

Untersuchung möglicher
therapeutischer Behandlungsalternativen
nach perkutaner transluminaler Angioplastie
auf pharmazeutischer und molekularbiologischer
Basis

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Jürgen Wilhelm von der Ruhr

aus München

Tübingen

2016

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen

Prüfungstermin: 30. 09. 2016

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Konrad Kohler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Katja Schenke-Layland

Teile der vorgelegten Arbeit wurden bereits publiziert oder auf Tagungen vorgestellt:

Kongressbeiträge:

2010:

Stentbeschichtung mit dem Naphtachinon-Derivat Shikonin zur Restenoseprophylaxe nach Stentimplantation

RöFo - Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren;
(Fortschr Röntgenstr) © Georg Thieme Verlag KG 2015; Ausgabe 182 · March 2010
J Schmehl¹, J.W. von der Ruhr², P Mahdavi¹, B Behnisch³, T Skutella², C Claussen¹, G Tepe⁴

Poster:

2007:

3rd World conference on regenerative medicine; WCRM; 17. - 20. Oktober 2007, Leipzig, Deutschland

Improved vascular regeneration and impeding of re-stenosis by Shikonin based stent coatings

J.W. von der Ruhr¹, J. Schmehl², S. Conrad¹, T. Skutella¹

2008:

BioStar 2008; 3rd Congress on Regenerative Biology and Medicine; 9. - 11. Oktober 2008. Stuttgart, Deutschland

Improved Vascular Regeneration and Impeding of Re-stenosis by Shikonin Based Stent Coatings

J.W. von der Ruhr¹, J. Schmehl², S. Conrad¹, T. Skutella¹

2009:

Deutsche Gesellschaft für Kardiologie; 75. Jahrestagung, 16. April 2009, Mannheim, Deutschland

Capture of endothelial progenitor cells by a bispecific protein/monoclonal antibody molecule induces re-endothelialization of vascular lesions

H.F. Langer¹, J.W. von der Ruhr², K. Daub¹, T. Schönberger¹, K. Stellos¹, A.E. May¹, A. Gauss¹, R. Hafner¹, H.-J. Buehring³, K. Klingel⁴, S. Conrad², M. Schaller⁵, M. van Zaandvoort⁶, G. Jung⁷, T. Skutella¹, M. Gawaz¹

2010:

BioStar 2008; 4th Congress on Regenerative Biology and Medicine; 13. - 15. Oktober 2010 Stuttgart, Deutschland

Shikonin Coating – Prophylaxis of Re-Stenosis after Stenting?

J.W. von der Ruhr¹, J. Schmehl², P. Mahdavi², B. Behnisch, C.D. Claussen², G.Tepe⁴, T. Skutella⁵

2011:

5th World conference on regenerative medicine; WCRM; 02. - 04. November 2011, Leipzig

Different Therapeutic Approaches to Improve Re-Endothelialization in Order to Avoid Re-Stenosis

Jürgen W. von der Ruhr^{1*}, Harald F. Langer^{2*}, Sabine Conrad¹, Karin Daub², Tanja Schoenberger², Konstantinos Stellos², Andreas E May², Alexandra Gauß², Ramona Hafner², Peter Lang³, Michael Schumm³, Hans-Jörg Bühring⁴, Karin Klingel⁵, Martin Schaller⁶, Marc van Zaandvoort⁷, Gundram Jung⁸, Stefanie Dimmeler⁹, Meinrad Gawaz² & Thomas Skutella^{1*}

Publikationen:

2010:

Capture of endothelial progenitor cells by a bispecific protein/monoclonal antibody molecule induces reendothelialization of vascular lesions.

J Mol Med (Berl). 2010 Jul; 88(7):687-99. doi: 10.1007/s00109-010-0614-5. Epub 2010 Apr 23.

PMID: 20414631

Langer HF, von der Ruhr JW, Daub K, Schoenberger T, Stellos K, May AE, Schnell H, Gauss A, Hafner R, Lang P, Schumm M, Bühring HJ, Klingel K, Conrad S, Schaller M, van Zandvoort M, Jung G, Dimmeler S, Skutella T, Gawaz M.

2013:

Balloon coating with rapamycin using an on-site coating device.

Cardiovasc Intervent Radiol. 2013 Jun; 36(3):756-63. doi: 10.1007/s00270-013-0583-5. Epub 2013 Feb 22. PMID: 23435745

Schmehl J, von der Ruhr J, Dobratz M, Kehlbach R, Braun I, Greiner TO, Claussen CD, Behnisch B.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Bedeutung des Herzens und der Blutgefäße	2
1.2. Funktion des Blutes	3
1.3. Aufbau und Morphologie der Blutgefäße	5
1.4. Blutgefäßassoziierte Zelltypen	7
1.4.1. Endothelzellen und Endotheltypen	7
1.4.2. Glatte Muskelzellen und Muskelzelltypen	9
1.4.3. Fibroblasten	11
1.4.4. Perizyten	11
1.5. Vaskulogenese und Angiogenese	12
1.5.1. Angiogenese	12
1.5.2. Angiogene Kaskade	13
1.6. Stammzellen und ihre Besonderheiten	17
1.6.1. Nische und Funktion endothelialer Vorläuferzellen	17
1.6.2. Charakterisierung der endothelialen Stamm-, Vorläuferzellen	19
1.7. (Molekulare) Regulation der Stammzellen/Angiogenese	21
1.7.1. Der NO-Signalweg	22
1.7.2. Der TGF- β -Signalweg	23
1.7.3. Der AKT-Signalweg	25
1.8. Blutgefäßpathogenese und deren Ursachen	26
1.8.1. Thrombosen	27
1.8.2. Stenosen	28
1.9. Medizinische Behandlungsansätze	30
Intervention bei Thrombosen	30
Intervention bei Stenosen	31
1.9.1. Limitierung der Stentangioplastie	32
1.9.2. Mögliche Lösungen	33
Pharmakologischer Ansatz	33
Stammzelltherapeutischer Ansatz	35
1.10. Aufgabenstellung	36

2. Material und Methoden	37
2.1. Material	37
2.1.1. Chemikalien	37
2.1.2. Lösungen	39
2.1.3. Zellkulturmedien	44
2.1.4. Geräte	45
2.2. Methoden	46
2.2.1. Zell- und Gewebematerial	46
Porcines Gewebe	46
Zellkultur, Zellen, Zelllinien	46
Primärzellen aus Vollblut, Leukapherese-Filtrat	47
2.2.2. Voruntersuchungen zum pharmazeutischen Ansatz	47
Pharmazeutische Löslichkeit	47
Beschichtungsdosis	48
Beschichtungsuntergrund	48
2.2.3. Beschichtung / Durchführung des pharmazeutischen Ansatzes	49
2.2.4. Analysemethoden des pharmazeutischen Ansatzes	50
MTT-Assay	50
PI-Assay	51
Vimentinfärbung	51
EPC Adhäsionsversuche auf Stents	52
2.2.5. Isolation von primären PBMCs	53
2.2.6. „Magnetic-Cell-Separation“ (MACS)	54
2.2.7. Voruntersuchungen zum molekularbiologischen Therapieansatz	55
Protein G & IgG Antikörper	55
<i>in vitro</i> -Flusskammerversuche (PeCon - IgG)	56
2.2.8. Zelladhäsionsexperimente Bispezifisches Antikörperkonstrukt	58
<i>in vitro</i> -Flusskammerversuche (PeCon – Bispez. Ab-Konstr)	59
Zelladhäsion (<i>ex vivo</i>) in Blutgefäß-Explantaten	59
2.2.9. Immun/Histologische-, Histochemische-Nachweismethoden	62
Silanbeschichtung von Objektträgern	62
Hämatoxilin/Eosin-Färbung (HE)	63
Immunhistochemie/Immunzytochemie	64

2.2.10. Molekularbiologische Nachweismethoden	65
DNS <i>in situ</i> -Hybridisierung	65
Humanspezifische Alu-Sonde und deren Herstellung	67
Polymerasekettenreaktion (PCR)	68
Agarose Gelelektrophorese	69
Dot-Blot Analyse	70
Proteinnachweis mittels Western-Blot	72
3. Ergebnisse	74
3.1. Pharmazeutischer Ansatz	74
Voruntersuchungen zur Beschichtungsdosis	75
Untersuchungsschema: Pharmazeutischer Ansatz	76
3.1.1. <i>In vitro</i> Wirkungsnachweis von Shikonin und Rapamycin	77
Zellviabilitäts-Assay (MTT)	77
Zelltod-Assay (PI)	81
Immunzytochemische Zytoskelettfärbung (Vimentin)	82
Zellnachweis mittels Vimentin (Shikonin)	83
Färbung für das Vergleichspharmakon (Rapamycin)	84
3.1.2. Endothelzell- und EPC-Adhäsion auf Stents	85
3.2. Molekularbiologischer Ansatz (Re-Endothelialisierung mittels bispezifischen Antikörperkonstrukts)	87
3.2.1. Isolations-, Kultivierungsoptimierung und Nachweis für EPCs	87
Zelldifferenzierung als Nachweismethode für EPCs	88
Zeitlicher Verlauf des Differenzierungsverhaltens von EPCs	89
EPC-Charakterisierung/Nachweis immunzytochemischer Marker	89
Qualitativer Nachweis IgG induzierter <i>in vitro</i> -Adhäsion	91
Quantitative Erfassung antikörperinduzierter Zelladhäsion	91
3.2.2. Induzierte Zelladhäsion mittels bispez. Antikörperkonstrukts	92
Bispez Antikörperkonstrukt induzierte EPC Adhäsion (<i>in vitro</i>)	93
Quantifizierung der Antikörperkonstrukt Adhäsion (<i>in vitro</i>)	94
Bispez. Antikörperkonstrukt induzierte EPC Adhäsion (<i>ex vivo</i>)	94
Quantifizierung der Antikörperkonstrukt Adhäsion (<i>ex vivo</i>)	96
3.2.3. AKT-Aktivierung durch das Antikörperkonstrukt	97

4. Diskussion	99
4.1. Pharmakologischer Therapie-Ansatz mit der Substanz Shikonin	102
Zellviabilität / MTT-Assay	103
PI-Assay	104
4.2. Molekularbiologischer Ansatz mit Fänger-molekülen	105
Antikörper-induzierte Zelladhäsion (Protein-G + IgG-Ab.)	106
Bispez. Antikörperkonstrukt induzierte Zelladhäsion (<i>in vitro</i>)	107
Bispez. Antikörperkonstrukt induzierte Zelladhäsion (<i>ex vivo</i>)	108
Untersuchung des <i>AKT</i> -Signalwegs	109
5. Zusammenfassung	110
6. Literatur	112
7. Anhang	138
7.1. Abbildungsverzeichnis	138
7.2. Abkürzungsverzeichnis	140
7.3. Danksagung	144
7.4. Lebenslauf	145
7.5. Veröffentlichungen	146

Die Vollkommenheit ist unerreichbar.

Gewiss ist die Vollkommenheit unerreichbar.

Sie hat nur den Sinn, deinen Weg wie ein Stern zu leiten.

Sie ist Richtung und Streben auf etwas hin.

- Antoine de Saint-Exupéry -
(Citadelle; 1948)

1. EINLEITUNG

Seit Jahren führen Herzkreislauferkrankungen, wie die chronisch ischämische Herzerkrankung, der akute Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz die Spitze der häufigsten krankheitsbedingten Todesursachen Deutschlands, wie auch der meisten anderen europäischen Industrienationen an (Stat.Bundesamt 2014). Ursache dieser Erkrankungen sind in der Regel pathologische Veränderungen im Inneren der Blutgefäße, in Form von Kalzifikationen oder fettreichen Ablagerungen (Plaques). Die Ablagerungen verringern lokal das Lumen der Blutgefäße – es entstehen Stenosen, letztlich führen solche häufig zu einem totalen Gefäßverschluss, einer Embolie. Infolge des Engpasses und der, in den dahinterliegenden Gewebearealen geringeren Durchblutung, resultiert eine Minderversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen. Ab einem kritischen Ausmaß der Unterversorgung hat dies unweigerlich einen Gewebeuntergang zur Folge, der bei sensiblen Gewebetypen wie dem Nervengewebe des Gehirns, aber auch den Herzmuskelzellen ernste und nicht selten tödlich endende Folgen für den Betroffenen nach sich ziehen kann. Bei rechtzeitiger Erkennung der Minderversorgung erfolgt therapeutisch häufig eine perkutane transluminale Angioplastie, die die Beseitigung der Blutgefäßverengung zum Ziel hat. Oftmals werden hierbei Blutgefäßstützen (Stents) im Gefäß platziert (Stentangioplastie), um die behandelten Engstellen nach dem Entfernen der Lumen-reduzierenden Ablagerungen zu stützen und dadurch einen ungehinderten Blutfluss zu gewährleisten. Einer der Risikofaktoren bei der Anwendung von Gefäßstützen ist ein erneuter Wiederverschluss, der sogenannten Re-Stenose. Die Re-Stenose beruht auf einer überschießenden Zellproliferation, der Hyperplasie, von Muskelzellen und Fibroblasten aus der Gefäßwand sowie einem Mangel an funktionalem Gefäßendothel. Daher sind Wege die Zellproliferation zu verhindern bereits seit einigen Jahren Gegenstand der Forschung. Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung möglicher therapeutischer Behandlungsalternativen nach perkutanen transluminalen Angioplastien auf pharmazeutischer und molekularbiologischer Basis. Der pharmazeutische Ansatz umfasst die Untersuchung der Substanz Shikonin als Beschichtung von Gefäßstützen zur Proliferationsunterdrückung, wohingegen der molekularbiologische Ansatz den Einsatz eines speziell entwickelten Fänger-moleküls zur Rekrutierung von Endothel-bildenden Vorläuferzellen aus dem Blutstrom verfolgt.

1.1. Bedeutung des Herzens und der Blutgefäße

Bereits im 5. und 4. vorchristlichen Jahrhundert, befassten sich griechische Ärzte der Antike wie bspw. Hippokrates und Praxagoras von Kos mit der Anatomie des Menschen und unterschieden bei den Blutgefäßen schon Venen von Arterien (Cardwell 1905). Erste schriftliche anatomische Erkenntnisse über Herz und Blutgefäße lassen sich auf die Zeit um 1500 v.Chr. datieren. Sie entstammen den altägyptischen Schriften wie dem Papyrus Edwin Smith, sowie dem Papyrus Ebert und beschreiben unter anderem die Verteilung des Blutes im Körper in Adern zusammen mit dem Herz als zentralem Organ (Haas 1999). Mit Gründung und Aufkommen der neuzeitlichen Lehre der Anatomie wurde schließlich Anfang des 16. Jahrhunderts der Weg für die Erforschung des Aufbaus und der Funktion des Körpers, und damit des inhärenten Blutgefäßsystems geebnet. Eine treibende Kraft dieser Epoche war Andreas Vesalius (bürgerlicher Name: Andreas Witnick * 1514, † 1564). Im Rahmen des von ihm 1543 veröffentlichten Werkes „*De humani corporis fabrica libri septem*“ (Vesalius 1543) war er maßgeblich an der Etablierung und der Weitergabe des anatomischen Wissens beteiligt (Lefrère and Berche 2010). *In puncto* Herz und Blutgefäße legte keine 100 Jahre später 1628 der Anatom und Arzt William Harvey, förmlich als Vorreiter, die Basis für ein gänzlich neues Verständnis hinsichtlich humaner Physiologie und Funktion. Ihm gelang es als erster mittels anatomischer Studien der Herzbewegung und des Blutes die *bis dato* gültige Ansicht, dass das Blut in der Leber gebildet würde und im Körper versickere zu widerlegen. In seiner Veröffentlichung: „*Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus*“ postulierte er, dass das Blut in einem geschlossenen Kreislauf mittels des Herzschlages durch den Körper zirkulieren würde (Fara 2007). Den letzten Beweis der bestehenden Verbindung zwischen Arteriolen und Venolen blieb William Harvey schuldig, jedoch erfolgte dieser schon wenige Jahre später 1661 von Marcello Malpighi und seiner mikroskopischen Entdeckung der Lungenkapillaren (Pearce 2007). Der für Säuger typische geschlossene Blutkreislauf, in dem sich das Blut in ständiger Bewegung in seinem eigenen Gefäßsystem befindet, lässt sich physiologisch in drei große Bereiche einteilen: Einen arteriellen Bereich (vom Herzen weg gerichtet), einen venösen Bereich (zum Herzen hin gerichtet) und einen lymphatischen Bereich. Letzterer wird heute häufig als eigenständiges System betrachtet und daher oft als lymphatisches System bezeichnet (Choi, Lee et al. 2012).

1.2. Funktion des Blutes

Im Vergleich zu anderen Organen wie dem Herz, der Lunge oder Leber nimmt das Blut aufgrund der mangelnden festen bzw. soliden Form eine Sonderstellung als eigenständiges Organ ein. Die Grundlage, Blut dennoch als Organ zu betrachten, begründet sich nicht zuletzt auf der Anzahl und der Vielfalt der spezialisierten Zellen, was sowohl die folgende Tabelle (Abb. 1-1) als auch die anschließende Abbildung (Abb. 1-2) widerspiegeln.

Zelluläre Zusammensetzung des Blutes	
5.000.000	Rote Blutkörperchen - Erythrozyten
4.000 - 10.000	Weiße Blutkörperchen - Leukozyten
	7500 Granulozyten
	2.000 - 7.000 Neutrophile ~
	80 - 400 Eosinophile ~
	4 - 100 Basophile ~
	1500 - 3500 Lymphozyten
	200 - 800 Monozyten
200.000 - 300.000	Thrombozyten

Abbildung 1-1: Zelluläre Zusammensetzung des Blutes pro μl . (Lippert 2006)

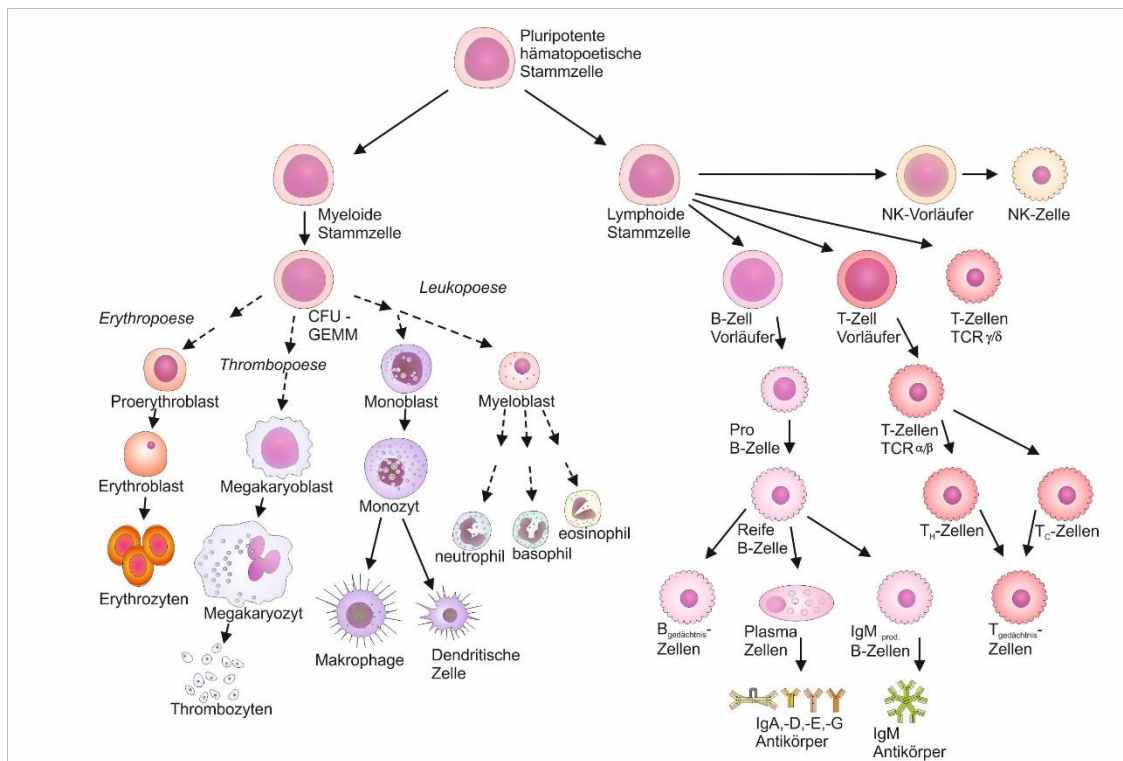


Abbildung 1-2: Stammbaum der CD34-positiven hämatopoetischen Stammzelle. (Adaptiert aus MedizinInfo.de)

Blut stellt das zentrale Transportmittel für annähernd alle erforderlichen Ausgangsstoffe bei homöostatischen Vorgängen dar, wodurch es wiederum eng in sämtliche physiologische Reaktionen verwoben ist. Beinahe jede Zelle des Körpers ist über die Blutgefäße an das körpereigene Versorgungssystem angeschlossen und kann durch dieses erreicht und versorgt werden. Dabei ist davon auszugehen, dass in der Regel keine Körperzelle weiter als drei bis vier Zellen von einem versorgenden Blutgefäß entfernt liegt (Randall 2000). Lediglich Knorpel, die Augenlinse wie auch die Kornea stellen hierbei Ausnahmen dar, sie werden bradytroph, also über Diffusion der sie umgebenden Flüssigkeiten versorgt (Beebe 2008, Torricelli, Singh et al. 2013). Die ausgeklügelte Transportfunktion des Blutes umfasst unter anderem den Blutgasaustausch - (O_2 -Ver- und CO_2 -Entsorgung), die Nährstoffversorgung - (Kohlenhydrate, Proteine, Fette, Aminosäuren, Vitamine und Mineralstoffe), sowie die Metaboliten-, Stoffwechselproduktentsorgung (Transport zu den Exkretionsorganen Darm und Niere oder aber zur Leber zum Umbau) (Asscher and Jones 1965, Billing and Black 1969, Kubanek 1980, Nikinmaa 1997). Darüber hinaus übernimmt Blut eine Vehikelfunktion für Hormone und andere biochemische Botenstoffe (zur Regulierung des Körperhaushalts), ferner dient es zudem als Wasser- und Wärmespeicher sowie als Verteiler der durch die Zellatmung entstehenden lebenswichtigen Körperwärme (Booth, Johnson et al. 2002, Gormley, Dong et al. 2003, Hall 1991, Jose, Raymond et al. 1992, Mekjavic and Eiken 2006, Young and Freedman 1971). Die Vielzahl an Funktionen des Blutes, seine komplexe Zusammensetzung sowie seine physikalischen und chemischen Eigenschaften machen es erforderlich, dass das Blut stetig von multiplen Sensoren und Organen kontrolliert wird. Erst diese stete Kontrolle und feine Regulation ermöglicht den Zustand der Homöostase, also einen weitgehend konstanten Konzentrationserhalt aller körperwichtigen transportierten Stoffe wie: Blutgase, Nährstoffe, Metabolite, Elektrolyte, Wasser, aber auch der Konstanthaltung wichtiger physiologischer Werte wie des pH-Werts und der Temperatur (Boron 2004, Montell and Caterina 2007, Niiijima 1989, Orlov and Mongin 2007, Staudinger and Lichti 2008). Aufgrund der enormen Relevanz eines konstanten Blutflusses und gleichbleibenden Versorgungszustands des Körpers, ist es im Falle von Verletzungen besonders wichtig einen auftretenden Blutverlust durch eine schnelle und effektive Blutstillung/Hämostase, die gleichzeitig auf mehreren Ebenen abläuft, so gering

wie möglich zu halten (Spaet 1966). Über das Immunsystem kommt dem Blut zusätzlich noch die Aufgabe zu, in den Körper eingedrungene Fremdkörper, Bakterien, Viren oder andere Erreger sowohl durch die antikörpervermittelte, als auch die zelluläre Immunantwort zu erkennen und eliminieren. Hierdurch wird eine Ausbreitung und Vermehrung der Pathogene im Körper verhindert (Adinolfi and Lessof 1972). Mit Hilfe dieser komplexen Funktions-, Regelungs- und Versorgungsstrategie gelingt es dem Körper, den Stoffwechsel aller ihn bildenden Zellen zu schützen und aufrechtzuerhalten (Bassingthwaighte 1970, Grundy 1978, Zierler 1999)

1.3. Aufbau und Morphologie der Blutgefäße

Je nach Größe, Lage, Ursprung und Funktion des einzelnen Blutgefäßes unterscheidet sich der Aufbau geringfügig, jedoch haben alle Blutgefäße eine, das Gefäß auskleidende, einzellige Schicht aus Endothelzellen gemeinsam, welche nach außen hin von einer Basalmembran begrenzt wird. Dieses Bauprinzip gilt gleichermaßen für Arterien, Venen, Arteriolen, Venolen wie auch für die Kapillargefäße. Alle außer Kapillaren besitzen zudem den typischen dreischichtigen Wandaufbau, der von innen nach außen aus Tunica intima, Tunica media und Tunica adventitia besteht (Abb. 1-3).

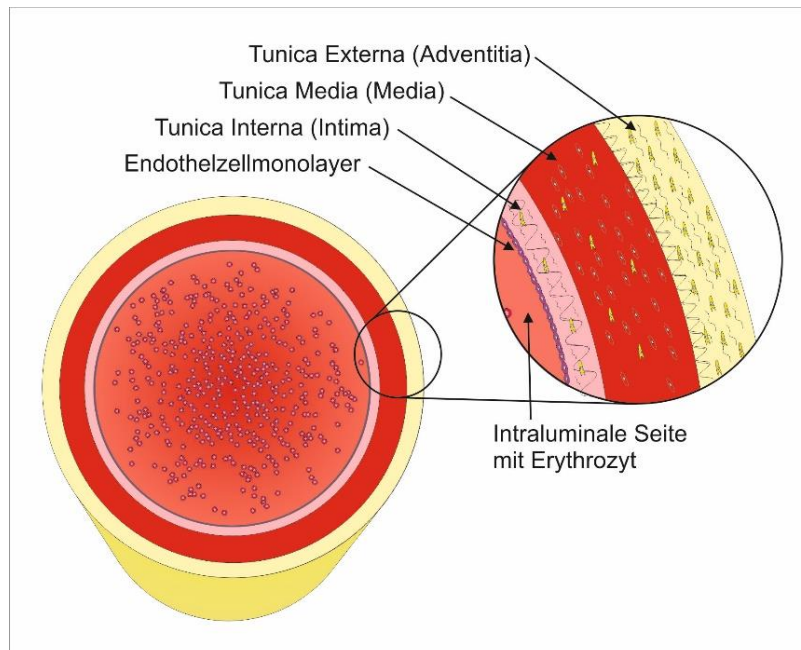


Abbildung 1-3: Skizze des morphologischen dreischichtigen Blutgefäßaufbaus

Tunica intima (Intima)

Die Tunica intima bildet die innerste der drei Schichten. Sie baut sich aus der lumenseitig befindlichen Endothelschicht, sowie einer nach außen hin begrenzenden Basalmembran auf. Die Endothelschicht schirmt nicht nur den Blutfluss funktional zum Gewebe hin ab und verhindert durch Bildung antikoagulatorischer Substanzen wie Heparansulfat ein Anheften der im Blut befindlichen Erythro- und Thrombozyten an die Gefäßwand, sondern reguliert mittels Bildung von Stickoxid (NO) und via des Renin-Angiotensin-Stoffwechsel die Größe des Blutgefäßes und hierüber unter anderem den Blutdruck (Hall 1991). Die von den Endothelzellen erstellte Basalmembran besteht vorwiegend aus Kollagen des Typs IV sowie weiteren Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM), wie Laminin und Proteoglykane etc. (Kramer 1985, Kramer, Bensch et al. 1984, Schwartz, Heimark et al. 1990). Unterhalb der Basallamina befindet sich bei Arterien und Venen lockeres Bindegewebe, das zumeist aus Kollagenfasern und elastischen Komponenten aufgebaut und von den dort lokalisierten Fibroblasten sezerniert wird (Hay 1999). In diesem Gewebeverband liegt die „Membrana elastica interna“, ein kompaktes elastisches Faserbündel, das bei Arterien histologisch nachweisbar ist und mikroskopisch visualisiert werden kann (Moore and Ruska 1957).

Tunica media (Media)

In der Tunica media – der mittleren der drei Schichten - liegt die Mehrzahl aller Muskelzellen des Blutgefäßes. Die Anordnung der Zellen im Gewebe ist radial orientiert und wird durch Kollagen- und elastische Fasern verstärkt (Dingemans, Jansen et al. 1981). Auf diese Weise kann die Tunica media im System elastischer Arterien, die durch den Blutdruck entstehende Spannung auf das Blutgefäß kompensieren (Windkesselfunktion). Im System muskulärer Arterien ist es der Tunica media so hingegen möglich über gezielt gesteuerte Kontraktionen und Relaxationen aktiv das Lumen und hierdurch wiederum den Blutdruck im nachgeschalteten Organ zu regulieren (Nicosia and Villaschi 1999). Aufgrund dessen ist die Media in dem systolisch höher belasteten arteriellen System stärker ausgeprägt und mit höheren Anteilen an elastischen Fasern ausgerüstet als dies im diastolischen System der Venen der Fall ist. Nach außen hin zur Tunica adventitia gelegen befindet sich ein weiteres elastisches Faserbündel, das in

Analogie zur „Membrana elastica interna“ aufgrund seiner äußeren Lage die Bezeichnung „Membrana elastica externa“ trägt (Van Aken, Seiffert et al. 1997).

Tunica externa (Zona adventitia)

Die Tunica externa, auch als Zona adventitia oder kurz nur Adventitia bezeichnet, stellt die das Gefäß nach außen hin abschließende Struktur dar und besteht überwiegend aus Fibroblasten. Die in ein Gespinnst aus Kollagenfasern eingebetteten Fibroblasten bilden ein mehrschichtiges Netz, dessen Funktion der Schutz und die Verankerung der Blutgefäße, in dem das Gefäß umgebenden Gewebe ist. Man findet in der Tunica externa zudem Nervenfasern, sowie bei größeren Adern die Zugänge der Gefäßäste, die das Blutgefäß selbst versorgen - Vasa vasorum genannt (McGeachie, Campbell et al. 1982).

1.4. Blutgefäßassoziierte Zelltypen

Die wichtigsten blutgefäßassoziierten Zelltypen wurden im Bereich des Gefäßaufbaus zwar bereits erwähnt, sollen aber nochmals detailliert vorgestellt werden.

1.4.1. Endothelzellen und Endotheltypen

Endothelzellen stellen eine meist auf einer Basalmembran liegende, flache einzellige Schicht dar, die alle Blut-, und Lymphgefäße intraluminal auskleidet. (Risau 1995). Funktional betrachtet ist das Endothel aufgrund seiner vielfältigen physiologischen Prozesse in die es involviert ist weitaus mehr als eine reine zelluläre Schicht auf der Blutgefäßinnenseite. Neben der angesprochenen Abgrenzungsfunktion des Blutes zum Gewebe hin greift es beispielsweise auch steuernd in den Gas- und Nährstoffaustausch zwischen Gewebe und Blut ein (Michel and Curry 1999). Ferner kann es über die Produktion von NO (Stickoxid) auch den Gefäßtonus und damit den Gesamtblutdruck des Kreislaufsystems regulativ beeinflussen (Hall 1991). Über dies ist das Endothel maßgeblich an der Gerinnungshemmung und somit am Erhalt der Fließeigenschaften des Blutes beteiligt, was von eminenter Wichtigkeit für die Aufrechterhaltung der Körperversorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff ist (Michel and Curry 1999). Selbst bei pathologischen Vorgängen kommt dem Endothel eine Schlüsselfunktion zu. Es wird bei lokalen inflammatorischen Ereignissen aktiviert, was zur Folge hat, dass im Blutkreislauf befindliche Zellen des Immunsystems (Leukozyten) ihrerseits

eine Aktivierung durch das Endothel erfahren (Risau 1995). Aufgrund der Aktivierung sind die Leukozyten nun in der Lage, durch die Endothelzellschicht in darunterliegenden Gewebsschichten zu migrieren, um dort an den Ort der Entzündung zu gelangen und die pathogenen Keime bzw. infektiösen Erreger zu bekämpfen. Die Endothelschicht nimmt nicht zuletzt auch bedeutenden Einfluss auf die Erweiterung des Blutgefäßsystems. Unter anderem wird dies ausgelöst durch den auf das Endothel wirkenden Blutdruck („shear stress“) (Obi, Yamamoto et al. 2009).

Übersicht der Endotheltypen

Im Bereich der Kapillaren lassen sich histologisch drei verschiedene Typen des Endothels voneinander abgrenzen. Sie unterscheiden sich anhand ihrer Durchlässigkeit für verschiedene Blutsubstanzen und Moleküle (Welsch 2010)

Kontinuierliches Endothel

Kontinuierliches Endothel zeichnet sich durch ausgeprägte „tight-junctions“ zwischen den einzelnen Endothelzellen aus. Diese befinden sich im Vergleich zu Epithelzellen häufig eher mittig zum extrazellulären Raum gelegen und stellen eine mehr oder minder unpassierbare Grenze für die im Blut gelösten Stoffe dar (Schneeberger and Lynch 2004). Die Transportfunktionen erfolgen daher typischerweise durch Mechanismen hochselektiver Kanäle. Beispiel für diesen Typus ist das Endothel das die Blut-Hirn-Schranke ausbildet (Risau 1995).

Fenestriertes Endothel

Fenestriertes Endothel wird nach außen hin nicht von einer kontinuierlichen Schicht der Basalmembran umgeben wie es beim kontinuierlichen Endothel der Fall ist. Fenestriertes Endothel ist hingegen vielmehr geprägt durch seine relative Durchlässigkeit für Moleküle kleiner ca. 70 nm (Esser, Wolburg et al. 1998). Dieser begrenzende Transfer entsteht durch vorhandene Fenster in den Zellen. Mit Ausnahme des Nierenendothels, besitzt fenestriertes Endothel jedoch die Möglichkeit die Durchlässigkeit der Fenster mittels einer Zwischenwand, dem Diaphragma, noch weiter zu regulieren. Man findet diese Art des Endothels typischerweise sowohl im Gastrointestinaltrakt, als auch in endokrinen Drüsen und Nierenglomeruli.

Diskontinuierliches Endothel

Das diskontinuierliche Endothel ist das am stärksten durchlässige aller Endothelien, sogar Zellen können dieses passieren. Ursache hierfür stellt die Tatsache dar, dass die einzelnen Endothelzellen zum Teil nicht einmal mehr in Kontakt zueinander stehen, woraus große Lücken in der Endothelwand resultieren. Ferner fehlt teilweise bis gänzlich die sonst vorhandene Basalmembran als Barriere. Beispiele für diskontinuierliches Endothel stellen die Lebersinusoide (Johannes 2010) sowie wie das Knochenmark und die Milz dar (Risau 1995).

1.4.2. Glatte Muskelzellen und Muskelzelltypen

Die Zellen der glatten Muskulatur ermöglichen den meisten Hohlorganen des Körpers mit Ausnahme des Herzens kontraktile Bewegungen. Die vergleichsweise großen spindelförmigen Zellen mit 25 µm bis zu 400 µm Länge tragen einen einzelnen mittigen Zellkern und verfügen über Einstülpungen der Zellmembran, den sogenannten Kaveolen, die mit der extrazellulären Matrix verbunden sind und der elektromechanischen Signalkopplung dienen. Die glatte Muskulatur unterscheidet sich weiterhin von der Skelettmuskulatur durch die fehlende charakteristische Querstreifung. Die Filamente scheinen bei glatten Muskelzellen vielmehr zufällig verteilt zu sein und stellen sich daher im Lichtmikroskop betrachtet als glatt dar. Die Filamente selbst bestehen aus dicken und dünnen gebündelten Myofilamenten, die teils in dichten Ansammlungen, teils in Anheftungsplaques („dense bodies“) aus Alpha-Actinin und Vinculin nahe der Zellmembran inserieren. Die unterschiedliche Anordnung der Myosinfilamente bzw. deren Abweichung vom Bauplan der Skelettmuskeln ermöglicht eine kraftvolle, andauernde, wenn auch nur langsame Muskelverkürzung. Man unterscheidet grundsätzlich zwei verschiedene Zell-Typen, einen Single-Unit-, sowie einen Multi-Unit-Typ die sich in ihrer Erregungsweise unterscheiden, wobei der Single Unit Typ in Blutgefäßen häufiger zu finden ist (Schmidt 2000).

Funktionale Besonderheiten glatter Muskulatur

Glatte Muskelzellen übernehmen in Blutgefäßen die Stellfunktion des Lumens, dessen Regulation global über Hormone, lokal aber auch über Botenstoffe erfolgt. Auch das periphere vegetative Nervensystem greift hier steuernd ein, weswegen häufig Nervenfasern und Axone an Gefäßen inserieren. Die Kontraktion der glatten Muskulatur entspricht grundlegend zwar der der Skelettmuskulatur, jedoch verläuft sie vielfach langsamer. Folglich wird bei der Aktivierung der Muskelzellen weniger Sauerstoff und Energie (ATP) verbraucht. Ausgelöst wird die Kontraktion durch eine intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung. Hierfür bestehen folgende drei Induktionsmöglichkeiten. Zum einen können per elektromechanischer Kopplung, mittels Aktionspotenzialen oder langanhaltenden Depolarisationen, spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle geöffnet werden. Zum anderen bewirken rezeptorgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle einen Ca^{2+} -Einstrom und vermögen hierdurch eine Kontraktion auszulösen. Botenstoffe dieser rezeptorinduzierten Reaktion stellen hierbei NAD (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid), ACh (Acetylcholin), Angiotensin, Histamin aber auch verschiedene Arzneistoffe dar. Letztlich besteht auch noch die Möglichkeit, über Gefäß-Dilatation dehnungs-abhängige Ca^{2+} -Kanäle zu öffnen. In allen drei Fällen kommt es jedoch zu einem intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg durch einströmendes extrazelluläres Ca^{2+} . Ca^{2+} bindet an Calmodulin und bildet den Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex. Dieser führt zur Aktivierung der „myosin light chain kinase“, einem Enzym das in seiner aktivierten Form in der Lage ist ATP (Adenosin-Tri-Phosphat) zu spalten und die leichten Ketten des Myosinmoleküls zu phosphorylieren. Die Phosphorylierung der Myosinketten ermöglicht den Ablauf des Querbrückenzykluses, und damit die Kontraktion, sprich die Verkürzung des Muskels. Die glatte Muskulatur zeigt diesbezüglich eine relativ hohe Latenzzeit (Zeitdauer zwischen Signal und muskulärer Reaktion) von rund einer viertel Sekunde, die auf der Diffusionsgeschwindigkeit des extrazellulären Ca^{2+} in die Muskelzelle hinein und der hierauf folgenden biochemischen Zellaktivierung basiert. Eine Muskelentspannung tritt ein, wenn der Ca^{2+} -Einstrom ausbleibt oder sinkt, bspw. intrazelluläres Ca^{2+} über aktive Antiporter in den extrazellulären Zwischenraum bzw. das sarkoplasmatische Retikulum transportiert wird. Die Folge ist, dass der Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex zerfällt und das Gegen-Enzym der „myosin light chain kinase“, die Myosinphosphatase, aktiviert wird. Sie de-phosphoryliert die leichten Myosinketten und verhindert dadurch den Ablauf von

Querbrückenzyklen. Eine weitere nicht unwichtige Aufgabe der glatten Muskulatur ist ihre Fähigkeit Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) wie bspw. Proteoglykane, Elastin, Laminin und Kollagen-I zu produzieren (Schmidt 2000, Welsch 2010).

