiben die Neo- bzw. Reendothelialisierung am verletzten endothelialen Monolayer, z.B. an einer verletzten Gefäßwand, an [71-74]. Demzufolge fragten wir uns, ob JAM-A die Reendothelialisierung eines verletzten endothelialen Monolayers fördert. Wir führten hierfür einen Scratch Assay durch, wie er bereits in der Literatur beschrieben wurde [63]. Primäre humane arterielle Endothelzellen (haECs) wurden bis zu deren Konfluenz in

einer Well Platte kultiviert. Nach einem Kratzer (Scratch) mit einer sterilen Pipettenspitze auf dem konfluenten Endothelrasen, wurden die dadurch abgelösten Zellen abgewaschen und CD34⁺ Zellen oder aber CD34⁺ Zellen und Thrombozyten in das Well gegeben. Die Co-Kultur wurde für 17 Stunden inkubiert. CD34⁺ Zellen förderten die Neoendothelialisierung der verletzten Zone, verglichen mit Wells in denen CD34⁺ Zellen fehlten (Reendothelialisierung in Prozent der betroffenen Fläche: Kontrolle (nur mit Medium) vs. CD34⁺ Zellen: Mittelwert \pm SD: 56 \pm 5,99% vs. 76 \pm 3,36%; $P < 0,05$; $n=3$; Abbildung 18). Ferner führte eine Addition von Thrombozyten zu den CD34⁺ Zellen in unserem Co-Kultur System zu einer abermals signifikant erhöhten Reendothelialisierung, verglichen mit CD34⁺ Zellen alleine (Reendothelialisierung in Prozent der betroffenen Fläche: CD34⁺ Zellen vs. CD34⁺ Zellen und Thrombozyten: Mittelwert \pm SD: 76 \pm 3,36% vs. 88 \pm 9,69%; $P < 0,05$; $n=3$; Abbildung 18).

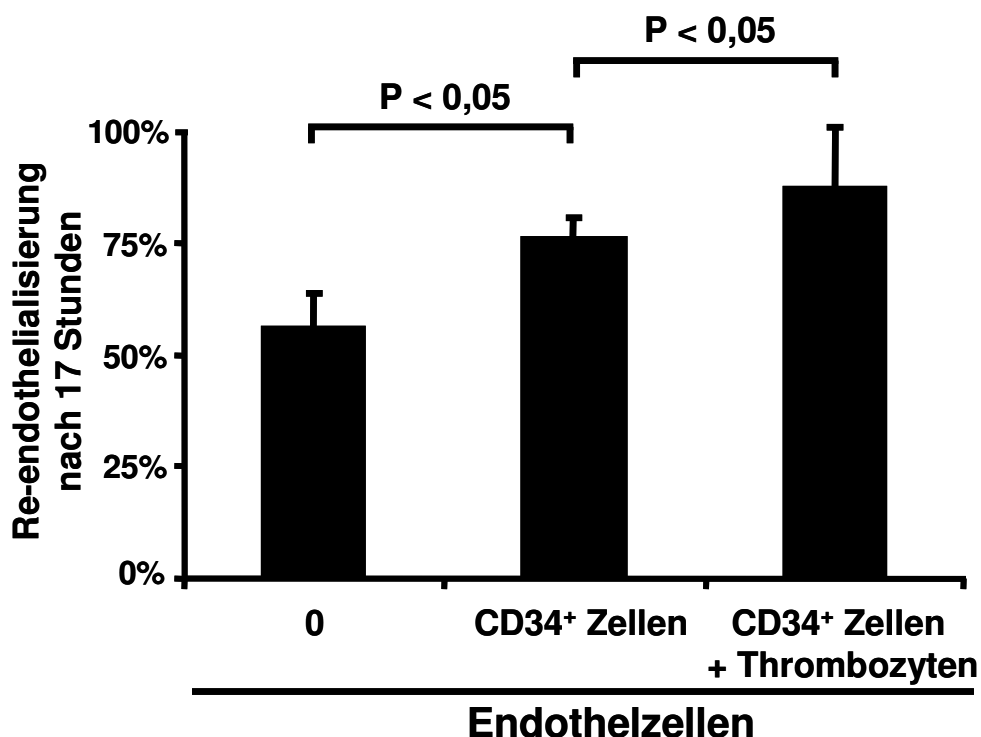


Abbildung 18 – Scratch Assay: CD34⁺ Zellen fördern den Reendothelialisierungsprozess nach einer Verletzung eines Endothel-Monolayers, im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Progenitorzellen, *in vitro*. Gibt man zusätzlich Thrombozyten in diese Co-Kultur, beschleunigt sich der Reendothelialisierungsprozess abermals.

Die Zugabe von löslichem JAM-A-Fc wiederum reduzierte signifikant diese CD34⁺ Zell-induzierte Reendothelialisierung der verletzten Zone, verglichen mit Kontrollexperimenten mit löslichem Control-Fc (Control-Fc vs. JAM-A-Fc: Mittelwert \pm SD: 74% \pm 12,81% vs. 53% \pm 10,78%; P<0,05; n=3; Abbildungen 19, 20). In ähnlicher Weise war auch die Reendothelialisierung in der Co-Kultur mit CD34⁺ Zellen und Thrombozyten signifikant durch JAM-A-Fc erniedrigt (Mittelwert \pm SD: 91% \pm 4,6% vs. 65% \pm 6,38%; P<0,05, n=3; Abbildungen 19, 20).

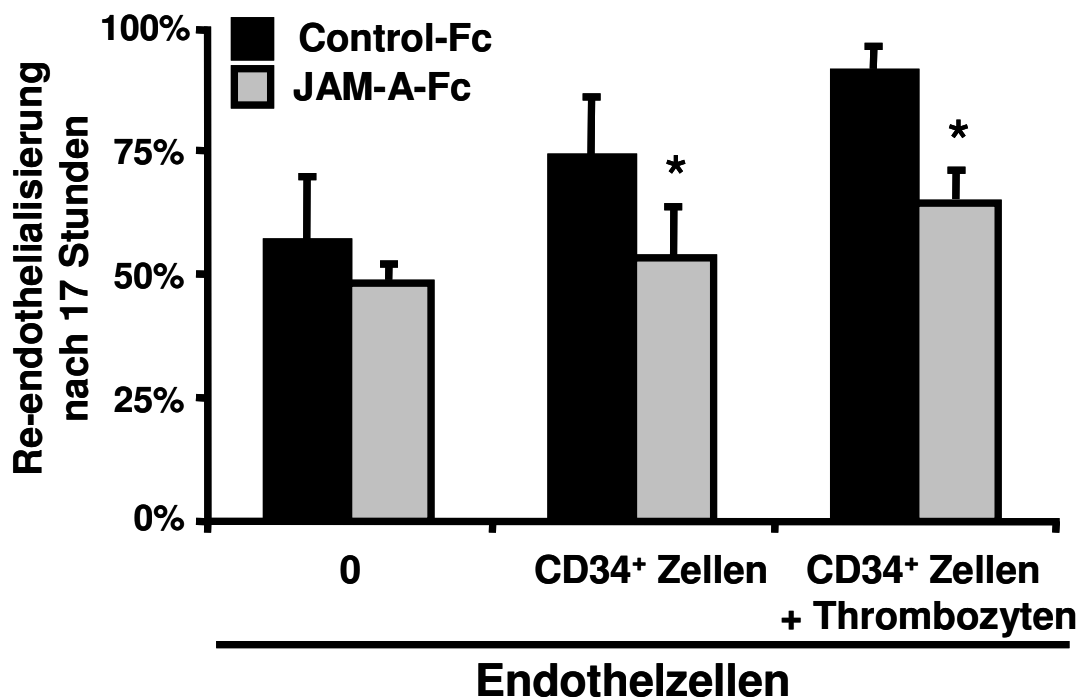


Abbildung 19 – Scratch Assay: Lösliches JAM-A-Fc inhibiert die Reendothelialisierung, sowohl in der Co-Kultur mit CD34⁺ Zellen alleine, als auch in der der Co-Kultur mit CD34⁺ Zellen und Thrombozyten, im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Control-Fc.