1.4.3. Fibroblasten

Fibroblasten stellen die Zellen des Bindegewebes dar und verfügen ähnlich der glatten Muskelzellen mit der Produktion von extrazellulärer Matrix (ECM), wie Kollagen und Proteoglykane über eine wichtige Funktion. Die Bildung beider Komponenten ist dabei eng mit der Stabilität der extrazellulären Matrix assoziiert. Verletzung und Schädigung des Gewebes führt zur Proliferation der Fibroblasten und erhöht via Zytokinausschüttung die Reparaturaktivität des Gewebes – Heilung tritt ein. Die motilen, jedoch ortsständigen Fibroblasten des Bindegewebes haben mesenchymalen Ursprung. Ihre Beweglichkeit nimmt aber mit der Differenzierung zu Fibrozyten zunehmend ab. Morphologisch sind sie als spindelförmige Zellen mit unregelmäßig ausgeprägten zytoplasmatischen Vorsätzen zu bezeichnen, über die sie mit ihren Nachbarzellen in Verbindung stehen. Da neben der Synthese auch der Umbau von Kollagenen bei Reparaturmechanismen eine große Rolle spielt, wie es beispielsweise von Kollagen-I zu Kollagen-III der Fall ist (Abe, Steinmann et al. 1979), sind Fibroblasten typischerweise mit einer endogenen Kollagenase ausgerüstet, die ihnen diese Ab- und Umbauvorgänge von Kollagenen ermöglicht.

1.4.4. Perizyten

Bei Perizyten handelt es sich morphologisch um Zellen mit verhältnismäßig großem Zellkern und kleinem Zytoplasma. Sie sitzen direkt auf den Endothelzellen der Kapillargefäße auf und sind von der Basallamina bedeckt. Über Ausstülpungen und „gap-junctions“ stehen sie mit den Endothelzellen in Verbindung und umfassen die Kapillarstruktur, wodurch diese stabilisiert wird (Katare and Madeddu 2013). Zudem nimmt an, dass Perizyten an der Neubildung von Gefäßen, der Angiogenese wesentlich beteiligt sind (Maier, Shepherd et al. 2010, Schrimpf, Teebken et al. 2014). Sie spielen darüber hinaus jedoch auch eine Rolle an pathologischen Vorgängen. Bei Schädigung der Perizyten bspw. entstehen

instabile Kapillarstrukturen, die wiederum kapillare Ausstülpungen - sogenannte Aneurysmen der Kapillarwände verursachen (Lindahl, Johansson et al. 1997). Regulierende Faktoren des Wechselspiels aus Proliferation und Zellarrest zwischen Perizyten und Endothelzellen sind TGF- β und PDGF, die hierbei antagonistische Wirkungen haben (Murakami and Simons 2009). Obwohl Perizyten funktional dem Bindegewebe angehören verfügen sie über ein kontraktiles Potenzial, daher geht man davon aus, dass Perizyten Einfluss auf das kapillare Lumen nehmen können und auf diese Weise auch an Ischämien beteiligt sind (Betsholtz, Lindblom et al. 2005, Birbrair, Zhang et al. 2015).

1.5. Vaskulogenese und Angiogenese

Zur begrifflichen Differenzierung zwischen Vaskulogenese und Angiogenese sei hier ein kurzer Abriss der wissenschaftlichen Sichtweise angefügt. Der Begriff Angiogenese umfasst zwar vom wörtlichen Sinn der Abstammung her sämtliche Prozesse in deren Rahmen Blutgefäße entstehen (Griech.: *angeion* = Angio = Gefäß und *genesis* = Genese = Entstehung), jedoch hat sich diese weitfassende Definition in den 1990er Jahren auf die Neu- und Ausbildung von Seitenarmen aus bestehenden Blutgefäßen reduziert. Vaskulogenese definiert demnach die primäre Erstentstehung (*de-novo*) des Blutgefäßsystems in der Embryonalentwicklung. Im Rahmen der Vaskulogenese bilden Angioblasten durch Aggregation zu Strängen ein Netzwerk aus Kapillaren, der sogenannten „Area vasculosa“ (Gilbert 2000, Müller W.A. 2012, Risau 1997, Risau and Flamme 1995). Auch die Vaskularisierung der Organe, die sich aus mesodermalen und entodermalen Anteilen bilden wie Lunge, Leber, Magen und Milz erfolgt ebenfalls durch Vaskulogenese (Demello, Sawyer et al. 1997, Gebb and Shannon 2000, Lammert, Cleaver et al. 2001, Matsumoto, Yoshitomi et al. 2001, Patan 2004, Robert and Abrahamson 2001, Vokes and Krieg 2002). Der Begriff Angioblast als Vorläuferzelle für die Blutgefäßentstehung ist diesbezüglich ein vokabularisches Relikt, *per definitionem* müsste er wohl korrekterweise als Vaskuloblast bezeichnet werden.

1.5.1. Angiogenese

Gemäß dem vorherigen Abschnitt definiert die Angiogenese alle Entwicklungsschritte, die zur Expansion und Verzweigung des bereits bestehenden Systems

aus Blutgefäßen führt (Carmeliet 2000, Patan 2000, Risau 1997). Es kann in eine aussprossende („sprouting“) und eine nicht-aussprossende („non-sprouting“) Entwicklung unterteilt werden. Letztere basiert auf Vorgängen des „bridgings“ und der Intussuszeption. Beim „bridging“ (Engl.: „bridge“ = Brücke) teilen dem Endothel entstammende Pfeilerzellen das Gefäßlumen und sorgen dadurch für eine Division des Blutgefäßes. Die Intussuszeption hingegen führt über die Einstülpung von Gefäßen zur Erhöhung der Gefäßanzahl (Bartel and Lametschwandtner 2000, Kalka, Asahara et al. 2000, Patan 2000, Patan 2004). Die sprossende Angiogenese findet häufig durch Teilung von Endothelzellen in kürzlich entstandenen Gefäßabschnitten statt. Sie führt ebenfalls zur Bildung tubulärer Strukturen, jedoch geht das Längenwachstum dabei meist von einem Pool spezialisierter, beweglicher Terminalzellen, den „tip-cells“ an der Spitze der Kapillaren aus. Diesen ist es möglich die Induktion von Zellbewegung und invasiver Aktivität durch aussprossen auszulösen und entlang eines chemoattraktiven Gradienten zu wandern. Dies geschieht anhand der Modulation von Zell-Zellkontakten und der Degradation der angrenzenden extrazellulären Matrix. Durch diese Migration der Terminalzellen und der Proliferation der dahinterliegenden Endothelzellen „stalk-cells“ verlängert sich die Kapillare - das tubuläre System wird erweitert (Eilken and Adams 2010). Angiogenese ist somit typisch für alle nicht in der Embryogenese durch Vaskulogenese (per Angioblasten) vaskularisierten Organe wie Gehirn und Rückenmark (Kurz, Korn et al. 2001). Jedoch lieferten Untersuchungen hierzu auch Hinweise darauf, dass es im adulten Körper noch persistierende Hämangioblasten bzw. primitive Stammzellen mit mesodermaler Qualität gibt, die eine Vaskulogenese ermöglichen können (Bailey and Fleming 2003, Cogle, Wainman et al. 2004, Kalka, Asahara et al. 2000).

1.5.2. Angiogene Kaskade

Die fein abgestimmte Regulation der Angiogenese, die strikt an die lokalen Erfordernisse des Organismus angepasst sein muss, erfolgt über eine komplexe zelluläre wie auch molekulare Kaskade mit angiogenen Faktoren - der angiogenen Kaskade. Sie umfasst nicht nur die Koordination wichtiger Bereiche wie der Initial-, Migrations-, Proliferations-, und Stabilisierungsphase, sondern schließt auch Lumen- und Anastomosenbildung mit ein. Selbst Aktivitäten wie Destabilisierung, Regression und kontrollierter Zelltod der Gefäße werden hierüber reguliert. Alle

hierfür benötigten angiogenen Faktoren werden dabei vom umgebenden Gewebe sezerniert (Müller W.A. 2012). Auslöser für die Ausschüttung von angiogenen Faktoren und damit der Initiation der angiogenen Kaskade ist häufig eine Unterversorgung mit Nähr- bzw. Sauerstoff. Der Verlauf der Angiogenese ist dabei jedoch abhängig von einer gezielten Steuerung und Regulation zahlreicher, unterschiedlicher Moleküle. Zu diesen zählen unter anderem Wachstumsfaktoren, ihre zellulären Rezeptoren, Zelladhäsionsmoleküle sowie ihre Gegenspieler die proteolytischen Enzyme. Auch extrazelluläre Matrixkomponenten spielen hierbei eine wichtige Rolle (Bishop, Bell et al. 1999, Folkman 1984, Kramer 1985, Kramer, Fuh et al. 1985).

Initialphase

Die Initialphase ist geprägt von der Auflösung der Basalmembran des Ursprungsgefäßes, sowie der dahinterliegenden interstitiellen Matrix. Dies geschieht durch die Endothelzellen selbst, da die vom Endothel synthetisierten Bestandteile der Basalmembran, wie Laminin, Fibronectin, Kollagen (IV), aber auch Heparansulfat und Proteoglykane einerseits aufgebaut, andererseits aber auch mittels Produktion von Proteasen wieder abgebaut werden können (Cheng and Kramer 1989, Kramer, Bensch et al. 1984, Lienau, Schell et al. 2005, Tilling, Engelbertz et al. 2002). Die hierbei involvierten Enzyme entstammen sowohl dem Plasminogen-Aktivator-System (PA-S) als auch dem Matrix-Metallo-Proteinase-System (MMP-S) (Mignatti and Rifkin 1996, Rodríguez, Morrison et al. 2010).

Migration und Proliferation

Der lokalen Matrixproteolyse folgt die gerichtete Migration der terminalen Endothelzellen in den entstandenen interstitiellen Freiraum in Richtung des angiogenen Stimulus hin (Xu, Rodriguez et al. 2001). Der angiogene Stimulus liegt in der Regel in Form angiogener Faktoren wie VEGF, Angiopoietin, bFGF und TGF α vor (Flamme and Risau 1992). Auch Neutrophine wie NGF können jedoch hieran beteiligt sein. Die Erkennung der ausgeschütteten Faktoren erfolgt dabei von Filopodien (mit ihrer jeweiligen Rezeptorausstattung) die sich an den Terminalzellenden befinden, wobei die Wachstumsrichtung hierbei entlang des Gradienten der sezernierten Faktoren terminiert wird, deren Konzentrationshöhe das Maß für die Anzahl der entstehenden Gefäße bildet (Müller W.A. 2012). Hinter der Migrationsfront beginnen die Endothelzellen zu proliferieren und bilden hierdurch

neue solide endotheliale Kapillarwände aus (Furcht 1986). Integrine nehmen dabei eine ausschlaggebende Schlüsselposition für die biochemische Kommunikation zwischen den aktivierten Endothelzellen mit der sie umgebenden Matrix ein (Balligand, Feron et al. 2009, Hynes 1992, Sheppard 2000) Abb. 1-4. Als Zelloberflächenrezeptoren für Adhäsionsmoleküle regulieren sie ablaufende dynamische Interaktionen, wie Proliferation, Differenzierung und Migration aber auch das Überleben der Endothelzellen (Gamble, Matthias et al. 1993, Iivanainen, Kahari et al. 2003). Als repulsive Gegenspieler der pro-angiogenen Faktoren existieren Signalmoleküle wie Netrin1, Semaphorin und Angiostatin, die den terminalen Endothelzellen signalisieren diese Region zu meiden. Ähnlich wichtig wie die gerade erwähnten Wachstumsfaktoren und die Regulation der Zelladhäsion zeigte sich auch der Einfluss mechanischer Stimuli wie der Systole und der Diastole, sowie der Einfluss des Blutflusses („shear-stress“) (Frame, Chapman et al. 1998). Die pulsatilen Kräfte des Blutflusses beeinflussen hierbei via eNOS und PDGF-Aktivierung den Aus- und Umbau des Gefäßsystems (Balligand, Feron et al. 2009, Resnick, Collins et al. 1993).

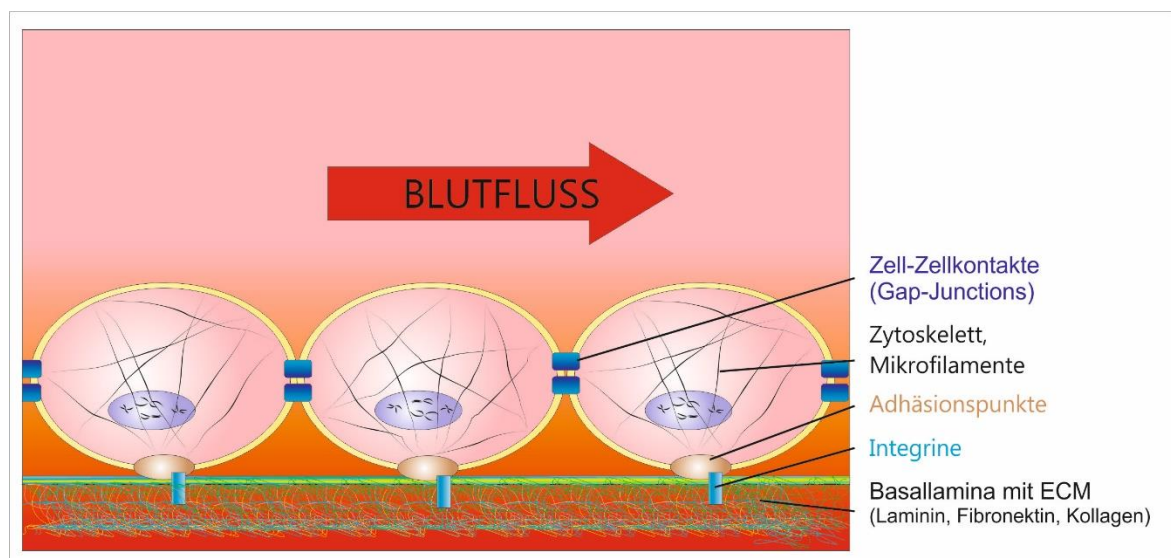


Abbildung 1-4: Zell-Zellkontakte und Integrine (Adaptiert aus Balligand, Feron et al. 2009)

Lumenbildung

Im Anschluss an die Migrations- und Proliferationsphase folgt die Lumenbildung, die auf verschiedene Arten erfolgen kann. Einerseits ist sie durch Polarisierung der Endothelzellen möglich - durch das Abflachen und die anschließende Vereinigung der Zellenden wird ein Hohlraum generiert. Im Kapillarbereich kann

ein solcher Hohlraum bereits von einer einzigen Endothelzelle gebildet werden (Paku 1998). Eine andere Variante der Ausbildung des Lumens besteht in der Generierung intrazellulärer Vakuolen in Endothelzellen. Durch die Zunahme der Vakuolendurchmesser sowie der anschließenden Verschmelzung untereinander wird schließlich ein intrazelluläres Lumen geformt. Erfolgt dieser Mechanismus nacheinander in benachbarten Endothelzellen entsteht auf diese Weise ein zusammenhängendes Kapillarlumen (Folkman and Haudenschild 1980). Schließlich ist noch eine rein apoptotische Lumenbildung beschrieben, bei welcher die innenliegenden Endothelzellen eines zunächst noch soliden Zellstranges den Kontakt zur Basalmembran verlieren, was zu Veränderungen führt die folgend die Apoptose dieser Zellen einleitet. Der so entstandene Freiraum bildet das spätere Lumen (Fierlbeck, Liu et al. 2003, Peters, Troyer et al. 2002).

Die zielgerichtete Verbindung von Arteriolen mit Venolen, um das Kapillarnetz korrekt zu schließen, findet anhand zellulärer Oberflächenmoleküle statt, die von den Terminalzellen mittels ihrer Rezeptoren erkannt werden. Ephrine wie Ephrin-B2a bei Arteriolen und Ephrin-B4 bei Venolen spielen hierbei die wesentlichste Rolle. Arterielle Ephrine wirken dabei auf Arteriolen repulsiv, venöse hingegen attraktiv und *vice versa*. Dies verhindert, dass sich Arteriolen mit Arteriolen und Venolen mit Venolen untereinander verbinden und gewährleistet den korrekten Blutgefäßzusammenschluß (Conover, Doetsch et al. 2000, Müller W.A.).

Stabilisierungsphase

Final wird die angiogene Kaskade schließlich von einer Stabilisierungsphase terminiert, in welcher die Stabilisierung und Maturation der neu entstandenen Gefäßstrukturen vonstattengeht. Es folgt die Rekonstruktion der Basalmembran und des umliegenden interstitiellen extrazellulären Gewebes um die neu-entstandene Kapillare herum (Jain 2003). Im Laufe dieser Phase wird auch die Neubesiedelung der Kapillare mit Perizyten initiiert. Dabei nimmt man an, dass diese einerseits aus den glatten Muskelzellen des Ursprungsgefäßes rekrutiert werden (Armulik, Abramsson et al. 2005), bzw. andererseits eine Differenzierung aus Fibroblasten respektive Transdifferenzierung aus Endothelzellen stattfindet (Nicosia and Villaschi 1999). Für eine erfolgreiche Stabilisierung sind Faktoren wie TGF- β („transforming growth factor-beta“), PDGF-BB („platelet derived growth factor-BB“), Angiopoietin-1 und deren Rezeptoren mitverantwortlich, was anhand

von „gene-knockouts und *in vitro*-Studien nachgewiesen werden konnte (Beck and D'amore 1997, Hirschi, Rohovsky et al. 1997). Allen Phasenabschnitten der angiogenen Kaskade (Initiations-, /Migrations-, Proliferations-, Lumenbildungs- aber auch der Stabilisierungs-Phase) kommt eine gleichrangige Stellung zu (Benjamin, Hemo et al. 1998).

1.6. Stammzellen und ihre Besonderheiten

Prinzipiell muss zwischen (ESC) embryonalen- und (ASC) adulten Stammzellen unterschieden werden. Nach Abschluss der Embryo-, Organogenese der ESCs übernehmen adulte Stammzellen die Aufgabe der Zellregeneration während der restlichen Lebensspanne des Körpers. Sie ersetzen abgestorbene Zellen der allgegenwärtigen Seneszenzvorgänge, wie auch die Regeneration bei Zellverlust bspw. nach Verletzungen (Watt and Hogan 2000). Theoretisch besitzen sie die Fähigkeit, sich unendlich unter vollem Erhalt ihrer Stammzeleigenschaften (*self-renewal*) zu teilen (Morrison, Shah et al. 1997).

1.6.1. Nische und Funktion endothelialer Vorläuferzellen

Endotheliale Vorläuferzellen (EPC im Englischen als „endothelial precursor cells“ bezeichnet) stellen eine zahlenmäßig geringe Fraktion im Blutstrom zirkulierender Zellen dar, die das Potenzial zur Differenzierung zu Endothelzellen besitzen. Sie tragen durch ihre Fähigkeit Blutgefäße intraluminal auszukleiden unter anderem zur Funktion der Thrombozytenaggregationsinhibition bei. Als Vorläuferzellen sind sie mit den Stammzellen der embryonalen Blutgefäßentwicklung (den Angioblasten der Vaskulogenese) verwandt. Im Gegensatz zu den bereits seit Anfang des 20. Jahrhunderts bekannten Angioblasten, sind die endothelialen Vorläuferzellen jedoch eine Entdeckung der späten 1990er Jahre durch Asahara (Asahara, Murohara et al. 1997). Neben der Charakterisierung der endothelialen Vorläuferzellen durch Asahara und seine Kollegen fand auch die Suche nach der Steuerung sowie der Lage der dazugehörigen Stammzellnische Eingang in die Forschung. Da die endotheliale Vorläuferzelle mesodermalen Ursprungs und somit im weiteren Sinne auch eng mit der hämatopoetischen Zelllinie assoziiert ist, also der blutbildenden Zellfraktion angehört ging man davon aus, dass endotheliale Vorläuferzellen auch in den selben Kompartimenten wie die

blutbildenden Zellen der hämatopoetischen Zelllinie, folglich dem roten Knochenmark, lokalisiert sind (Asahara, Masuda et al. 1999). Die Migration der endothelialen Vorläuferzellen aus ihrer Nische (dem Knochenmark) in den peripheren Blutfluss wird durch unterschiedliche Faktoren wie VEGF ("vascular endothelial growth factor"), SDF1 („stromal derived factor 1“) G-CSF („granulocyte stimulating factor“), jedoch auch von der, die Stammzelle umgebenden extrazellulären Membran beeinflusst (Abb. 1-5) (Leone, Valgimigli et al. 2009, Trappmann, Gautrot et al. 2012). Im Blut angekommen lösen angiogenese-regulierende Faktoren vor Ort das Ansiedeln der endothelialen Vorläuferzellen an die Bereiche mit akutem Endothelzellbedarf aus. Dort wird durch gezielt gesteuerte Proliferation und Differenzierung die Re-Endothelialisierung bzw. Angiogenese eingeleitet (He, Smith et al. 2004). Ein Hinweis für die Existenz der endothelialen Vorläuferzell-Nische im Knochenmark ist deren zelluläre Aktivier- und Mobilisierbarkeit durch Verabreichung des granulozytenstimulierenden Faktors (G-CSF). Eine solche Stimulation findet bspw. Anwendung bei geplanten Gefäßinterventionen im Rahmen von endothelialen Vorläuferzell-Eigenspenden zur Verbesserung des Therapieerfolgs (Bodine, Seidel et al. 1996, Rafii and Lyden 2003).

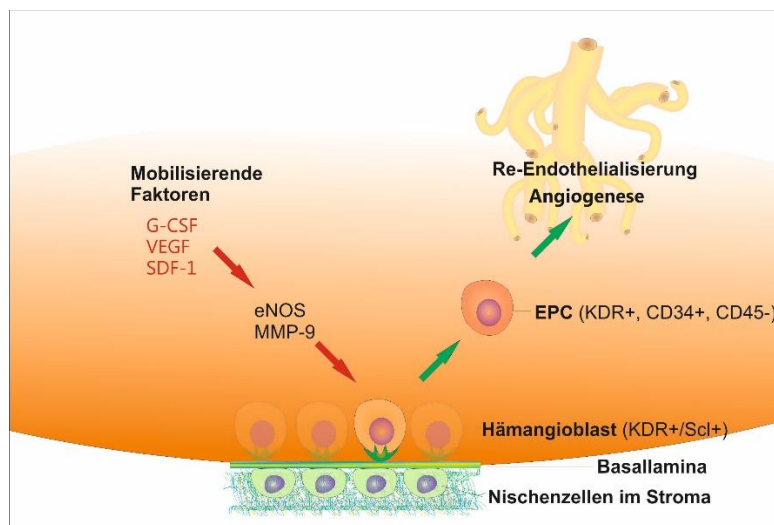


Abbildung 1-5: Nische und Differenzierung der endothelialen Vorläuferzellen. (Adaptiert aus Leone A.M.2009)

Zusätzlich zum nachgewiesenen Locus des Knochenmarks als Stammzellnische der endothelialen Vorläuferzellen werden in der Wissenschaft auch noch andere Loci diskutiert, allen voran ist hier der muskuläre Anteil der Tunica media zu nennen (Ergun and Gehling 2007). Nicht geklärt bleibt hierbei allerdings, ob die endothelialen Vorläuferzellen *postnatal* aus dem Knochenmark kommend über

den Blutstrom in den Gefäßbereich der Media migrieren, sich dort im Rahmen des „homings“ in ihrer Nische ansiedeln und bestehen bleiben, oder aber *per se* bereits seit der Ontogenese des Embryos dort existieren.

1.6.2. Charakterisierung der endothelialen Stamm-, Vorläuferzellen

Der eine, einzige und ausschließliche Marker für endotheliale Vorläuferzellen, wie er für manch andere Zelltypen existieren mag, wurde *bis dato* noch nicht gefunden. Vielmehr geht man davon aus, dass ein bestimmtes Expressionsmuster an Antigenen bzw. Proteinrezeptoren für Zellen mit endotheliale Vorläuferpotenzial existiert. Jedoch selbst dieses Expressionsmuster wird von unterschiedlichen Forschergruppen widersprüchlich diskutiert und definiert (vergl. (Asahara, Murohara et al. 1997) vs. (Prater, Case et al. 2007)). In diesem Zusammenhang werden und wurden verschiedene Unterscheidungsgruppen-Marker der CD-Klasse („cluster of differentiation“) genannt, die entweder exprimiert werden müssen oder aber nicht vorhanden sein dürfen. CD's stellen meist membrangebundene Oberflächenmoleküle auf Zellen dar, die vorwiegend aus zellspezifischen Glykoproteinen bestehen und unterschiedliche Funktionen wie Rezeptor-, Signal- und Kommunikationsfunktionen erfüllen. Die hier in dieser Arbeit als endotheliale Vorläuferzellen definierten Zellen sind Zellen, deren Marker für CD34, CD133 positiv sind sowie den VEGF Rezeptor-2 tragen (Coppolino, Bolignano et al. 2008).

CD34

Prominentester Vertreter der CD-Marker für endotheliale Vorläuferzellen ist vaskuläres Sialomucin, auch als CD34 bezeichnet. Es stellt einen frühen Marker der hämatopoetischen Stammzelllinie (vergl. Abb. 1-2) dar, der für die Entstehung aller im Blut befindlichen Zellen, wie Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten verantwortlich ist. CD34 positive hämatopoetische Stammzellen findet man vornehmlich im Knochenmark, wo sie jedoch nur einen geringen Teil der dortigen Zellpopulation ausmachen. Sie sind einerseits in der Lage von ihrer Nische aus als hämatopoetische oder endotheliale Vorläuferzellen in den Blutkreislauf zu emigrieren, um dort bei Bedarf geschädigte Bereiche zu besiedeln andererseits, aber auch zurück ins Knochenmark zu immigrieren und sich in ihrer Nische wieder durch „homing“ anzusiedeln (Leone, Valgimigli et al. 2009). Vaskuläres Sialomucin

bzw. CD34 ist ein glykosyliertes Membranprotein des Typs I, mit einer die Zellmembran durchspannenden Transmembrandomäne (Abb. 1-6) (Fiedler, Christian et al. 2006).

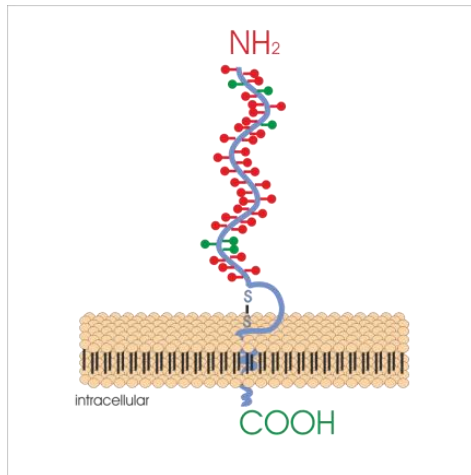


Abbildung 1-6: CD34 Sialomucin.
(Adaptiert aus (Alon and Rosen 2007))

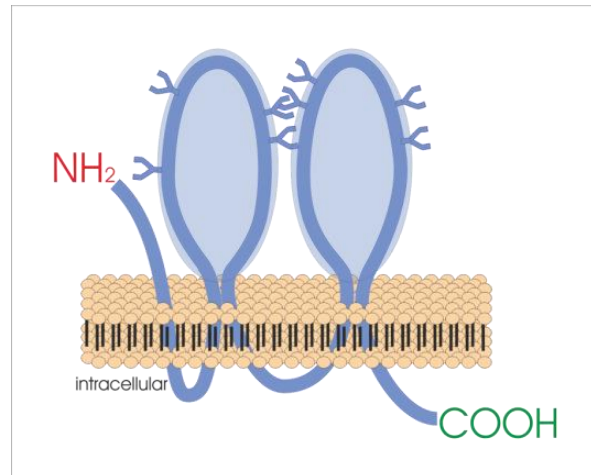


Abbildung 1-7: CD133/Prominin.
(Adaptiert aus (Jaszai, Fargeas et al. 2007))

CD133

Neben CD34 stellt CD133 (AC133), auch als Prominin bezeichnet, den zweiten der drei verlässlichsten Marker für endotheliale Vorläuferzellen dar (Yin, Miraglia et al. 1997). CD133 codiert für ein tierisches Membranprotein mit ungewöhnlichem Aufbau. Das Glykoprotein besteht aus fünf Transmembrandomänen mit einem cytoplasmatischem C- und einem extrazellulären N-Terminus, sowie zwei zwischen den Enden liegenden großen extrazellulären Schleifen. CD133 ist charakteristisch für Stamm-, Epithel- jedoch auch für Nichtepithelzellen. Prominin reagiert zudem mit dem Cholesterin der Zellmembran und stellt auf diese Weise einen Marker für ein Lipid-Derivat des Cholesterins dar, das als Raft bezeichnet wird (Weigmann, Corbeil et al. 1997) (Abb. 1-7).

VEGF

Der dritte charakteristische Marker der auf EPCs vorhanden ist wird von den Zellen in Form des VEGF-Rezeptors 2 („vascular endothelial growth factor receptor 2“) gebildet. Der VEGF-Rezeptor Typ 2 bindet extrazellulär die Untertypen A, C, D des Wachstumsfaktors VEGF, wobei VEGF-A mit wenigstens acht unterschiedlichen Splice-Varianten das häufigste und somit bedeutendste Molekül für die vaskuläre Homöostase bildet (Neufeld, Cohen et al. 1996). VEGF

(„vascular endothelial growth factor“) stellt ein wichtiges Signalmolekül sowohl der embryonalen Vaskulogenese (*de-novo*), als auch der postnatale Angiogenese dar (Wang, Nakayama et al. 2010) (Abb. 1-8).

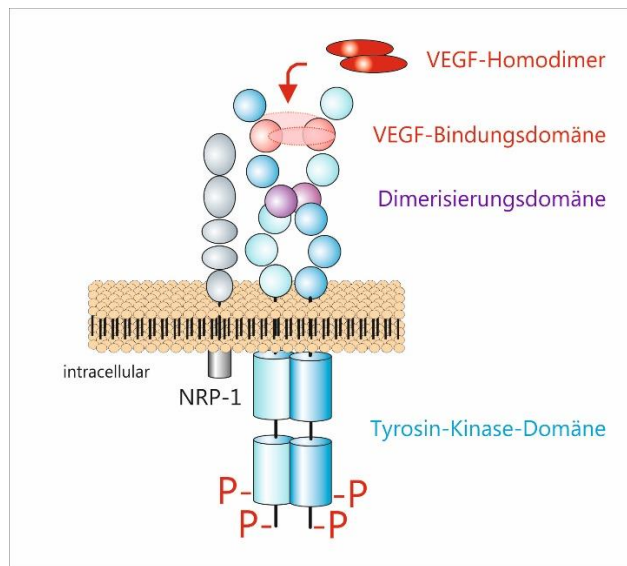


Abbildung 1-8: VEGF-Rezeptor-2 Aktivierung
(Adaptiert aus (Bry, M. Alitalo, K. 2014 & Neufeld Cohen et al.1999)

Bei Bindung der VEGF-Homodimere an ihre Rezeptoren kommt es zunächst zu einer Rezeptor-Dimerisierung, was wiederum die gegenseitige Phosphorylierung der Rezeptoren induziert und eine Aktivierung des intrazellulären Signalwegs via Tyrosin Kinase zur Folge hat (Neufeld, Cohen et al. 1999). VEGF wird unter anderem durch glatte Muskelzellen, Makrophagen oder Epithelzellen bei Sauerstoffmangel/Hypoxie ausgeschüttet. Hypoxie löst hierbei die Freisetzung von HIF („hypoxia inducible factor“) aus, die wiederum die Transkription und Abgabe von VEGF bedingt und somit die Neuentstehung von Gefäßen initiiert, um die Sauerstoffversorgung des hypoxischen Gewebes zu verbessern (Dor, Porat et al. 2001, Semenza 2000, Veyssier-Belot and Cacoub 1999).

1.7. (Molekulare) Regulation der Stammzellen/Angiogenese

Wie bereits im vorherigen Kapitel kurz erwähnt, werden endotheliale Vorläuferzellen durch vielfältige Faktoren stimuliert. Mechanische Belastung sogenannter „shear stress“ (Obi, Yamamoto et al. 2009), Inflammation (Watson, Goon et al. 2008) oder wie auch die Behandlung mit Wachstumsfaktoren

aktivieren und steigern die Zahl der peripheren, in der Blutbahn befindlichen, freien endothelialen Vorläuferzellen. Über die obigen Faktoren werden hierbei verschiedene Signalwege in Gang gesetzt, die die Aktivität der endothelialen Vorläuferzellen steuern. Drei der wichtigsten Signalwege werden hier näher dargestellt.

1.7.1. Der NO-Signalweg

Stickoxid (NO) nimmt als kleines und ubiquitäres Signalmolekül über die Aktivierung des Enzyms NO-Synthase (NOS - „nitric oxide synthase“) Einfluss auf vielerlei biologische Prozesse. Beispielsweise die Insulin-Sekretion (via NOS II), die Darmperistaltik (via NOS I), den Tonus und dessen Steuerung im Bereich der Atemwege sowie der Blutgefäße via NOS III. In Blutgefäßen reguliert NO jedoch nicht nur den Muskeltonus und verhindert die Adhäsion von Leukozyten und Blutplättchen sondern induziert funktionell via VEGF-, PDGF- und TGF- β -Aktivierung die Proliferation von Endothelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen. NOS III auch als endotheliale NO-Synthase (eNOS) bezeichnet, spielt dabei die zentrale Rolle (Heiss, Schanz et al. 2010, Veysier-Belot and Cacoub 1999). Im Falle eines erhöhten Blutdrucks beispielsweise katalysiert das in den Endothelzellen endogen vorhandene eNOS bei Aktivierung durch „shear stress“ aus reduziertem Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) und L-Arginin \rightarrow NO, Citrullin und oxidiertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP) (Abb. 1-9) (Bir, Xiong et al. 2012).

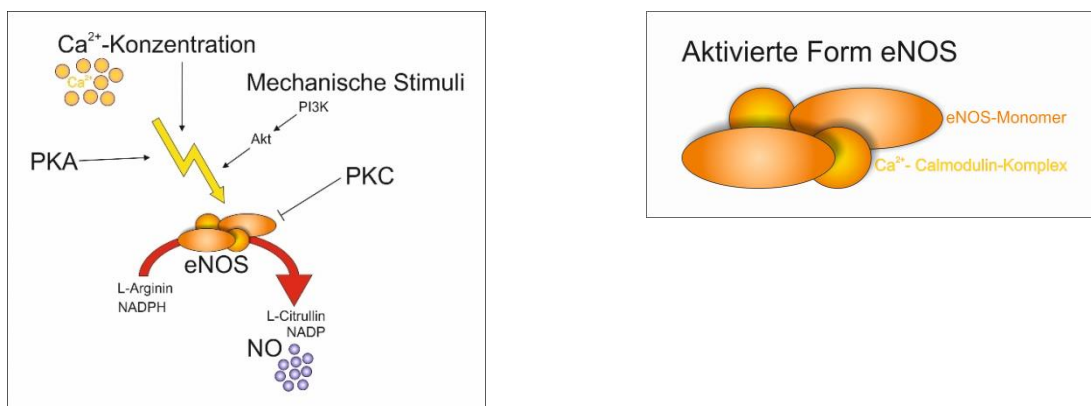


Abbildung 1-9: Aktivierung des eNOS Signalwegs (Adaptiert aus Bir, Xiong et al. 2012)

Nach Diffusion des katalysierten NOs ins Zytosol benachbarter glatter Muskelzellen löst dies über mehrere Zwischenschritte die Entspannung der Muskelzellen aus (Triggle, Samuel et al. 2012). Über eine negative Feedback-Schleife ist NO wiederum in der Lage die Expression von eNOS zu regulieren. Die NO Produktion in Endothelzellen kann zudem von außen neben Faktoren wie „shear stress“ auch über PDGF („platelet derived growth factor“), Acetylcholin (ACh) und andere Zytokine angeregt werden.

1.7.2. Der TGF- β -Signalweg

TGF- β („transforming growth factor- β “) ist ein intrazellulär segregiertes Protein, das in drei Isoformen β 1, β 2 und β 3 vorkommt. Es gehört der TGF- β -Superfamilie an, zu der unter anderem auch Inhibin, Aktivin und die BMPs („bone morphogenic proteins“) gezählt werden. Generell steuert TGF- β in der Mehrheit aller Zellen sowohl die Proliferation, als auch die Zelldifferenzierung wodurch TGF- β wiederum in eine Vielzahl relevanter pathologischer Prozesse involviert ist (Massagué and Xi 2012). Hierunter fallen Störungen des Immunsystems, Krebs, Diabetes aber auch Herzerkrankungen (Massagué 2012, Massague, Blain et al. 2000, Wu and Hill 2009). *In puncto* Angiogenese nimmt TGF- β , moduliert durch den Hilfsrezeptor Endoglin (CD105) (siehe EPC-Marker), direkten Einfluss auf die Proliferation, Migration und Differenzierung (Abb. 1-10) (Fonsatti, Nicolay et al. 2009).

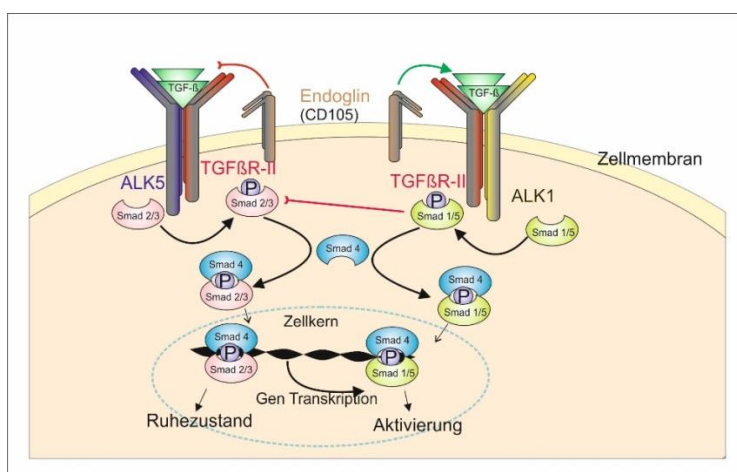


Abbildung 1-10: TGF- β Signaling und Endoglin (Adaptiert aus Fonsatti 2009).

TGF- β stellt strukturell ein Protein mit rund 400 Aminosäuren (AS) dar, das funktionell als Homodimer vorliegt (Massague, Cheifetz et al. 1992). Es verfügt über neun Cystein-Reste, acht bilden untereinander Sulfidbrücken und dadurch die Proteinstruktur, der neunte Cystein-Rest verbindet die beiden Monomere zum Dimer (Daopin, Piez et al. 1992). Via Aktivierung des SMAD-Signalwegs, aber auch entlang der DAXX („death associated protein 6“) Signalkaskade reguliert TGF- β beispielsweise die Apoptose (Massague 2000). SMAD bildet hierbei eine Gruppe intrazellulär aktiver Signalproteine, die durch die extrazelluläre Bindung von TGF an den TGF-Rezeptor aktiviert werden und daraufhin im Zellkern regulativ auf die Transkription ihrer Zielgene wirken (Abb. 1-11). Man geht davon aus, dass Cholesterol (LDL) die Reaktionsfähigkeit der kardiovaskulären Zellen auf TGF- β senkt und dadurch die schützende Wirkung bezüglich atherosklerotischer Vorgänge im Herz und Blutkreislauf unterdrückt (Lin, Li et al. 2010). Statine die den Cholesterolspiegel senken erhöhen hingegen die Schutzwirkung von TGF- β und vermindern so das Risiko für Atherosklerose und Herzerkrankungen.

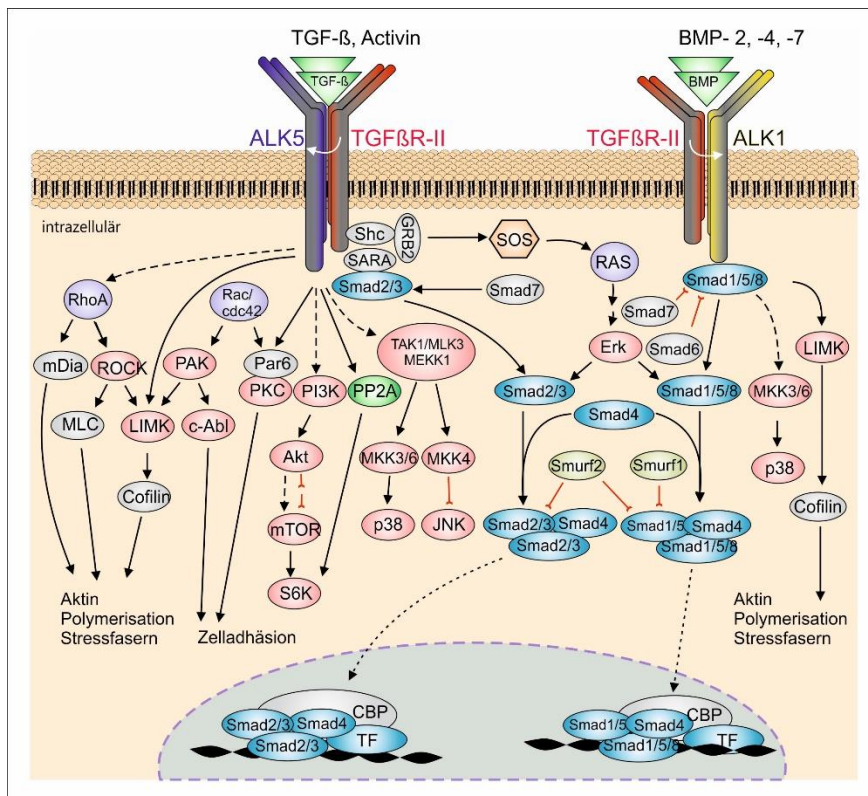


Abbildung 1-11: Übersicht TGF- β Signalweg, (Adaptiert aus Cell-Signaling)

1.7.3. Der AKT-Signalweg

Der AKT-Signalweg ist einerseits grundlegend, da er zellbiologisch weit verbreitet ist, andererseits aber auch hoch komplex und *bis dato* Gegenstand der Forschung (Hemmings and Restuccia 2012). Er ist in zahlreiche Vorgänge involviert, sei es die Regulation des Zellstoffwechsels, des Zellwachstums oder aber der Zellproliferation. Eine Aktivierung von AKT anhand der Phosphorylierung zu Phospho-AKT durch mTor („mammalian target of rapamycin“), Tie2 und durch TGF- β ziehen mitunter weitreichende Zellregulierungen nach sich (Niu, Perruzzi et al. 2004, Wang, Kim et al. 2009, Xue, Restuccia et al. 2012). Sie reichen von einfachen Zelleigenschaftsveränderungen im Rahmen von Transitionsvorgängen über die Förderung von Tumormetastasen, Induktion von Ischämien bis hin zur Einleitung der Apoptose (Meadows, Iyer et al. 2009, Niu, Perruzzi et al. 2004, Wang, Kim et al. 2009). AKT ist sowohl ein Schlüsselprotein in der Regulation des Zellüberlebens während der vaskulären Entwicklung, als auch eines für die Zellmotilität (Adini, Rabinovitz et al. 2003, Xue and Hemmings 2013). Ferner werden auch Entwicklungen bspw. die EPC-Differenzierung über Statine reguliert, die direkt auf den AKT-Signalweg Einfluss nehmen (Dimmeler, Aicher et al. 2001). (Abb. 1-12).

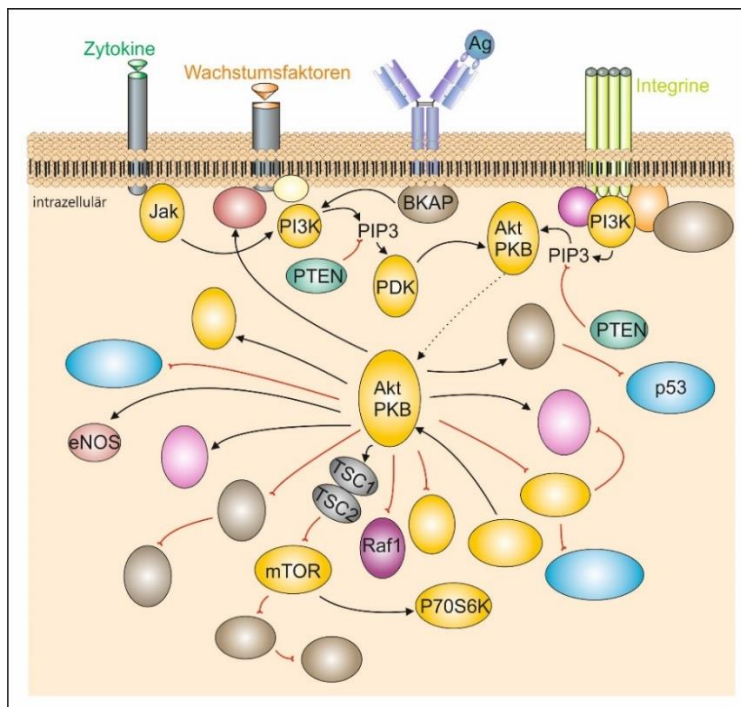


Abbildung 1-12: AKT-Signalweg (Adaptiert und exzerpiert aus SAB Signalway Antibody)

1.8. Blutgefäßpathogenese und deren Ursachen

Zu pathologischen Erscheinungen kommt es in der Regel dann, wenn das nötige Blutgefäßlumen lokal stark vermindert ist, was durch einen akuten Thrombus aber auch durch chronische Prozesse in der Blutgefäßwand auftretend kann. Infolge der eingeschränkten Durchblutung entstehen Minderversorgungen der hinter der Engstelle liegenden Gewebeareale. Im günstigsten Fall führt dies nur zu lokalen Leistungseinschränkungen. Ab einem kritischen Ausmaß jedoch kann es hierdurch zum Gewebeuntergang mit unter Umständen erheblichen Folgen für den Betroffenen kommen. Besonders bei sensiblen Gewebetypen wie den Neuronen des Gehirns und den Zellen des Herzmuskels zeigt sich ein akuter Versorgungsmangel oft rasch und prägnant. Nicht selten enden diese ischämischen Infarkte tödlich. Chronisch ischämische Herzerkrankungen (ICD-10 Klassifikation: I25), akuter Myokardinfarkt (I21) und Herzinsuffizienz (I50) führen seit mehr als 10 Jahren die Spitze der häufigsten Todesursachen an (Stat.Bundesamt 2014). Nicht zu Unrecht gehören daher Herzkreislauf-erkrankungen in den Industriestaaten zu den häufigsten Krankheitsbildern, die unabhängig bzw. trotz unseres guten medizinischen Versorgungsstandards, erschreckend konstant hohe Mortalitätsraten aufweisen (Abb. 1-13).

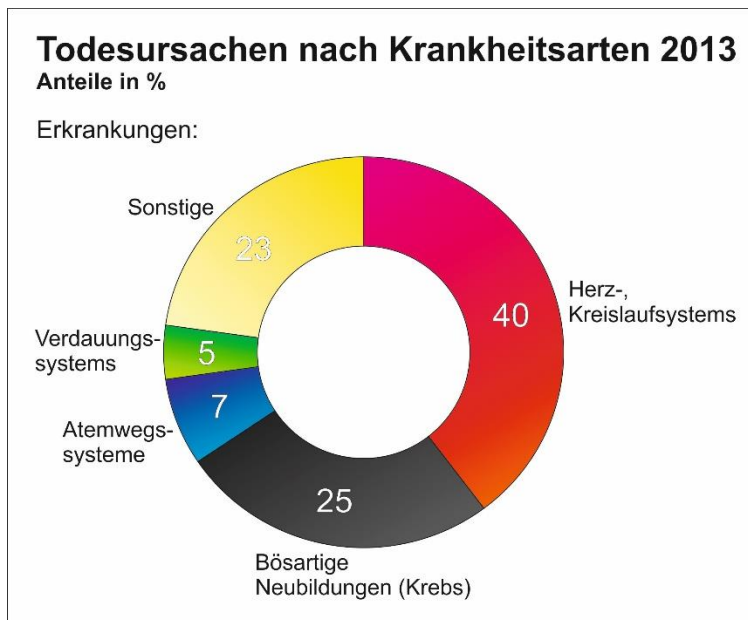


Abbildung 1-13: Todesursachen nach Krankheitsarten (Adaptiert aus Stat. Bundesamt 2014)).

1.8.1. Thrombosen

Thrombosen sind *per definitionem* intravasale Thrombozyten-induzierte Gefäßverschlüsse. Sie entstehen verstärkt im venösen, also dem Niederdruck-Bereich der Blutgefäße und werden dort als Phlebothrombose bezeichnet. Lokaler Ursprung von Thrombosen bilden aufgrund der reduzierten Blutgeschwindigkeit (Stase) und einer damit verbundenen Hypoxie oftmals die Venenklappen (Esmon 2009). Häufig treten diese in Folge eines Krankenhausaufenthalts mit Bettlägerigkeit durch Ruhigstellung nach operativen Eingriffen auf, jedoch sind akute Bewegungseinschränkung durch längeres Sitzen während Flug und oder Busreisen ebenso Risikofaktoren für Thrombosen. Blutstauungen im Bereich der Venenklappen aufgrund Fehl- bzw. Mangelfunktion der venösen Muskelpumpe, die das venöse Blut durch Kontraktion der blutgefäßumgebenden Muskulatur in Richtung Herz drückt sind eine weitere Ursache für Blutgefäßverschlüsse, in deren Folge Varikositäten entstehen können. Oberflächennah folgen diesen oft Ulzerationen der darüber liegenden Dermis mit beteiligten Weichteildefekten – dem sogenannten „offenen Bein“ (Ulcus cruris). Thrombosen ereignen sich zwar meist in der venösen Körperperipherie, können prinzipiell aber auch im arteriellen Blutgefäßsystem auftreten (Chapman 2007). Dort kommt es gehäuft dazu, wenn die, das Blutgefäß auskleidende Endothelschicht der Gefäßwand, durch abschilfernde Endothelzellen oder sogar ganze Endothelzellflächen (sogenannte Patches) beschädigt wird. An der, unter dem Endothel liegenden extrazellulären Matrix der Basallamina mit ihren Matrixproteinen, bzw. den TF- („tissue factor“) tragenden Zellen kommt es zur Komplexbildung zwischen TF und den Plasma-Faktoren VII & VIIa, was die Koagulations-Kaskade startet (Drake, Morrissey et al. 1989, Manly, Boles et al. 2011). Verantwortlich für das Auftreten solcher Endotheldefekte sind unter anderem akut entzündliche Reaktionen im Umfeld des Gefäßes. Diese werden häufig von Toxinen oder Keimen ausgelöst, die eine direkte Schädigung des Endothelmonolayers bewirken - selbst kleine Defekte können hierbei bereits pathologische Auswirkungen wie Thrombosen zur Folge haben (Beck, Rafat et al. 2007). Ein weiterer Grund für entstehende Defekte liegt in der Gefäßalterung. Über Jahre hinweg bilden sich, gehäuft bei ungesundem Lebensstil mit Tabakkonsum, Bewegungsmangel sowie zu reichhaltiger Ernährung, fettreiche und/oder kalzifizierte Plaques. Teils heften sich diese intraluminal an der Gefäßwand an, teils können sie aber auch

subendothelial liegen (Siqueira, Abdalla et al. 2006, Wang, Kim et al. 2009). Zusätzlich zu den bereits genannten Induktionsfaktoren bringen auch artifizielle traumatische Ereignisse wie Unfallverletzungen oder gezielt durchgeführte operative Eingriffe die Gefahr einer möglichen Thrombosebildung mit sich. Verstärkt werden diese häufig durch chronische Erkrankungen wie Diabetes mellitus die *per se* als Begleiterscheinung ein erhöhtes Thromboserisiko in sich bergen (Sawada, Jiang et al. 2014). Jedoch können selbst Änderungen der Blutzusammensetzung bereits Thrombosen auslösen. Hierunter fallen u.a. erhöhte Blutgerinnungsneigungen bspw. durch Kontrazeptiva induzierte Aktivierung der Gerinnungs-Faktoren (Sidney, Petitti et al. 2004) ebenso wie erheblicher Wassermangel sowie Gifte, die ein verstärktes Risiko für eine Thrombose darstellen. Schwangere haben, bedingt durch erhöhte Titer der Gerinnungsfaktoren VII, VIII, X und von Willebrandfaktor bereits eine gesteigerte Prädisposition für auftretende Thrombosen (James 2009). Letztlich können aber auch Störungen der körpereigenen Thrombolyse (Fibrinolyse), seien sie genetisch vererbt oder pharmakologisch induziert, zum Auftreten von Thrombosen führen (Napolitano, Mariani et al. 2010). Die häufigste erbliche Variante ist hierbei die APC-Resistenz („activating protein c“), bei der eine Punktmutation im Genom des Proteins C für die Bindungsstelle von Faktor V dazu führt, dass das Faktor V-inaktivierende Protein-C dieses nicht mehr spalten kann – somit Faktor V dauerhaft aktiv ist. Eine relevante pharmazeutische Komponente mit gerinnungssteigernder Wirkung ist Vitamin-K, die die gamma-Carboxylierung mehrerer Gerinnungsfaktoren (II, VII, IX und X) aktivierend beeinflusst (Löffler).

1.8.2. Stenosen

Im Gegensatz zur akuten Thrombose durch einen Thrombus entsteht eine Stenose (Verengung von Blutgefäßen) überwiegend durch Prozesse in den Schichten der Tunica intima und Tunica media, die man allgemein als Atherogenese bezeichnet. Hierbei wird das Blutgefäßlumen durch langsame aber stetige Verdickung der Gefäßwand in Richtung Lumen, sowie durch auftretende Gefäßwandverhärtungen zunehmend eingeschränkt (Urbich and Dimmeler 2005, Zieman, Melenovsky et al. 2005). Dies ist, ähnlich wie bei alterungsbedingten Thrombosen ein schleichender Prozess, dessen Folge ist, dass sich cholesterin-

reiche Lipoproteine LDL (low density lipoprotein) im Blut anreichern, wodurch es zur Hyperlipoproteinämie kommt (Löffler).

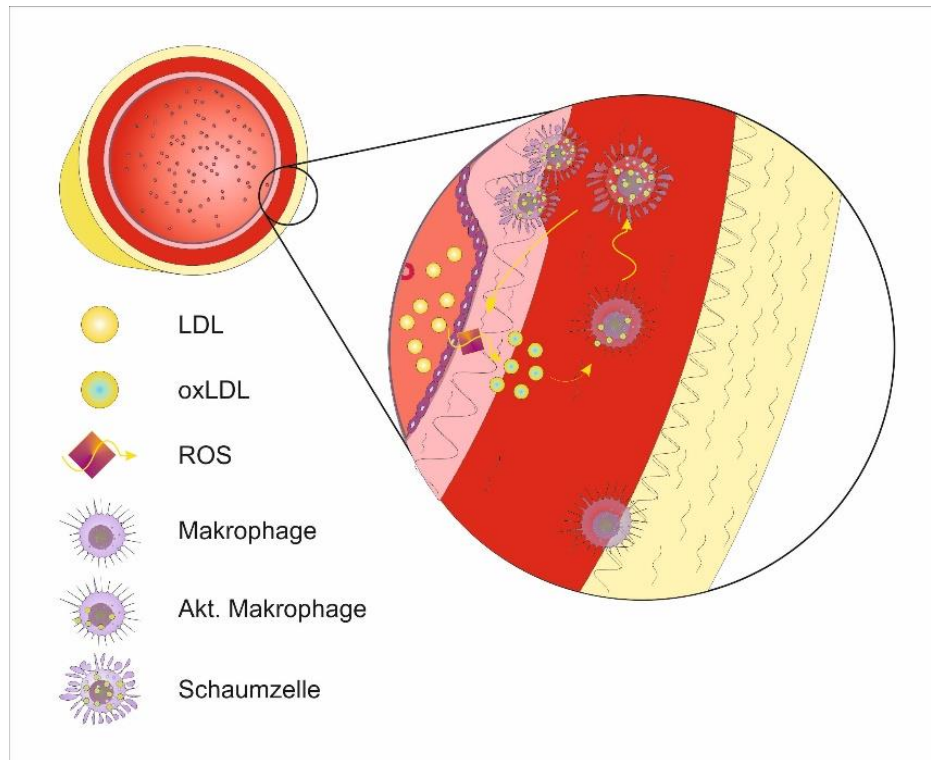


Abbildung 1-14: Stenose-Induktion durch LDL-Migration aus dem Blut in die Gefäßwand. (Adaptiert aus: Afanasyeva und Rose 2003)

Hält dieser Zustand über einen längeren Zeitraum an, werden die LDL-Moleküle aus dem Blut von Endothelzellen aufgenommen, durch freie Radikale (NO und H_2O_2), die als ROS („reactive oxygen species“) bezeichnet werden, oxidiert. Sie gelangen als oxLDL („oxydized low density lipoprotein“) weiter in die Gefäßwand, wo sie von Makrophagen über CD36 vermittelte Bindungen aufgenommen werden. Die Makrophagen transformieren hierbei zu Schaumzellen, die nun ihrerseits pro-inflammatorische Zytokine produzieren, die das Immunsystem über T-Zellaktivierung zusätzlich stimulieren (Steinbrecher 1991). Darüber hinaus werden von den Schaumzellen auch Myeloperoxidasen sezerniert, die wiederum an der Bildung von weiteren freien Radikalen (ROS) beteiligt sind. Mit der Bildung der ROS, die für die Entstehung der oxLDL verantwortlich sind startet eine positive „feed-back“-Schleife (Chapman 2007, Lin, Li et al. 2010) (Abb. 1-14).

1.9. Medizinische Behandlungsansätze

Intervention bei Thrombosen

An erster Stelle der medizinischen Therapie bei akut diagnostizierten Thrombosen steht eine möglichst rasche und frühzeitige Auflösung des Thrombus mittels Thrombolyse. Dies geschieht zum einen durch Aktivierung der körpereigenen Spaltung des Fibrinpolymergerüsts mittels Plasmin, dem durch t-PA („tissue Plasmin Activator“) aktivierten Plasminogen, bzw. zum anderen durch hochdosierte Gabe von pharmakologisch erzeugten körperfremden Enzymen wie Strepto- und Urokinase, Alteplase, Reteplase sowie Tenecteplase mit gleicher Wirkung. Die Pharmazeutikagabe erfolgt meist zusammen mit Plasminogen, um die thrombolytische Wirkung weiter zu verstärken (Mignatti and Rifkin 1996). Eine lokale, wie auch systemisch medikamentöse Intervention muss hierbei innerhalb eines kritischen Zeitfensters nach Auftreten der Thrombose beginnen, um erfolgversprechend zu sein. Das Zeitlimit hierfür liegt bei rund vier Stunden nach Auftreten der Thrombose (Asadi, Yan et al. 2014). Verzögert sich die Behandlung über diesen Zeitpunkt hinaus, steigt das Risiko für bereits eingesetzte irreversible Nekrosen im nicht durchbluteten Gewebe stark an, dies macht eine erfolgreiche Thrombolyse unwahrscheinlich. Zum einen, da das Gewebe bereits unabdingbar geschädigt ist, zum anderen muss in diesen Fällen kritisch abgewogen werden, ob die erwünschten Wirkungen der Lysetherapie gegenüber den nicht risikolosen Nebenwirkungen wie Blutungen (v.a. Hirnblutungen) überwiegen. Neben der gerade vorgestellten primären Lyse ist es pharmakologisch ebenfalls möglich Gerinnungsinhibitoren wie bspw. Antithrombin-III oder aber Vitamin-K Co-Faktoren, wie Protein-C und -S, zur Verhinderung einer Thrombose zu verabreichen. Auf diese Weise wird der Bildung weiterer Thromben präventiv antikoagulatorisch vorgebeugt. Letztlich bleibt als konservativ interventioneller Eingriff noch die mechanische Entfernung des Thrombus (Thrombektomie) mittels Katheter bei der in Anlehnung an die im folgenden Kapitel näher vorgestellte Angioplastie der Thrombus durch einen Ballonkatheter aus dem verschlossenen Gefäß entfernt wird (Jenkins and Michael 2014, Mordasini, Brekenfeld et al. 2013, Przybylowski, Ding et al. 2014).

Intervention bei Stenosen

Während Thrombosen bei frühzeitiger Erkennung häufig noch pharmazeutisch via Thrombolyse therapierbar sind, ist die medizinische Behandlung von akuten Stenosen fast immer an invasive Eingriffe gekoppelt (Jenkins and Michael 2014). Beim Myokardinfarkt bedeutet dies im schlimmsten Fall eine mehrstündige Operation bei geöffnetem Brustkorb am offenen Herzen. Hierbei wird ein geeignetes Gefäß aus der Peripherie entnommen und als Umgehung („bypass“) für das verschlossene Koronargefäß gelegt. Das hinter der Engstelle der Stenose liegende Gewebe wird hierdurch wieder an den Blutkreislauf angeschlossen und mit allen lebensnotwendigen Stoffen versorgt (Carr 2006, Weir 2006). Milde Stenosen werden hingegen oftmals durch Einsatz von Ballonkathetern im Rahmen einer perkutanen transluminalen Angioplastie, häufig in Kombination mit einer nachfolgenden Gefäßstützen-Implantation (Stent-Angioplastie) behandelt (Ontario 2010). Die perkutane transluminale Angioplastie stellt im Vergleich zur Bypass-Operation eine vergleichsweise einfache und schnelle Interventionsmöglichkeit dar. Je nach Lokalisation der Stenose wird der arterielle Zugang gewählt. Häufig ist dies aufgrund der günstigen Zugangseigenschaften die in der Leistengegend befindliche Arteria iliaca communis, die hierbei punktiert wird. Über den Zugang wird der Ballon bis zum Engpass geschoben und dort mittels einer Pumpvorrichtung dilatiert. Hierdurch wird das Blutgefäß an dieser Stelle zwar lokal überdehnt, die Lumeneinschränkung durch Plaques und Stenosen somit aber entfernt. Je nach Indikation und Schwere der Stenose bzw. der Stärke der Überdehnung des Gefäßes kann hierbei zusätzlich der Einsatz einer Blutgefäßstütze (Stent) indiziert sein.

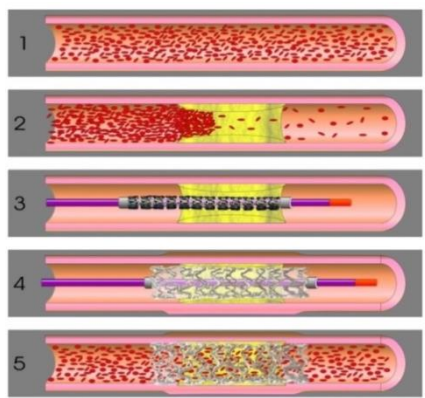


Abbildung 1-15: Ablaufschema einer Stent-Angioplastie.
(Adaptiert von University Surgical Vascular)



Abbildung 1-16: „bare metal stents“ in einer Petrischale

Die Aufgabe des Stents ist es, das Lumen nach erfolgter PTA vor einem möglichen Gefäßkollaps zu schützen. Die PTA mit Applikation eines Stents verläuft zunächst wie eben beschrieben, jedoch wird nach Beseitigung der Stenose, ein auf den Ballonkatheter gecrimpter Stent (häufig aus rostfreien chirurgischem Edelstahl) via Ballondilatation in den stenotisierten Bereich der Gefäßwand dilatiert (Jenkins and Michael 2014) (Abb. 1-15 und Abb. 1-16).

1.9.1. Limitierung der Stentangioplastie

Eindeutige Limits der Stentangioplastie begründen sich auf deren Risiken eine Re-Stenose zu induzieren (Cox and Gotlieb 1986, Kastrati, Schomig et al. 1998, Sick, Grieshammer et al. 2001). Hinter dem Begriff Re-Stenose verbirgt sich jedoch meist keine erneute Kalzifizierung oder Plaquebildung, sondern ein vielfältiges Zusammenspiel aus einem, durch die perkutane transluminale Angioplastie verursachten Gefäßtrauma sowie einer auftretenden Migrations- und erhöhten Proliferationsneigung bestimmter Zelltypen aus der Tunika intima, der sogenannten neointimalen Hyperplasie (De Maria, Porto et al. 2015). Findet keine adäquate körpereigene Regulation des Geschehens statt, kann es zum erneuten Gefäßverschluss - der *in-stent*-Re-Stenose, durch neointimale Hyperplasie körpereigener gesunder Zellen kommen. Ein weiterer medizinischer Eingriff zur Behandlung der *in-stent*-Re-Stenose ist die Folge (Neumann 2005, Sick, Grieshammer et al. 2001). Je nach Gruppe und Studie liegt das Risiko eine Re-Stenose zu erleiden im Durchschnitt bei 30% (zwischen 10% bis über 40%) (Sick, Grieshammer et al. 2001). Die Folge-Behandlung birgt zum einen sämtliche Risiken des therapeutischen Eingriffes selbst, zum anderen auch die Risiken einer möglicherweise abermals eintretenden Re-Stenose nach „stent-in-stent-Transplantation“ in sich (Windecker and Meier 2007). Bereits die zelluläre und materialbedingte Lumenabnahme einer auftretenden *in-stent*-Re-Stenose und die abermalige Verwendung von Gefäßstützen limitiert eine wiederholte Behandlung mit Stents rasch— je kleiner das „ge-stentete“ Gefäß ist, desto schneller ist dieser Punkt erreicht (Elezi, Kastrati et al. 1998).

Vielfältige Entwicklungen und Untersuchungen der letzten Jahre befassten sich mit der Etablierung neuer Stents aus bioresorbierbaren Materialien (BRS) wie beispielsweise Polylactid (PLA, „poly lactic acid“), Polylaktat oder Metalloxidverbindungen, wie Zink-, Magnesium-, und Calciumlegierungen (Bourantas, Zhang et

al. 2012, Onuma, Ormiston et al. 2011). Diese haben sich jedoch bisher aufgrund ihrer Nebenwirkungen wie Inflammationsinduktion und Blutgefäßreizungen durch die Abbauprodukte der Stents während der Resorption nicht durchsetzen können und wurden inzwischen wieder weitestgehend durch „bare metal stents“ (BMS) vom Markt verdrängt. Letztere besitzen bei gleicher Strut-Stärke zudem wesentlich höhere mechanische Stabilitätswerte gegenüber bioresorbierbaren Stents (Gogas 2014), selbst wenn sie dafür dauerhaft im Gefäß/Körper verbleiben.

1.9.2. Mögliche Lösungen

Pharmakologischer Behandlungsansatz

Der von Stent-Herstellern favorisierte Lösungsansatz zur Verhinderung einer Re-Stenose war und ist der Einsatz von Stents mit antiproliferativer Beschichtung. Die sogenannten „drug eluting stents“ sollen die neointimale Hyperplasie, also die Proliferation glatter Muskelzellen und Fibroblasten unterdrücken und hierdurch eine Re-Stenose verhindern (Moses, Kipshidze et al. 2002).

Antiproliferative Substanzen - Paclitaxel und Rapamycin

Zum Einsatz als pharmazeutische Beschichtungen auf Stents kamen bzw. kommen Substanzen wie Taxol oder Rapamycin (Moses, Kipshidze et al. 2002, Moses, Leon et al. 2003) (Abb. 1-17). Offensichtlicher Nachteil beider Beschichtungen ist, dass sie unspezifisch wirken. Die Pharmaka inhibieren somit jegliche Zellteilung, auch die Proliferation der zur Heilung erforderlichen Endothelzellen (Inoue, Croce et al. 2011, Inoue, Shinke et al. 2014). Eine funktionsfähige Re-Endothelialisierung der behandelten Blutgefäßbereiche kann hierdurch nicht oder nur unzureichend stattfinden (Hamilos, Ostojic et al. 2008). Kurzfristig bzw. zeitlich begrenzt kann so für die Dauer der Pharmaka-Abgabe („drug release“) zwar eine mögliche frühe Re-Stenose mit der Behandlungsstrategie unterbunden werden (Hamilos, Ostojic et al. 2008), jedoch weichen die Einjahresprognosen für DES („drug eluting stents“) *versus* BMS („bare metal stents“ ohne Beschichtung) nur geringfügig voneinander ab (Kastrati, Mehilli et al. 2007).

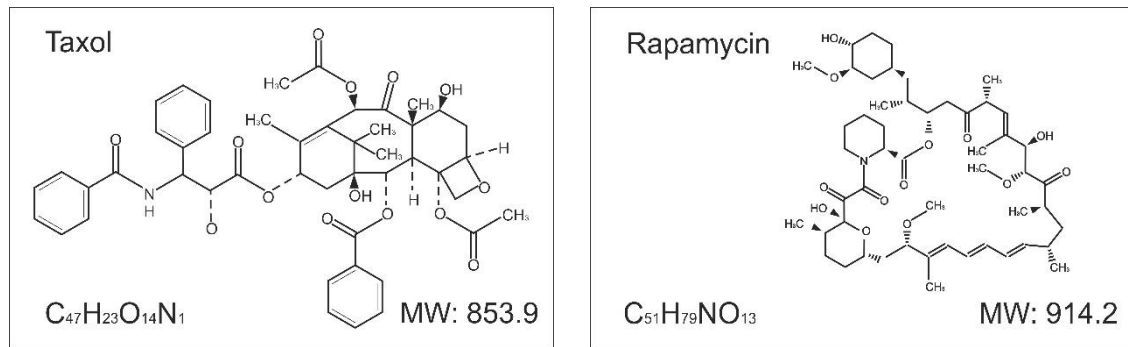


Abbildung 1-17: Strukturformel, chem. Formel und Molekulargewicht von Taxol (links), Rapamycin (rechts).

Die Ideallösung wäre hier somit ein Pharmakon, dass eine selektive Proliferations-Inhibition vermittelt, in dem es proliferativ aktivere Zellen, wie die Zellen der glatten Muskulatur und die Fibroblasten stärker hemmt, als diejenigen der teilungsschwächeren Endothelzellen.

Shikonin

Bei Shikonin handelt es sich um ein kleines, planares Molekül mit der Strukturformel $C_{16}H_{16}O_5$ und dem Molekulargewicht von 288,3 g (Abb. 1-18). Shikonin gehört zusammen mit seiner Chimäre, dem Alkananin, zu den Naphtochinon-derivaten und wird nachweislich bereits seit dem 5. – 4. vorchristlichen Jahrhundert für medizinische Zwecke genutzt (Papageorgiou 1999).

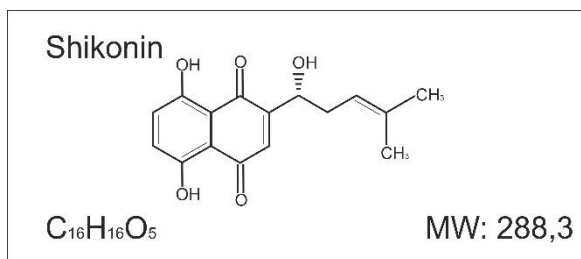


Abbildung 1-18: Strukturformel, chem. Formel und Molekulargewicht von Shikonin.

Auch in der traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) fand Shikonin bereits seit langer Zeit zur Behandlung von offenen Wunden und Verbrennungen Verwendung. Die Gewinnung des stark farbigen roten Extrakts fand aus „Zicao“, den getrockneten Wurzeln des Echten Steinsamens („*Lithospermum erythrorhizon*“) statt und wurde in Form von Tees, Aufgüssen und Suden oberflächlich angewendet (Papageorgiou, Assimopoulou et al. 2008). Neuere

Untersuchungen der Substanz Shikonin belegen hingegen ein breites Wirkungsspektrum. Dieses reicht von allgemein wundheilenden, über anti-inflammatorischen, anti-bakteriellen, fungiziden, anti-viralen, anti-kanzerogenen bis hin zu anti-angiogenetischen Effekten (Chen, Yang et al. 2003, Guo, Zhang et al. 1991, Hisa, Kimura et al. 1998, Kuo, Hsia et al. 2004, Min, Zun et al. 2010, Ozaki, Ohno et al. 1994, Pierce and Mustoe 1995, Sasaki, Abe et al. 2002, Tanaka, Tajima et al. 1986, Wang, Bai et al. 1994). Jedoch wurden auch pro-angiogene, also konträre, Wirkungen publiziert (Prangsaengtong, Park et al. 2013), weswegen Shikonin möglicherweise ein alternatives Pharmakon zur Stentbeschichtung mit den genannten wünschenswerten Wirkungen einer selektiven Inhibition glatter Muskelzellen und Fibroblasten darstellt. Die jeweils eingesetzte Dosis scheint ein wichtiger Aspekt und zugleich Schlüssel zu den zahlreichen wie auch widersprüchlichen Wirkungen zu sein, sodass die Erforschung der passenden Einsatzkonzentration von Shikonin hierbei von vordergründigem Interesse sein könnte.

Stammzelltherapeutischer Ansatz

Ein gänzlich anderes Prinzip verfolgt der stammzelltherapeutische Lösungsansatz. Er beruht darauf, alle geschädigten, somit auch endothelzellfreien Bereiche in möglichst kurzer Zeit durch Adhäsionsinduktion von frei zirkulierenden Endothelzellvorläufern aus dem Blutkreislauf wiederzubesetzen (Hristov, Zerneck et al. 2007). Es soll somit möglichst noch vor Start proliferativer Vorgänge einer neointimalen Hyperplasie der Ursprungszustand des behandelten Blutgefäßabschnitts wieder erlangt werden (Bigalke, Langer et al. 2007, Massberg, Gawaz et al. 2003, Schulz, Penz, Hoffmann, Langer, Gillitzer, Schneider, Brandl, Seidl, Massberg, Pichler, Kremmer, Stellos, Schönberger et al. 2008). Die Umsetzung dieses Zieles wird mit Hilfe eines bispezifischen Proteins verfolgt, das als Fängermolekül mit zwei unterschiedlichen Bindungsstellen ausgestattet ist. „Designed“ und erstellt wurde das Protein über die gerichtete Koppelung („cross linking“) zweier Bindungsproteine. (Baumer, Leder et al. 2012, Langer, Von Der Ruhr, Daub, Schoenberger, Stellos, May, Schnell, Gauss, Hafner, Lang, Schumm, Bühring et al. 2010). Die Realisierung des bispezifischen Proteins erfolgte in einer Kooperation von Gundram Jung und Meinrad Gawaz. Eines der Enden des gekoppelten Antikörper-Proteins stellt das Molekül Glykoprotein-VI dar, das selektiv an physiologische Kollagenfasern bindet (Jung and Moroi 2004, Schulz,

Penz, Hoffmann, Langer, Gillitzer, Schneider, Brandl, Seidl, Massberg, Pichler, Kremmer, Stellos, Schönberger et al. 2008) (Abb.1-19).