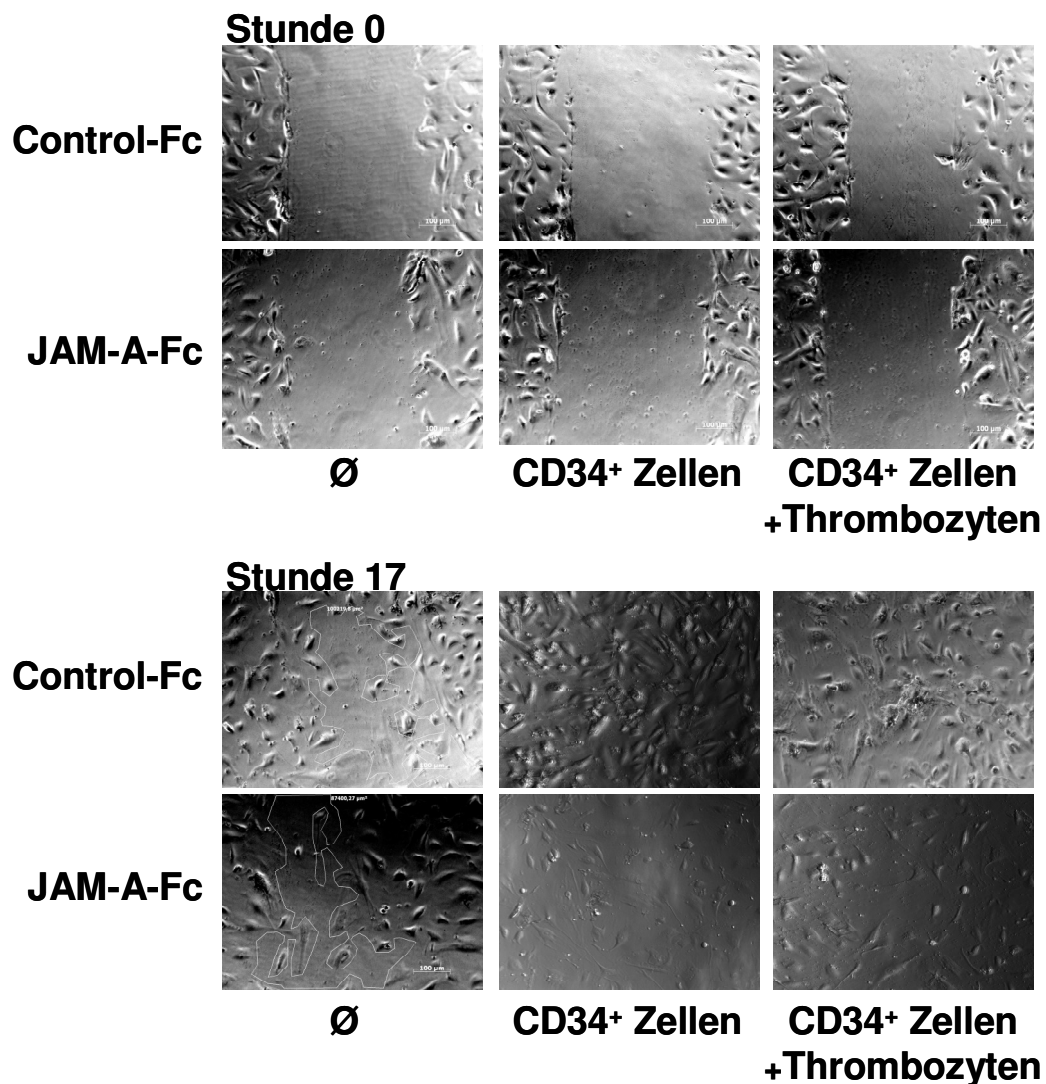


Abbildung 20 – Scratch Assay: Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen des Re-endothelialisierungsprozesses nach Scratch Injury. Lösliches JAM-A-Fc inhibiert die Re-endothelialisierung des verletzten Monolayers wie in Abbildung 19 quantitativ dargestellt.

4. Diskussion

Die zentralen Ergebnisse dieser Studie sind: 1) Die Thrombozyteninduzierte Adhäsion humaner CD34⁺ Progenitorzellen wird durch Interaktion mit JAM-A ermöglicht, 2) JAM-A wird auf humanen CD34⁺ Zellen exprimiert, 3) JAM-A Interaktionen kommen sowohl mit auf Progenitorzellen exprimiertem JAM-A als auch mit dem Beta-2-Integrin LFA-1 zustande, 4) JAM-

A fördert die Differenzierung von CD34⁺ Progenitorzellen zu endothelialen Progenitorzellen, 5) JAM-A spielt im CD34⁺ Zell-induzierten Reendothelialisierungsprozesses *in vitro* eine Rolle.

Die Domizilierung humaner Progenitorzellen in peripheres Gewebe ist eine Kaskade, welche die initiale Adhäsion an die Gefäßwand und die konsekutive Differenzierung in vaskuläre Zellen beinhaltet [43, 75]. Thrombozyten sind die ersten zirkulierenden Blutzellen, die an einer beschädigten Gefäßwand adhäreren und in der Mikrozirkulation ischämischen Gewebes akkumulieren [76, 77], dort die Angiogenese fördern [78-80] und für vaskuläre Regeneration durch Interaktion mit Progenitorzellen sorgen [44, 47, 48].

Unsere und andere Arbeitsgruppen konnten in den letzten Jahren zeigen, dass Thrombozyten die Rekrutierung von Progenitorzellen und deren anschließende Differenzierung in einen endothelialen Phänotyp beeinflussen [44-49]. Jedoch sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen bis dato noch immer unzureichend verstanden. Junctional Adhesion Molecules (JAMs) sind Proteine der Immunglobulin-Superfamilie, die an Zell-Zell Kontakten von Epithel und Endothel sowie auf der Oberfläche von Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten exprimiert werden [81-85]. Es gibt Anzeichen dafür, dass JAM Proteine für eine Vielzahl von zellulären Prozessen wichtig sind, so z.B. für den Tight Junction Aufbau, für die Leukozyten-Transmigration, für die Thrombozyten-Aktivierung, für die Angiogenese und für die Virusbindung [81-85]. JAMs sind wichtig für die Kontrolle der vaskulären Permeabilität und die Leukozyten-Transmigration an endothelialen Oberflächen, durch homophile (JAM - JAM) und heterophile (JAM - Beta-2-Integrin) Interaktionen [54]. Durch ihre Expressierung auf den Oberflächen von Endothelzellen und Thrombozyten tragen JAMs zu adhäsiven Interaktionen mit zirkulierenden Progenitorzellen bei. Junctional Adhesion Molecule-A (JAM-A/ JAM-1/ F11R) ist ein Zelladhäsionsmolekül, welches auf epithelialen und endothelialen Zellen exprimiert wird sowie auf Blutzellen, wie z.B. Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten [52, 86-92]. JAM-A spielt eine Rolle in der Thrombozytenaggregation, -sekretion und -adhäsion [53, 66-69, 93]. Die Rolle

von JAM-A bei der Interaktion von Thrombozyten mit Progenitorzellen wurde bislang jedoch noch nicht erforscht. In dieser Studie zeigen wir zum ersten Mal, dass auf Thrombozyten exprimiertes JAM-A, die Adhäsion und Differenzierung humaner CD34⁺ Zellen zu einem endothelialen Phänotyp fördert. Darüber hinaus, in Einklang mit aktuellen Forschungsergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe und zwar dass JAM-A auf murinen hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird [56], konnten wir die Expression von JAM-A auf der Oberfläche von humanen CD34⁺ Progenitorzellen verifizieren. Um die Ligand/ Rezeptor Interaktionen weiter aufzuklären, die in der JAM-A vermittelten Thrombozyteninteraktion mit Progenitorzellen involviert sind, führten wir eine Reihe von Adhäsions Assays durch, die zeigten, dass JAM-A sowohl an das auf CD34⁺ Zellen exprimierte JAM-A als auch an das Integrin LFA-1 bindet. Des Weiteren unterstützt immobilisiertes JAM-A nicht nur die Adhäsion humaner CD34⁺ Zellen, sondern fördert auch deren Differenzierung zu endothelialen Progenitorzellen, ähnlich stark wie Fibronectin.