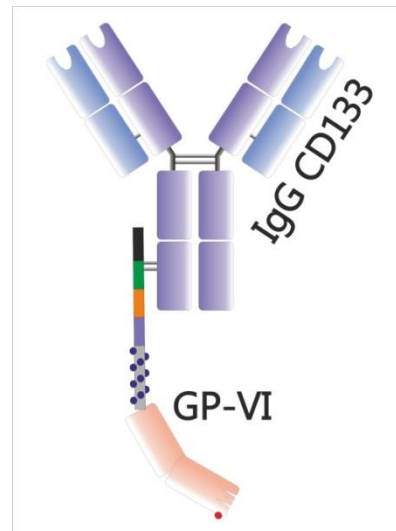
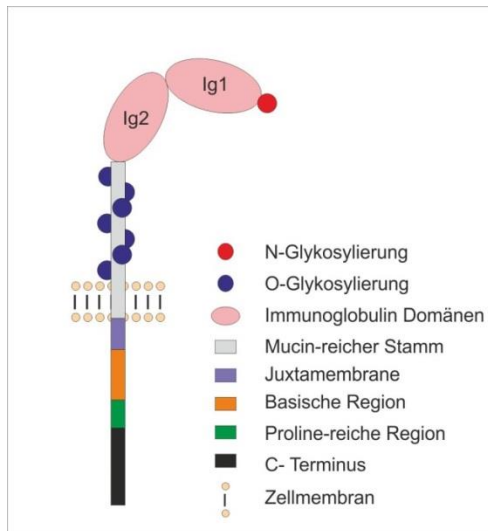


Abbildung 1-19: Schema des GPVI-Moleküls,

Abbildung 1-20: Schema GPVI CD133-Molekül

Das gegenüberliegende Ende besteht aus dem Antikörper gegen das Epitop Prominin, dies entspricht dem Zellpool der CD133 positiven, endothelialen Vorläufer-Zellen (EPC) (Baumer, Leder et al. 2012, Salven, Mustjoki et al. 2003, Vu, Masuda et al. 2009) (Abb. 1-20). Da endotheliale Vorläuferzellen in geringer Anzahl frei im Blut zirkulieren, um sich bei Bedarf an geschädigte Bereiche anzulagern und dort Endothellücken zu schließen (Li, Tjwa et al. 2005) ist es denkbar, dass eine induzierte Adhäsionserhöhung von endothelialen Vorläuferzellen durch das Fängermolekül mit einer gesteigerten Re-Endothelialisierung einhergeht.

1.10. Aufgabenstellung

Inhalt der hier vorgestellten Arbeit ist die Untersuchung und Evaluation der beiden unterschiedlichen therapeutischen Ansatzpunkte auf ihre Anwendbarkeit und Tauglichkeit hin: Einerseits die selektive Proliferationsinhibition mittels der pharmazeutischen Beschichtung von Stents mit Shikonin, die eine Re-Stenose verhindern soll und andererseits der molekularbiologische Ansatz unter Verwendung und Applikation eines bi-spezifischen Fängermoleküls zur schnelleren Bindung von Endothelvorläuferzellen an geschädigte kollagenreiche Regionen der Blutgefäßwand.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material (Chemikalien, Lösungen, Medien, Geräte)

2.1.1. Chemikalien

Acetic Anhydrid	Sigma Aldrich, Steinheim Deutschland
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid/Bis-Lösung (29:1)	Sigma Aldrich, Steinheim Deutschland
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
AmpliTaq Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat 80 mg/ml)	Sigma Aldrich, Steinheim Deutschland
BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat)	Roche, Mannheim, Deutschland
Biocoll (1,077 g/ml)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Bizspezifisches Ab-Konstrukt	Ag. G. Jung, EKV-Tübingen, Deutschland
Blockierungs-Reagenz	Roche, Mannheim, Deutschland
Bromphenol-Blau	Sigma Aldrich, Steinheim Deutschland
BSA Fraktion V	Roche, Mannheim, Deutschland
Collagen I Rat tail	Roche, Penzberg, Deutschland
Collagen IV Rat tail	BD, Bioscience, Bedford, MA, USA
Coomassie (Brilliant Blue)	Merck, Darmstadt, Deutschland
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Denhardt's-Lösung	Sigma Aldrich, Steinheim Deutschland
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Dextransulfat	Sigma Aldrich, Steinheim Deutschland
DMEM with Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Gibco, Paisley, Scotland,UK
DMEM w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Gibco, Paisley, Scotland,UK
DNeasy tissue kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
dNTP Mix	Invitrogen, Karlsruhe Deutschland
DTT (Dithiothreitol)	Sigma Aldrich, Steinheim Deutschland
EBM-1	Cambrex (Lonza), Walkersville, MD, USA
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA (Versen)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Eisessig	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäureanhydridlösung	Sigma Aldrich, Steinheim Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (absolut Ph.Eur)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
FCS (Fetal Calf Serum)	Invitrogen) Gibco, Paisley, Scotland,GB
FCS (Gold, Charge)	PAA, Pasching, Österreich
Formamid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Glycerol	Sigma Aldrich, Steinheim Deutschland
Glycin	Sigma Aldrich, Steinheim Deutschland
HCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Sigma Aldrich, Steinheim Deutschland

Material und Methoden

HiCo-Mic	Hirtz & Co., Köln, Deutschland
Kaisers Gelatine	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Levamisol	Dako, Glostrup, Denmark
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Maleinsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
MgCl ₂	Thermo Fisher, Osterode Deutschland
MTT	Roche, Mannheim, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaOH	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumcitrat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
NatriumDeoxycholate	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid)	Roche, Mannheim, Deutschland
NP-40 (70 %)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS (1x) Ca ²⁺ , Mg ²⁺	PAA, Pasching, Österreich
PBS (1x) w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	PAA, Pasching, Österreich
PCR-DIG Probe Synthesis Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Propidium Iodide PI	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Qiaquick (Gel Extraktions Kit)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Rapamycin (bereitgestellt durch Translumina)	Cfm, Marktrechwitz, Deutschland
SDS (Sodium-dodecylsulfate 20 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Shikonin (bereitgestellt durch Translumina)	Cfm, Marktrechwitz, Deutschland
Silan (3 (Aminopropyl)triethoxysilane)	Sigma Aldrich, Steinheim Deutschland
SmBM	Cambrex (Lonza), Walkersville, MD, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triethanolaminhydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris, pH 6,8	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris-Base	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris-HCl	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
TritonX-100	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
t-RNA	Roche, Mannheim, Deutschland
Trypan Blau	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin/EDTA	PAA, Pasching, Österreich
Tween-20	Merck, Darmstadt, Deutschland

Primärantikörper	
Maus-anti-Mensch CD105 (Endoglin)	Abcam, Cambridge, UK
Kaninchen-anti-Mensch CD133 (Prominin)	Abcam, Cambridge, UK
Maus-anti-Mensch CD34 (Sialomucin)	Millipore, Darmstadt, Deutschland
Kaninchen-anti-AKT	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Kaninchen-anti-Phospho.-AKT (Ser 473)	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Kaninchen-Anti-VEGF	Chemikon, Hofheim, Deutschland
Maus-Anti-Vimentin	Dako, Glostrup, Denmark
Maus-Anti-vWF	Dako, Glostrup, Denmark

Sekundärantikörper	
Alexa488 Ziege-anti-Kaninchen	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Alexa488 Ziege-anti-Maus	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Cy3 Ziege-anti-Maus	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Cy3 Ziege-anti-Kaninchen	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.2. Lösungen

Immunhistochemie, Immunzytochemie

10x TBS

- ◆ 30,3 g Trizma base
 - ◆ 81,8 g Natriumchlorid
 - ◆ 800 ml ddH₂O
 - ◆ pH 7,5 einstellen
- Auffüllen auf 1 l

10x PBS

- ◆ 80 g Natriumchlorid
 - ◆ 2 g Kaliumchlorid
 - ◆ 2,4 g Kaliumdihydrogenphosphat
 - ◆ 14,4 g Natriumdihydrogenphosphat
 - ◆ In 800 ml ddH₂O lösen, mit HCl oder NaOH auf pH 7,4 einstellen.
- Auffüllen auf 1 l

10x Citratpuffer (*AntigenRetrieval*)

- ◆ 21 g Zitronensäure-Monohydrat
 - ◆ 800 ml ddH₂O
 - ◆ Mit HCl oder NaOH pH- pH 6,0 einstellen
- Auffüllen auf 1 l

AP-Substratpuffer (Alkalische Phosphatase), (*AntigenRetrieval*)

- ◆ 12,1 g/l Tris, pH 9,5 (0,1 M)
- ◆ 5,84 g/l NaCl (0,1 M)
- ◆ 10,2 g/l MgCl₂
- ◆ pH 9,5 einstellen

0,1 % TBS/BSA

- ◆ 100 ml 1x TBS (pH 7,5)
- ◆ 0,1 g BSA (Bovines Serum Albumin Fraktion V)
- ◆ Mischen bis zur Auflösung auf Magnetrührer
- ◆ Lagern bei 4°C

0,1 % PBS/BSA

- ◆ 100 ml 1x PBS (pH 7,4)
- ◆ 0,1 g BSA (Bovines Serum Albumin Fraktion V)
- ◆ Mischen bis zur Auflösung auf Magnetrührer
- ◆ Lagern bei 4°C

Fixierung

- ◆ 4 % PFA (pH7,2)
- ◆ 20 min RT für Gewebeschnitte
- ◆ 5 min RT für Zellen
- ◆ 3 x 5 min waschen mit PBS (1x)

Permeabilisierung

- ◆ PBS (1x) + 1 % Tween-20
- ◆ 20 min RT für Gewebeschnitte
- ◆ 5 min RT für Zellen
- ◆ 3 x 5 min waschen mit

Blockierung

- ◆ PBS (1x) + 1 % BSA (Fraktion V)
- ◆ 20 min RT für Gewebeschnitte
- ◆ 10 min RT für Zellen
- ◆ 3 x 5 min waschen mit PBS (1x) + 0,1 % BSA

Primärantikörper

Verdünnung gemäß Beiblatt in

- ◆ PBS (1x) + 0.1 % BSA (Fr.V)
- ◆ 30 - 60 min RT / 12 Stunden 4 °C für Gewebeschnitte
- ◆ 10 - 20 min RT / 12 Stunden 4 °C für Zellen
- ◆ 3 x 5 min waschen mit PBS (1x) + 0,1 % BSA (Fr.V)

Sekundärantikörper

Verdünnung gemäß Beiblatt (bzw. 1:800 – 1:1000) in

- ◆ PBS (1x) + 0.1 % BSA (Fr.V)
- ◆ Suspension 30 sec zentrifugieren, nur Überstand verwenden
- ◆ 30 - 60 min RT / 12 Stunden 4 °C für Gewebeschnitte
- ◆ 10 - 20 min RT / 12 Stunden 4 °C für Zellen
- ◆ 3 x 5 min waschen mit PBS (1x) + 0,1 % BSA (Fr.V)

DNS *in situ*-Hybridisierung

DEPC-ddH₂O: (Zur Herstellung DNase- und RNase-freier Lösungen)

- ◆ 0,1% v/v Diethylpyrocarbonat
- ◆ in ddH₂O lösen
- ◆ für mindestens 3 h bei 37°C inkubieren
- autoklavieren

10x PBS:

- ◆ 80 g/l NaCl
- ◆ 2,4 g/l KH₂PO₄
- ◆ 35,8 g/l Na₂HPO₄*12H₂O
- ◆ pH 7,4 einstellen, anschließend autoklavieren
- ◆ für 1x Gebrauchslösung 1:10 verdünnen und 0,05 % Tween-20 zugeben

TEA (Triethanolamin)-Puffer:

- ◆ 18,5 g/l (= 0,1 M) Triethanolaminhydrochlorid
- ◆ pH 8,0 mit 1 M NaOH einstellen

TEA-Essigsäureanhydridlösung:

- ◆ 0,25 % (v/v) Essigsäureanhydridlösung in 0,1 M TEA-Puffer

Hybridisierungslösung:

- ◆ 100 mg/ml Dextransulfat
- ◆ 0,3 M NaCl
- ◆ 0,02 M Tris-Base, pH 8,0
- ◆ 5 mM EDTA (Ethylendiamintetraacetat), pH 8,0
- Dextransulfat unter leichtem Erhitzen lösen, anschließend abkühlen

Zugabe von:

- ◆ 1x Denhardt's-Lösung (50x)
- ◆ 0,5 mg/ml t-RNA
- ◆ 50 % Formamid (deionisiert)
- vor Gebrauch 10 mM DTT (Dithiothreitol) zugeben

20x SSC (Saline-Natrium-Citrat)-Puffer:

- ◆ 175,3 g/l NaCl (3 M)
- ◆ 88,2 g/l Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (0,3 M)
- ◆ pH 7,0 mit 1 M HCl einstellen, anschließend autoklavieren

10x Maleinsäurepuffer:

- ◆ 116,1 g/l Maleinsäure (1 M)
- ◆ 87,7 g/l NaCl (1,5 M)
- ◆ pH 7,0 mit 10 M NaOH einstellen, anschließend autoklavieren
- ◆ → für 1x Gebrauchslösung 1:10 verdünnen 0,05 % Tween-20 zugeben

2x PK-Puffer (Proteinase-K):

- ◆ 12,1 g/l Tris-HCl (100 mM)
- ◆ 3,72 g/l EDTA (10 mM):
- ◆ pH 8,0 einstellen, anschließend autoklavieren
- für 1x Gebrauchslösung 1:10 verdünnen 0,05 % Tween-20 zugeben

10x Tris-NaCl (TN)-Puffer:

- ◆ 121,1 g/l Tris-HCl (1 M)
- ◆ 87,7 g/l NaCl (1,5 M)
- ◆ pH 7,5 mit 10 M NaOH einstellen, anschließend autoklavieren
- für 1x Gebrauchslösung 1:10 verdünnen + 0,05 % Tween-20 zugeben

10x Blockierungslösung:

- ◆ 100 g/l Blockierungs-Reagenz in 1x Maleinsäurepuffer 1 h bei 60°C lösen
- ◆ Lösung autoklavieren und bei 4°C lagern
- für 1x Gebrauchslösung 1:10 mit 1x Maleinsäurepuffer verdünnen

AP-Substratpuffer (Alkalische Phosphatase):

- ◆ 12,1 g/l (= 0,1 M) Tris, pH 9,5
- ◆ 5,84 g/l (= 0,1 M) NaCl
- ◆ pH 9,5 einstellen
- ◆ 10,2 g/l MgCl₂

NBT/BCIP-Substratlösung:

- ◆ 3,5 µl/ml BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat)
- ◆ 4,5 µl/ml NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid)
- ◆ → in AP-Substratpuffer + 0,5mg/ml Levamisol (1:40 von 20 mg/ml Stock)

Western-Blot

RIPA Buffer:

- ◆ 50 mM pH 8,0 Tris/HCl
- ◆ 150 mM NaCl
- ◆ 1% NP-40
- ◆ 0,5% Natrium-Deoxycholate
- ◆ 0,1% SDS

SDS-Probenpuffer:

- ◆ 10 mg Bromphenol
- ◆ 10 ml 1,5 M Tris, pH 6,8
- ◆ 6 ml SDS (Sodium-dodecylsulfate 20 %)
- ◆ 30 ml Glycerol
- ◆ 15 ml β-Mercaptoethanol

Laufpuffer (1x):

- ◆ 3,03 g Tris-Base
- ◆ 14,4 g Glycin
- ◆ 5 ml SDS 20 %
- ◆ → in 1 l ddH₂O lösen

Blot-Puffer (1x):

- ◆ 3,03 g Tris-Base
- ◆ 14,4 g Glycin
- ◆ 20 % Methanol
- ◆ → pH 8,5 einstellen

Trenngel (12 %):

- ◆ 4,8 ml Acrylamid/Bis-Lösung (29:1)
- ◆ 3 ml Tris-HCl (1 M), pH 6,8
- ◆ 60 µl SDS
- ◆ 3 µl TEMED
- ◆ 180 µl APS (Ammoniumpersulfat 80 mg/ml)
- ◆ 3,9 ml ddH₂O

Sammelgel (5 %):

- ◆ 1,66 ml Acrylamid/Bis-Lösung (29:1)
- ◆ 1,25 ml Tris-HCl (1 M), pH 6,8
- ◆ 50 µl SDS
- ◆ 3 µl TEMED
- ◆ 150 µl APS (Ammoniumpersulfat 80 mg/ml)
- ◆ 6,88 ml ddH₂O

Coomassie-Färbelösung:

- ◆ 0,05 % Coomassie Brilliant Blue
- ◆ in Eisessig:Methanol:ddH₂O (1:5:5)
- ◆ SDS-Gel ca. 1 h bei RT anfärben

Coomassie-Entfärbelösung:

- ◆ 7,5 % Methanol
- ◆ 5 % Eisessig
- ◆ in ddH₂O lösen
- ◆ SDS-Gel bis zu mehrere Stunden bei RT entfärben

PVDF Transfer Puffer (10x):

- ◆ Tris Base 60.55 g
- ◆ Glycine 288.27 g
- ◆ Mit ddH₂O auf 2 l auffüllen
- Zur Herstellung einer 1x Lösung
- ◆ 10x Puffer 80 ml
- ◆ ddH₂O 720 ml
- ◆ Methanol 200 ml

2.1.3. Zellkulturmedien

Medium: FF239 Fibroblasten

- DMEM high glucose 4,6mg/ml
- + L-Glutamin,
- + Pyruvat
- + 10% FCS
- + 1 % Pen/Strep (100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin)

Medium: hEPC / HAEC

- EBM1-Bullet-Kit (für humane aortale endotheliale Vorläuferzellen und für humane aortale Endothelzellen)
- + „single quotes“ ohne FCS (der „single quotes“)
- + 20 % FCS

Medium: AoSM

- SmBM Bullet Kit (für humane aortale glatte Muskelzellen)
- + SmBM „single quotes“

2.1.4. Geräte

Blot-Gelkammer	BioRad, Puchheim, Deutschland
Blot-Transferkammer	BioRad, Puchheim, Deutschland
DNA-Cycler	Fisher Scientific, Osterode Deutschland
Edelstahlzellträger (bereitgestellt durch)	Translumina, Hechingen, Deutschland
ElisaReader Dynex	Dynatech, Chantilly, VA, USA
Entwässerungsautomat (Citadel-1000)	Thermo Shandon, Frankfurt, Deutschland
Flusskammer LaCon POC	PeCon GmbH, Erbach, Deutschland
Fogarty (Embolektomiekatheter 3F)	Edwards, Unterschleissheim, Deutschland
Geldokumentation (ChemiDoc)	BioRad, Puchheim, Deutschland
HistoAcryl	B.Braun AG, Melsungen, Deutschland
HistoEmbedder Leica EG 1160	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
IMT Rollerpumpe (4-Kanal)	Ismatec, Wertheim, Deutschland
Inflation Device	Abbott Vascular, AbbottPark, IL, USA
Kryotom CMV 1850	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
MACS Cell filter (40 µm)	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS LS Columns	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS Microbeads: CD-,34,-105, -133	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS Magnet MIDI-MACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Microtom DSC 2	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Axioplan2	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop AxioVert200	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop AxioVert25	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Minireaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Minisart Filter (0,22 µm)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Objektträger 26 mm x 76 mm	Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Objektträger SuperFrost®	Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Perfusor® (f. Spritzen)	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
PVDF-Membran	Fisher Scientific, Osterode Deutschland
Raster-EM (TM1000)	Hitachi, Tokyo, Japan
Roboter EVO® 75,	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Rollerpumpenschläuche (IDEX)	Ismatec, Wertheim, Deutschland
Sonifier Cell Disruptor 185	Branson, Dietzenbach, Deutschland
Spritzen 5, 10, 20, 50 ml LuerLock	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Stents (bereitgestellt durch)	Translumina, Hechingen, Deutschland
Sterilpipetten 1, 2, 5, 10, 25, 50 ml	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Thermoschüttler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultraschallbad (ElmaS10)	Elmasonic, Mörfelden-Walldorf, Deutschland
Wellplates (6, 12, 24, 48, 96)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturbank (HERA-Safe®)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zellkulturflaschen (T25, T75)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturinkubator (HERACell®)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge (Multifuge® S1R)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifugationsröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner, Frickenhausen, Deutschland

2.2. Methoden

2.2.1. Zell- und Gewebematerial

Porcines Gewebe

Für die *ex vivo*-Adhäsions-Untersuchungen in Blutgefäßexplantaten wurden ausschließlich porcine Blutgefäße der Halsregion, vornehmlich die Arterien: A. carotis interna/externa sowie die venösen Gefäße: V. jugularis verwendet. Grund hierfür waren neben dem benötigten Kaliber von 4 mm - 5 mm, für die Verwendung im Bioreaktor, die nötige Länge der Gefäße ohne Ausbildung von Seitenästen, welche *per se* eine Schwachstelle bei der Perfusion mit Zellen darstellen würden. Die Entnahme der Blutgefäße erfolgte von der Abteilung für Experimentelle Medizin Tübingen gemäß den Richtlinien des Tierschutzgesetzes. Die Durchführung wurde vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt. Die Proben wurden direkt nach Entnahme in steriler Kochsalzlösung auf Eis überführt. Die Verwendung der Gewebe für die Untersuchungen erfolgte in der Regel sofort, spätestens jedoch innerhalb von 12 Stunden nach Explantation.

Zellkultur

Sämtliche Zellkulturexperimente wurden in den Laboratorien der Anatomie Tübingen unter sterilen Bedingungen der Sicherheitsstufe-1 durchgeführt. Die Aufzucht der Zellen fand, so nicht anders erwähnt in T-Flaschen, bzw. die Experimente in Multiwellplatten statt. Die Kultivierung- und Expansion der Zellen sowie die Inkubation der besiedelten Blutgefäße erfolgte in Inkubatoren des Typs HeraCell unter Schutzatmosphäre mit 95 % Feuchtigkeit, 5 % CO₂ bei 37°C. Ein Mediumwechsel der kultivierten Zellen wurde in der Regel spätestens alle fünf bis sechs Tage vorgenommen. Bei Erreichen einer Konfluenz von zwischen 70 % und 90 % wurden die Zellen passagiert.

Zellen, Zelllinien (HAEC, AoSM, FF239)

Für die pharmakologischen *in vitro*-Untersuchungen der Substanz Shikonin wurden zwei primär isolierte aortale Zelllinien bei Cambrex in Passage 1-2 erworben und bis Passage 30 verwendet. Dies waren humane aortale Endothelzellen (HAEC = human aortic endothelial cells) sowie aortale glatte Muskelzellen (AoSM = aortic smooth muscle cells). Kultiviert wurden die Zellen in den speziell dafür entwickelten Medien der Firma Cambrex, EBM-1 für die Endothelzellen

(HAEC) bzw. SmBM für die glatten Muskelzellen (AoSM). Darüber hinaus kam eine, am Anatomischen Institut etablierte immortalisierte Fibroblasten-Zelllinie (FF239) aus humaner Vorhautpräparation zur Verwendung, welche mit DMEM (High Glucose) Medium bis Passage 35 zu Versuchen herangezogen wurde.

Primärzellen aus Vollblut, Leukapherese-Filtrat

Die für die Adhäsionsversuche isolierten Zellen (endothelialen Vorläuferzellen) wurden aus gepoolten Vollblutspenden und Leukapherese-Filtrat gewonnen. Beide wurden von der Blutbank Tübingen bezogen und kamen aus der Verarbeitung von Blutspenden zu Frischplasma und Erythrozytenkonzentrat, sowie per Apherese voraufgereinigten Leukozytenkonzentraten. Die Entnahme und Weitergabe der Präparate wurde gemäß den Richtlinien von der Ethikkommission genehmigt. Die Proben wurden direkt nach Verarbeitung durch die Blutbank abgeholt. Die Weiterverarbeitung der Proben für die Untersuchungen erfolgte in der Regel sofort, spätestens jedoch innerhalb von 6 Stunden nach Abholung. Die aus den Blutspenden gewonnenen Zellen EPCs wurden über Dichtezentrifugation und anschließende weitere Aufreinigungsschritte mittels MACS („magnetic cell sorting“) bezüglich der CD-Marker CD34, CD105 bzw. CD133, isoliert und direkt im Anschluss den einzelnen Experimenten zugeführt. Die für die Versuche verwendeten Zellen wurden vor Verwendung nicht kultiviert oder passagiert. Als Medium zur Zellapplikation wurde EBM Medium verwendet.

2.2.2. Voruntersuchungen zum pharmazeutischen Ansatz

Pharmazeutische Löslichkeit

Zwar besitzt die kristalline Substanz Shikonin in reinem Ethanol (EtOH, Ph. Eur.), mit 2 mg/ml eine weitaus geringere Löslichkeit verglichen mit 11 mg/ml in Dimethylsulfoxid (DMSO), jedoch fiel Aufgrund der besseren Vergleichbarkeit zur Pharmakon Rapamycin (das bereits als Stent-Beschichtung standardisiert in EtOH gelöst wird) sowie einer möglichen höheren verbleibenden Rest-Zelltoxizität von DMSO nach Evaporation der Lösungsmittelphase die Entscheidung für eine Verwendung von EtOH als Lösungsmittel der Pharmaka.

Beschichtungsdosis

Die Konzentrationsfindung des Pharmakons Shikonin erfolgte auf Basis eruiertes Einsatzbandbreiten bisheriger Studien und lag zwischen 0 $\mu\text{mol/l}$ und 256 $\mu\text{mol/l}$ für die Substanz Shikonin, woran sich auch die Kontrollsubstanz Rapamycin zunächst orientierte (siehe Tabelle). Erste Viabilitätsuntersuchungen mit Shikonin ermöglichten eine Reduktion auf von 64 $\mu\text{mol/l}$, da bereits bei dieser Beschichtungsdosis nach 48-stündiger Inkubation keine vitalen Zellen mehr nachweisbar waren. Die jeweiligen Untersuchungskonzentrationen wurden gemäß der Tabelle in Abbildung 2-1 gewählt: 0 μM (Kontrolle), 1 μM , 2 μM , 4 μM , 8 μM , 16 μM , 32 μM , 64 μM für Shikonin resp. 1 μM , 2 μM , 4 μM , 8 μM , 16 μM , 32 μM , 64 μM , 128 μM , 288 μM für das Vergleichspharmakon Rapamycin.

		Shikonin														
μM	0	1	2	3	4	6	8	12	16	24	32	48	64	96	128	256
ng/cm ²	0,00	1,44 ⁻⁵	2,88 ⁻⁵	4,32 ⁻⁵	5,77 ⁻⁵	8,65 ⁻⁵	1,15 ⁻⁴	1,73 ⁻⁴	2,31 ⁻⁴	3,46 ⁻⁴	4,61 ⁻⁴	6,92 ⁻⁴	9,23 ⁻⁴	1,38 ⁻³	1,85 ⁻³	3,69 ⁻³

		Rapamycin														
μM	0	1	2	3	4	6	8	12	16	24	32	48	64	96	128	288
ng/cm ²	0,00	4,57 ⁻⁵	9,14 ⁻⁵	1,37 ⁻⁴	1,83 ⁻⁴	2,74 ⁻⁴	3,66 ⁻⁴	5,49 ⁻⁴	7,31 ⁻⁴	1,10 ⁻³	1,46 ⁻³	2,19 ⁻³	2,93 ⁻³	4,39 ⁻³	5,85 ⁻³	1,32 ⁻²

Abbildung 2-1: Tabelle mit der Konzentrationsauswahl der pharmazeutischen Substanzen Shikonin und Rapamycin (grau hinterlegt) in μM Konzentration bzw. ng/cm² (rot: max. verwendete Konzentration)

Beschichtungsuntergrund

Im Anschluss an die Wahl des Lösungsmittels, sowie der Festlegung der pharmazeutischen Einsatzkonzentrationen wurden vor Start der Untersuchung zunächst mögliche unterschiedliche Beschichtungsuntergründe hinsichtlich ihrer Eignung getestet (Abb. 2-2). Dies waren zum einen Polystyrol (PS), als Material der Zellkulturschalen, zum anderen Glasdeckgläser. Polystyrol (PS) als möglicher pharmakologischer Beschichtungsuntergrund für die Substanzen (Shikonin und Rapamycin) wurde Aufgrund von Unklarheiten bezüglich möglicher chemischer Reaktionen und Materialveränderungen zwischen dem Lösungsmittel bzw. den Pharmaka mit den Oberflächen während der Inkubation ausgeschlossen. Die Beschichtung von Glasdeckgläsern zeigte hingegen Inkonsistenzen hinsichtlich ihrer homogenen Beschichtbarkeit, wodurch auch diese keine Anwendung fand.

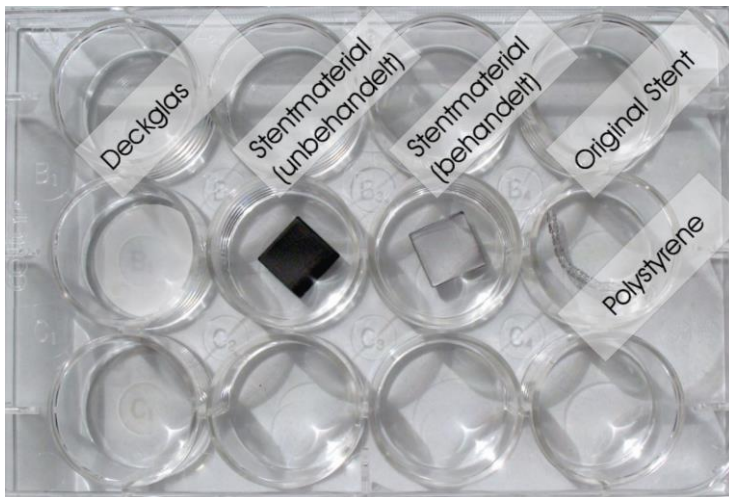


Abbildung 2-2: Untersuchte Beschichtungsmaterialien für die Pharmakonstudie.

Von links nach rechts: Glasdeckgläser (weißlich unterlegt), Stentmaterial (Güte W.Nr. 1.4404) mit unbehandelter und behandelter Oberfläche, sowie original Stents. Unten rechts Polystyrene des „Wellplates“.

Die Entscheidung fiel, nicht zuletzt aufgrund einer wesentlich besseren Vergleichbarkeit zum gedachten Zieleinsatz auf Gefäßstützen, zu Gunsten der Verwendung des Stentmaterials als Beschichtungsuntergrund. Hierfür wurden eigens quadratische Edelstahlzellträger aus Stahlblechen der Güte W.Nr. 1.4404 (X2CrNiMo17-12-2) AISI316L/V4A hergestellt, sowie einer, der den Gefäßstützen analogen Vorbehandlung unterzogen. Die einzelnen Zellträger umfassten eine Seitenlänge von 10 mm x 10 mm (1 cm²) und eine Materialstärke von 2 mm. Vor Beschichtung und anschließendem Einsatz zur Zellkulturuntersuchung wurden die Edelstahlzellträger zunächst mit Aceton entfettet, maschinell gespült, getrocknet und bei 180°C für 4 Stunden RNase frei gebacken.

2.2.3. Beschichtung und Durchführung des pharmazeutischen Ansatzes

Die Beschichtung der Edelstahlzellträger mit den Pharmaka erfolgte durch Ansetzen der Maximalkonzentration, sowie der darauf folgenden Verdünnung mittels Ethanol absolut (99,5% Ph. Eur.). Dies gilt sowohl für Shikonin als auch für Rapamycin. Je Einsatzkonzentration wurden 50 µl Pharmakasuspension pro Metallquadrat (cm²) aufgetragen. Die Evaporation des Lösungsmittels EtOH erfolgte steril über Nacht. Am Folgetag fand die Besiedelung mit je 1 x 10⁵ Zellen/cm auf den Edelstahlzellträgern sowie einer 48 stündigen Inkubation unter

Standard-Zellkulturbedingungen statt. Im Anschluss an die Inkubation erfolgten die Zellanalysen mittels MTT-Assay, PI-Assay und immunzytochemischer Färbung für Vimentin (Abb. 2-3).

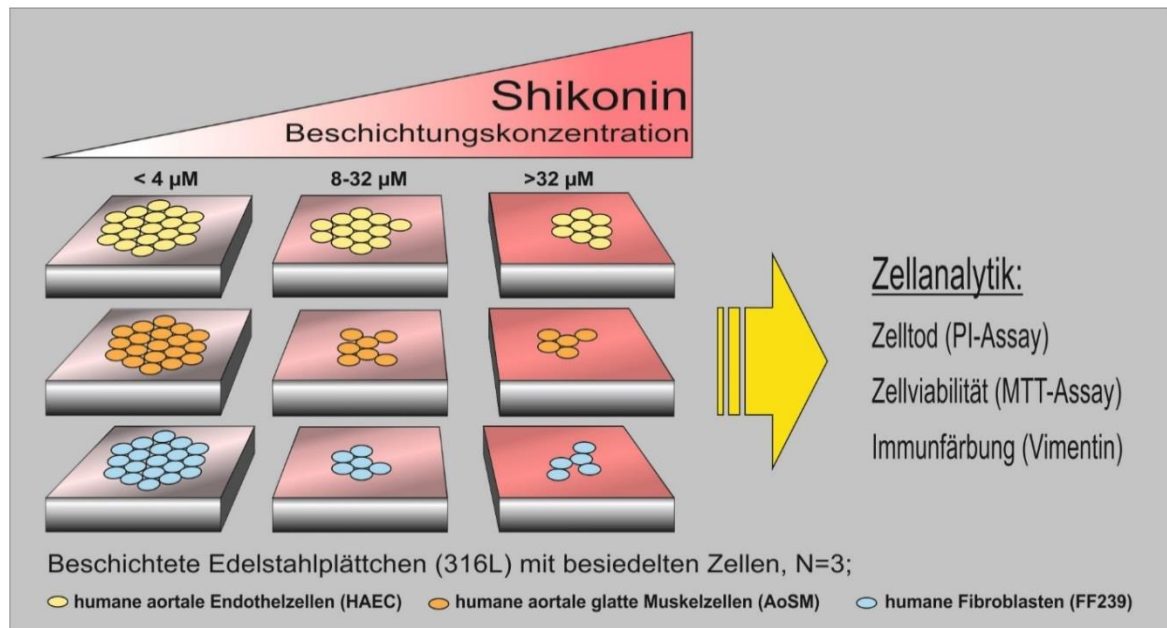


Abbildung 2-3: Schema der Untersuchungen zur pharmazeutischen Zellinhibition

2.2.4. Analysemethoden des pharmazeutischen Ansatzes

MTT-Assay

Der Zellviabilitätstest in Form des 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide Assays, MTT-Assays beruht auf einer intrazellulären Spaltung des Tetrazoliumrings in ein lösliches Farbprodukt/Farbsalz in den Mitochondrien der Zellen. Hierdurch bilden nur vitale Zellen den löslichen Farbstoff Formazan (Mosmann 1983). Die Untersuchung der Viabilität erfolgte nach 48 stündiger *in vitro*-Kultur der Zellen auf den mit Pharmaka beschichteten Edelstahlzellträgern. Hierzu wurde das Zellkulturmedium der Zellen durch die MTT-Lösung (MTT: Zellkulturmedium, 1:11) ersetzt und für zwei Stunden unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Nach der zweistündigen Inkubation fand die Lösung des in dieser Zeit gebildeten Formazansalzes in den Zellen statt. Die MTT-Lösung wurde ab-pipettiert und das intrazellulär entstandene Formazan mit 500 μl DMSO gelöst, die Messung der optischen Dichte (OD) des Eluats erfolgte im Elisa-Reader bei 550 nm Wellenlänge. Je stoffwechselaktiver die Zellen aufgrund ihrer Viabilität bzw. des sie umgebenden Milieus sind, desto mehr Formazan wird von ihnen

umgesetzt und umso intensiver ist die Färbung nach Lösung des Farbstoffes durch Dimethylsulfoxid (DMSO). Die steigende Intensität der Färbung mit zunehmendem metabolischen Zellumsatz, stellt damit einen Indikator für die Viabilität der Zellen dar.

PI-Assay

Der Propidium-Iodid-Assay (PI-Assay) oder Zelltod-Assay stellt im Grunde das Gegenteil des zuvor beschriebenen Viabilitätsassays dar. Er beruht auf der Aufnahme von dem Medium zugegebenem Propidium-Iodid durch die Zellen. Vitale Zellen sind aufgrund ihrer intakten Zellmembran für PI impermeabel. Mit eintretender Schädigung der Zellmembran bzw. Letalität der Zellen - geht diese Fähigkeit jedoch zunehmend verloren - PI infundiert und akkumuliert sich in den geschädigten Zellen. Hierbei interkaliert es an der DNS im Zellkern, wo das interkalierte Propidium-Iodid aufgrund seiner Fluoreszenzeigenschaften im Zellkern geschädigter Zellen visualisiert und quantifiziert werden kann. Je letaler geschädigter die Zellen durch, das sie umgebende Milieu sind, desto mehr PI akkumuliert sich intrazellulär und desto intensiver erscheint die Fluoreszenzfärbung der Zellen unter dem Mikroskop.

Vimentinfärbung

Vimentin stellt als Typ-III Intermediärfilament aus der Gruppe der Desmine (vergl: GFAP, Desmin, Peripherin) ein Molekül des Zytoskeletts dar, das bei Wirbeltieren von allen mesenchymalen Zellen gebildet wird. Somit exprimieren alle der hier verwendeten Zelltypen dieses Protein im Zytoplasma und können hierdurch fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden. Nur Zellen, die in der Lage sind auf den mit Pharmaka beschichteten Plättchen zu adhären und zu persistieren, lassen sich somit mittels Antikörperfärbungen gegen ihr Zytoskelett (Vimentin) nachweisen und visualisieren. Gleichzeitig ist es möglich deren Morphologie auf den beschichteten Edelstahlzellträgern darzustellen. Die Darstellung der Vimentin-Intermediärfilamente erfolgte hierbei auf Basis einer indirekten immunzytochemischen Antikörperfärbung. Hierzu wurden die Edelstahlzellträger nach Inkubation mit MetOH Methanol bei -20 °C für 20 min fixiert und permeabilisiert, anschließend per Primärantikörper Maus-anti-Vimentin das Zytoskelett markiert und mit Ziege-anti-Maus-Alexa488-Zweitantikörper in Kombination mit DAPI (1:5000) zur Darstellung im Mikroskop visualisiert (Abb. 2-4).