Das dritte Mitglied der JAM Familie, JAM-C (auch JAM-3), wurde initial als neuer Rezeptor für das Leukozyten Beta-2-Integrin Mac-1 (alpha(M)beta(2), CD11b/CD18) auf Thrombozyten beschrieben [65, 94-96]. Seit dem deuten immer mehr Ergebnisse darauf hin, dass JAM-C multiple wichtige Rollen spielt, so z.B. bei der Aufrechterhaltung der Integrität und Funktion myelinisierter peripherer Nerven [97], bei der transendothelialen Migration von Monozyten und Neutrophilen während der Inflammation [96, 98], bei der vaskulären, endothelialen Permeabilität [99], bei der Differenzierung runder Spermatozoen in Spermatozoen [100], bei der Angiogenese und beim Tumorwachstum [101]. Weiterhin fördert die homophile JAM-C Bindung (JAM-C-JAM-C) Interaktionen zwischen Tumor- und Endothelzellen [102]. In dieser Studie untersuchten wir auch Effekte von thrombozytärem JAM-C auf die Progenitorzell-Rekrutierung und anschließende Differenzierung. Wir konnten jedoch keinen fördernden Effekt von JAM-C bei der thrombozyteninduzierten Differenzierung der CD34⁺ Zellen zu endothelialen Progenitorzellen feststellen.

Hämatopoetische Progenitorzellen und endotheliale Progenitorzellen werden zu ischämischen Regionen hin rekrutiert und modulieren die

Vaskulogenese, beschleunigen die Reendothelialisierung und limitieren die Formierung atherosklerotischer Läsionen [30, 71-73, 103-107]. Klinische Studien zeigen einen vorteilhaften Effekt einer intrakoronaren Applikation von Progenitorzellen auf die myokardiale Funktion bei Patienten mit ischämischer Herzkrankheit [108-110]. Jedoch sind die potentiellen Determinanten und Rezeptoren, die in die Reendothelialisierung und Regeneration involviert sind, noch immer unzureichend bekannt [111-113]. In dieser Studie konnten wir zeigen, dass lösliches JAM-A-Fc die CD34⁺ Zell-induzierte Reendothelialisierung inhibiert, was darauf hinweist, dass JAM-A eine entscheidende Rolle in diesem Reendothelialisierungsprozess spielt.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass thrombozytengebundenes JAM-A die Rekrutierung zirkulierender CD34⁺ Zellen in Richtung der beschädigten Gefäßwand (Gefäßwandläsion oder Entzündung des Endothels) und die Differenzierung der CD34⁺ Zellen in endotheliale Progenitorzellen fördert und somit die Reendothelialisierung und Gefäßregeneration unterstützt. JAM-A spielt möglicherweise eine entscheidende Rolle im peripheren Homing zirkulierender CD34⁺ Progenitorzellen an Stellen vaskulärer Läsionen oder in der Mikrozirkulation ischämischen Gewebes (z.B. Myokard) und somit also für Gefäß- und Gewebereparaturmechanismen. Es werden weitere Studien nötig sein, um die *in vivo* Relevanz dieser Ergebnisse zu verifizieren. Können unsere *in vitro* Ergebnisse *in vivo* bestätigt werden, eröffnet dies möglicherweise neue Therapieansätze für Patienten mit Myokardinfarkt oder chronisch ischämischen (Herz-)Erkrankungen.

5. Zusammenfassung

Hintergrund: Geweberegeneration und Gefäßreparatur sowie die Neoangiogenese, z.B. nach Myokardinfarkt, sind Kaskaden, die eine initiale Festadhäsion zirkulierender Progenitorzellen an die Gefäßwand und im Anschluss eine Differenzierung jener Progenitorzellen zu Endothelzellen beinhalten. Es wurde bereits in der Literatur beschrieben, dass Thrombozyten,

die ersten Zellen an Ort und Stelle eines Gefäßschadens, diese zirkulierenden Progenitorzellen rekrutieren und dass sie auf ihrer Oberfläche unter anderem Junctional Adhesion Molecule-A (JAM-A) exprimieren. JAM-A ist ein Zelladhäsionsmolekül, das bekanntermaßen am Aufbau von Tight-Junctions beteiligt ist und auch bei Entzündungsreaktionen eine Rolle spielt. Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die Rolle von JAM-A in der von Thrombozyten induzierten Adhäsion und konsekutiven Differenzierung humaner CD34⁺ Progenitorzellen zu endothelialen Vorläuferzellen zu evaluieren.

Methoden und Ergebnisse: CD34⁺ Zellen adhären auf immobilisierten Thrombozyten unter statischen- sowie unter dynamischen Bedingungen, wie wir in statischen Adhäsions Assays und in der Flusskammer zeigen konnten. Die Rolle von JAM-A in der von Thrombozyten induzierten Adhäsion wurde dabei durch neutralisierende lösliche Proteine (sJAM-A-Fc) und blockierende monoklonale Antikörper (anti-JAM-A) untersucht. Vorinkubationen mit sJAM-A-Fc oder aber anti-JAM-A resultierten dabei in einer signifikant erniedrigten Adhäsion humaner CD34⁺ Zellen an Thrombozyten. Humane CD34⁺ Zellen exprimieren weiterführend selbst in hohem Maße JAM-A, wie wir durch Durchflusszytometrie und Immunoblots beweisen konnten. Da JAM-A sowohl homophile JAM-A – JAM-A Interaktionen, als auch heterophile Liganden Interaktionen, z.B. mit LFA-1 (αLβ2 Integrin) eingeht, untersuchten wir welche Interaktion hierbei eine Rolle spielt. Die Adhäsion von CD34⁺ Zellen an immobilisiertem JAM-A konnte dabei durch beides, sowohl anti-JAM-A als auch Antikörper gegen LFA-1, inhibiert werden. Colony Forming Unit Assays zeigten, dass Präinkubationen mit löslichem JAM-A-Fc die durch Thrombozyten vermittelte Differenzierung von CD34⁺ Zellen zu endothelialen Progenitorzellen signifikant reduziert. Darüber hinaus förderte immobilisiertes JAM-A-Fc die Differenzierung von hierauf applizierten CD34⁺ Zellen zu endothelialen Progenitorzellen, ähnlich stark wie immobilisiertes Fibronektin. Die Verifizierung der Differenzierung zum endothelialen Phänotyp wurde dabei durch einen Multimarkeransatz mittels Durchflusszytometrie und RT-PCR durchgeführt. Außerdem wurde eine Immunfluoreszenzfärbung für den Von-Willebrand Faktor durchgeführt. In Scratch Assay Versuchen zeigten wir weiterhin, dass eine

Blockierung von JAM-A in einer verminderten CD34⁺ Zell-induzierten Reendothelialisierung, nach einer Verletzung, führt.

Diskussion: Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Expression von JAM-A auf CD34⁺ Zellen deren Adhäsion an immobilisierte Thrombozyten und konsekutive Differenzierung zu endothelialen Progenitorzellen *in vitro* vermittelt. Beides sind potentiell wichtige Schritte in der Gefäßregeneration.

6. Literaturverzeichnis

1. Statistisches Jahrbuch 2008 für die Bundesrepublik Deutschland. Statistisches Bundesamt. 1. Auflage. 2008. ISBN-13: 978-3824608225.
2. Assmann G, Cullen P, Jossa F, Lewis B, Mancini M. Coronary Heart Disease: Reducing the risk: The scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease. A worldwide view. International Task force for the Prevention of Coronary Heart Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Aug;19(8):1819-24.
3. Bühling KJ, Lepenies J, Witt K. Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie. Urban & Fischer Bei Elsevier; 3. Auflage. September 2004. ISBN-13: 987-3437424113.
4. Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J. Basislehrbuch Innere Medizin. Urban & Fischer Bei Elsevier; 3. Auflage. 2006. ISBN-13: 978-3437444609.
5. Herold G. Innere Medizin. Herold; 1. Auflage. 2008. ISBN-13: 987-3890197043.
6. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol.* 1977 Mar;86(3):675-84.
7. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 Sep;15(9):1512-31.
8. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002 Dec 19-26;420(6917):868-74.
9. Kannel WB: Overview of atherosclerosis. *Clin Ther* 1998;20 (Suppl B):B2-B17.
10. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH: The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 1992 Jan 23;326(4):242-50.
11. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH: The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med* 1992 Jan 30;326(5):310-8.
12. Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, Bertrand ME, Lewis BS, Natarajan MK, Malmberg K, Rupprecht H, Zhao F, Chrolavicius S, Copland I, Fox KA. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet.* 2001 Aug 18; 358(9281):527-33.
13. Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M, Oyamada A, Nakamori S, Nishimura H, Sadamoto K, Horii M, Matsumoto T, Murasawa S, Shibata T, Suehiro S, Asahara T. Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction. *Circulation.* 2006 Mar 14;113(10):1311-25.