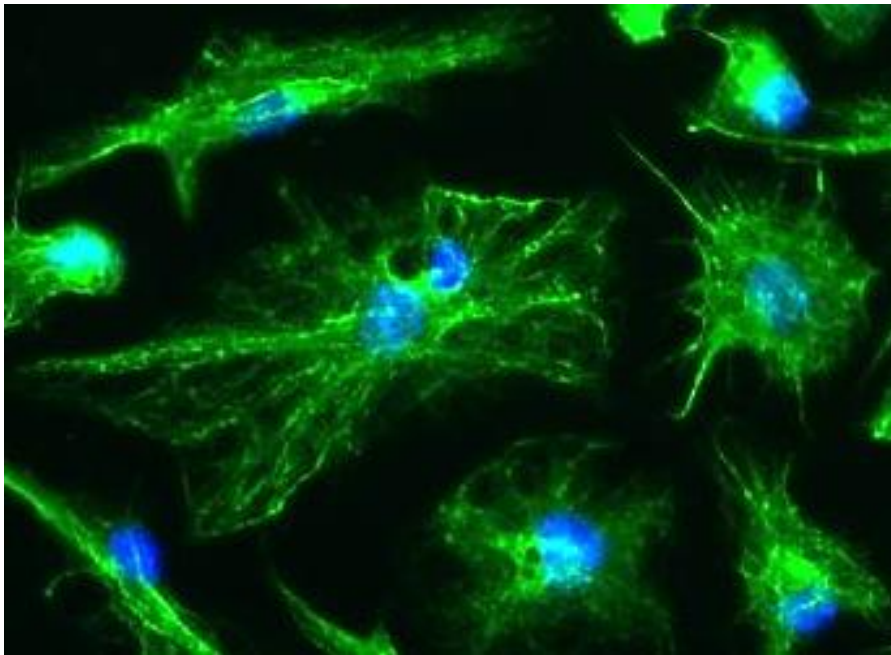


Abbildung 2-4: Immunzytochemische Darstellung des Vimentinzytoskeletts von HAECs mit Alexa Fluor 488 (grün), Kernfärbung DAPI (blau).

EPC Adhäsionsuntersuchungen auf Stents

Zur Klärung inwieweit EPCs – also die frei im Blutstrom kursierende endothelialen Vorläuferzellen – in der Lage sind die Streben („struts“) der Stents zu besiedeln und diesen artifiziellen Untergrund nutzen, um ein möglichst schnelles, vor allem aber vollständig und physiologisch korrektes Einheilen der Stents nach Implantation zu gewährleisten, wurden Stents *in vitro* mit EPCs besiedelt. Zur Besiedelung der Stents mit EPCs erfolgte zunächst eine Zellisolierung aus humanen Leukapherese-Filtrat mittels Dichtegradientenzentrifugation und anschließender MACS („magnetic cell separation“). Am Ende dieser liegt eine CD133-positive, aufgereinigte Stammzellfraktion weißer Blutkörperchen vor. Die isolierten hEPCs wurden zur *in vitro*-Besiedelung einer dreitägigen Kultivierung in hEPC Medium unterzogen, um kurzfristige Anheftungen von langfristigen Zelladhäsionen zu unterscheiden. Der Zellenachweis erfolgte im Anschluss durch eine mikroskopische Darstellung der EPCs auf den Stents. Zum einen per Raster-Elektronenmikroskop (REM) TM1000 Hitachi direkt nach Fixierung bzw. zum anderen nach Fixierung und folgender immunzytochemischer Anfärbung mittels Vimentin und DAPI mikroskopisch per Laser-Scanning 3D-Immunfluoreszenz-Darstellung.

2.2.5. Isolation von primären PBMCs (periphere mononukleare Blutzellen)

Die für die Besiedelungsexperimente benötigten EPCs wurden aus der mononuklearen Zellfraktion humanen Blutes gewonnen (Abb. 2-5).

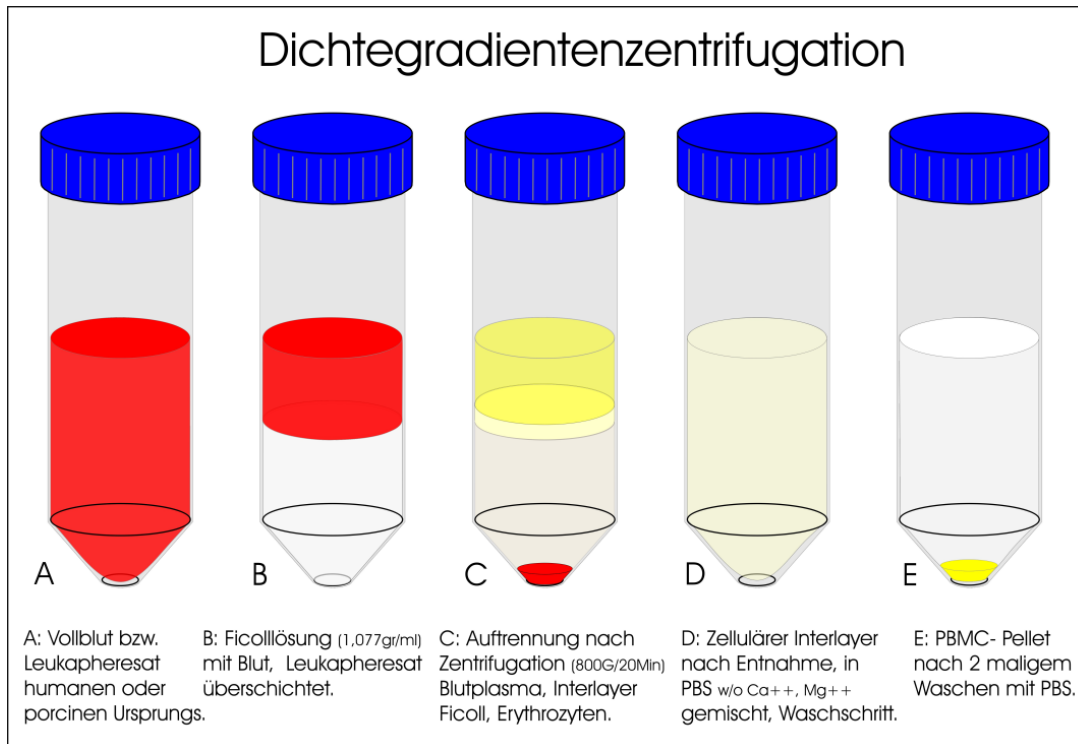


Abbildung 2-5: Schritte der PBMC-Isolierung mittels Dichtegradientenzentrifugation.

Ablauf:

- ✦ 15 ml Separationslösung (1,077g/ml) in 50 ml Zentrifugationsröhrchen vorlegen.
- ✦ Blutspende-, Buffy-Coat-, Leukapheresebeutel äusserlich desinfizieren.
- ✦ Beutelinhalt steril entnehmen.
- ✦ (Blutspende, (Buffy-Coat-Inhalt) 3:1 mit PBS (1x) w/o Ca²⁺/Mg²⁺ verdünnen)
- ✦ Biocoll mit 35 ml Blut-, Leukapherese-Suspension überschichten.
- ✦ Zentrifugation bei 800 G für 25 min, ohne Bremse, bei RT.
- ✦ Überstand (Serum) bis auf ca. 0,5 cm an Zwischenlage abnehmen.
- ✦ Weißliche Zwischenlage vorsichtig überführen.
- ✦ Zwischenlage 2 x mit 50 ml PBS(1x) w/o Ca²⁺/Mg²⁺, waschen anschließend bei 400 G, 10 min, Bremse an, RT zentrifugieren.
- ✦ Zellpellet in 10 ml EBM-Medium resuspendieren.
- ✦ Zelldichte mit Neubauerzählkammer bestimmen und einstellen.

2.2.6. „Magnetic-Cell-Separation“ (MACS)

MACS dient der Auftrennung eines Zellgemisches mit Antikörpern unter Zuhilfenahme eines Magnetfeldes in eine Antigen-tragende sowie eine Antigen-nichttragende Fraktion. Dies wird durch die Inkubation einer heterogenen Zellsuspension mit Antikörpern erreicht. Die Antikörper, die i.d.R. gegen die gewünschten antigentragenden Zellpopulationen gerichtet sind können dabei entweder bereits direkt an paramagnetischen „micro beads“ gebunden sein, oder werden andernfalls indirekt, mit gegen die Primärantikörper gerichtete „micro beads“ gekoppelt (Abb. 2-6).

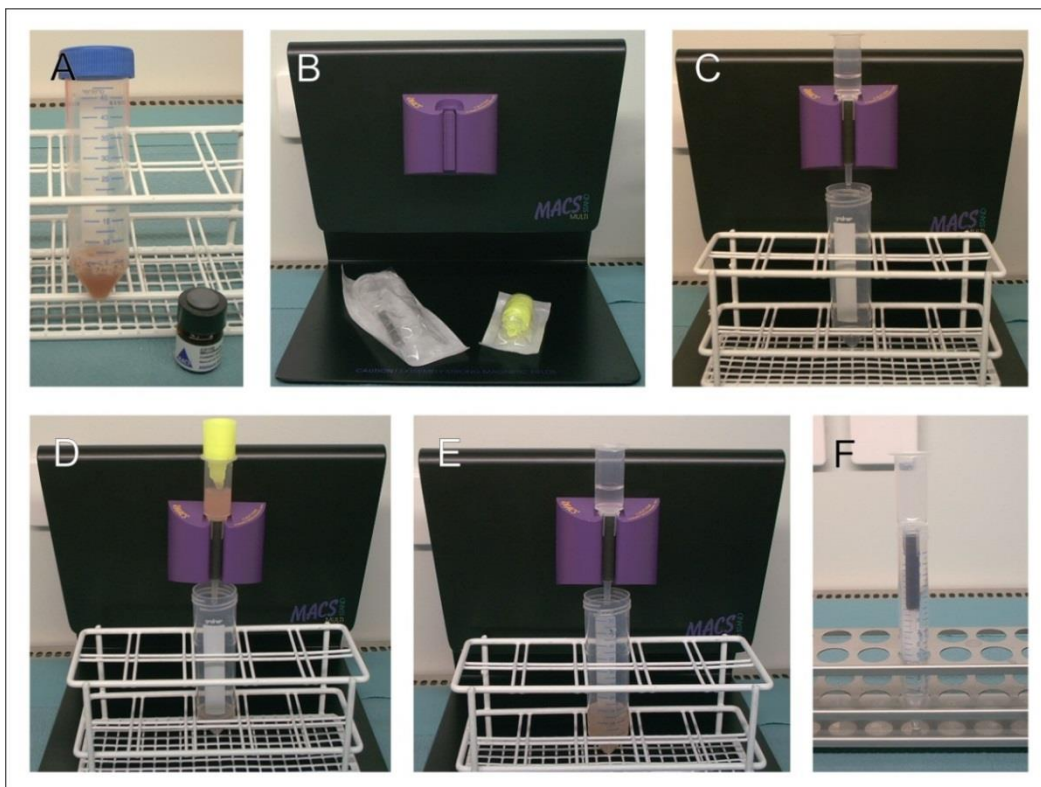


Abbildung 2-6: Ablauf der MACS Isolierung mit LS-Säule® und Midi-Magnet®.

A: PBMC-Zellfraktion mit MACS „micro bead“-Lösung. B: Magnet-Halter, LS-Säule® und Midi-Magnet® und Zellfilter (40 µM). C: Equilibrieren der Säule. D: Zellapplikation der „micro bead“ gelabelten PBMC Fraktion. E: Spülschritt. F: Zellseparation.

Bei den „micro beads“ handelt es sich um ca. 50 nm große paramagnetische mit Polysaccharid umgebene Eisenoxidkerne. Durch die Kopplung an Oberflächenprotein-erkennende Antikörper sorgen diese für eine magnetische Markierung der gewünschten Zellpopulation. Beim anschließenden Durchfluss durch eine mit paramagnetischem Material ausgerüsteten Säule, spezifischer Länge und Körnung, erfolgt die eigentliche Auftrennung, durch ein, die Säule umgebendes

starkes Magnetfeld. Die mit den magnetischen „micro beads“ markierten Zellen (MACS positive Fraktion) werden hierbei vom sie umgebenden Magnetfeld in der Säule zurückgehalten, während unmarkierte Zellen (MACS negative Fraktion) diese ungehindert passieren können. Entfernt man anschließend die Säule aus dem Magnetfeld, lässt sich, dank der paramagnetischen Eigenschaften, die positive Fraktion durch Spülen vom ebenfalls paramagnetischen Material der Säule lösen. Auf diese Weise erhält man beim Spülen der Säule in Abwesenheit eines Magnetfeldes die „micro bead“-markierte Zellpopulation.

MACS- Puffer (Magnetic Cell Sorting):

- ✦ PBS w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$.
- ✦ 5,0 g/l BSA Fraktion V

BSA-Lösung sterilfiltrieren

- ✦ (minisart Filter 0,22 μM)
- ✦ mit PBS (1x) auf 1 l auffüllen
- ✦ pH auf 7,2 einstellen.

Vor Verwendung

- ✦ Im Ultraschallbad entgasen,

Zur Verwendung

- ✦ auf Eis gekühlt lagern.

2.2.7. Voruntersuchungen zum molekularbiologischen Therapieansatz

Protein G + IgG Antikörper

Protein G, ein Protein um die 60kD, das man in den Zellwänden einiger Bakterien der Gattung (Streptococcus) findet, weist eine hohe Bindungsaffinität für den F(c)-terminalen Teil von IgG-Antikörpern auf. Das Bakterium nutzt somit in gewissem Sinn dieses Protein, um sich mittels Bindung wirtseigener IgG-Antikörper vor der zellulären Immunantwort des Wirtes zu schützen. Mit F(c)-Terminal an der Bakterienwand gebundenen Antikörpern kann die vom Bakterium bereits belegte F(c)-Bindungsstelle nun nicht mehr von den Immunzellen zur Aktivierung der Abwehrreaktion genutzt werden. Das Prinzip der Bakterien kann theoretisch somit dazu verwendet werden, um IgG-Antikörper F(c)-Terminal gerichtet an eine Protein-G vorbeschichtete Oberfläche zu koppeln und dadurch passende antigen-

exprimierende Zellen an den vorbeschichteten Oberflächen über die freie F(ab) Bindungsstellen zu binden. Ziel dieser Untersuchung war es, zu überprüfen, ob auf diese Weise vorbehandelte Oberflächen tatsächlich in der Lage sind eine spezifische und stabile Zelladhäsion zu vermitteln und damit aus einem heterogenen Zellpool wie beispielsweise „buffy coats“, Zellen eines bestimmten Antigens zu binden. Die hierbei interessierenden Antigene, respektive die diese Antigene exprimierenden Zellen, waren CD34 (Sialomucin), CD133 (Prominin1), CD105 (Endoglin), da für diese Marker positive Zellen allgemein als endotheliale Vorläuferzellen oder Blutstammzellen (EPC) angesehen werden können. Durch gezielte Adhäsion dieser Zellen wäre neben der stammzelltypischen Teilungsfähigkeit zusätzlich auch noch eine Differenzierbarkeit zu Endothelzellen wünschenswert. Auf eine Anwendung im Blutgefäß übertragen, sollte sich dies in einem beschleunigten Heilungsprozess durch raschere Endothelialisierung widerspiegeln.

Flusskammerversuche (I)

Um die Funktionalität gekoppelter IgG-Antikörper an einer Prot.G-Oberfläche nachzuweisen und damit die theoretische wie auch praktische Funktion von bispezifischen Antikörper zu eruieren, wurden Oberflächen von Glasdeckgläsern zunächst mit Protein G (10 ng/ml) in PBS für 30 min bei 37°C vorbeschichtet. Die Funktionalisierung erfolgte mittels handelsüblich erworbener IgG-Antikörper deren Spezifität gegen Epitope auf endothelialen Vorläufern gerichtet waren (CD34, CD133, CD105). Im Anschluss daran wurden die Protein-G vor-, und funktional mit IgG-Antikörpern nachbeschichteten Deckgläser getrocknet und bei 4°C kühl und trocken bis zur Verwendung gelagert. Die mit Protein-G und IgG Antikörpern beschichteten Glasdeckgläser wurden dynamisch auf ihre Funktionalität hin untersucht. Hierzu wurden die beschichteten Glasdeckgläser in einer *in vitro*-Flusskammer (PeCon) (Abbildung 2-7 & 2-8) platziert und unter mikroskopischer Kontrolle mit Zellen perfundiert. Die Perfusion der aus humanen „buffy coats“ isolierten PBMCs erfolgte in 15 ml EBM-1 unter Verwendung einer 50 ml LuerLock Spritze und eines Perfusors® mit einer Flussrate von etwa 0,25 ml/min. Nach 60 minutiger Zellperfusion wurde die Flusskammer mit weiteren 50 ml EBM-1 Medium (ohne Zellen) für 6 Stunden gespült um nur nicht-transiente, also stabil auf der Oberfläche angehefteten Zellen zu erhalten. Im Anschluss an die Spülphase wurden die beschichteten Deckgläser entnommen in 4 % PFA für 20 min fixiert

und mittels immunzytochemischer Färbung für die Analyse vorbereitet und statistisch ausgewertet.



Abbildung 2-7: Darstellung der PeCon-Flusskammer (geschlossener Zustand). Zentral die Flusskammereinheit mit gekoppelten Schläuchen, sowie dem sie umgebenden Kammerkorpus.

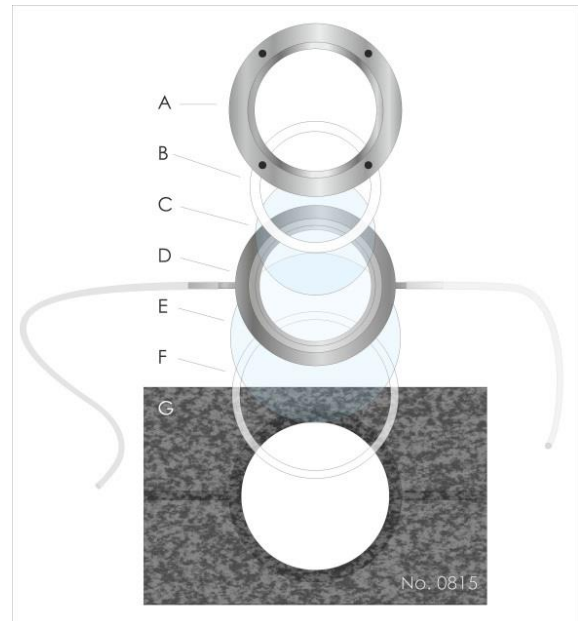


Abbildung 2-8: Darstellung der PeCon-Flusskammer in zerlegtem Zustand. Man erkennt von oben nach unten: A: Fixierring, B: Dichtring 1, C: Deckglas 1, D: Flusskammereinheit mit gekoppelten Schläuchen, E: Deckglas 2, F: Dichtring 2, G: Kammerkorpus.

In die PeCon-Kammer wurde, das wie oben beschrieben beschichtete Deckglas auf der Unterseite eingelegt, gefolgt von Dichtungsringen, die das System nach außen hin abdichten. Die Adhäsionsprüfung erfolgte durch Perfusion der Kammer mit aus „buffy coats“ bzw. Plasmapherese isolierten EPCs. Diese wurden mittels einer Spritzen-Perfusionspumpe und einer Perfusions-Spritze mit einer Flussrate von 0,25 ml/min durch die Flusskammer perfundiert (Abb. 2-9). Im Anschluss an die Adhäsions-, Besiedelungsphase der beschichteten Oberfläche mit den EPCs wurde die Kammer mittels einer Rollerpumpe und 250 ml Endothelmedium nachperfundiert, um nicht fest anhaftende Zellen auszuspülen. Die Spülperfusion fand mit einer Flussrate von ca. 2 ml/min für weitere 8 Stunden statt. Nach Abschluss wurden die besiedelten Deckgläser der Flusskammer entnommen und 20 min mit 4% PFA fixiert. Es folgte die histologische/mikroskopische Aufarbeitung.

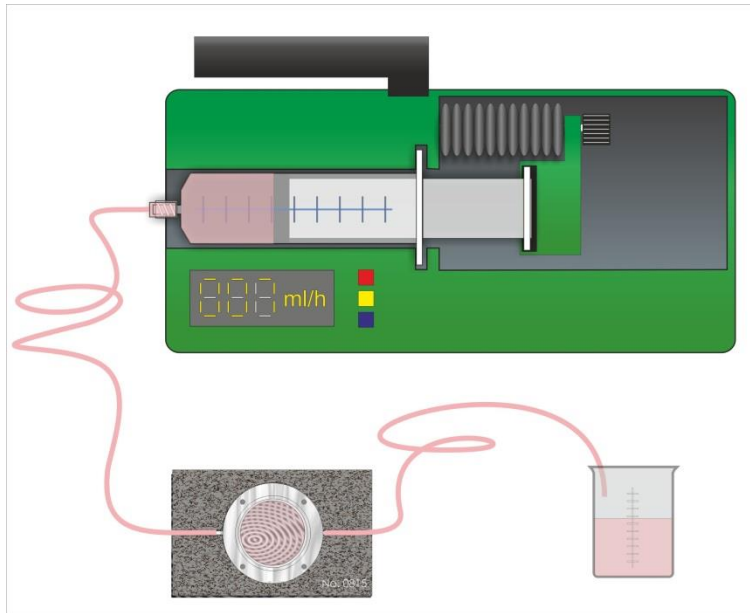


Abbildung 2-9: Schema der *in vitro*-Adhäsionsexperimente im PeCon Flusskammermodell mit Zellapplikation per Spritzenperfusor[®].

2.2.8. Zelladhäsionsexperimente - bispezifisches Antikörperkonstrukt

In Anlehnung an die Untersuchung der Kombination aus Protein G und IgG-Antikörpern beschichteten Oberflächen und deren Potenzial zur aktiv vermittelten Zelladhäsion, wurde in Kooperation von der Ag. Gawaz und Ag. Jung ein monoklonaler Antikörper (mAb) und das Glykoprotein-VI (GPVI) mittels eines chemischen „crosslinkers“ (SPDP) via Disulfidbindungen miteinander gekoppelt. Durch die Kopplung entstand ein neues bi-spezifisches Protein mit zwei Bindungsstellen. Das Target des mAb war in diesem Fall gegen das Stammzellantigen Prominin1 (CD133) gerichtet, das des Glykoproteins (GPVI), das aus den Blutplättchen stammt richtet sich hingegen gegen offene Kollagenfasern. Hierdurch entsteht ein Molekül das endotheliale Stamm-, resp. Vorläuferzellen an geschädigte Blutgefäßbereiche mit offenen Kollagenfasern binden und somit zu einer verbesserten Ein-, bzw. Abheilung der geschädigten Bereiche anhand verstärkter Re-Endothelialisierung führen soll.

Flusskammerversuche (II)

Die *in vitro*-Experimente des bispezifischen Antikörperkonstrukts erfolgten ebenfalls dynamisch im Flusskammermodell (Abb.2-7 – 2-9). Im direkten Vergleich

zum bispezifischen Antikörperkonstrukt kamen Beschichtungen aus: Kollagen (I) allein, CD133 mAb alleine, Glykoprotein-VI alleine sowie einem (1:1) Gemisch aus CD133 und GPVI nicht gekoppelt. Die Realisierung der Micro-Array-Spots auf den Glasflächen erfolgte durch die Ag. Gauklitz (phys. Chemie). Vor Aufbringen des Konstrukts, den Einzelbestandteilen bzw. deren (1:1) Mischung wurden die Deckgläser mit einer Kollagen I Lösung für 1 Stunde bei 37°C vorbeschichtet. Im Anschluss daran fand die einstündige Endbeschichtung mit den einzelnen Lösungen bei 37°C statt. Alle zur Vor- und Endbeschichtung verwendeten Lösungen lagen in einer 10 µg/ml Konzentration vor.

Zelladhäsion (*ex vivo*) in Blutgefäß-Explantaten

Den *in vitro*-Adhäsionsexperimenten folgte der realitätsnähere Nachweis bezüglich der Funktion des bispezifischen Antikörperkonstrukts im *ex vivo*-Modell unter Verwendung porciner Blutgefäßexplantate. In diesem wurden steril entnommene Blutgefäße vom Schwein (A. carotis oder V. jugularis interna) (Abbildung 2-10) in einem perfundierbaren Bioreaktor zur Untersuchung verwendet. Vorteil dieses Ansatzes ist die Tatsache, dass im *ex vivo*-Explantat ein physiologisches Substrat in Form eines realen Blutgefäßes vorliegt das mit EPCs besiedelt werden kann. Dies bringt den Vorteil einer deutlich verbesserten Übertragbarkeit der Ergebnisse im Vergleich zum *in vitro*-Modell mit sich. Zur Realisierung wurden porcine „Carotiden“ (Arterien) resp. Jugularvenen von Schweinen steril unter Operationsbedingungen durch die Abteilung Experimentelle Medizin explantiert. Verbliebene Erythrozyten oder Blutclots wurden durch Spülen des Gefäßlumens mit heparinisiertem Puffer direkt nach dem Transport entfernt. Die Lagerung der Gefäße nach Explantation bis zur Verwendung (längstenfalls 5 Stunden) fand in Endothelmedium bei 4°C statt.

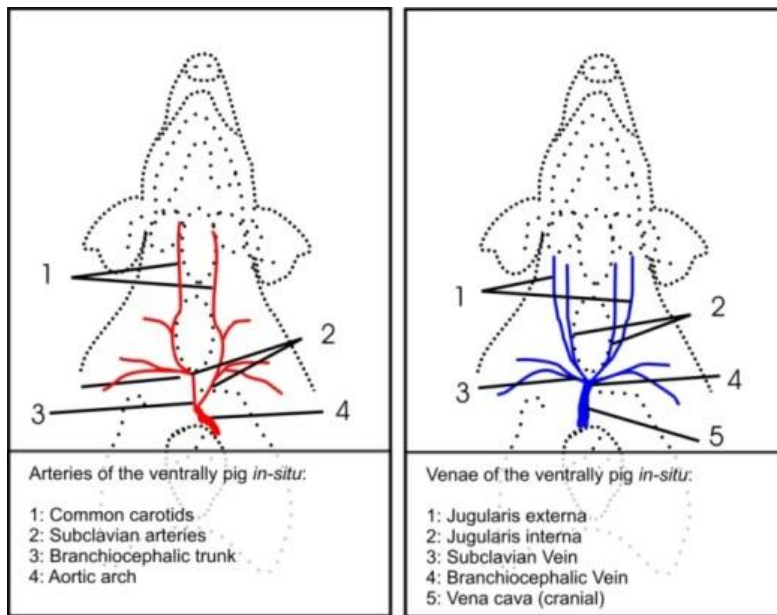


Abbildung 2-10: Schema der Entnahmeregionen der verwendeten porcinen BlutgefäÙe für die *ex vivo*-Explantatversuche.

Für die *ex vivo*-Experimente mit den BlutgefäÙexplantaten kam ein Koaxialglas-Bioreaktor zum Einsatz. Dieser verfügt über zwei getrennte Kammerbereiche, einen inneren Bereich, der durch zwei axial verlaufende, hohle Glasstutzen begrenzt wird auf denen das BlutgefäÙexplantat rechts und links aufgezogen und daran befestigt werden kann, sowie einen äußeren Bereich, der nach verschließen mit einer koaxial verlaufenden Glasröhre um das BlutgefäÙ herum komplett mit Medium gefüllt wird. Äußerlich werden die Tunika adventitia und die darunter befindlichen Regionen des BlutgefäÙes über das umgebende Medium trophisch mit Nährstoffen versorgt. Das Lumen des, auf den Glasstutzen befindlichen BlutgefäÙes, ist vom äußeren extraluminal liegenden Mediumbereich getrennt, kann aber von außen über Glasverbindungen separat mit Medium- und Zellsuspensionen perfundiert und über diesen Zugang auch trophisch versorgt werden (Abb. 2-11). Vor Befestigung auf den Glasstutzen des Bioreaktors wurde das GefäÙ auf die passende Länge gekürzt, beide Enden anschließend auf die gegenüberliegenden Glasstümpfe geschoben und dort mit CyanAcrylat Gewebeklebstoff befestigt. Der Bioreaktor wurde geschlossen und von den Perfusionszugängen her intraluminal mit EBM-Medium respektive extraluminal mit HBSS (Ca^{2+} , Mg^{2+}) gefüllt. Um einen, einer PTA-Behandlung ähnlichen Zustand mit intraluminalen GefäÙwandschäden zu erreichen wurden die porcinen

Blutgefäße mittels eines, für humane Behandlungen üblichen, Fogarty Embol-ektomiekatheeter 3F denudiert.

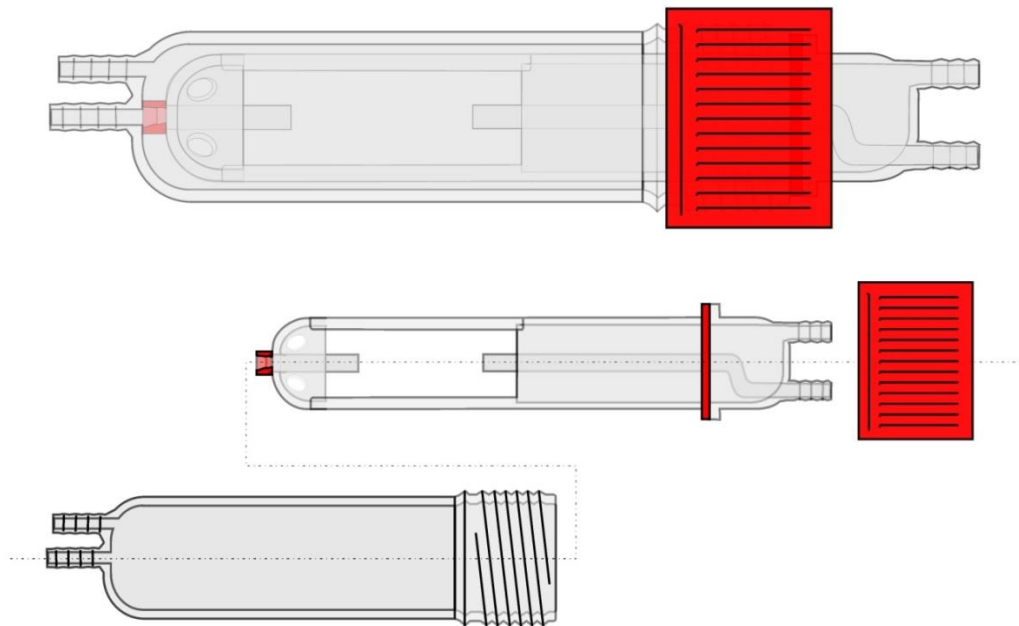


Abbildung 2-11: Koaxialglaszylinder zur Versorgung und Perfusion von Blutgefäß-explantaten für die *ex vivo*-Explantatversuche. (Adhäsion von EPCs mittels bispezifischen Antikörperkonstrukts). Oben: geschlossenes Modell. Unten: geöffneter Bioreaktor mit den beiden Enden der Glasstutzen auf die die Gefäße aufgezogen und befestigt wurden.

Hierzu wurde der expandierte Ballonkatheter mehrmals (4x) über die offene Gefäßlänge gezogen, um den endothelialen Monolayer des Gefäßes mechanisch von der darunterliegenden intimalen Gefäßwand abzulösen und die darunterliegende extrazelluläre Matrix (überwiegend Kollagenfasern) freizulegen (Abb. 2-12). Das auf diese Weise denudierte Gefäß stellte die Basis für die folgenden Beschichtungen der Gefäßwand statt. Zum Einsatz kamen das Antikörperkonstrukt (bestehend aus CD133-GPVI), die beiden Einzelkomponenten für sich, sowie die Mischung beider Komponenten zusammen, jedoch ungekoppelt. Alle Beschichtungslösungen lagen hierbei in einer 10 µg/ml Konzentration vor und wurden zur Beschichtung für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dem Beschichtungsprozess folgte ein Spülvorgang mit 10 ml EBM-Medium. Angeschlossen daran fand die Besiedelung mit 2×10^6 (aus PBMCs mittels MACS-Technologie isolierten) CD34⁺ bzw. CD105⁺ Zellen in 10 ml EBM (2×10^5 Zellen/ml EBM) statt. Die Flussrate der Besiedelung lag bei 10 ml/h und wurde mittels des Spritzen-Perfusors realisiert. Nach Besiedelung wurde mittels Rollerpumpe eine höhere Scheer-Rate mit ca. 20

ml/min appliziert, um transient anhaftende Zellen zu lösen. Dies erfolgte über Nacht bei 37°C in Zellkulturatmosphäre. Am Folgetag wurde das mit humanen Zellen besiedelte Blutgefäß aus dem Bioreaktor entnommen und mit 4 % PFA für 24 Stunden bei 4 °C fixiert.

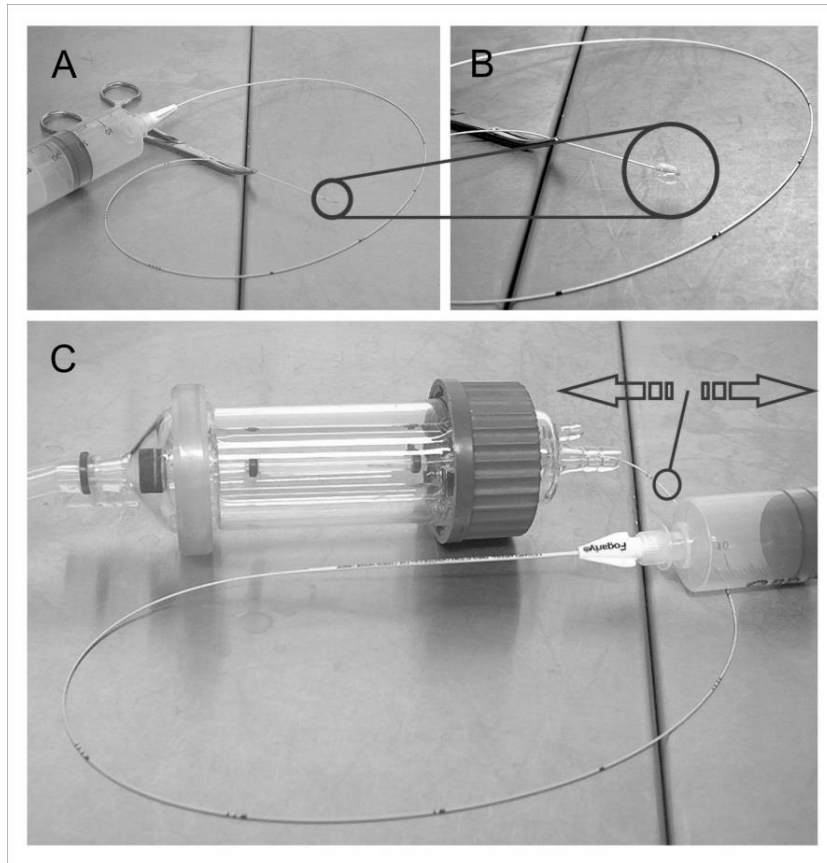


Abbildung 2-12: Darstellung des Denudationsprinzips. Intraluminale Expansion eines Embolektomiekatheters. A: Fogarty Embolektomie-Katheter 3F. B: Katheter mit expandiertem Ballon, C: Darstellung der intraluminale Denudation im Koaxialglasreaktor. Die Pfeile indizieren die Schub und Zugrichtung bei der Denudation.

2.2.9. Histologische / Histochemische Nachweismethoden

Silanbeschichtung von Objektträgern

Sofern keine Objektträger mit Haftbeschichtung bspw. Superfrost® zur Verwendung kamen wurden handelsübliche unbeschichtete Objektträger mit Silan funktionalisiert um die Hafteigenschaften für Paraffin- wie auch Kryoschnitte zu verbessern. Zur Adhäsionsverbesserung der Präparatschnitte auf den Objektträgern während des Färbeprozesses wurden die Objektträger mittels einer Silan-

schicht (3-Aminopropyltriethoxysilane) mit Aminogruppen versehen, wodurch das Gewebe der histologischen Schnitte stärker an der Glasoberfläche anhaften kann.

Ablauf:

- ✦ Objektträger zur Erlangung von RNase-freiheit 3h bei 180 °C backen.
- ✦ Objektträger 1x durch kurzes waschen in Aceton reinigen.
- ✦ Objektträger 10 min in einer 2 % 3-Aminopropyltriethoxysilane-Acetonlösung inkubieren.
- ✦ Objektträger anschließend 2x kurz in ddH₂O waschen.
- ✦ Objektträger bei 60°C trocknen.

Hämatoxilin/Eosin-Färbung (HE)

Hämatoxilin ist ein positiv geladener Farbstoff, der sich während der Färbung an die negativ geladenen Phosphatgruppen von Nukleinsäuren anlagert. Die tiefblaue Färbung der Kerne wird durch Inkubation in Leitungswasser erreicht. Das wasserlösliche Eosin G ist ein rot-gelblicher Farbstoff, der negativ geladen ist und an positive Gruppen von beispielsweise Eiweißen bindet. Es erzeugt somit eine Zellplasmafärbung des Gewebes. In dieser Arbeit wurden die zu untersuchenden Gewebe zunächst je nach Größe für 1 – 4 h in 4 % (v/w) Paraformaldehyd fixiert und anschließend zur Entwässerung in ein Routinelabor gebracht. Nach erfolgter Einbettung in Paraffin wurden 5 µm dicke Schnitte an einem Mikrotom erstellt und auf silanisierte Objektträger aufgezogen. Zur HE Färbung wurden die Gewebeschnitte zunächst 20 min in Xylol entparaffiniert anschließend mit einer absteigenden Alkoholreihe (Xylol/EtOH 1:2, 100 % EtOH, 96 % (v/v) EtOH, 70 % (v/v) EtOH, 50 % (v/v) EtOH jeweils 5 min) gewässert. Es folgte die Färbung des Gewebes mit einer Mayers Hämalaunlösung.