14. Kawamoto A, Iwasaki H, Kusano K, Murayama T, Oyamada A, Silver M, Hulbert C, Gavin M, Hanley A, Ma H, Kearney M, Zak V, Asahara T, Losordo DW. CD34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells. *Circulation*. 2006 Nov 14;114(20):2163-9. Epub 2006 Oct 30.
15. Tei K, Matsumoto T, Mifune Y, Ishida K, Sasaki K, Shoji T, Kubo S, Kawamoto A, Asahara T, Kurosaka M, Kuroda R. Administrations of peripheral blood CD34-positive cells contribute to medial collateral ligament healing via vasculogenesis. *Stem Cells*. 2008 Mar;26(3):819-30. Epub 2008 Jan 10.
16. Taguchi A, Soma T, Tanaka H, Kanda T, Nishimura H, Yoshikawa H, Tsukamoto Y, Iso H, Fujimori Y, Stern DM, Naritomi H, Matsuyama T. Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest*. 2004 Aug;114(3):330-8.
17. Madeddu P, Emanuelli C, Pelosi E, Salis MB, Cerio AM, Bonanno G, Patti M, Stassi G, Condorelli G, Peschle C. Transplantation of low dose CD34+KDR+ cells promotes vascular and muscular regeneration in ischemic limbs. *FASEB J*. 2004 Nov;18(14):1737-9. Epub 2004 Sep 2.
18. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997 Feb 14;275(5302):964-7.
19. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science*. 1999 Feb 5;283(5403):845-8.
20. Kahn JF, Favriou F, Jouanin JC, Grucza R. Effect of co-contractions on the cardiovascular response to submaximal static handgrip. *Eur J Appl Physiol*. 2000 Dec;83(6):506-11.
21. Petit I, Goichberg P, Spiegel A, Peled A, Brodie C, Seger R, Nagler A, Alon R, Lapidot T. Atypical PKC-zeta regulates SDF-1-mediated migration and development of human CD34+ progenitor cells. *J Clin Invest*. 2005 Jan;115(1):168-76.
22. Goichberg P, Kalinkovich A, Borodovsky N, Tesio M, Petit I, Nagler A, Hardan I, Lapidot T. cAMP-induced PKCzeta activation increases functional CXCR4 expression on human CD34+ hematopoietic progenitors. *Blood*. 2006 Feb 1;107(3):870-9. Epub 2005 Oct 4.
23. Carmona G, Chavakis E, Koehl U, Zeiher AM, Dimmeler S. Activation of Epac stimulates integrin-dependent homing of progenitor cells. *Blood*. 2008 Mar 1;111(5):2640-6. Epub 2007 Nov 21.
24. Yeh ET, Zhang S, Wu HD, Körbling M, Willerson JT, Estrov Z. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation*. 2003 Oct 28;108(17):2070-3. Epub 2003 Oct 20.
25. Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, Hicklin DJ, Zhu Z, Bohlen P, Witte L, Hendrikx J, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Werb

- Z, Lyden D, Rafii S. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med*. 2002 Aug;8(8):841-9. Epub 2002 Jul 1.
26. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000 Feb 1;95(3):952-8.
 27. Grote K, Salguero G, Ballmaier M, Dangers M, Drexler H, Schieffer B. The angiogenic factor CCN1 promotes adhesion and migration of circulating CD34+ progenitor cells: potential role in angiogenesis and endothelial regeneration. *Blood*. 2007 Aug 1;110(3):877-85. Epub 2007 Apr 11.
 28. Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, Menke A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Knapp WH, Drexler H. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation*. 2005 May 3;111(17):2198-202. Epub 2005 Apr 25.
 29. Wojakowski W, Tendera M, Michałowska A, Majka M, Kucia M, Maślankiewicz K, Wyderka R, Ochała A, Ratajczak MZ. Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004 Nov 16;110(20):3213-20. Epub 2004 Nov 8.
 30. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 1999 Apr;5(4):434-8
 31. Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest*. 2005 Mar;115(3):572-83. Review.
 32. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):702-12. Review.
 33. Gawaz M, Stellos K, Langer HF. Platelets modulate atherogenesis and progression of atherosclerotic plaques via interaction with progenitor and dendritic cells. *J Thromb Haemost*. 2008 Feb;6(2):235-42. Epub 2007 Dec 10. Review.
 34. Xu Q. The impact of progenitor cells in atherosclerosis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006 Feb;3(2):94-101
 35. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*. 2005 Sep 8;353(10):999-1007.
 36. Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kämper U, Dimmeler S, Zeiher AM. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation*. 2005 Jun 7;111(22):2981-7. Epub 2005 May 31

37. Fadini GP, de Kreutzenberg SV, Coracina A, Baesso I, Agostini C, Tiengo A, Avogaro A. Circulating CD34+ cells, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *Eur Heart J*. 2006 Sep;27(18):2247-55. Epub 2006 Aug 15.
38. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*. 2001 Jul 6;89(1):E1-7.
39. Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. *Circulation*. 2004 Jun 8;109(22):2692-7. Review.
40. Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part I: angiogenic cytokines. *Circulation*. 2004 Jun 1;109(21):2487-91. Review.
41. Hristov M, Weber C. The therapeutic potential of progenitor cells in ischemic heart disease--Past, present and future. *Basic Res Cardiol*. 2006 Jan;101(1):1-7.
42. Kollet O, Spiegel A, Peled A, Petit I, Byk T, HersHKoviz R, Guetta E, Barkai G, Nagler A, Lapidot T. Rapid and efficient homing of human CD34(+)/CD38(-/low)/CXCR4(+) stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Blood*. 2001 May 15;97(10):3283-91.
43. Stellos K, Gawaz M. Platelet interaction with progenitor cells: potential implications for regenerative medicine. *Thromb Haemost*. 2007 Nov;98(5):922-9. Review.
44. Massberg S, Konrad I, Schürzinger K, Lorenz M, Schneider S, Zohlnhoefer D, Hoppe K, Schiemann M, Kennerknecht E, Sauer S, Schulz C, Kerstan S, Rudelius M, Seidl S, Sorge F, Langer H, Peluso M, Goyal P, Vestweber D, Emambokus NR, Busch DH, Frampton J, Gawaz M. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med*. 2006 May 15;203(5):1221-33. Epub 2006 Apr 17.
45. Langer H, May AE, Daub K, Heinzmann U, Lang P, Schumm M, Vestweber D, Massberg S, Schönberger T, Pfisterer I, Hatzopoulos AK, Gawaz M. Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro. *Circ Res*. 2006 Feb 3;98(2):e2-10. Epub 2005 Dec 22.
46. Daub K, Langer H, Seizer P, Stellos K, May AE, Goyal P, Bigalke B, Schönberger T, Geisler T, Siegel-Axel D, Oostendorp RA, Lindemann S, Gawaz M. Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells. *FASEB J*. 2006 Dec;20(14):2559-61. Epub 2006 Oct 31.
47. Stellos K, Langer H, Daub K, Schoenberger T, Gauss A, Geisler T, Bigalke B, Mueller I, Schumm M, Schaefer I, Seizer P, Kraemer BF, Siegel-Axel D, May AE, Lindemann S, Gawaz M. Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of