Ablauf:

- ✦ Entparaffinierung der Objektträger in Xylol mit absteigender EtOH Reihe

Färbung des Gewebes

- ✦ 5 sec in Mayers Hämalaunlösung (filtriert, 1:2 mit ddH₂O gefärbt
- ✦ 5 min mit Leitungswasser gebläut
- ✦ 20 sec in 0,5 % wässrigen Eosin G-Lösung gefärbt
- ✦ Waschen in ddH₂O
- ✦ Entwässerung mit aufsteigender EtOH Reihe
- ✦ Eingedeckeln mit Hico-Mic

Immunhisto-, Immunzytochemische Nachweismethoden

Ziel der Immunhistochemie ist es, Proteine/Zielstrukturen in eingebetteten Geweben bzw. daraus hergestellten Mikrotomschnitten mittels spezifischer mono- oder polyklonaler Antikörper nachzuweisen. Es ist ebenso möglich eine solche Antikörperfärbung an *in vitro* kultivierten Zellen (Immunzytochemie) durchzuführen. Die Antikörperfärbung und Visualisierung kann entweder anhand der Umsetzung von Farbsubstraten bspw. von Diaminobenzidin (DAB) oder Alkalische Phosphatase (AP) unter Anwendung enzymatischer Aktivität durch Peroxidasen (HRP) oder aber durch gekoppelte Fluorochrome erfolgen. Die Chromo-, bzw. Fluorophore sind hierbei entweder direkt an den, gegen das Antigen gerichteten, Antikörper gebunden (direkte Methode), oder aber werden indirekt nachgewiesen. Bei der indirekten Methode wird zunächst ein Primärantikörper an das gesuchte Epitop auf dem zu untersuchenden Gewebe gekoppelt und anschließend in einem zweiten Schritt ein gegen den Primärantikörper gerichteter (meist Fluorophor gelabelter) Sekundärantikörper zur Bindung gebracht. Der Nachweis auf Paraffinschnitten erfordert es oftmals, die Antigene in den Geweben im Vorfeld zu demaskieren, um die Bindung des Antikörpers an das Epitop zu ermöglichen. Die Demaskierung erfolgt hierbei, je nach Antikörper pH-abhängig durch 5 minütiges kochen der Objektträger mit den enthaltenen Gewebeschnitten in Citrat-, oder aber AP-Puffer, gefolgt von anschließendem raschen Abkühlen auf Eis, um die Gewebedenaturierung so gering wie möglich zu halten.

Ablauf:

- ◆ Die Gewebeschnitte werden wie beschrieben entparaffiniert.
- ◆ 3x 5 min in 1x TBS mit 0,05 % (v/v) Tween-20 waschen.
- ◆ 30 min mit 10 % (v/v) Schweineserum, 0,3 % (v/v) Triton X-100 in TBS-BSA Puffer blockieren.
- ◆ Blockierlösung abklopfen und Primärantikörper in TBS-BSA auftragen,
- ◆ Inkubation in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C.
- ◆ 3x 5 min in 1x TBS mit 0,05 % (v/v) Tween-20 waschen.
- ◆ Inkubieren Fluorochrom-gekoppelter Sekundärantikörper in 4 % (v/v) Schweineserum/TBS-BSA für 30 min bei RT in einer feuchten Kammer.
- ◆ 3 x 5 min in 1 x TBS mit 0,05 (v/v) % Tween-20 waschen.

Kernfärbung

- ◆ 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI; 1 mg/ml gelöst in ddH₂O) 1:1000 mit TBS-BSA verdünnen und ca. 5 min bei RT auf den Schnitten inkubieren.
- ◆ Schnitte 3 x 5 min in ddH₂O waschen, trocknen lassen und mit Kaiser-Gelatine eindeckeln.

2.2.10. Molekularbiologische Nachweismethoden

DNS *in situ*-Hybridisierung

Die Verwendung der *in situ*-Hybridisierung ermöglicht es Desoxy-, sowie Ribonukleinsäuresequenzen (DNS/RNS) gezielt in Geweben, wie auch *in vitro* in Zellen nachzuweisen. Hierzu wird eine künstlich generierte und markierte Sonde bestehend aus einer Nukleinsäuresequenz eingesetzt, die an die nachzuweisende Zielsequenz bindet. Dieser Vorgang wird als Hybridisierung bezeichnet. Die Markierung der Sonde kann dabei entweder direkt mit visuell detektierbaren Fluoreszenzfarbstoffen oder aber indirekt z.B. über Digoxigenin erfolgen. Bei der indirekten Markierung wird lediglich nach vollzogener Hybridisierung zusätzlich noch der Einsatz eines Antikörpers gegen das Markermolekül Digoxigenin benötigt. Die Visualisierung der verwendeten Anti-DIG-Antikörper erfolgt hierbei durch Farbreaktion eines an den Antikörper gekoppelten Moleküls, beispielsweise der Alkalischen Phosphatase (AP). Dieses setzt ein zur Verfügung gestelltes Substrat in Farbstoffe um. Bei dem dabei verwendeten Substrat handelt es sich häufig um: 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP), das in Verbindung mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) einen violett-blauen Farbstoff bildet. Die Farbreaktion besteht aus der von der alkalischen Phosphatase katalysierten Umsetzung von 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT). BCIP wird katalytisch durch enzymatische Abspaltung der Phosphatgruppe in Indoxyl überführt, wodurch sich in weiteren Schritten Indigo-Dimere bilden. Die Verstärkung der Färbung findet durch die Reduktion von NBT zum purpurnen Diformazan statt. Da beide Farbstoffe in unmittelbarer Nähe der AP-Moleküle entstehen färben sie die Umgebung der markierten DNA-Sonde dunkelviolett an und indizieren somit die vorliegende Zielsequenz im Präparat.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Technik der *in situ*-Hybridisierung dazu verwendet um *ex vivo*, in murine/porcine Blutgefäß-Explantate, applizierte humane Zellen mittels einer, an die humanspezifische Alu-Sequenz bindenden Sonde, nachzuweisen. (Die Digoxigenin markierten Alu-Sonden wurden, wie oben erwähnt, mit einem gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper nachgewiesen an den eine Alkalische Phosphatase gebunden war.)

In situ-Hybridisierung mittels Evo freedom[®] Roboter

Ablauf:

Vorbehandlung:

- ◆ Entparaffinieren 15 min in Xylol

Absteigende EtOH Reihe (Gewebe wässern)

- ◆ 5 min in Xylol/Ethanol (1:2).
- ◆ 5 min in 100 % Ethanol.
- ◆ 5 min in 70 % (v/v) Ethanol.
- ◆ 5 min in 50 % (v/v) Ethanol.
- ◆ Wässern 2 min in ddH₂O.
- ◆ Waschen 2 min in 0,9 % (v/w) NaCl.
- ◆ Inkubieren 5 min in 2,4 µl/ml Acetic Anhydrid gelöst in 0,1 M I
- ◆ Inkubieren (TEA) pH 8,0.
- ◆ Erneut 2,4 µl/ml Acetic Anhydrid zugeben und weitere 5 min.
- ◆ 2 min in PBS (2.10) spülen.
- ◆ 2 min in 0,9 % (v/w) NaCl spülen.
- ◆ 2 min in 70 % (v/v) Ethanol inkubieren.
- ◆ 2 min in 95 % (v/v) Ethanol inkubieren.
- ◆ 2 min in 100 % Ethanol inkubieren.
- ◆ Schnitte bei 37 °C trocknen

In situ Hybridisierungsprogramm des Roboters:

- ◆ Waschen 3x 5 min in PBS (2.6.1) mit 0,05 % (v/v) Tween-20.
- ◆ Inkubieren 2x 15 min in PBS mit 0,3 % (v/v) Triton X-100.
- ◆ Waschen 3x 5 min in PBS mit 0,05 % (v/v) Tween-20.
- ◆ 5 min mit Proteinase-K Puffer und 0,05 % (v/v) Tween äquilibrieren.
- ◆ Waschen 3x 5 min in PBS (2.6.1) mit 0,05 % (v/v) Tween-20.
- ◆ Inkubieren 2x 15 min in PBS mit 0,3 % (v/v) Triton X-100.
- ◆ Waschen 3x 5 min in PBS mit 0,05 % (v/v) Tween-20.
- ◆ 5 min mit Proteinase-K Puffer und 0,05 % (v/v) Tween äquilibrieren.

Prähybridisierung.

- ◆ Inkubieren 2x 30 min bei 85 °C in 100 ng/ml Sonde, gelöst in Hybridisierungspuffer
- ◆ Inkubieren 10 mM DTT.

Hybridisierung 5 h bei 37 °C.

- ◆ Waschen 5x 5 min bei 37 °C in 2x SSC (2.12.1) mit 0,05 % (v/v) Tween-20.
- ◆ Waschen 4x 15 min bei 37 °C in 0,1x SSC mit 0,05 % (v/v) Tween-20.
- ◆ Waschen 2x 5 min in Maleinsäurepuffer (2.12.1) mit 0,05 % (v/v) Tween-20.
- ◆ *Blockieren* 2x 15 min in Blockierungslösung (2.12.1) mit 0,05 % (v/v) Tween-20
- ◆ Inkubieren 2x 30 min mit anti-DIG-AP Antikörper 1:2000 verdünnt in Blockierungslösung.
- ◆ Waschen 4x 15 min in Maleinsäurepuffer mit 0,05 % (v/v) Tween-20 waschen.
- ◆ Äquilibrieren 2x 5 min mit AP-Puffer (2.12.1) pH 9,5.

Entwicklung

- ◆ Entwickeln der Schnitte in NBT/BCIP-Substratlösung im Dunkeln.
- ◆ Abschließend 3x mit ddH₂O waschen, trocknen und mit Kaiser Gelatine eindecken.

Humanspezifische Alu-Sonde und deren Herstellung

Alu Sequenzen bilden rund 10% des gesamten humanen Genoms. Sie stellen eine Gruppe säugerspezifischer sogenannter Tandem Regionen dar, deren Familie (Alu-repeats) sich ausschließlich in Primaten wieder findet, wodurch sie aufgrund ihrer spezifischen Herkunft dazu verwendet werden können humane Zellen von nicht humanen Zellen zu unterscheiden. Die Herstellung der Digoxigenin markierten humanspezifischen Alu-Sonde erfolgte mittels PCR gemäß Protokoll (Just et al. 2003). Hierzu wurde humane genomische DNS als Referenzsequenz aus Lebergewebe isoliert. Anschließend erfolgte die Vervielfältigung mittels PCR unter Verwendung von Primern, die an eine hoch konservierte Region, der human-spezifischen Alu-Sequenz binden. Die generierte Sonde umfasst 224 Basenpaaren (bp).

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR bildet sowohl eine wichtige Basis als auch ein potentes Werkzeug in der Molekularbiologie. Mit ihr ist es möglich geringste Mengen an Erbsubstanz (DNS) durch enzymatischen Einsatz von Polymerasen *in vitro* zu amplifizieren. Dabei geht das Produkt des jeweils vorherigen Zyklus als Edukt in die erneute Vervielfältigung ein – womit eine exponentielle Vervielfältigungsrate erreicht wird. Ausgehend vom der Original-DNS-Sequenz (dem Template) mit bekannter Länge und definierter Sequenz wird es mit Hilfe von zwei Primern, die die Zielsequenz an der Start und Endposition einrahmen möglich DNS-Fragmente von bis zu 3000 Basenpaar-Länge (3kbp) (Standard-PCR) zu amplifizieren.

Der Amplifikationszyklus der in einem Thermocycler stattfindet besteht im Wesentlichen aus drei aufeinander folgenden Schritten.

(1) Denaturierung/Schmelzen:

Hierbei wird die, als doppelsträngige DNS, vorliegende Zielsequenz stark erhitzt (auf ca. 95 °C) um die beiden, von Wasserstoffbrückenbindungen, zusammengehaltenen Stränge voneinander zu trennen.

(2) Primerhybridisierung/Annealing:

In der Regel erfolgt diese bei Temperaturen von ca. 55 °C – 65 °C. Unter diesen thermischen Bedingungen lagern sich die Primer spezifisch an die komplementären Bindungsstellen der offenliegenden Einzelstränge an.

(3) Polymerisation/ Elongation:

Im letzten Schritt des Zyklus startet die Polymerase mit der Verlängerung/ dem Auffüllen der Sequenz mit freien Nukleotiden (DNTP), von den 3'-Primerenden her, sodass am Ende dieses Schrittes ausgehend von einem Stück Doppelstrang-DNS zwei identische Doppelstränge vorliegen. Die hierfür benötigte Temperatur gibt die Polymerase mit ihrem jeweiligen Temperaturoptimum vor, sie liegt aber meist im Bereich von um die 70°C. Wiederholt man den Amplifikations-Zyklus so erhält man am Ende jeweils die doppelte Anzahl der anfangs vorliegenden DNS-Stränge. (2, 4, 8, 16, 32...).

PCR-Ansatz:

- ✦ 2,5 µl 10x Puffer (MgCl₂)
- ✦ 1 µl dNTPs (10 mM)
- ✦ 0,25 µl Amplitaq DNS-Polymerase
- ✦ 1 µl Primer forward (10 µM)
- ✦ 1 µl Primer reverse(10 µM)
- ✦ 5 µl Template DNS
- ✦ 25 µl ddH₂O

PCR-Bedingungen:

- ✦ Denaturierung: 95 °C, 10 min
- (1)** Denaturierung: 95 °C, 30 sec
- (2)** Primer-Annealing: 58 °C, 45 sec
- (3)** Elongation: 72 °C, 45 sec
- ✦ Elongation: 72 °C, 10 min

Die Schritte 1 – 3 wurden 25mal wiederholt

Sequenz der Alu-Primer:

- ✦ Forward: 5'-ACGCCTGTAATCCCAGCACTT-3'
- ✦ Reverse: 5'-TCGCCCAGGCTGGAGTGCA-3'

Agarose Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese nutzt die Eigenschaft Molekülgemische mittels eines elektrischen Feldes, gemäß ihrer Größe und Ladung aufzutrennen. Dies geschieht innerhalb eines Agarose-Gels, das sich in einer Pufferlösung befindet. Je nach Größe und Ladung bewegen sich die Moleküle dabei unterschiedlich schnell durch das Gel. Durch das engmaschige Netz des Agarose-Gels wird das aufzutrennende Molekülgemisch auf seiner Wanderung im elektrischen Feld mehr oder weniger behindert. Große Moleküle laufen langsamer als kleine, Moleküle mit großer Ladung schneller als die mit geringerer Ladung. Negativ geladene Moleküle, z.B. DNS/RNS, werden zur positiv geladenen Anode abgelenkt. Identische Moleküle wandern somit im Gel mit gleicher Geschwindigkeit auf gleicher Höhe und bilden dabei Banden aus (Abb. 2-13). Die Auswertung auf vorhandene Banden im Agarosegel erfolgt durch Färbung der Nukleinsäure-

moleküle mittels Ethidiumbromid. Diese können anschließend unter UV-Licht dargestellt und durch Vergleich mit einem während des Laufes mitaufgetragenen Größenstandards hinsichtlich ihrer Größe beurteilt werden. Das PCR-Produkt der Alu-Sonde wurde nach Amplifikation zur Auftrennung auf ein 2 % (v/w) Agarosegel aufgetragen und nach erfolgter Elektrophorese mit Ethidiumbromid (10 ng/ml) gefärbt, die Banden ausgeschnitten und aufgereinigt. Anschließend wurde die Sonde mit Digoxigenin (DIG) markiert. Hierzu fand das PCR-DIG Probe Synthesis Kit von (Roche) Verwendung. Gefolgt wurde dieser Schritt von einer Ethanol-Präzipitation Aufreinigung gemäß Protokoll des PCR-DIG Probe Synthese Kits.

Ladepuffer (Agarosegel):

- ◆ 40 % w/v Sucrose
- ◆ 0,25 % w/v Bromphenolblau
- ◆ in ddH₂O lösen

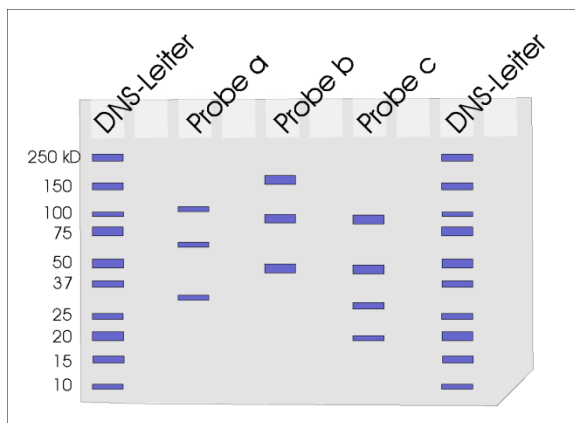


Abbildung 2-13: Skizze eines Agarose-Gels mit DNS-Leitern. Drei aufgetrennte Proben a-c nach Elektrophoreselauf.

Dot-Blot Analyse

Mittels Dot-Blot-Analyse ist es bspw. möglich die Konzentration einer per PCR hergestellten Sonde zu bestimmen. Hierzu wird eine Verdünnungsreihe eines Standards bekannter Konzentration mit der erstellten Sonde verglichen. Dazu werden beide, Standardreihe sowie erstellte Sonde, auf eine Nitrozellulosemembran pipettiert und angefärbt. Die Konzentration der hergestellten Sonde kann danach anhand eines optischen Vergleichs der Farbintensitäten bestimmt werden (Abb. 2-14).

Ablauf:

Je Verdünnungsstufe wird 1 µl Lösung auf eine Hybond-N-Membran aufgetragen und diese anschließend kurz getrocknet. Membran 30 sec bei 120 °C backen.

- ✦ 3x 2 min in 1x Maleinsäurepuffer waschen.
- ✦ 10 min in 1x Blockierungslösung + 4 % (v/v) Schafserum blockieren.
- ✦ 1 h Inkubation mit Schaf Anti-DIG-Alkalische Phosphatase Antikörper
- ✦ (1:5000) in 1x Blockierungslösung.
- ✦ 3x 2 min in 1x Maleinsäurepuffer waschen.
- ✦ 2x 2 min in AP-Puffer waschen.
- ✦ Dot-Blot mit NBT/BCIP-Substrat ca. 2 h bei RT im Dunkeln entwickeln.
- ✦ Reaktion mit ddH₂O abstoppen.
- ✦ 20x Saline-Sodium-Citrat (SSC)-Puffer:
 - ✦ 3 M NaCl
 - ✦ 0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
 - ✦ pH auf 7,0 einstellen, anschließend autoklavieren.
- ✦ Verdünnungspuffer (10 ml):
 - ✦ 5 ml ddH₂O
 - ✦ 3 ml 20x SSC
 - ✦ 2 ml Formaldehyd
- ✦ 10x Maleinsäurepuffer:
 - ✦ 1 M Maleinsäure
 - ✦ 1,5 M NaCl
 - ✦ pH auf 7,0 mit 10 M NaOH einstellen, anschließend autoklavieren.
- ✦ für 1x Gebrauchslösung 0,05 % (v/v) Tween-20 zugeben.
- ✦ Blockierungslösung 1:10 mit Maleinsäurepuffer verdünnen.
- ✦ Alkalische Phosphatase (AP)-Substratpuffer:
 - ✦ 0,1 M Tris/HCl
 - ✦ 0,1 M NaCl
 - ✦ pH auf 9,5 einstellen.
- ✦ NBT/BCIP-Substratlösung:
 - ✦ 3,5 µl/ml BCIP
 - ✦ 4,5 µl/ml NBT
 - ✦ In AP-Puffer verdünnen.

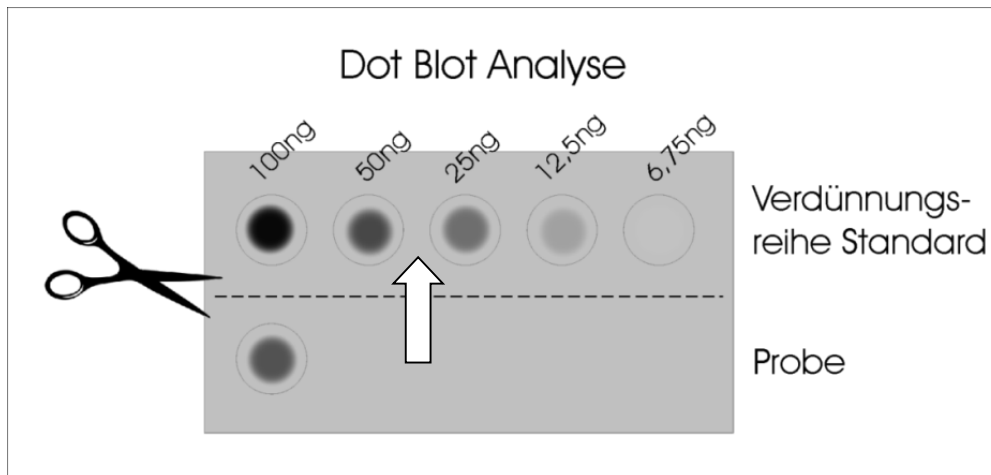


Abbildung 2-14: Skizze einer Dot-Blot-Analyse:
Nach Abschneiden und vergleichen der Probe mit dem Standard ergibt sich eine ungefähre Konzentration zwischen 50 ng und 25 ng.

Proteinnachweis mittels Western Blot

Der Western Blot ist ein analytischer Nachweis für Proteine. Er zeigt an, ob ein Gen translatiert und damit auf Proteinebene exprimiert wird. Um dies zu überprüfen muss daher zunächst eine Proteinisolierung des Gewebes/der Zellen erfolgen. Ist dies geschehen wird das Proteingemisch in einem Acrylamidgel (einer „SDS-Page“) elektrophoretisch aufgetrennt und zu Nachweiszwecken temporär visualisiert. Anschließend folgt im Transferverfahren der Immunoblot auf eine PVDF-Membran (Abb. 2-15). Auf dieser kann immunologisch mittels einer Antikörperfärbung ein vorhandenes Protein nachgewiesen werden. Nach enzymatischer Ablösung der Zellen aus den Petrischalen, wurden diese kurz zentrifugiert und anschließend in RIPA-Puffer lysiert. Die Proteinkonzentration wurde jeweils auf ca. 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt. Es erfolgte die Beladung der Acrylamid Taschen (Sammel-, Trenngel) mit rund 20 μg Protein je Tasche in Probenpuffer. Die Auftrennung selbst fand im Laufpuffer in der Blot-Kammer für 45 Minuten bei 160 V statt. Die Proteine wurden bei 4 °C für 12 Stunden und 40 V im Blot-Puffer auf eine PVDF Membran transferiert, anschließend die PVDF Membran entnommen die Proteine auf dieser blockiert und eine AP-basierte Immunochemie gegen die Epitope AKT und Phospho-AKT (Ser 473) durchgeführt.

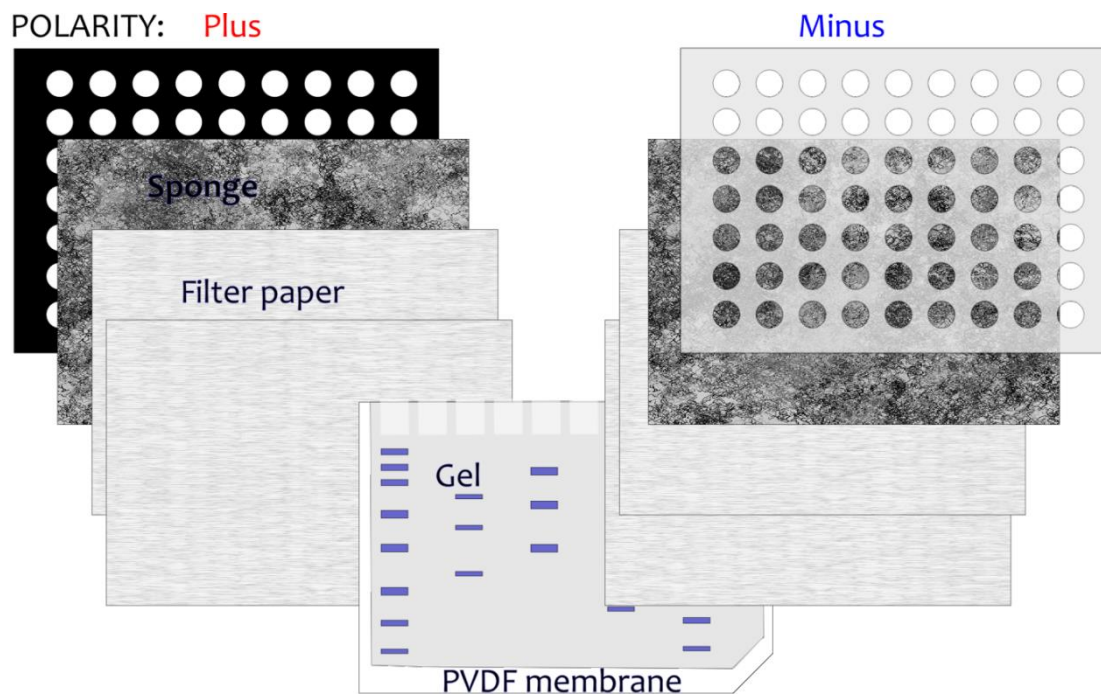


Abbildung 2-15: Skizze der Proteinübertragung aus dem SDS-Gel auf die PVDF Membran

3. ERGEBNISSE

Ziel der Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation war es, mögliche Ansatzpunkte zur therapeutischen Intervention und Regeneration von geschädigtem Blutgefäßendothel nach erfolgter Stenosebehandlung mittels perkutaner transluminaler Angioplastie (PTA) auf ihre Anwendbarkeit hin zu überprüfen. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Untersuchungsansätze gewählt: Zum einen ein pharmazeutischer Ansatz mit der Substanz Shikonin als Beschichtung für den Einsatz von endovaskulären Gefäßstützen (Stents) sog. „drug eluting stents“ (DES), zum anderen ein molekularbiologischer Ansatz unter Verwendung eines eigens hierfür entwickelten bispezifischen Antikörperkonstrukts zur selektiven Bindung von Endothelvorläuferzellen (EPCs) aus dem Blutstrom, dies jedoch ohne die Verwendung und Applikation von endovaskulären Stents.

3.1. Pharmazeutischer Ansatz:

Shikonin als mögliches inhibitorisches Pharmakon

Das Pharmakon Shikonin wurde und wird aufgrund seiner vielfältig dokumentierten Wirkungen als potente Droge für zahlreiche Anwendungen gehandelt und aufgrund dessen in dieser Arbeit als mögliches Therapeutikum der Wahl untersucht. Die Applikation der Substanz soll bei erfolgreicher Testung als pharmakologische Beschichtung für endovaskuläre Gefäßstützen (sogenannte „drug eluting stents“ DES) herangezogen werden. Shikonin wurde daher auf sein Potenzial bezüglich einer Zelltyp-spezifischen Inhibition der besonders teilungsaktiven und damit für eine Re-Stenose verantwortlichen Zelltypen, wie glatter Muskelzellen und Fibroblasten hin untersucht. Durch die Zellselektive Inhibition soll eine schnellere und verbesserte Re-Endothelialisierungsquote nach Stentimplantation erreicht, und dadurch eine mögliche Re-Stenose verhindert werden. Hierzu wurden drei Re-Stenose-beteiligte Zelltypen gewählt. Neben Fibroblasten, die unter anderem in der Tunika intima zu finden sind, waren dies glatte Muskelzellen der Tunika media, sowie die für eine Re-Endothelialisierung wichtigen Endothelzellen (Abb. 3-1). Als ausdifferenzierte Zellen kleiden Endothelzellen einerseits intraluminal das Blutgefäß aus, andererseits zirkulieren sie als Progenitorzellen (EPCs) in geringer Anzahl frei im Blutstrom, um an geschädigte Stellen zu adhären („homen“), und dort vor Ort durch Integration und

Proliferation wieder einen vollständigen und intakten Endothelmonolayer auszubilden. Fibroblasten und glatte Muskelzellen sind aufgrund ihrer bedeutend höheren Teilungsrate maßgeblich für die Entstehung von frühen Re-Stenosen durch neointimale Hyperplasien nach Interventionen wie Stent-Angioplastien mitverantwortlich. Im Rahmen der Untersuchung wurde die *in vitro*-Wirkung von Shikonin zunächst mit einer bereits für den Einsatz als Beschichtung von Stents (DES) etablierten Substanz - dem Rapamycin - verglichen. Rapamycin nimmt hierbei über einen in allen Zellen inhärenten Signalweg, den mTOR-„pathway“ (mTOR – „mammalian target of rapamycin“) direkt auf die Zellzyklusaktivität Einfluss und inhibiert dadurch die Zellteilung (Li, Kim et al. 2014, Zheng, Florentino et al. 1995).

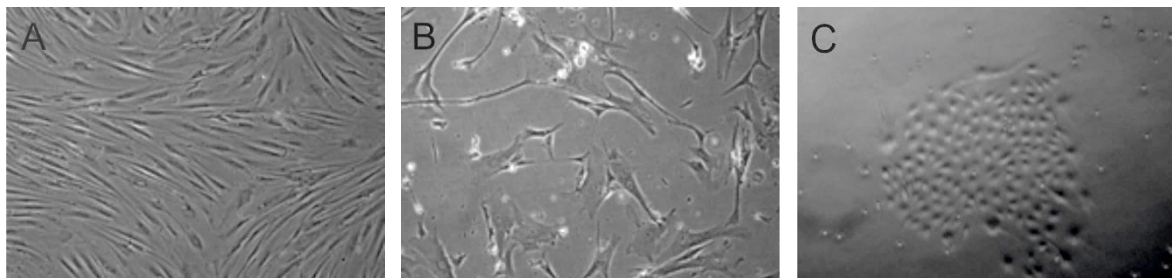


Abbildung 3-1: Mikroskopische Phasenkontrastaufnahme der zur pharmazeutischen Untersuchung verwendeten humanen Zelltypen.

A: immortalisierte Fibroblastenzelllinie (FF239); B: primäre humane aortale glatte Muskelzellen (AoSM); C: primäre humane aortale Endothelzellen (HAEC).

Abbildung 3-1 zeigt eine Übersicht, der zur Untersuchung des Pharmakons Shikonin herangezogenen Zelltypen. Zu beobachten sind die jeweiligen typischen morphologischen Eigenschaften der *in vitro*-Kulturen. A: Die humane immortalisierte Fibroblastenzelllinie FF239 mit ihren gleichmäßigen stark spindelförmigen homogenen Zellformen und abgeflachten zentralen Zellkernen. B: Primäre humane aortale Muskelzellen mit ihrer vielgestaltigen, teils kuboiden, teils mehrfach verzweigten Formen und ihren langen und dünnen unregelmäßigen Zellenden. C: Primäre humane aortale Endothelzellen mit ihrer charakteristisch runden Zellmorphologie und der Anordnung in typischer Kopfsteinpflasterform.

Voruntersuchungen zur Beschichtungsdosis

Die Konzentrationsfindung der Beschichtungsdosis des Pharmakons Shikonin basierte zunächst auf einer vor Untersuchungsbeginn eruierten Einsatzbandbreite

bisheriger Shikonin-Studien. Der hieraus resultierende für Zellkultur relevante Bereich lag zwischen 0 μM und 256 μM für die Substanz Shikonin, woran sich auch die Vergleichssubstanz Rapamycin zunächst orientierte (Abbildung 3-2). Erste Viabilitätsuntersuchungen mit Shikonin ergaben jedoch bereits eine Reduktion der Einsatzbandbreite auf 64 μM , da nach 48-stündiger Inkubation auf mit Shikonin beschichteten Untergründen keine vitalen Zellen mehr nachweisbar waren. Für das Vergleichspharmakon Rapamycin fand im Rahmen des Zellaufweises per immunzytochemischer Färbung hingegen sogar eine Dosiserweiterung auf 288 μM statt.

		Shikonin														
μM	0	1	2	3	4	6	8	12	16	24	32	48	64	96	128	256
ng/cm ²	0,00	1,44 ⁻⁵	2,88 ⁻⁵	4,32 ⁻⁵	5,77 ⁻⁵	8,65 ⁻⁵	1,15 ⁻⁴	1,73 ⁻⁴	2,31 ⁻⁴	3,46 ⁻⁴	4,61 ⁻⁴	6,92 ⁻⁴	9,23 ⁻⁴	1,38 ⁻³	1,85 ⁻³	3,69 ⁻³

		Rapamycin														
μM	0	1	2	3	4	6	8	12	16	24	32	48	64	96	128	288
ng/cm ²	0,00	4,57 ⁻⁵	9,14 ⁻⁵	1,37 ⁻⁴	1,83 ⁻⁴	2,74 ⁻⁴	3,66 ⁻⁴	5,49 ⁻⁴	7,31 ⁻⁴	1,10 ⁻³	1,46 ⁻³	2,19 ⁻³	2,93 ⁻³	4,39 ⁻³	5,85 ⁻³	1,32 ⁻²

Abbildung 3-2: Tabelle des Konzentrationsbereiches.

Dieser wurde vor Studienbeginn aus der Literaturrecherche eruiert. Obere Tabelle für das Naphtochinonderivat Shikonin, untere Tabelle für die Vergleichssubstanz Rapamycin, die bereits als Pharmakon für DES Anwendung findet. Rot markiert sind jeweils die maximalen pharmazeutischen Konzentrationen der Substanzen basierend auf den zellulären Voruntersuchungen. Substanzkonzentrationen in μM (obere Zeile), sowie in ng/cm² Substanz (jeweils in der unteren Zeile).

Untersuchungsschema: Pharmazeutischer Ansatz

Abbildung 3-3 zeigt schematisch den Untersuchungsablauf der pharmazeutischen Studie bezüglich einer möglichen selektiven Proliferationsinhibition. Nach Beschichtung der Edelstahlplättchen ((X2CrNiMo17-12-2) AISI316L/V4A) mit jeweils 50 μl Pharmakonlösung der entsprechenden Konzentration und anschließender Evaporation des Lösungsmittels für mindestens 24h wurden humane aortale Endothelzellen (HAEC), glatte Muskelzellen (AoSM) sowie Fibroblasten (FF239) auf diesen ausplattiert und für 48 Stunden unter Standard-Zellkulturbedingungen in ihren entsprechenden Medien kultiviert. Im Anschluss an die Kultivierung fanden die Analysen bezüglich der Zellviabilität, des Zelltods sowie der Zellzahl/Zellmorphologie im Rahmen einer immunzytochemischen Färbung für Vimentin statt.

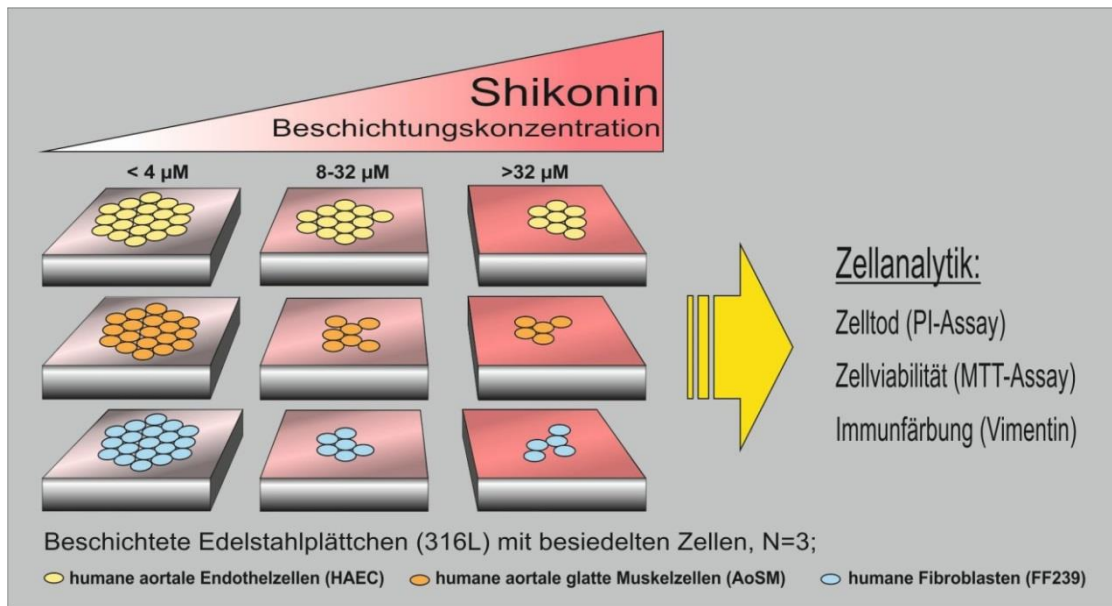


Abbildung 3-3: Schema des Untersuchungsablaufs zur pharmazeutischen Zellinhibition. Nach 48 stündiger Kultivierung aller drei Zelltypen unter Standardzellkulturbedingungen, auf mit pharmazeutisch unterschiedlichen Konzentrationen beschichteten Edelstahlzellträgern der Güte WNr. 1.4404 ((X2CrNiMo17-12-2) AISI316L/V4A) fand die Zellanalytik in Form von Zell-Assays für MTT, PI, sowie einer Immunfluoreszenzfärbung für Vimentin statt.

3.1.1. Wirkungsnachweis von Shikonin und Rapamycin

Zellviabilitäts-Assay (MTT)

Zur Untersuchung der Zellviabilität fand der MTT-Assay Anwendung. Dieser beruht auf einer intrazellulären, enzymatischen Umsetzung des Formazansalzes (MTT) in ein lösliches Farbprodukt. Die Intensität der Färbung hängt von dem metabolischen Zellumsatz ab und steigt mit wachsendem Zellumsatz. Dadurch, stellt die Intensität der Färbung einen Indikator für die Viabilität der Zellen dar (Abb. 36 ff).

In Abbildung 3-4 wurden für ansteigende Konzentrationen zwischen der Kontrolle (0 μM) bis 16 μM Shikoninbeschichtung signifikante Viabilitätsabnahmen bei allen drei Zelltypen HAEC (Endothelzellen) und AoSM (gl. Muskelzellen) sowie FF239 (Fibroblasten) beobachtet. Diese lagen für HAEC zwischen der Kontrolle **0 μM** : (100; 100; 100) und **8 μM** : (14,253; 5,35; 33,435) sowie **0 μM** und **16 μM** : (5,556; 2,673; 20,434) (Median; 25 % Perzentile; 75 % Perzentile), ferner zwischen **1 μM** : (100,643; 89,277; 101,57) und 8 μM bzw. 1 μM und 16 μM , sowie zwischen **2 μM** : (84,722; 78,819; 88,779) und 16 μM (Median; 25 % Perzentile; 75 % Perzentile) $P < 0,05$, $N = 9$).

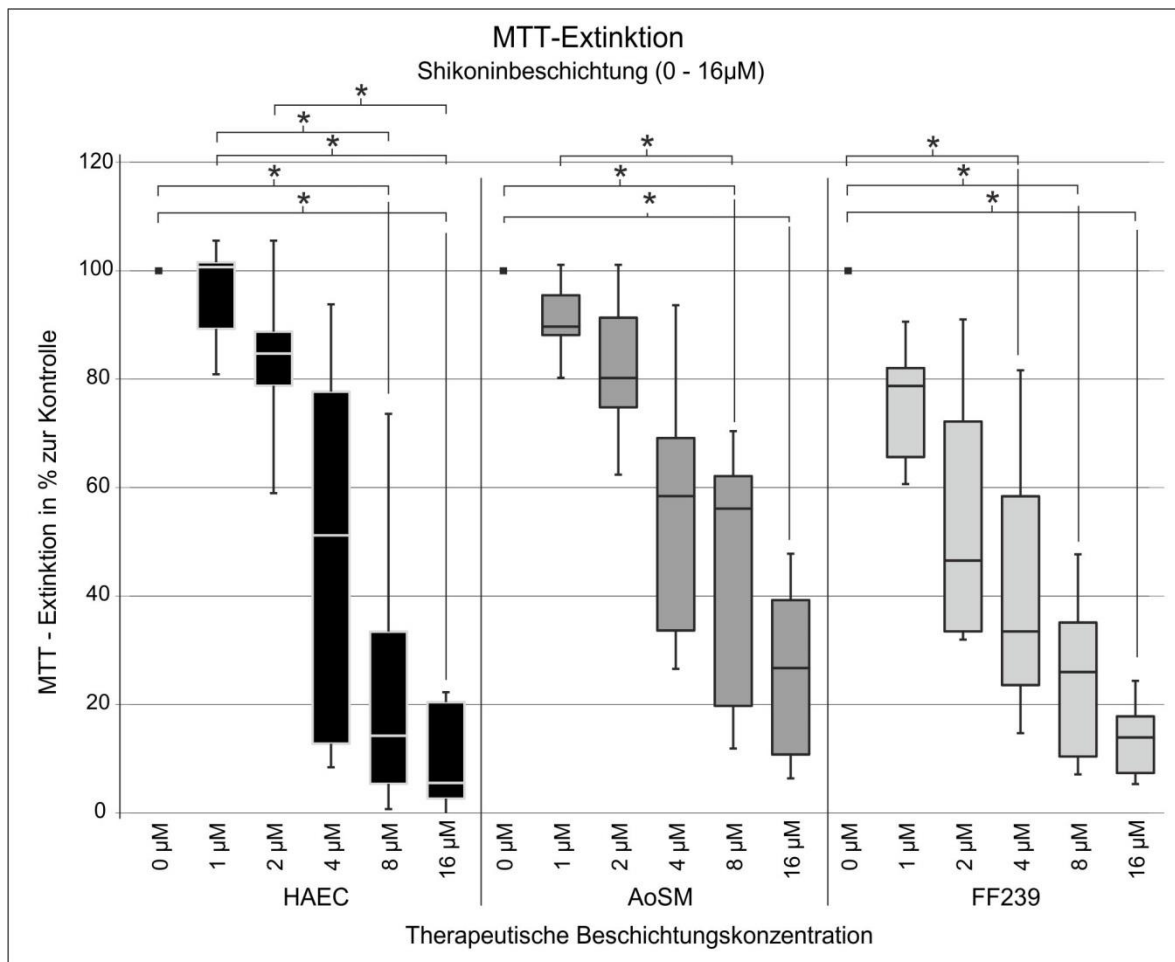


Abbildung 3-4: Extinktionswerte des MTT-Assays im Vergleich zur Kontrolle, der für 48 Stunden auf Shikonin kultivierten Zellen.

Die Boxen des Plot-Diagramms, auf der Ordinate aufgetragen stellen den Bereich von der 25 % bis zur 75 % Perzentile dar, die Mittellinie repräsentiert den Median, die Antennen die minimalen und maximalen Datenpunkte der MTT-Extinktion. Die Abszisse bildet die Beschichtungsdosis der Untersuchungssubstanz Shikonin für die einzelnen Zelltypen im Bereich von 0 μ M – 16 μ M ab. Die Graustufen codieren für die unterschiedlichen Zelltypen. Die Sterne zeigen eine statistische Signifikanz zwischen den beiden markierten Gruppen an „Kruskal Wallis ANOVA on Ranks“ (PostHocTest: Dunn’s Method). N = 9, P < 0,05.

Signifikante Abnahmen bei den glatten Muskelzellen AoSM fanden zwischen **0 μ M**: (100; 100; 100) und **8 μ M**: (19,764; 56,154; 62,12) sowie zwischen 0 μ M und **16 μ M**: (26,694; 10,774; 39,228) Beschichtung. Ferner waren die Unterschiede zwischen **1 μ M**: (89,706; 88,136; 95,49) und 16 μ M (Median; 25 % Perzentile; 75 % Perzentile) p < 0,05, N = 9) ebenfalls signifikant. Die Fibroblasten wiesen signifikante Abnahmen zwischen **0 μ M**: (100; 100; 100) und **4 μ M**: (23,548; 33,503; 58,393), zwischen 0 μ M und **8 μ M**: (10,391; 25,987; 35,11) wie auch zwischen 0 μ M und **16 μ M** auf: (7,387; 13,943; 17,796) auf (Median; 25 % Perzentile; 75 % Perzentile). P < 0,05. N = 9).

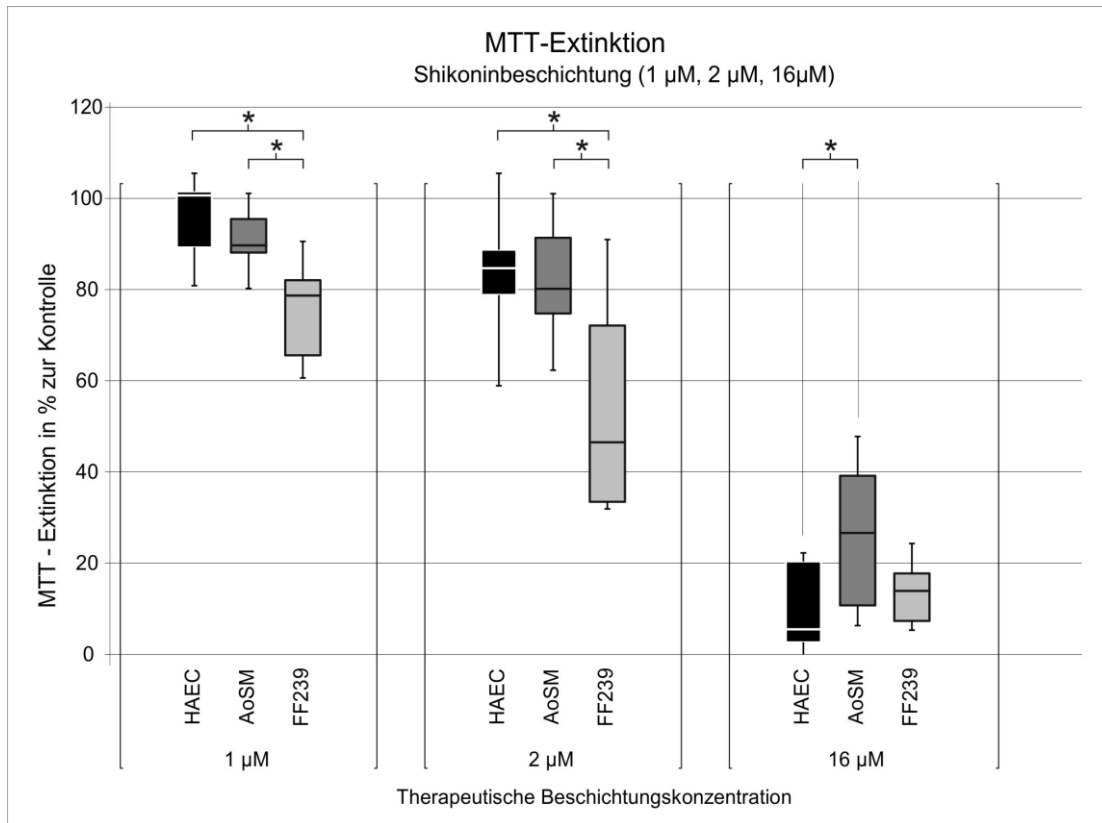


Abbildung 3-5: Prozentuale Extinktionswerte des MTT-Assays im Vergleich zur Kontrolle aus Abbildung 3-4 für die Konzentrationen 1 µM, 2 µM und 16 µM (Shikonin).

Die Boxen des Plot-Diagramms, auf der Ordinate aufgetragen stellen den Bereich von der 25 % bis zur 75 % Perzentile dar, die Mittellinie repräsentiert den Median, die Antennen die minimalen und maximalen Datenpunkte der MTT-Extinktion. Die Abszisse bildet die Beschichtungskonzentrationen der Untersuchungssubstanz Shikonin im Bereich von 0 µM – 16 µM ab. Die Graustufen codieren für die unterschiedlichen Zelltypen. Die Sterne zeigen eine statistische Signifikanz zwischen den beiden markierten Gruppen an „Kruskal Wallis ANOVA on Ranks“ PostHoc-Test (Dunn’s Methode). N = 9, P < 0,05.

Abbildung 3-5 zeigt den Wirkungsvergleich der Beschichtungssubstanz Shikonin aus Abbildung 3-4 auf alle drei Zelltypen für die einzelnen Dosisbereiche aufgetragen. Hierbei sind signifikante Unterschiede zwischen den Zelltypen innerhalb einzelner Dosisbereiche zu beobachten. Es unterscheiden sich die Endothelzellen (HAEC) von den Fibroblasten (FF239) im Dosisbereich von 1 µM Beschichtung voneinander, wobei die Endothelzellen die jeweils höhere MTT-Extinktion aufweisen: **1 µM: HAEC** (100,643; 89,277; 101,57), **FF239** (78,744; 65,631; 82,071). **2 µM** Shikoninbeschichtung, auch hier liegt die Extinktion der Fibroblasten unter der, der Endothelzellen. **HAEC** (84,722; 78,819; 88,779), **FF239** (46,565; 33,47; 72,168). Die glatten Muskelzellen haben in beiden Beschichtungs-

bereichen (1 μM und 2 μM) ebenfalls eine signifikant höhere Extinktion im Vergleich zu den Fibroblasten. **1 μM : AoSM** (89,706; 88,136; 95,49) zu **FF239** (78,744; 65,631; 82,071). **2 μM Shikoninbeschichtung: AoSM** (80,202; 74,803; 91,35) zu **FF239** (46,565; 33,47; 72,168). Bei **16 μM Beschichtung** sind hingegen signifikante Unterschiede zwischen den Endothelzellen (HAEC) und glatten Muskelzellen (AoSM) zu erkennen, die eine stärkere Beeinflussung der HAEC-Zellen zeigen. **HAEC:** (5,556; 2,673; 20,434), **AoSM:** (26,694; 10,774; 39,228) (Median; 25 % Perzentile; 75 % Perzentile) $P < 0,05$; $N = 9$).

Um die Wirksamkeit von Shikonin intensiver zu untersuchen und besser abschätzen zu können, erfolgten Vergleichsexperimente mit der Kontrollsubstanz Rapamycin. Rapamycin ist ein bereits etabliertes Pharmakon und wird als Beschichtung auf Stents (DES) verwendet. Die Beschichtungsdosen wurden in Anlehnung an die Substanz hierbei konstant gehalten. Sie umfassten ebenfalls den Bereich von 0 μM bis 16 μM Konzentration.

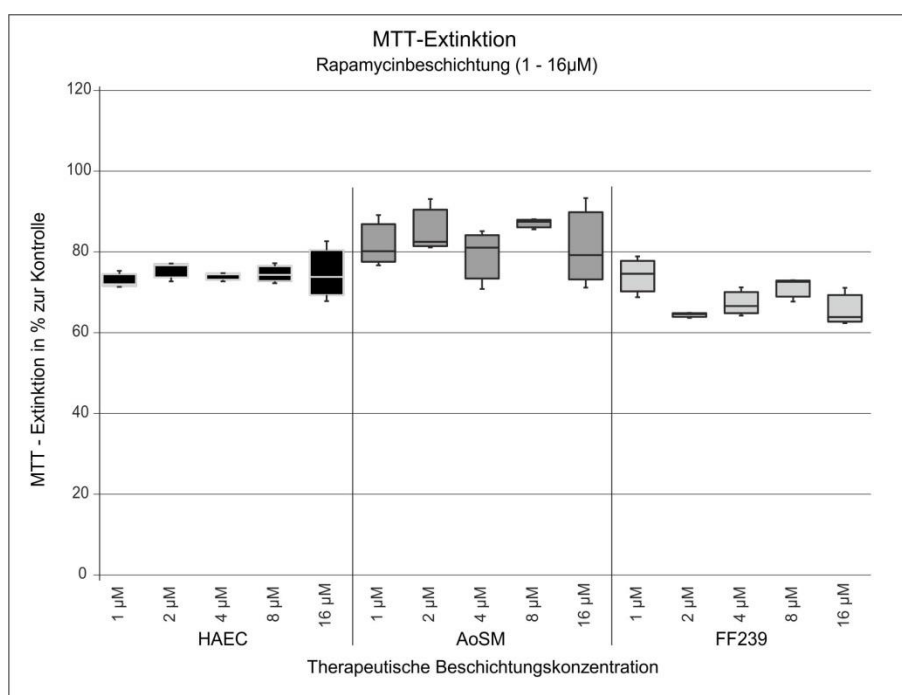


Abbildung 3-6: Prozentuale Extinktionswerte des MTT-Assays im Vergleich zur Kontrolle (Rapamycin).

Die Zellen hierfür wurden für 48 Stunden auf Beschichtungskonzentrationen (Rapamycin) von 0 μM bis 16 μM kultiviert. Die Boxen des Plot-Diagramms, auf der Ordinate aufgetragen stellen den Bereich von der 25 % bis zur 75 % Perzentile dar, die Mittellinie repräsentiert den Median, die Antennen die minimalen und maximalen Datenpunkte der MTT-Extinktion. Die Abszisse bildet die Beschichtungsdosis der Untersuchungssubstanz Rapamycin für die einzelnen Zelltypen im Bereich von 0 μM – 16 μM ab. Die Graustufen codieren für die unterschiedlichen Zelltypen. $N = 3$, $P < 0,05$.

Das Pharmakon Rapamycin in Abbildung 3-6 zeigt als Vergleichssubstanz bei identischer Beschichtungskonzentration (0 μM bis 16 μM) für den betrachteten Zeitraum von 48 Stunden keine signifikanten Extinktionsabnahmen trotz ansteigender Pharmakon-Dosis.

Zelltod-Assay (PI)

Der PI-Assay beruht auf der Aufnahme, von dem Medium zugegebenem, Propidiumiodid (PI). Die Zellmembranen vitaler Zellen sind PI-impermeabel, die Zellmembranen geschädigter/letaler Zellen hingegen nicht. Das fluoreszierende Molekül PI akkumuliert sich daher in geschädigten/letalen Zellen, es interkaliert dort im Kern an die DNS.

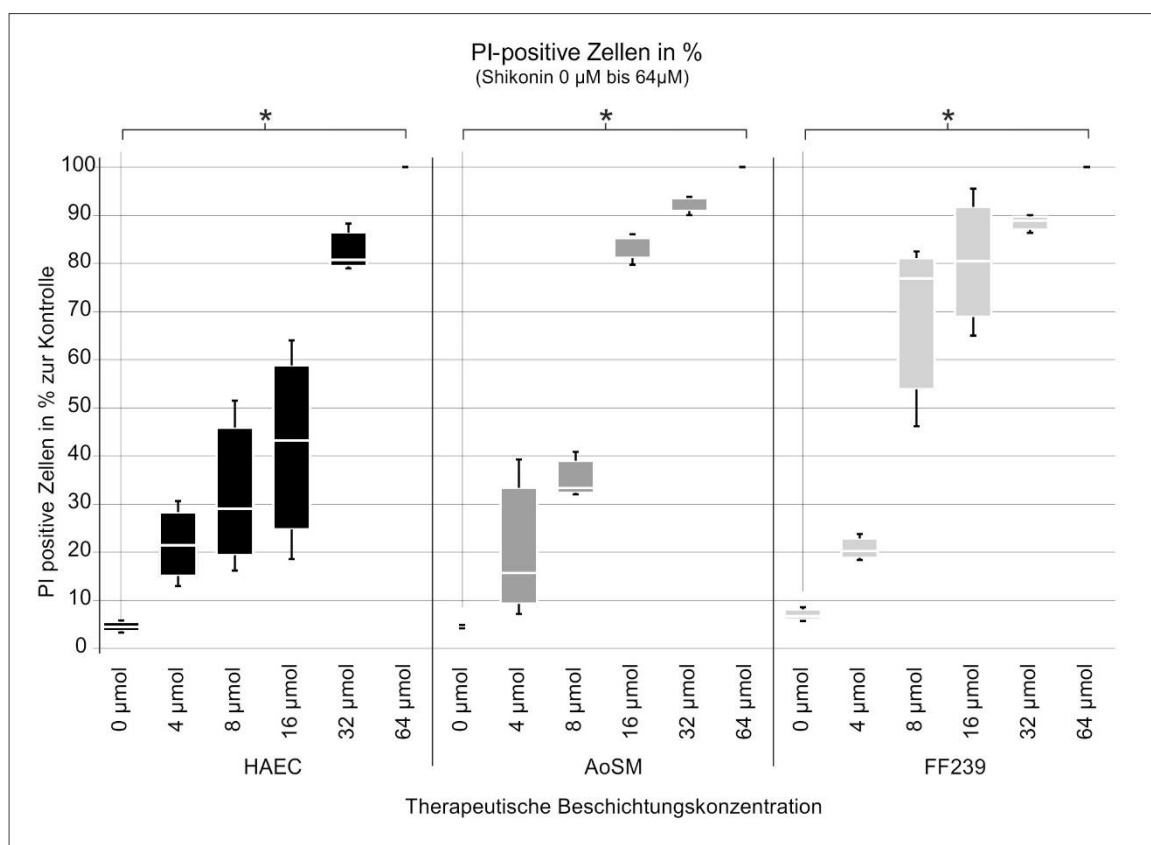


Abbildung 3-7: Quantifizierung des Zelltods (PI-Einlagerung) in Abhängigkeit zur Beschichtungskonzentration mit Shikonin.

Die Ordinate zeigt die Anzahl PI-positiver Zellen in % zur Kontrolle. Die Boxen des Plot-Diagramms, auf der Ordinate aufgetragen stellen den Bereich von der 25 % bis zur 75 % Perzentile dar, die Mittellinie repräsentiert den Median, die Antennen die minimalen und maximalen Datenpunkte des Verhältnisses PI-positiver zu PI-negativer Zellen in %. Die Abszisse bildet die Beschichtungskonzentrationen der Untersuchungssubstanz Shikonin im Bereich von 0 μM – 64 μM ab. Die Graustufen codieren für die unterschiedlichen Zelltypen. Die Sterne zeigen eine statistische Signifikanz zwischen den beiden markierten Gruppen an. „Kruskal Wallis ANOVA on Ranks“, (PostHoc Test Dunn's Methode), $P < 0,05$. $N = 3$.

Hierdurch können die geschädigten, mit PI angereicherten Zellen fluoreszenzmikroskopisch visualisiert und quantifiziert werden. Abbildung 3-7 zeigt die Anzahl PI-positiver Zellen in Prozent, abhängig von der Konzentration der Metallplättchenbeschichtung Shikonin. Es ist eine wirkungsspezifische Zunahme PI-positiver, also letaler Zellen mit steigender Shikoninkonzentration zu beobachten. Dies bedeutet, dass mit steigender Beschichtungskonzentration alle drei Zelltypen nachweisbare Letalitätszunahmen aufweisen. Im Bereich zwischen 0 μM und 64 μM zeigen sich hierbei für alle drei Zelltypen signifikante dosisabhängige Wirkungen. Eine zelltypspezifische Wirkung innerhalb der Dosisbereiche konnte hingegen, auf den Daten des Zelltod-Assays basierend, nicht verzeichnet werden.

Die Daten des PI-Assays unterstützen die Aussage, dass es sich bei Shikonin um ein potentes Pharmakon handelt, das bereits im Konzentrationsbereich von 64 μM inhibitorische/ toxische Wirkungen erzielt. In Abhängigkeit von der Konzentration der Beschichtung ließen sich signifikante Zuwachsraten letaler Zellen mit steigender Dosis für alle drei Zelltypen beobachten. Im Detail umfassten diese jeweils die Dosisbereiche: 0 μM vs. 64 μM mit **HAEC 0 μM** (4,605; 3,849; 5,976) und **HAEC 64 μM** (100; 100; 100) (Median; 25 % Perzentile; 75 % Perzentile) $P < 0,05$. $N = 3$. Für AoSM und FF239 waren ebenfalls signifikante Letalitätseinflüsse zwischen 0 μM und 64 μM ($P < 0,05$, $N = 3$) nachweisbar. **AoSM 0 μM** : (4,388; 4,222; 5,234), und **AoSM 64 μM** : (100; 100; 100) **FF239 0 μM** : (6,702; 5,921; 8,104) **FF239 64 μM** : (100; 100; 100) (Median; 25 % Perzentile; 75 % Perzentile) $P < 0,05$, $N = 3$).

Der Untersuchung des Zelltodes mittels PI-Assay folgte ein immunzytochemischer Nachweis des Zytoskeletts nach 48 stündiger Kultivierung der Zellen auf den beschichteten Edelstahlzellträgern anhand einer Vimentin-Färbung.

Immunzytochemische Zytoskelettfärbung (Vimentin)

Vimentin stellt als Typ-III Intermediärfilament aus der Gruppe der Desmine (vergl.: GFAP, Desmin, Peripherin) ein Molekül des Zytoskeletts dar, das bei Wirbeltieren von allen Zellen mesenchymalen Ursprungs gebildet wird (Abb. 3-8). Da alle der hier verwendeten Zelltypen mesenchymalen Ursprungs sind exprimieren sowohl HAEC, AoSM als auch FF239 das Protein Vimentin.

Ergebnisse

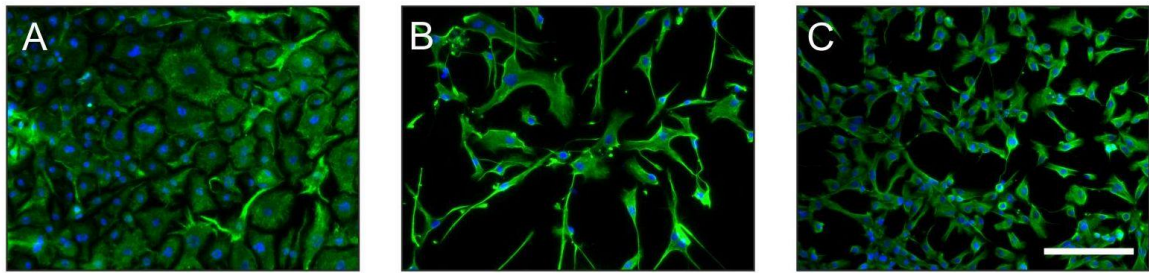


Abbildung 3-8: Immunzytochemische Färbung des Zytoskeletts (Vimentin)

A: aortale Endothelzellen (HAEC), B: aortale glatte Muskelzellen (AoSM) und C: Fibroblasten (FF239). Grün gefärbt die Vimentinfilamente mit Alexa488-Fluorochrom, blau Kernfärbung mit DAPI, Maßstab: 100 μm .

Zellen, die in der Lage sind auf den mit Pharmaka beschichteten Plättchen zu adhären und dort zu persistieren, lassen sich mittels Antikörperfärbungen gegen ihr Zytoskelett (Vimentin) nachweisen und fluoreszenzmikroskopisch visualisieren.

Zellnachweis mittels Vimentinfärbung

Mit steigender Einsatzkonzentration der Pharmakonbeschichtung steigt auch der inhibitorische (toxische) Einfluss auf die Zellen, wodurch die Zahl der adhärenen und damit nachweisbaren Zellen sinkt (Abb. 3-9).

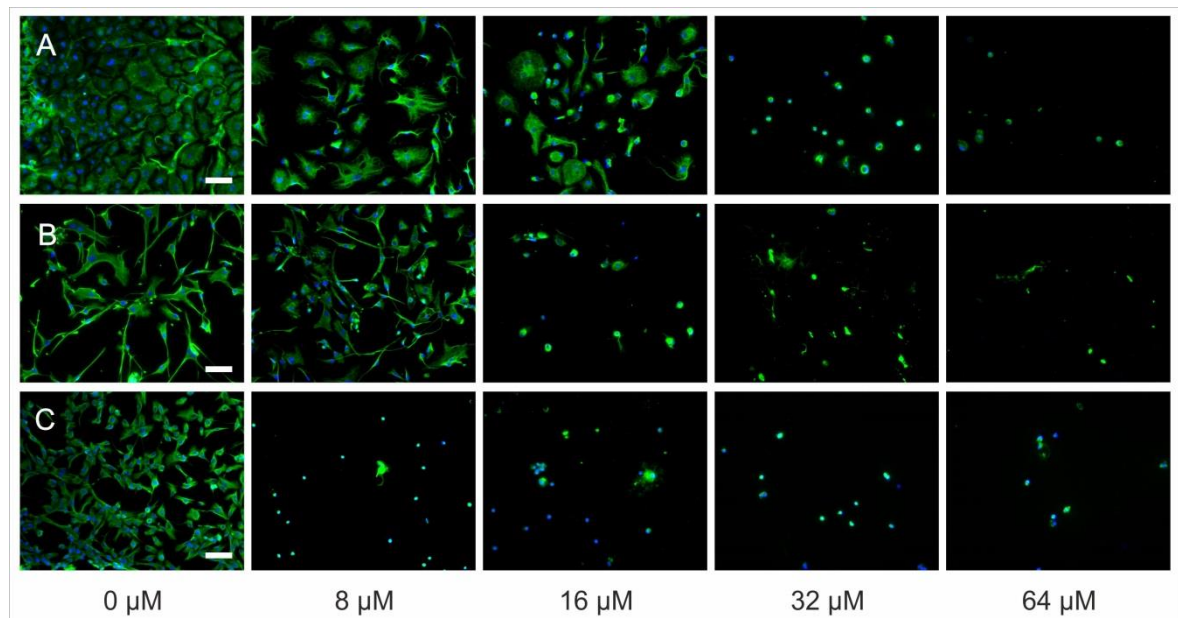


Abbildung 3-9: Immunzytochemische Fluoreszenzfärbung der drei Zelltypen nach 48 stündiger Kultivierung auf Shikonin-beschichteten Edelstahlplättchen.

Dargestellt sind die Vimentinfärbungen (A: HAEC, B: AoSM, C: FF239) mit steigenden Konzentrationen der Substanz Shikoninbeschichtung (0 - 64 μM Konzentration). Grün gefärbt stellen sich die Vimentinfilamente, blau gefärbt die Kerne dar (DAPI), Maßstab: 50 μm .

Die visualisierbaren Zellen bilden über ihre Anzahl und Morphologie ein direktes Maß für die Vitalität der Zellen auf den beschichteten V4A-Plättchen. Zahl und Zustand nehmen mit steigender pharmazeutischer Beschichtungskonzentration ab. Abbildung 3-9 zeigt exemplarisch das Ergebnis der immunzytochemischen Fluoreszenzfärbungsreihe, der auf den beschichteten Edelstahlzellträgern kultivierten Zellen. Mit steigender Shikoninbeschichtung zeigt sich zunächst für alle Zelltypen eine sinkende Anzahl adhärenter Zellen, dies jedoch in unterschiedlich starkem Maß. Während die Endothelzellen in dieser Abbildung bis zur Konzentration von 16 μM mit nur leichten morphologischen Änderungen des Zytoskeletts und Zellzahlen auf die Substanz Shikonin reagieren lässt sich ein stärkerer Einfluss bei den aortalen Muskelzellen beobachten. Dort liegt die Grenzkonzentration bis zu der das Zytoskelett der Zellen überwiegend unauffällig erhalten bleibt bei 8 μM . Der Einfluss auf die Fibroblasten ist nochmals stärker; bereits bei 8 μM Konzentration weisen diese annähernd keine adhärenenten Zellen auf.

Färbung für das Vergleichspharmakon Rapamycin

Abbildung 3-10 zeigt, in Analogie zu oben, exemplarisch die Vimentinfärbung der auf den beschichteten Zellträgern kultivierten drei Zelltypen für Rapamycin.

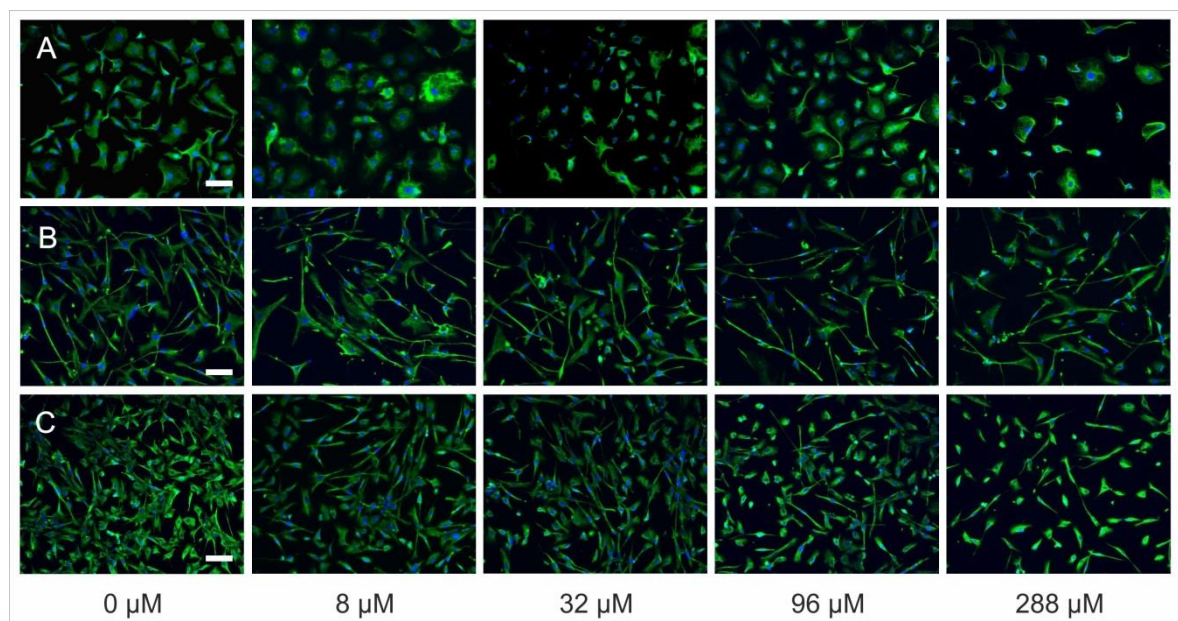


Abbildung 3-10: Immunzytochemische Fluoreszenzfärbung der drei Zelltypen nach 48-stündiger Kultivierung auf mit Rapamycin beschichteten Edelstahlplättchen.

Dargestellt sind die Vimentinfärbungen (A: HAEC, B: AoSM, C: FF239) für steigende Beschichtungskonzentrationen mit der Substanz Rapamycin von 0 μM bis 288 μM . Grün gefärbt die Vimentinfilamente, blau Kernfärbung (DAPI), Maßstab: 50 μm .

Die Beschichtung umfasste hierbei Konzentrationen bis max. 288 μM Rapamycin. Für den Vergleichs-Dosisbereich zu Shikonin (bis 64 μM) waren bei Rapamycin qualitativ keine vergleichbaren Vitalitätsverluste zu erkennen.

3.1.2. Endothelzell- und EPC-Adhäsion auf Stents

Neben der pharmakologischen Fragestellung hinsichtlich Wirkung und Einsatzfähigkeit der Substanz Shikonin als pharmazeutische Beschichtung für Stents und deren anschließenden Einsatz als „drug eluting stents“ war weiterhin von vordergründigem Interesse, inwieweit sowohl Endothelzellen (HAEC) als auch Endothelvorläuferzellen in der Lage sind, die Streben („struts“) der Stents als artifiziellen Untergrund zur Besiedelung zu nutzen. Die erfolgreiche Besiedelung der „stent struts“ ist wichtig, um nach Implantation der Stents ein möglichst schnelles, vor allem aber vollständiges und physiologisch korrektes Einheilen zu gewährleisten. Dies gilt in besonderem Maße für die, das Gefäß auskleidende Endothelzellschicht mit ihrer antithrombogene Wirkung. Um die Akzeptanz der Zellen für die körperfremden Metalloberflächen zu untersuchen, wurden Stents *in vitro* mit HAEC Zellen wie auch mit EPCs besiedelt und anschließend für 3 Tage unter Standardzellkulturbedingungen kultiviert. Die mehrtägige Kultivierung diente hierbei dem Ziel kurzfristige Zellanheftungen von langfristigen Zelladhäsionen zu unterscheiden.

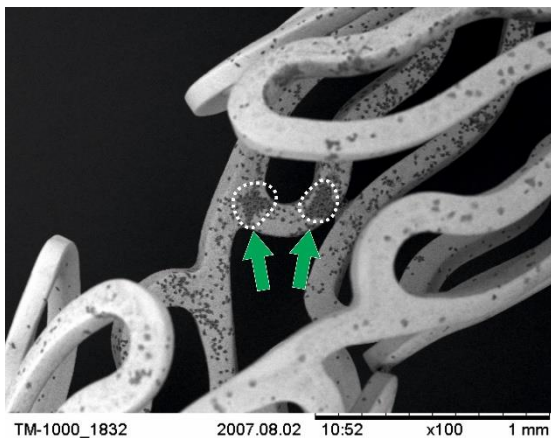


Abbildung 3-11: REM-Aufnahme von mit HAECs besiedelten Stents. Die dunklen Bereiche (grüne Pfeile) stellen die nach dreitägiger Kultivierung teils dicht besiedelten Zell-Cluster der Endothelzellen auf den Stent-Struts dar. Maßstab 1 mm.

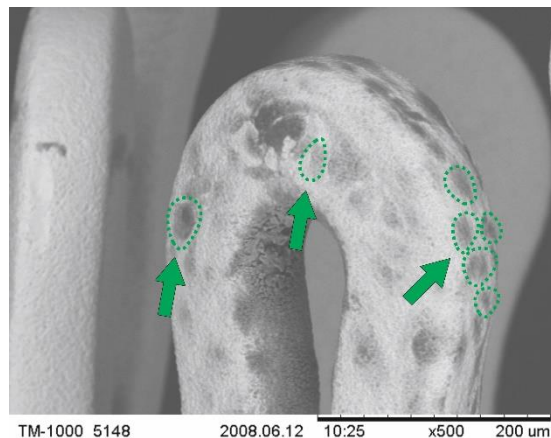


Abbildung 3-12: REM-Detailaufnahme einer Strut-Biegung. Exemplarisch grün umrandet die dunklen Bereichen adhärenter Endothelzellen und deren kopfsteinpflasterartiges Wuchsmuster (rechter grüner Pfeil), Maßstab 200 μm .

Der mikroskopische Zellenachweis im Anschluss erfolgte direkt nach Fixierung der Zellen auf den Stents anhand einer Visualisierung im Raster-Elektronenmikroskop (Abb. 3-11 und 3-12). Im Rahmen dieser Fragestellung fanden weitere Besiedelungen von Stents statt, diese jedoch im Gegensatz zu den ausdifferenzierten Endothelzellen der Zellkultur mit primär isolierten Endothelvorläuferzellen. Die Endothelvorläuferzellen wurden aus humanem Leukapheresefiltrat mittels Dichtegradientenzentrifugation und daran angeschlossener MACS („magnetic cell separation“) gewonnen. Die CD133⁺ (Prominin-positive) Endothelvorläuferfraktion wurde zur Besiedelung gemeinsam mit den Stents ebenfalls für drei Tage *in vitro* unter Standardkulturbedingungen kultiviert, anschließend fixiert und immunzytochemisch gefärbt (Abb. 3-13).

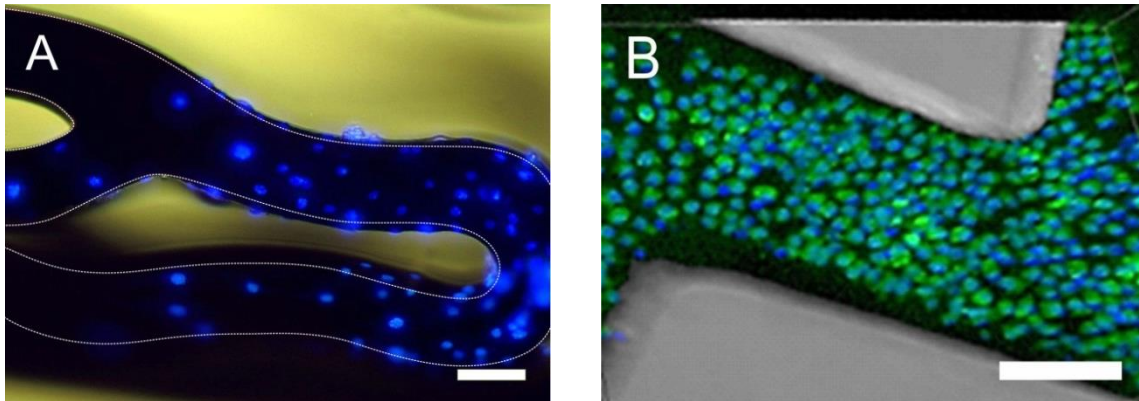


Abbildung 3-13: Immunfluoreszenz-Darstellung von *in vitro* mit EPCs besiedelten Stents. A: Man erkennt den rundum verlaufenden Zellbewuchs der Stent-Streben („stent struts“) anhand der Kernfärbung mit DAPI und den skizzierten Struttkanten. B: Konfokale Laser-Scanningmikroskopie. Zu erkennen ist die dichtflächige Besiedelung der EPCs auf der Strutfläche. Grün gefärbt das Zytoskelett (Vimentin), blau Kernfärbung mit DAPI, Maßstab: 100 μ m.

Die Immunfluoreszenz-Darstellungen in Abbildung 3-13 verdeutlichen anhand des allseitigen Bewuchses der Zellen in Abbildung A: Fluoreszenzmikroskopie, wie auch der hohen Zelldichte in Abbildung B: Laser-Scanningmikroskopie, die gute Akzeptanz der Endothelvorläuferzellen für die metallischen Oberflächen der Gefäßstützen. Dies stellt eine wesentliche Grundvoraussetzung für eine rasche Re-Endothelialisierung und hierdurch die Basis für eine mögliche erfolgreiche therapeutische Anwendung von intraluminalen Stents dar.