- human CD34+ cells to endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2008 Jan 15;117(2):206-15. Epub 2007 Dec 17.
48. Jin DK, Shido K, Kopp HG, Petit I, Shmelkov SV, Young LM, Hooper AT, Amano H, Vecilla ST, Heissig B, Hattori K, Zhang F, Hicklin DJ, Wu Y, Zhu Z, Dunn A, Salari H, Werb Z, Hackett NR, Crystal RG, Lyden D, Rafii S. Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4+ hemangiocytes. *Nat Med*. 2006 May;12(5):557-67. Epub 2006 Apr 30.
 49. de Boer HC, Verseyden C, Ulfman LH, Zwaginga JJ, Bot I, Biessen EA, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ. Fibrin and activated platelets cooperatively guide stem cells to a vascular injury and promote differentiation towards an endothelial cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Jul;26(7):1653-9. Epub 2006 Apr 20.
 50. Du Pasquier L, Zucchetti I, De Santis R. Immunoglobulin superfamily receptors in protochordates: before RAG time. *Immunol Rev*. 2004 Apr;198:233-48.
 51. Bradfield PF, Nourshargh S, Aurrand-Lions M, Imhof BA. JAM family and related proteins in leukocyte migration (Vestweber series). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Oct;27(10):2104-12. Epub 2007 Jul 5.
 52. Bazzoni G. The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol*. 2003 Oct;15(5):525-30.
 53. Babinska A, Kedees MH, Athar H, Ahmed T, Batuman O, Ehrlich YH, Hussain MM, Kornecki E. F11-receptor (F11R/JAM) mediates platelet adhesion to endothelial cells: role in inflammatory thrombosis. *Thromb Haemost*. 2002 Nov;88(5):843-50.
 54. Weber C, Fraemohs L, Dejana E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jun;7(6):467-77. Review.
 55. Sobocki T, Sobocka MB, Babinska A, Ehrlich YH, Banerjee P, Kornecki E. Genomic structure, organization and promoter analysis of the human F11R/F11 receptor/junctional adhesion molecule-1/JAM-A. *Gene*. 2006 Jan 17;366(1):128-44. Epub 2005 Dec 5.
 56. Sugano Y, Takeuchi M, Hirata A, Matsushita H, Kitamura T, Tanaka M, Miyajima A. Junctional adhesion molecule-A, JAM-A, is a novel cell-surface marker for long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1167-72. Epub 2007 Nov 6.
 57. Zerneck A, Liehn EA, Fraemohs L, von Hundelshausen P, Koenen RR, Corada M, Dejana E, Weber C. Importance of junctional adhesion molecule-A for neointimal lesion formation and infiltration in atherosclerosis-prone mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Feb;26(2):e10-3. Epub 2005 Nov 23.
 58. Ostermann G, Fraemohs L, Baltus T, Schober A, Lietz M, Zerneck A, Liehn EA, Weber C. Involvement of JAM-A in mononuclear cell recruitment on inflamed or atherosclerotic endothelium: inhibition by soluble JAM-A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Apr;25(4):729-35. Epub 2005 Jan 27.

59. Kostrewa D, Brockhaus M, D'Arcy A, Dale GE, Nelboeck P, Schmid G, Mueller F, Bazzoni G, Dejana E, Bartfai T, Winkler FK, Hennig M. X-ray structure of junctional adhesion molecule: structural basis for homophilic adhesion via a novel dimerization motif. *EMBO J.* 2001 Aug 15;20(16):4391-8.
60. Shaw SK, Ma S, Kim MB, Rao RM, Hartman CU, Froio RM, Yang L, Jones T, Liu Y, Nusrat A, Parkos CA, Luscinskas FW. Coordinated redistribution of leukocyte LFA-1 and endothelial cell ICAM-1 accompany neutrophil transmigration. *J Exp Med.* 2004 Dec 20;200(12):1571-80.
61. Naik MU, Mousa SA, Parkos CA, Naik UP. Signaling through JAM-1 and alphavbeta3 is required for the angiogenic action of bFGF: dissociation of the JAM-1 and alphavbeta3 complex. *Blood.* 2003 Sep 15;102(6):2108-14. Epub 2003 May 15.
62. Langer HF, Daub K, Braun G, Schönberger T, May AE, Schaller M, Stein GM, Stellos K, Bueltmann A, Siegel-Axel D, Wendel HP, Aebert H, Roecken M, Seizer P, Santoso S, Wesselborg S, Brossart P, Gawaz M. Platelets recruit human dendritic cells via Mac-1/JAM-C interaction and modulate dendritic cell function in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Jun;27(6):1463-70. Epub 2007 Mar 22.
63. Angers-Loustau A, Côté JF, Tremblay ML. Roles of protein tyrosine phosphatases in cell migration and adhesion. *Biochem Cell Biol.* 1999;77(6):493-505.
64. Fraemohs L, Koenen RR, Ostermann G, Heinemann B, Weber C. The functional interaction of the beta 2 integrin lymphocyte function-associated antigen-1 with junctional adhesion molecule-A is mediated by the I domain. *J Immunol.* 2004 Nov 15;173(10):6259-64.
65. Santoso S, Sachs UJ, Kroll H, Linder M, Ruf A, Preissner KT, Chavakis T. The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J Exp Med.* 2002 Sep 2;196(5):679-91.
66. Kornecki E, Walkowiak B, Naik UP, Ehrlich YH. Activation of human platelets by a stimulatory monoclonal antibody. *J Biol Chem.* 1990 Jun 15;265(17):10042-8.
67. Naik UP, Ehrlich YH, Kornecki E. Mechanisms of platelet activation by a stimulatory antibody: cross-linking of a novel platelet receptor for monoclonal antibody F11 with the Fc gamma RII receptor. *Biochem J.* 1995 Aug 15;310 (Pt 1):155-62.
68. Wang F, Naik UP, Ehrlich YH, Osada S, Ohno S, Kornecki E. Stimulatory antibody-induced activation and selective translocation of protein kinase C isoenzymes in human platelets. *Biochem J.* 1995 Oct 15;311 (Pt 2):401-6.
69. Sobocka MB, Sobocki T, Banerjee P, Weiss C, Rushbrook JI, Norin AJ, Hartwig J, Salifu MO, Markell MS, Babinska A, Ehrlich YH, Kornecki E. Cloning of the human platelet F11 receptor: a cell adhesion molecule member of the immunoglobulin superfamily involved in platelet aggregation. *Blood.* 2000 Apr 15;95(8):2600-9.

70. Babinska A, Kedees MH, Athar H, Sobocki T, Sobocka MB, Ahmed T, Ehrlich YH, Hussain MM, Kornecki E. Two regions of the human platelet F11-receptor (F11R) are critical for platelet aggregation, potentiation and adhesion. *Thromb Haemost.* 2002 Apr;87(4):712-21.
71. Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Böhm M, Dirnagl U, Nickenig G. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 Oct 1;22(10):1567-72.
72. Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Bohm M, Nickenig G. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res.* 2003 Jul 25;93(2):e17-24. Epub 2003 Jun 26.
73. Dimmeler S, Zeiher AM. Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis? *J Mol Med.* 2004 Oct;82(10):671-7.
74. Griese DP, Ehsan A, Melo LG, Kong D, Zhang L, Mann MJ, Pratt RE, Mulligan RC, Dzau VJ. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation.* 2003 Nov 25;108(21):2710-5. Epub 2003 Nov 3.
75. Urbich C, Aicher A, Heeschen C, Dernbach E, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2005 Nov;39(5):733-42. Epub 2005 Sep 29.
76. Massberg S, Konrad I, Bültmann A, Schulz C, Münch G, Peluso M, Lorenz M, Schneider S, Besta F, Müller I, Hu B, Langer H, Kremmer E, Rudelius M, Heinzmann U, Ungerer M, Gawaz M. Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo. *FASEB J.* 2004 Feb;18(2):397-9. Epub 2003 Dec 4.
77. Massberg S, Gawaz M, Grüner S, Schulte V, Konrad I, Zohlnhöfer D, Heinzmann U, Nieswandt B. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med.* 2003 Jan 6;197(1):41-9.
78. Kisucka J, Butterfield CE, Duda DG, Eichenberger SC, Saffaripour S, Ware J, Ruggeri ZM, Jain RK, Folkman J, Wagner DD. Platelets and platelet adhesion support angiogenesis while preventing excessive hemorrhage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jan 24;103(4):855-60. Epub 2006 Jan 17.
79. Patruno R, Arpaia N, Gadaleta CD, Passantino L, Zizzo N, Misino A, Lucarelli NM, Catino A, Valerio P, Ribatti D, Ranieri G. VEGF concentration from plasma activated platelets rich correlates with microvascular density and grading in canine mast cell tumour spontaneous model. *J Cell Mol Med.* 2008 Apr 18. [Epub ahead of print]

80. Brill A, Dashevsky O, Rivo J, Gozal Y, Varon D. Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization. *Cardiovasc Res.* 2005 Jul 1;67(1):30-8.
81. Williams LA, Martin-Padura I, Dejana E, Hogg N, Simmons DL. Identification and characterisation of human Junctional Adhesion Molecule (JAM). *Mol Immunol.* 1999 Dec;36(17):1175-88.
82. Aurrand-Lions M, Duncan L, Ballestrem C, Imhof BA. JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells. *J Biol Chem.* 2001 Jan 26;276(4):2733-41. Epub 2000 Oct 25.
83. Johnson-Léger CA, Aurrand-Lions M, Beltraminelli N, Fasel N, Imhof BA. Junctional adhesion molecule-2 (JAM-2) promotes lymphocyte transendothelial migration. *Blood.* 2002 Oct 1;100(7):2479-86.
84. Liang TW, Chiu HH, Gurney A, Sidle A, Tumas DB, Schow P, Foster J, Klassen T, Dennis K, DeMarco RA, Pham T, Frantz G, Fong S. Vascular endothelial-junctional adhesion molecule (VE-JAM)/JAM 2 interacts with T, NK, and dendritic cells through JAM 3. *J Immunol.* 2002 Feb 15;168(4):1618-26.
85. Naik MU, Mousa SA, Parkos CA, Naik UP. Signaling through JAM-1 and alphavbeta3 is required for the angiogenic action of bFGF: dissociation of the JAM-1 and alphavbeta3 complex. *Blood.* 2003 Sep 15;102(6):2108-14. Epub 2003 May 15.
86. Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol.* 1998 Jul 13;142(1):117-27.
87. Ozaki ME, Coren BA, Huynh TN, Redondo DJ, Kikutani H, Webb SR. CD4+ T cell responses to CD40-deficient APCs: defects in proliferation and negative selection apply only with B cells as APCs. *J Immunol.* 1999 Nov 15;163(10):5250-6.
88. Malergue F, Galland F, Martin F, Mansuelle P, Aurrand-Lions M, Naquet P. A novel immunoglobulin superfamily junctional molecule expressed by antigen presenting cells, endothelial cells and platelets. *Mol Immunol.* 1998 Dec;35(17):1111-9.
89. Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Mueller F, Nelboeck P, Schmid G, Bartfai T, Dejana E, Brockhaus M. Homophilic interaction of junctional adhesion molecule. *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):30970-6.
90. Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Orsenigo F, Cordenonsi M, Citi S, Dejana E. Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem.* 2000 Jul 7;275(27):20520-6.
91. Liu Y, Nusrat A, Schnell FJ, Reaves TA, Walsh S, Pochet M, Parkos CA. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci.* 2000 Jul;113 (Pt 13):2363-74.

92. Palmeri D, van Zante A, Huang CC, Hemmerich S, Rosen SD. Vascular endothelial junction-associated molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is localized to intercellular boundaries of endothelial cells. *J Biol Chem*. 2000 Jun 23;275(25):19139-45.
93. Sobocka MB, Sobocki T, Babinska A, Hartwig JH, Li M, Ehrlich YH, Kornecki E. Signaling pathways of the F11 receptor (F11R; a.k.a. JAM-1, JAM-A) in human platelets: F11R dimerization, phosphorylation and complex formation with the integrin GPIIIa. *J Recept Signal Transduct Res*. 2004 Feb;24(1-2):85-105.
94. Aurrand-Lions M, Johnson-Leger C, Wong C, Du Pasquier L, Imhof BA. Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members. *Blood*. 2001 Dec 15;98(13):3699-707.
95. Keiper T, Al-Fakhri N, Chavakis E, Athanasopoulos AN, Isermann B, Herzog S, Saffrich R, Hersemeyer K, Bohle RM, Haendeler J, Preissner KT, Santoso S, Chavakis T. The role of junctional adhesion molecule-C (JAM-C) in oxidized LDL-mediated leukocyte recruitment. *FASEB J*. 2005 Dec;19(14):2078-80. Epub 2005 Sep 29.
96. Chavakis T, Keiper T, Matz-Westphal R, Hersemeyer K, Sachs UJ, Nawroth PP, Preissner KT, Santoso S. The junctional adhesion molecule-C promotes neutrophil transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 2004 Dec 31;279(53):55602-8. Epub 2004 Oct 14.
97. Scheiermann C, Meda P, Aurrand-Lions M, Madani R, Yiangou Y, Coffey P, Salt TE, Ducrest-Gay D, Caille D, Howell O, Reynolds R, Lobrinus A, Adams RH, Yu AS, Anand P, Imhof BA, Nourshargh S. Expression and function of junctional adhesion molecule-C in myelinated peripheral nerves. *Science*. 2007 Nov 30;318(5855):1472-5.
98. Bradfield PF, Scheiermann C, Nourshargh S, Ody C, Luscinskas FW, Rainger GE, Nash GB, Miljkovic-Licina M, Aurrand-Lions M, Imhof BA. JAM-C regulates unidirectional monocyte transendothelial migration in inflammation. *Blood*. 2007 Oct 1;110(7):2545-55. Epub 2007 Jul 11.
99. Orlova VV, Economopoulou M, Lupu F, Santoso S, Chavakis T. Junctional adhesion molecule-C regulates vascular endothelial permeability by modulating VE-cadherin-mediated cell-cell contacts. *J Exp Med*. 2006 Nov 27;203(12):2703-14. Epub 2006 Nov 20.
100. Glikli G, Ebnet K, Aurrand-Lions M, Imhof BA, Adams RH. Spermatid differentiation requires the assembly of a cell polarity complex downstream of junctional adhesion molecule-C. *Nature*. 2004 Sep 16;431(7006):320-4.
101. Lamagna C, Hovalala-Dilke KM, Imhof BA, Aurrand-Lions M. Antibody against junctional adhesion molecule-C inhibits angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res*. 2005 Jul 1;65(13):5703-10.
102. Santoso S, Orlova VV, Song K, Sachs UJ, Andrei-Selmer CL, Chavakis T. The homophilic binding of junctional adhesion molecule-C mediates tumor cell-endothelial cell interactions. *J Biol Chem*. 2005 Oct 28;280(43):36326-33. Epub 2005 Aug 23.

103. Chavakis E, Carmona G, Urbich C, Göttig S, Henschler R, Penninger JM, Zeiher AM, Chavakis T, Dimmeler S. Phosphatidylinositol-3-kinase-gamma is integral to homing functions of progenitor cells. *Circ Res*. 2008 Apr 25;102(8):942-9. Epub 2008 Mar 6. Erratum in: *Circ Res*. 2008 Jul 3;103(1):e13-4
104. Kwon SM, Eguchi M, Wada M, Iwami Y, Hozumi K, Iwaguro H, Masuda H, Kawamoto A, Asahara T. Specific Jagged-1 signal from bone marrow microenvironment is required for endothelial progenitor cell development for neovascularization. *Circulation*. 2008 Jul 8;118(2):157-65.
105. Urao N, Inomata H, Razvi M, Kim HW, Wary K, McKinney R, Fukai T, Ushio-Fukai M. Role of nox2-based NADPH oxidase in bone marrow and progenitor cell function involved in neovascularization induced by hindlimb ischemia. *Circ Res*. 2008 Jul 18;103(2):212-20. Epub 2008 Jun 26.
106. Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Sasaki K, Bruhl T, Farhadi MR, Vajkoczy P, Hofmann WK, Peters C, Pennacchio LA, Abolmaali ND, Chavakis E, Reinheckel T, Zeiher AM, Dimmeler S. Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization. *Nat Med*. 2005 Feb;11(2):206-13. Epub 2005 Jan 23.
107. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*. 2004 Aug;10(8):858-64. Epub 2004 Jul 4.
108. Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Süselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM; REPAIR-AMI Investigators. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006 Sep 21;355(12):1210-21.
109. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*. 2004 Jul 10-16;364(9429):141-8.
110. Erbs S, Linke A, Schächinger V, Assmus B, Thiele H, Diederich KW, Hoffmann C, Dimmeler S, Tonn T, Hambrecht R, Zeiher AM, Schuler G. Restoration of microvascular function in the infarct-related artery by intracoronary transplantation of bone marrow progenitor cells in patients with acute myocardial infarction: the Doppler Substudy of the Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction (REPAIR-AMI) trial. *Circulation*. 2007 Jul 24;116(4):366-74. Epub 2007 Jul 9.
111. Schächinger V, Aicher A, Döbert N, Röver R, Diener J, Fichtlscherer S, Assmus B, Seeger FH, Menzel C, Brenner W, Dimmeler S, Zeiher AM. Pilot Trial on Determinants of Progenitor Cell Recruitment to the Infarcted Human Myocardium. *Circulation*. 2008 Sep 15. [Epub ahead of print]
112. Hristov M, Weber C. Ambivalence of progenitor cells in vascular repair and plaque stability. *Curr Opin Lipidol*. 2008 Oct;19(5):491-7.

113. Zampetaki A, Kirton JP, Xu Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res.* 2008 Jun 1;78(3):413-21. Epub 2008 Mar 18. Review.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
µl	Mikroliter
A.	Arterie
ACD	Acid-Citrate-Dextrose (Puffer)
ADP	Adenosindiphosphat
anti-JAM-A	Monoklonaler Antikörper gegen JAM-A
ASS	Acetylsalicylsäure
BSA	Bovines Serum Albumin
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CD34 ⁺	CD34-positiv
CHO Zelle	Chinesische Hamster Ovarialzelle
CTX	Cortical Thymocyte Marker bei <i>Xenopus laevis</i>
CVRF	Kardiovaskuläre Risikofaktoren
CXCR4	Chemokin (C-X-C motif) Rezeptor 4
DAPI	4',6-Diamino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECs	Endothelzellen
eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase
EPCs	Endotheliale Progenitorzellen
FACS	Fluoreszenz Aktivierte Zellsortierung, auch Durchflusszytometrie
Fc	Fc-Domäne
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein (Fluoreszenzfarbstoff)

Flk-1	siehe VEGFR-2
g	Gravitation
griech.	Griechisch
haECs	Humane Arterielle Endothelzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (Marker-Enzym)
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1 (CD54)
IgG	Immunglobulin G
IgSF	Immunglobulin Superfamilie
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
INF- γ	Gamma-Interferon
JAM-A	Junctional Adhesion Molecule-A
JAM-C	Junctional Adhesion Molecule-C
KHK	Koronare Herzkrankheit
L	Liter
LDL	Low Density Lipoprotein
LFA-1	alpha(L)beta(2), CD11a
M	Mol
mAb	Monoklonaler Antikörper
Mac-1	alpha(M)beta(2), CD11b
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
n	Fallzahl
NaHCO ₃	Natriumbikarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
ng	Nanogramm

OD	Optische Dichte
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
pAVK	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PE	Phycoerythrin (Fluoreszenzfarbstoff)
PECAM-1	Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1, (CD31)
pH	pondus Hydrogenii
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid Protease Inhibitor
PRP	Plättchenreiches Plasma
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
SD	Standardabweichung
SDF-1	Stromal Cell Derived Factor-1
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
sJAM-A-Fc	lösliches (soluble) JAM-A-Fc
Tie-2	Tyrosinkinase Rezeptor-2
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
tPA	Tissue Type Plasminogen Activator
TRAP	TNF-related Activation Protein
VEGFR-2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2
vWF	Von-Willebrand Faktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Histologischer Schnitt: Koronararteriosklerose.....	7
Abbildung 2 - 3D Darstellung: Junctional Adhesion Molecule-A.....	13
Abbildung 3 - Statischer Adhäsions Assay: Progenitorzellen adhären an Thrombozyten.....	25
Abbildung 4 - Statischer Adhäsions Assay: Eine Inhibition von JAM-A mindert die Adhäsion von Progenitorzellen an Thrombozyten.....	26
Abbildung 5 - Flusskammer: Schematische Darstellung.....	27
Abbildung 6 - Flusskammer: Progenitorzellen adhären unter Flussbedingungen an Thrombozyten, Inhibition durch JAM-A.....	28
Abbildung 7 - Durchflusszytometrie: Thrombozyten und Progenitorzellen exprimieren JAM-A.....	29
Abbildung 8 - Immunoblot: Thrombozyten und Progenitorzellen exprimieren JAM-A.....	30
Abbildung 9 - Statischer Adhäsions Assay: Progenitorzellen adhären an JAM-A.....	31
Abbildung 10 - Statischer Adhäsions Assay: Schematische Darstellung...	31
Abbildung 11 - Statischer Adhäsions Assay: Progenitorzelladhäsion an JAM-A kann durch lösliches JAM-A oder anti-JAM-A inhibiert werden	32
Abbildung 12 - Colony Forming Unit Assay: Progenitorzellen differenzieren auf Thrombozyten zu endothelialen Progenitorzellen	34
Abbildung 13 - Colony Forming Unit Assay: Progenitorzellen differenzieren auf JAM-A zu endothelialen Progenitorzellen.....	36
Abbildung 14 - Durchflusszytometrie: Differenzierungsbestätigung der Progenitorzellen anhand von Oberflächenantigenen.....	37
Abbildung 15 - Immunfluoreszenzmikroskopie: Differenzierungsbestätigung der Progenitorzellen anhand des Von-Willebrand Faktor.....	38
Abbildung 16 - Durchflusszytometrie: EPC Verhalten nach Aktivierung....	39
Abbildung 17 - PCR Analyse: Differenzierungsbestätigung der Progenitorzellen anhand von Oberflächenantigenen.....	40

Abbildung 18 - Scratch Assay: Progenitorzellen fördern den Re- endothelialisierungsprozess	41
Abbildung 19 - Scratch Assay: Lösliches JAM-A inhibiert die progenitorzell- vermittelte Reendothelialisierung	42
Abbildung 20 - Scratch Assay: Repräsentative Phasenkontrastbilder.....	43

8. Danksagung

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater, Professor Dr. Meinrad Gawaz, für die Überlassung meines interessanten Dissertationsthemas und für die konstruktive und geistreiche Supervision dieses Projektes danken.

Meinem Betreuer, Dr. Konstantinos Stellos, gebührt für die intensive und fundierte Einarbeitung in die benötigten Methoden Dank und darüber hinaus für die enge Zusammenarbeit während aller Phasen dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern der AG Gawaz für die professionelle sowie herzliche Zusammenarbeit im Labor. Insbesondere gilt mein Dank hier Frau Jadwiga Kwiatkowska, die mir gerade in meinen ersten Monaten immer mit einem guten Rat und einer helfenden Hand zur Seite stand.

Meiner Familie danke ich an dieser Stelle, da sie dies alles überhaupt erst möglich gemacht und mich immer voll und ganz unterstützt hat.

Für das Korrekturlesen danke ich Frau Kathrin Vogler.

Und zu guter Letzt gebührt der Familie Beuter ein ganz spezieller Dank, weil sie mir in einem entscheidenden Lebensabschnitt einen wichtigen Impuls gaben.

9. Publikationen

9.1 Publikationen mit Ergebnissen aus dieser Arbeit

Paper:

1. K. Stellos, H. Langer, S. Gnerlich, V. Panagiota, E. Ninci, D. Menzel, I. Mueller, B. Bigalke, T. Geisler, D. Siegel-Axel, A. Bültmann, S. Lindemann, M. Gawaz. Junctional adhesion molecule-A is expressed on human CD34⁺ cells and promotes adhesion to immobilized platelets and differentiation to endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* In Revision.

Buchbeiträge:

1. S. Gnerlich, H. Langer, V. Panagiota, M. Schneider, C. Gotsis, E. Ninci, I. Mueller, B. Bigalke, T. Geisler, A. Bültmann, S. Lindemann, M. Gawaz, K. Stellos. Junctional Adhesion Molecule-A wird auf humanen CD34⁺ Zellen exprimiert und fördert deren Adhäsion an immobilisierten Thrombozyten sowie Differenzierung zu endothelialen Progenitorzellen. In: Heinle H, Schulte H, Schäfer J (eds). *Arteriosklerose*. Deutsche Gesellschaft für Arterioskleroserecherche 2009, In Press.

Abstracts:

1. K. Stellos, H. Langer, S. Gnerlich, V. Panagiota, E. Ninci, I. Mueller, B. Bigalke, A. Bültmann, S. Lindemann, M. Gawaz. Junctional adhesion molecule-A is expressed on human CD34⁺ cells and promotes adhesion to immobilized platelets and differentiation to endothelial progenitor cells. ESC Congress 2009, Barcelona.
2. K. Stellos, H. Langer, S. Gnerlich, V. Panagiota, M. Schneider, C. Gotsis, E. Ninci, I. Mueller, B. Bigalke, T. Geisler, A. Bültmann, S. Lindemann and M. Gawaz. Junctional adhesion molecule-A is expressed on human CD34⁺ cells and promotes adhesion to immobilized platelets and differentiation to endothelial progenitor cells. 75. Jahrestagung Mannheim, DGK Kongress, Mannheim 16-18.04.2009. *Clin Res Cardiol* 98, Suppl 1, April 2009 [V1550].
3. K. Stellos, H. Langer, S. Gnerlich, V. Panagiota, M. Schneider, C. Gotsis, E. Ninci, I. Mueller, B. Bigalke, T. Geisler, A. Bültmann, S. Lindemann and M. Gawaz. Junctional adhesion molecule-A is expressed on human CD34⁺ cells and promotes adhesion to immobilized platelets and differentiation to endothelial progenitor cells. DGAF Kongress, Blaubeuren 2009.

9.2 Weitere Publikationen des Autors

Paper:

1. K. Stellos, S. Gnerlich, B. Kraemer, S. Lindemann, M. Gawaz. Platelet interaction with progenitor cells: vascular regeneration or injury? Pharmacol Rep. 2008 Jan-Feb;60(1):101-8.

Buchbeiträge:

1. K. Stellos, V. Panagiota, S. Sachsenmaier, S. Gnerlich, H. Langer, B. Bigalke, K. Daub, T. Schönberger, M. Gawaz. Die Rolle der Interaktion von Thrombozyten und Progenitorzellen in Bezug auf die vaskuläre Regeneration und die Geweberegeneration. In: Heinle H, Schulte H, Schäfer J (eds). Arteriosklerose: Neue Aspekte aus der Hämostasiologie, Lipidologie und Gefäßwandbiologie. Deutsche Gesellschaft für Arterioskleroseforschung 2008.
2. K. Stellos, M. Schneider, V. Panagiota, S. Gnerlich, P. Seizer, T. Geisler, T. Schönberger, E. Ninci, M. Gawaz. Die Rolle der Interaktion von Thrombozyten und Progenitorzellen in Bezug auf das vaskuläre Remodeling und die Atherogenese. In: Heinle H, Schulte H, Schäfer J (eds). Arteriosklerose: Neue Aspekte aus der Hämostasiologie, Lipidologie und Gefäßwandbiologie. Deutsche Gesellschaft für Arterioskleroseforschung 2008.
3. K. Stellos, B. Bigalke, A. Schad, J. Grimm, V. Mozes, F. Pfaff, V. Panagiota, S. Gnerlich, M. Gawaz. Thrombozytäres SDF-1 ist bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom erhöht und korreliert mit der Anzahl der zirkulierenden CD34⁺ Progenitorzellen. In: Heinle H, Schulte H, Schäfer J (eds). Arteriosklerose: Neue Aspekte aus der Hämostasiologie, Lipidologie und Gefäßwandbiologie. Deutsche Gesellschaft für Arterioskleroseforschung 2008.

Abstracts:

1. K. Stellos, K. Daub, J. Grimm, S. Gnerlich, V. Panagiota, S. Sachsenmaier, M. Schneider, C. Gotsis, V. Mozes, B. Bigalke, P. Seizer, S. Lindemann, M. Gawaz. Binding of oxidized LDL on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndrome and facilitates platelet adhesion on vascular wall. 75. Jahrestagung Mannheim, DGK Kongress, Mannheim 16-18.04.2009. Clin Res Cardiol 98, Suppl 1, April 2009 [P1329].
2. K. Stellos, V. Panagiota, S. Sachsenmaier, S. Gnerlich, B. Bigalke, F. Pfaff, M. Schneider, C. Gotsis, J. Grimm, V. Mozes, O. Brost, L. Fekecs, H. Langer, T. Geisler, A.E. May, M. Gawaz. Circulating platelet –

- progenitor cell co-aggregates are increased in patients with acute coronary syndrome and present with increased adhesion and differentiation capability. 75. Jahrestagung Mannheim, DGK Kongress, Mannheim 16-18.04.2009. Clin Res Cardiol 98, Suppl 1, April 2009 [V839].
3. K. Stellos, H. Langer, G. Petrakis, V. Panagiota, S. Gnerlich, T. Schönberger T, Gauss A, Jahntz C, Ninci E, Müller I, Gawaz M. Circulating platelet - stem cell co-aggregates present with enhanced capability for peripheral domiciliation in comparison to pure CD34⁺ cells: implications in vascular regeneration. 74th Annual meeting of the German Cardiac Society, Mannheim, March 27-29 2008. Clin Res Cardiol 2008; 97- Suppl 1 [V647].
 4. K. Stellos, B. Bigalke, H. Langer, A. Schad, S. Gnerlich, T. Geisler, P. Seizer, P. Htun, S. Lindemann, M. Gawaz. Expression of SDF-1 on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndromes and correlates with the number of CD34⁺ progenitor cells. ESC Congress 2009, Barcelona.
 5. K. Stellos, B. Bigalke, D. Stakos, T. Geisler, P. Seizer, N. Henkelmann, S. Gnerlich, P. Htun, S. Lindemann, M. Gawaz. Platelet-bound P-selectin expression in patients with acute myocardial infarction: association with clinical presentation and with markers of myocardial necrosis. ESC Congress 2008, Munich, Germany, 31.08- 03.09.2008. European Heart Journal 2008 (Abstract Supplement).
 6. K. Stellos, B. Bigalke, D. Stakos, N. Henkelmann, T. Geisler, H. Langer, S. Gnerlich, B. Krämer, P. Htun, S. Lindemann, M. Gawaz. Platelet-bound P-selectin expression correlates with the extent of myocardial necrosis in patients with coronary artery disease. 74th Annual meeting of the German Cardiac Society, Mannheim, March 27-29 2008. Clin Res Cardiol 2008; 97- Suppl 1 [P1476].
 7. K. Stellos, B. Bigalke, D. Stakos, T. Geisler, H. Langer, N. Henkelmann, S. Gnerlich, B. Kraemer, P. Htun, S. Lindemann, M. Gawaz. Platelet-bound P-Selectin Expression in Patients with Coronary Artery Disease: Association with Clinical Presentation and with Markers of Myocardial Necrosis. ESC Congress 2009, Barcelona.
 8. K. Stellos, B. Bigalke, H. Langer, A. Schad, V. Panagiota, V. Mozes, J. Grimm, S. Sachsenmaier, S. Gnerlich, T. Geisler, P. Seizer, P. Htun, S. Lindemann, M. Gawaz. Expression of SDF-1 on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndromes and correlates with the number of CD34⁺ progenitor cells. 75. Jahrestagung Mannheim, DGK Kongress, Mannheim 16-18.04.2009. Clin Res Cardiol 98, Suppl 1, April 2009 [P412].

10. Lebenslauf

Name: Stephan Matthias Gnerlich
Geburtsdatum: 20. September 1982
Geburtsort: Engen
Nationalität: Deutsch

SCHULBILDUNG

09/1993 – 07/1999 Realschule, Engen
09/1999 – 07/2002 Wirtschaftsgymnasium, Singen

WEHRDIENST

10/2002 – 06/2003 Grundwehrdienst, Sonthofen

MEDIZINSTUDIUM

10/2003 – 01/2004 Krankenpflegepraktikum, Singen
04/2004 – 05/2010 Medizinstudium Eberhard-Karls Universität
Tübingen
- 03/2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- Famulaturen Innere Medizin, Singen
Kardiologie, Tübingen
Low Cost Care, Vellore, Indien
Pädiatrie, Ondangwa, Namibia
Orthopädie, Singen
- PJ Tertiale Chirurgie, Zürich, Schweiz
Innere Medizin, Houston, USA
Anästhesiologie, Friedrichshafen
- 05/2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
(Mündliche Prüfung 11.05.2010)