3.2. Molekularbiologischer Ansatz:

(Re-Endothelialisierung mittels bispezifischen Antikörperkonstrukts)

Der molekularbiologische Ansatz bedient sich des Einsatzes eines bispezifischen Antikörperkonstrukts. Dieses wurde in Kooperation von Ag. Gawaz und Ag. Jung konzipiert und erstellt. Es verfügt dank der Koppelung zweier Bindungsproteine unter Zuhilfenahme des Protein-Vernetzers SPDP (N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate) über die Spezifität von zwei unterschiedlichen Bindungsdomänen. Die erste Domäne erkennt über das Glykoprotein-VI Molekül freiliegendes, physiologisches Kollagen, die zweite hingegen bindet das für Stammzellen, wie auch für Endothelvorläuferzellen charakteristische Antigen CD133. Durch den Einsatz des Antikörperkonstrukts soll mittels einer erhöhten Bindung von CD133-positiven Endothelvorläuferzellen aus dem Blutstrom heraus, die natürlich stattfindende Re-Endothelialisierung geschädigter Bereiche beschleunigt und dadurch die Rate einer häufig post-therapeutisch auftretenden Restenose durch neointimale Hyperplasie gesenkt werden.

3.2.1. Isolations-, Kultivierungsoptimierung und Nachweis für EPC's

Untersuchungen zu Beginn dienten der Klärung, welche Zellquelle, welches Isolationsverfahren, welches Zellkulturmedium bzw. welche Oberflächenbeschichtung am besten geeignet ist, um humane endotheliale Vorläuferzellen aus einem heterogenen humanen Zellpool wie Vollblutspenden („buffy coats“) oder aber Leukapherese-Filtrat zu isolieren.

Zellquelle	
Vollblutspenden	Leukapherese-Filtrat
EPC-Isolationsverfahren	
Dichtegradientenzentrifugation	Dichtegradientenzentrifugation + MACS-Aufreinigung
Oberflächenbeschichtung	
Kollagen	Fibronektin

Abbildung 3-14: Die tabellarische Übersicht über die untersuchten Parameter zur Isolation und Kultivierung von endothelialen Vorläuferzellen.

Ziel war es, für die anschließenden Adhäsionsuntersuchungen über eine möglichst reine und homogene Zellquelle zu verfügen (tabellarischer Überblick der Voruntersuchungsparameter Abb. 3-14).

Zelldifferenzierung als Nachweismethode für EPCs

Es wurde untersucht, ob und inwieweit die Differenzierbarkeit möglicher Endothelvorläuferzellen *in vitro* als funktionelle Nachweismethode einer erfolgreichen Isolierung und Kultivierung aus verschiedenen Zellquellen (Vollblutspenden sowie Leukapherese-Filtrat) geeignet ist (Abb. 3-15 und Abb. 3-16).

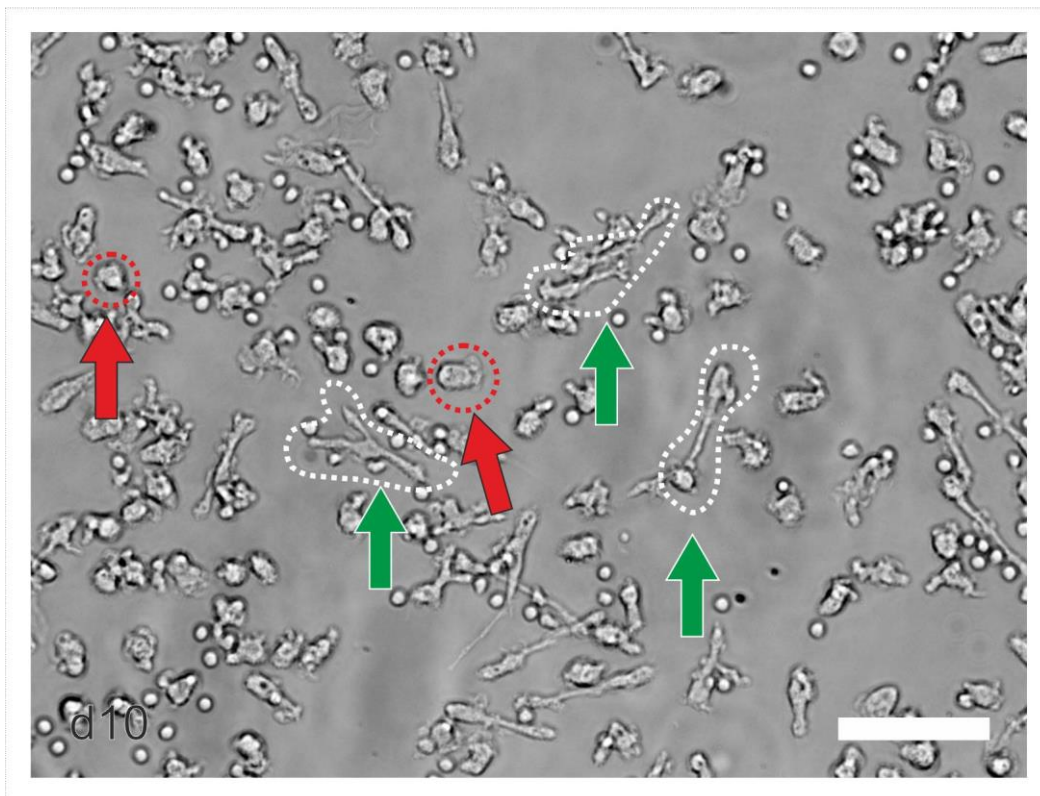


Abbildung 3-15: Erfolgreiche Isolation von EPCs aus Leukapherese-Filtrat. Als Nachweismethode für EPCs wurde deren Differenzierungsfähigkeit untersucht. Bei EPCs tritt im Rahmen der Differenzierung die typische Zellformänderung von kugelig-, (roter Pfeil) zu gestreckter Morphologie (grüner Pfeil) auf. Maßstab: 50 μm .

Abbildung 3-15 zeigt, dass eine erfolgreiche Endothelvorläuferzell-Isolation aus unterschiedlichen Zellquellen wie Vollblut und Leukapherese-Filtrat *per se* möglich, sowie die Methode der Differenzierung als Zelnachweis für Endothelvorläufer geeignet ist. Die isolierten Zellen ändern durch Differenzierungsinduktion in typischer Art ihre Zellmorphologie (Bellik, Ledda et al. 2005).

Zeitlicher Verlauf des Differenzierungsverhaltens von EPCs in der Zellkultur

Um das auftretende Differenzierungsverhalten der isolierten Endothelvorläuferzellen (EPC) in der Zellkultur zeitlich detailliert zu betrachten, wurden, die sich differenzierenden Zellen an Tag 0, Tag 2, Tag 4, Tag 6, Tag 8 und Tag 10 mikroskopisch überprüft (Abb. 3-16).

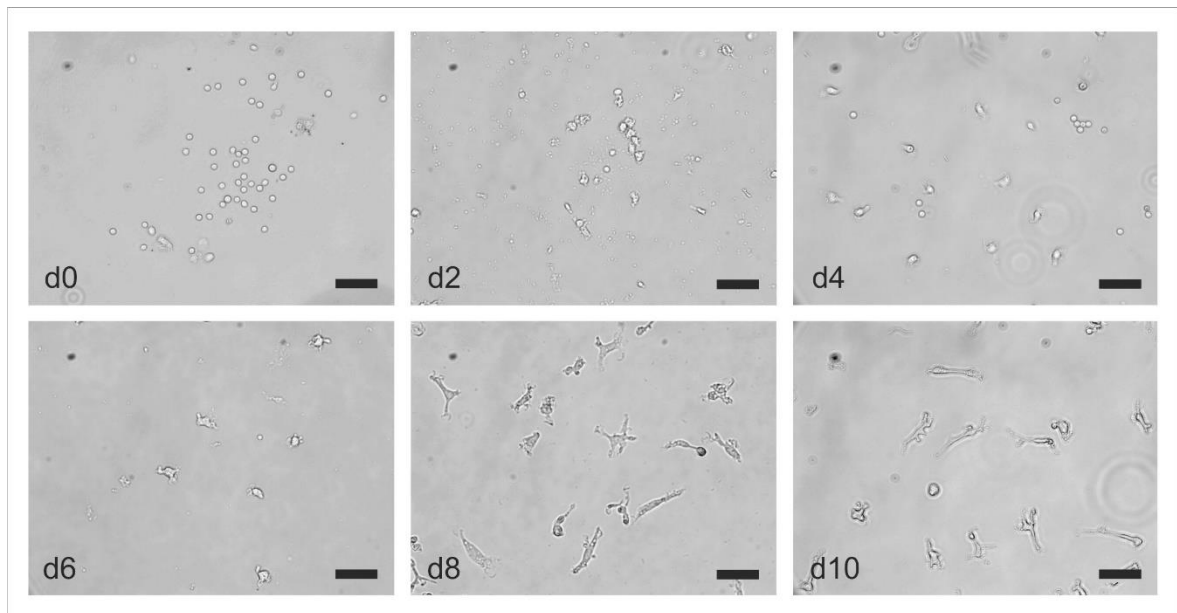


Abbildung 3-16: Dargestellt ist zeitliche Verlauf der EPC-Differenzierung in der Zellkultur. Hierfür wurden per Dichtegradient und anschließender MACS-Aufreinigung aus humanem Leukapherese-Filtrat EPCs (CD105⁺) isoliert. Diese wurden anschließend mittels Zugabe von humanem VEGF (165c) für 10 Tage in der Zellkultur differenziert. Eine erfolgreiche EPC-Differenzierung zeigt sich hierbei zwischen Tag 6 und 8 aufgrund der typischen Morphologieänderungen der Zellen von zunächst kugeligen zu gestreckten Zellformen. Maßstab: 50 μ m

EPC-Charakterisierung über den Nachweis immunzytochemischer Marker

Zusätzlich zur Identifizierung der isolierten Zellen als Endothelvorläuferzellen anhand ihrer Differenzierbarkeit, wurden weitere Charakterisierungsmerkmale mittels immunzytochemischer Färbungen für relevante Endothelzell/ Endothelvorläuferzellen-Marker/Antigene untersucht. Diese Verifizierung als Vorläufer-(EPCs) bzw. Endothelzellen (ECs) fand durch die Nachweise von Endoglin (CD105), von-Willebrand-Faktor (vWF) sowie des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptors-II (VEGF-RII) statt (Abb. 3-17).

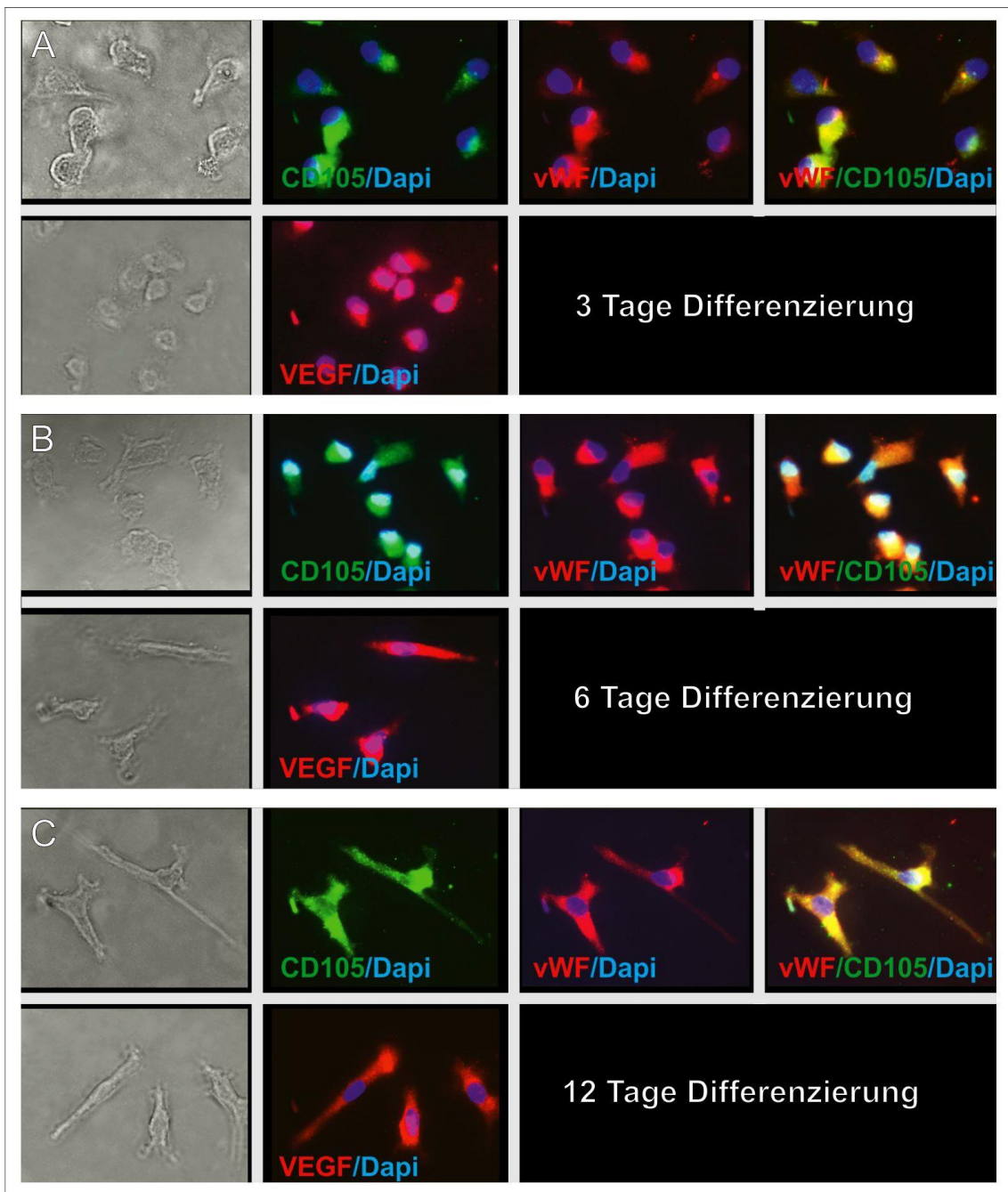


Abbildung 3-17: Die immunzytochemische Färbung der Marker: Endoglin (CD105), von Willebrand Faktor (vWF) sowie des VEGF-Rezeptors-II (VEGF-RII). Diese weisen die isolierte Zellfraktion als endotheliale Vorläuferzellen (EPCs) und spätere Endothelzellen aus. Hierzu wurde in den isolierten Zellen mittels VEGF-Gabe die Differenzierung induziert. Zu drei Zeitpunkten (A: Tag 3, B: Tag 6 und C: Tag 12) der Differenzierung fanden die immunzytochemischen Färbungen statt. Jeweils in der oberen Zeile sind von links nach rechts eine Phasenkontrastaufnahme, eine Immunfluoreszenzfärbung für Marker 1, für Marker 2, sowie die Überlagerung von Marker 1 und Marker 2 zu erkennen. In der jeweils unteren Zeile hingegen sind Phasenkontrastaufnahme und Marker 1 dargestellt.

Alle der hier untersuchten Marker werden, wie in Abbildung 3-17 gezeigt, über die gesamte Differenzierungsphase hin von den dargestellten Zellen exprimiert.

Qualitativer Nachweis IgG induzierter *in vitro*-Adhäsion

Zur Durchführung der Studie wurden Glasdeckgläser mit Protein-G vorbeschichtet und danach mit den zu untersuchenden handelsüblichen Antikörpern (CD34, CD105, CD133) aktiviert. Anschließend fand die Adhäsion der Monozytenfraktion (PBMCs) im PeCon-Flusskammer Modell statt (Abb. 3-18).

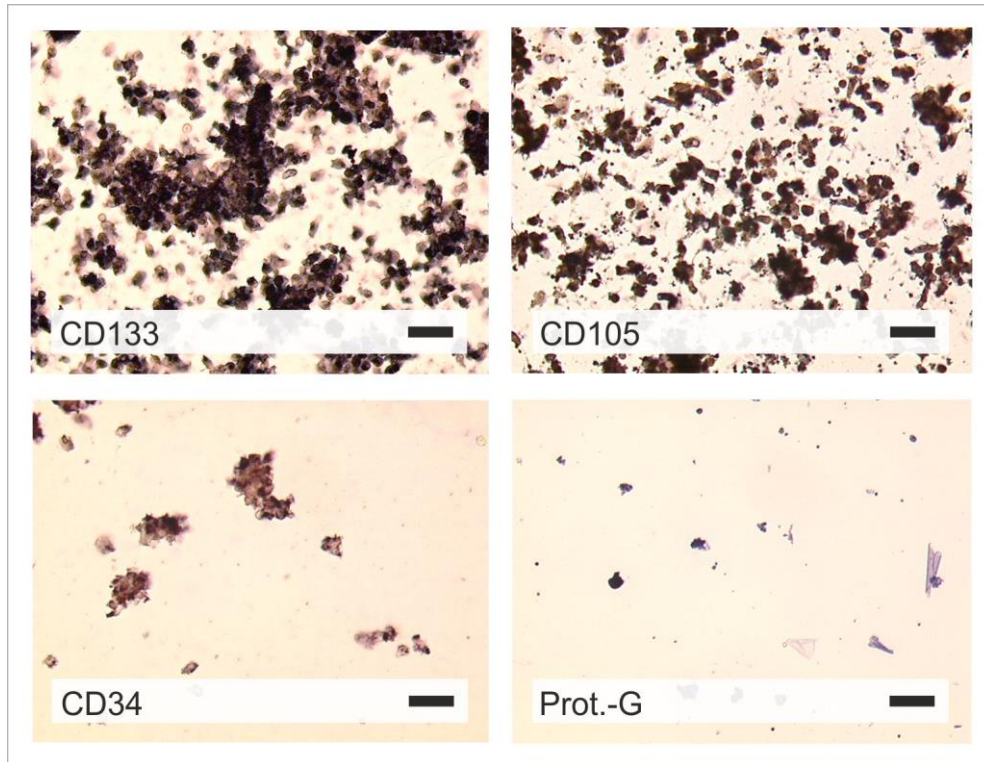


Abbildung 3-18: Immunzytochemische Färbung von angehafteten EPC's auf mit Protein-G und IgG-Antikörper beschichteten Deckgläsern.

Die Darstellung zeigt die Möglichkeit der Adhäsionsbeeinflussung von Zellen mit passenden Oberflächenantigenen anhand der Kombinationsbeschichtung von Protein-G und IgG-Antikörpern auf Deckgläsern. Erkennbar ist in dieser Abbildung eine Abnahme adhärenter Zellen der IgG-vermittelten Zelladhäsion abhängig von den zur Beschichtung verwendeten Antikörpern (CD133, CD105, CD34 bzw. eine reine Protein-G Beschichtung ohne IgG-Antikörper als Adhäsionskontrolle). Maßstab: 25 µm.

Quantitative Erfassung antikörperinduzierter Zelladhäsion

Die statistische Analyse der in Abbildung 3-18 dargestellten IgG vermittelten EPC-Zelladhäsion auf Protein-G vor- und mit handelsüblichen IgG-Antikörpern (CD34, CD105, CD133) nachbeschichteten Glasdeckgläsern im PeCon-Flusskammer-Modell zeigt signifikante Unterschiede bei der Adhäsion antigentragender Zellen. CD133 und CD105 haben einen signifikant höheren Anteil an adhäsiven Zellen im Vergleich zur Beschichtung mit CD34 und Protein-G (Kontrolle) (Abb. 3-19).

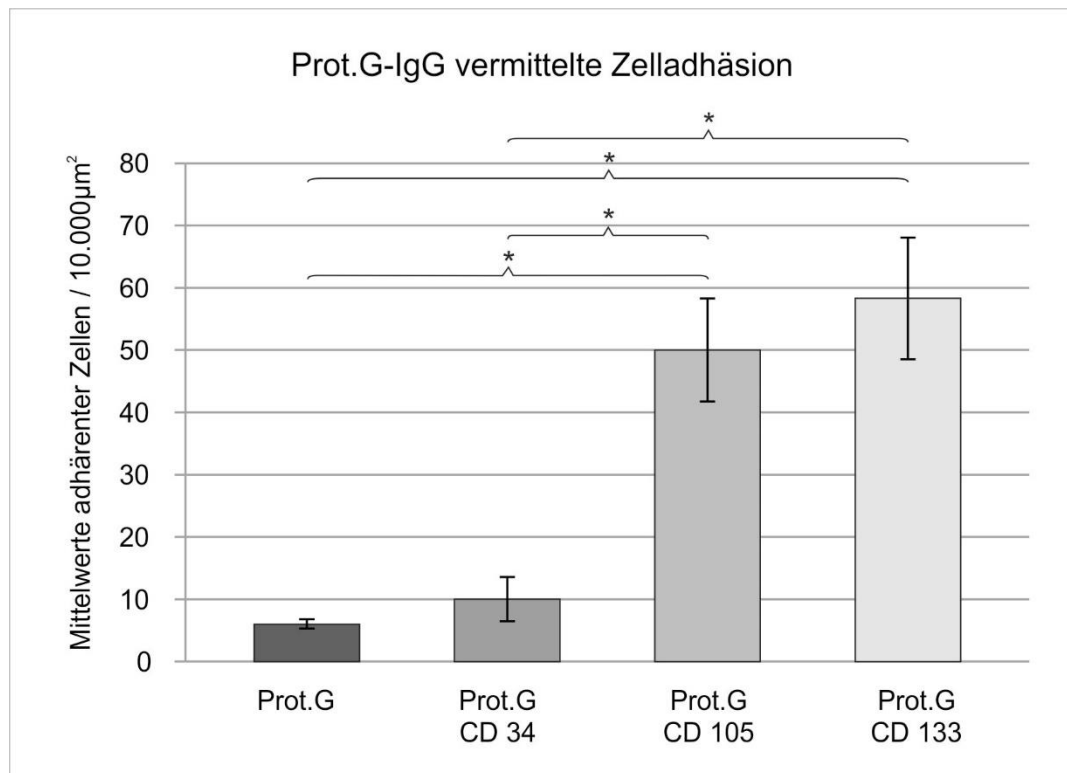


Abbildung 3-19: Mittelwerte der IgG-vermittelten Zelladhäsion auf Protein-G vorbeschichteten Deckgläsern im PeCon-Flusskammer-Modell

Dargestellt sind mit ihren jeweiligen Standardabweichungen. Prot.-G-CD105: 50 +/- 10,149; Prot.-G-CD133: 58,333 +/- 11,93; Prot.G-CD34: 10 +/- 4,359; Prot.G: 6 +/- 1 (Mittelwerte +/- Standardabweichung), $p < 0,005$; $N = 3$.

Prot.-G-CD105: 50 +/- 10,149; Prot.-G-CD133: 58,333 +/- 11,93; Prot.G-CD34: 10 +/- 4,359; Prot.G: 6 +/- 1 (Mittelwerte +/- Standardabweichung), $p < 0,005$; $N = 3$.
 Funktional, so konnte gezeigt werden, ist es möglich, mittels IgG-Antikörpern auf Protein-G beschichteten Oberflächen Zelladhäsionen von Zellen mit passendem Antigen aktiv auszulösen.

3.2.2. Induzierte Zelladhäsion mittels bispezifischen Antikörperkonstrukts

Der positiven Funktionalitätsprüfung einer induzierten Zelladhäsion, mittels kombinierter Protein-G und IgG-Antikörperbeschichtung, folgte die Untersuchung der Einsatzfähigkeit des bispezifischen Antikörperkonstrukts. Dies verfügt aufgrund der Kopplung von zwei unterschiedlichen Antikörpern, via Proteinvernetzer (SPDP), über die Spezifität zweier gerichteter Bindungs-Domänen. Die erste Domäne erkennt und bindet über einen GPVI-Antikörper an freiliegendes Kollagen. Die zweite Domäne hingegen ist gegen Prominin (CD133) gerichtet, das

einen Endothelvorläuferzell- und Stammzellmarker darstellt. Das bispezifische Antikörperkonstrukt wurde zunächst in Analogie zum Prot.G–IgG-Ansatz im Flusskammer-Modell auf kollagenbeschichteten Deckgläsern untersucht. Im Anschluss erfolgte der Ansatz *ex vivo* in Blutgefäßexplantaten deren Endothelzellschicht zuvor mittels Denudierung per Ballonkatheter entfernt wurde.

Bispezifische Antikörperkonstrukt-vermittelte EPC Adhäsion (*in vitro*)

In vitro verliefen die Untersuchungen in Analogie zur Prot.G – IgG-Antikörper-induzierten Zelladhäsion.

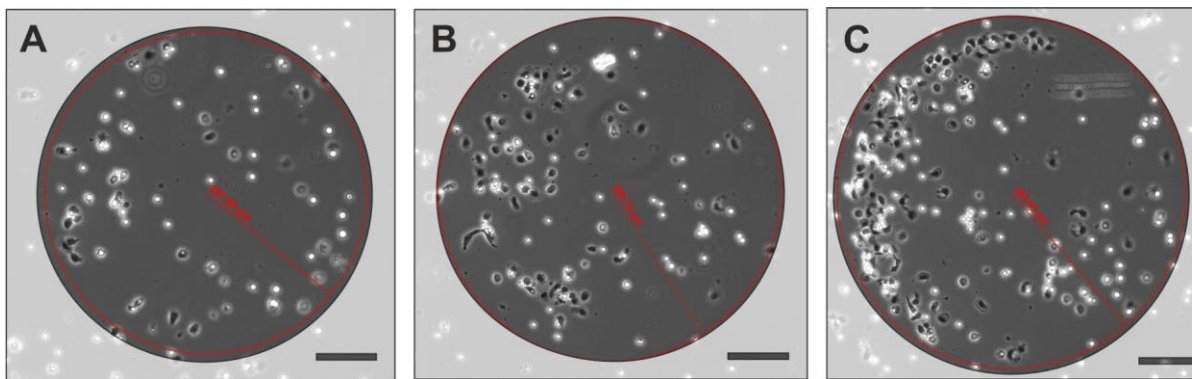


Abbildung 3-20: Mikroskopische Phasenkontrastdarstellung der Antikörperkonstrukt-vermittelten Zelladhäsion auf „microarray spots“.

Hierzu wurden die Glasdeckgläser mittels Printverfahren mit „microarray spots“ der zu untersuchenden Beschichtungen versehen und diese anschließend mit isolierten CD133⁺ EPCs im PeCon-Flusskammer Modell besiedelt. A: Zeigt die Zelladhäsion auf einer Kollagenbeschichtung, B: Kollagen plus die ungebundenen Einzelkomponenten des Konstrukts (GPVI, CD133), C: Kollagen plus bispezifisches Antikörperkonstrukt. Maßstab: 100 µm.

Hierbei wurden jedoch von der Ag. Gauklitz „microarray-spots“ des bispezifischen Antikörperkonstrukts über ihre GPVI-inherente Bindungsstelle auf Kollagenvorbeschichtete Deckgläser aufgetragen, um anschließend die Funktionalität des Konstrukts bezüglich ihrer Zellbindungseigenschaft auf den Kollagenoberflächen untersuchen zu können. (Abb. 3-20). Als Kontrolle diente hierbei sowohl ein Gemisch der einzelnen Komponenten (GPVI, CD133, das nicht per SPDP-„crosslinker“ verbunden wurde), als auch eine reine Kollagenbeschichtung. Im PeCon-Flusskammer-Modell wurde die Zelladhärenz der auf diese Weise funktionalisierten Oberflächen und ihren Kontrollen auf aus PBMC vorisolierten Zellen hin überprüft. Abbildung 53 stellt die Quantifikation der adhärennten Zellen für jeweils 9 „microarray-spots“ dar.

Quantifizierung der bispez. Antikörperkonstrukt Adhäsion

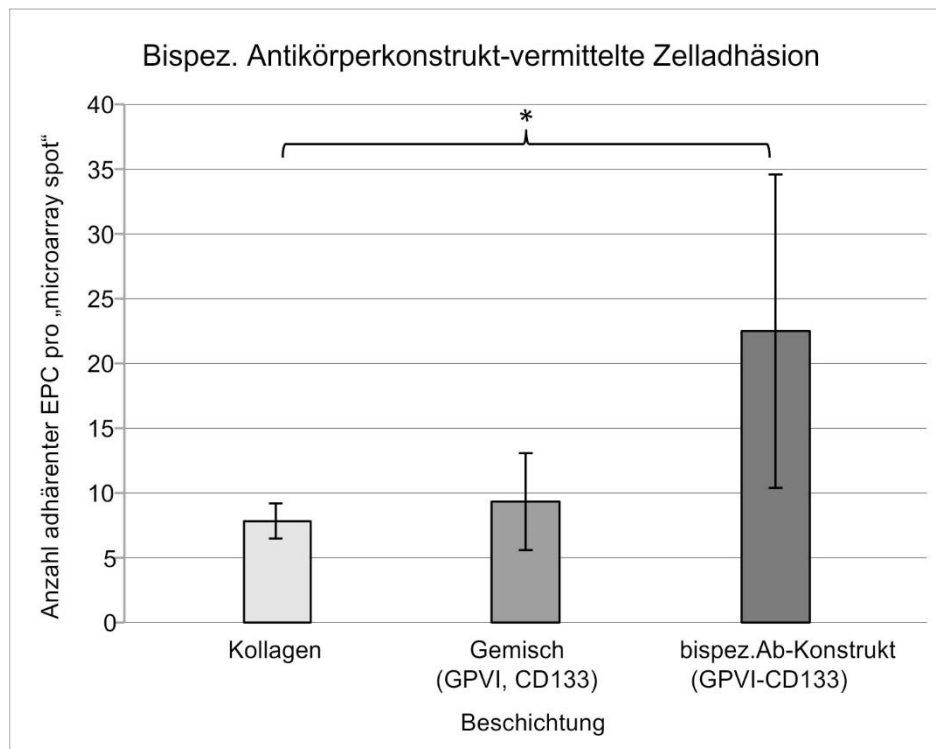


Abbildung 3-21: Mittlere Anzahl adherenter Zellen in Abhängigkeit der jeweiligen Beschichtung der „microarray spots“.

Hierzu wurden auf die Glasdeckgläser mittels Printverfahren „microarray spots“ mit den unterschiedlichen Beschichtungen aufgedruckt und anschließend mit isolierten CD133⁺-EPCs in der PeCon-Flusskammer besiedelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Zelladhäsion auf „microarray-spots“ sowie der Standardfehler der Mittelwerte. Die Beschichtungen der „microarray spots“ zeigen einen signifikanten Unterschied der adhäsiven Eigenschaften auf die Zellbindung. $p < 0,005$, $N = 9$.

Die Quantifikation der bispezifischen Antikörperkonstrukt-vermittelten Zelladhäsion aus Abbildung 3-20 zeigt in Abbildung 3-21 einen Adhäsionsunterschied. Die im PeCon-Flusskammer-Modell untersuchte Zellbindung von Endothelvorläuferzellen auf „microarray spots“ mit einer bispezifischen Antikörperkonstruktbeschichtung im Vergleich zu „spots“ ohne eine solche funktionelle Beschichtung (reine Kollagenbeschichtung) wies signifikante Unterschiede auf. Bispez. Antikörperkonstrukt: $22,500 \pm 5,408$; vs. Kollagen: $7,833 \pm 0,60$ (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts). $P < 0,005$. $N = 9$.

Bispez. Antikörperkonstrukt induzierte EPC Adhäsion in Gefäßexplantaten

Nach positiver Verifikation der Funktionalität des bispezifischen Antikörperkonstrukts auf Deckgläsern anhand von „microarray-spots“ wurde das bispezifische

Antikörperkonstrukt *ex vivo* in explantierten Blutgefäßen getestet. Hierzu kam ein Koaxialglaszylinder als Kultivierungs-Reaktor zum Einsatz. Die Entnahmeregion der porcinen Blutgefäße lag im Halsbereich und umfasste sowohl die Blutgefäße der Arteria carotis interna/externa, als auch die Vena jugularis. Die Blutgefäße wurden direkt nach Tötung der Tiere unter OP-Bedingungen entnommen und steril bei 4°C in PBS (Ca^{2+} , Mg^{2+}) überführt. Nach Spülen der Gefäßstücke mit heparinisierendem Puffer wurden die Blutgefäße an die Länge der Glasstutzen des Koaxialglaszylinders angepasst und auf diesen befestigt. Der Kultivierungs-Reaktor wurde extra- wie auch intraluminal mit Medium gefüllt und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Vor der Oberflächenbeschichtung fand eine Denudation der Blutgefäße mittels Embolektomiekatheter statt, bei der die Endothelzellen mittels eines dilatierten Ballonkatheters mechanisch von der Basalmembran gelöst werden. Hierdurch wird das unter der Endothelzellschicht liegende Kollagen der Basallamina (vorwiegend Typ III und Typ IV) freigelegt. Im Anschluss erfolgte die Beschichtung mit den Beschichtungslösungen (bispez. Antikörperkonstrukt, beide Antikörperkonstruktbestandteile nicht vernetzt (gemeinsam), GPVI einzeln, CD133 einzeln, sowie eine PBS-Lösung als Negativkontrolle). Zur Beschichtung wurden alle Lösungen hierzu intraluminal in das Blutgefäß perfundiert, zu Adhäsionszwecken inkubiert und anschließend mit Endothelmedium ausgespült. Die gemäß der Anfangsuntersuchungen isolierten und MACS aufgereinigten (CD105^+) Zellen aus Leukapherese-Filtrat wurden mittels Spritzen-Perfusor durch das denudierte und beschichtete Gefäß geleitet.

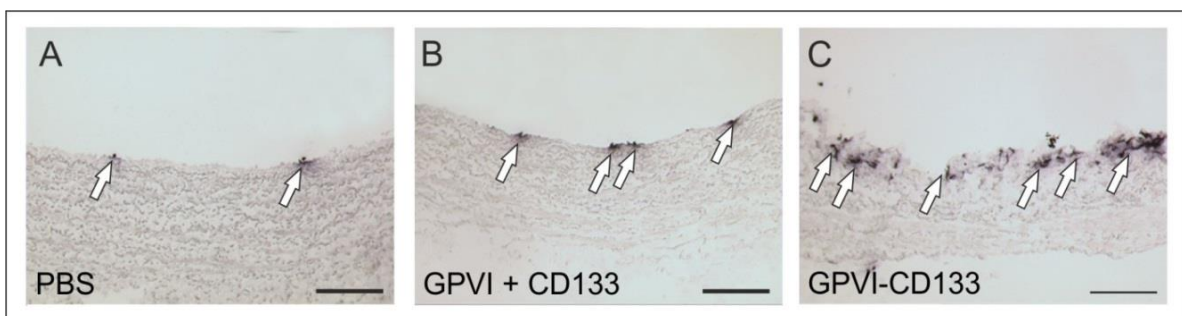


Abbildung 3-22: EPC Adhäsions-Nachweis in porcinen Blutgefäßexplantaten mittels *in situ*-Hybridisierung (ISH) für humanspezifische Alu-Sequenzen.

Dunkel (blauschwarz) gefärbt stellen sich die, intraluminal auf der Gefäßwand adhärenen Zellkerne (mit Pfeilen markiert) der humanen EPCs dar. A: Ohne Beschichtung, B: Nicht gekoppeltes Gemisch (GPVI und CD133). C: Mit bispezifischem Antikörperkonstrukt beschichtetes Gefäß. Maßstab: 50 µm.

Gefolgt wurde diese Adhäsionsphase von einer mehrstündigen Spülphase mit Medium, um mögliche nicht angeheftete Zellen aus dem Blutgefäß zu entfernen. Das Gefäß wurde anschließend entnommen, fixiert und histologisch aufgearbeitet. Anhand von Paraffin-Mikrotomschnitten der Blutgefäße erfolgte eine *in situ*-Hybridisierung (ISH) humanspezifischer Alu-Marker um humane adhärenente endotheliale Vorläuferzellen in dem porcinem Gewebe der Gefäßexplantate nachzuweisen (Abb. 3-22).

Quantifizierung der bispezifischen Antikörperkonstrukt Adhäsion (*ex vivo*)

Quantifiziert man die Adhäsion der Endothelvorläuferzellen in den denudierten und unterschiedlich beschichteten porcinen Blutgefäßen (aus Abb. 55), so zeigt sich, dass in den mit bispezifischem Antikörperkonstrukt beschichteten Gefäßen höhere Zellzahlen adhärenieren, im Vergleich zu den anderen Beschichtungskonditionen.

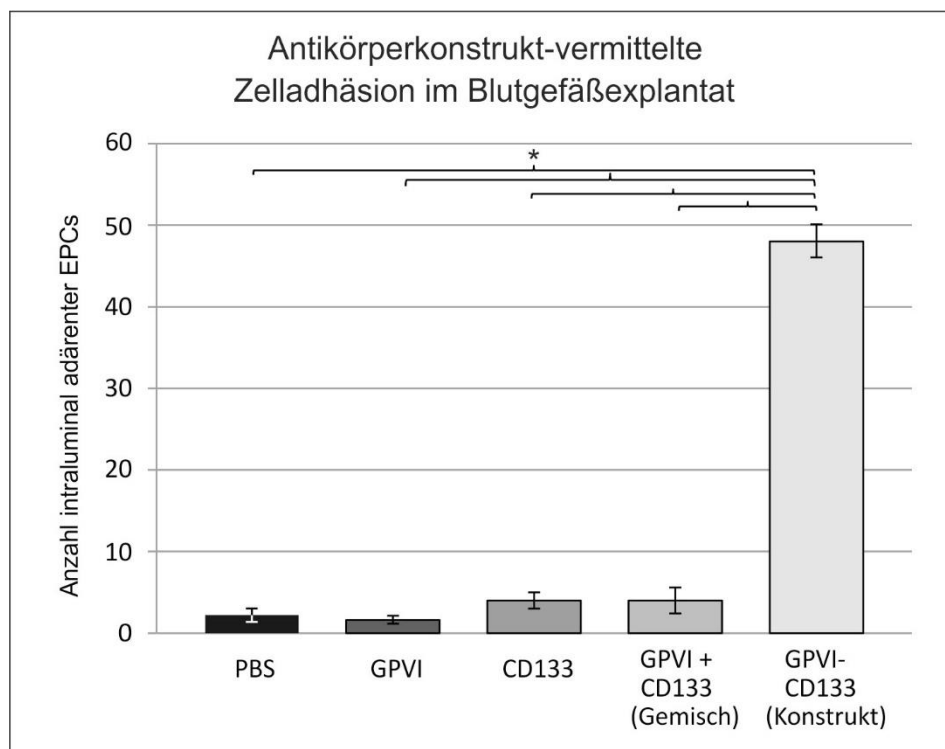


Abbildung 3-23: Dargestellt ist die Anzahl der intraluminal adhärenenten Zellen in Abhängigkeit von der Beschichtung der Blutgefäßexplantate.

Eine signifikante erhöhte EPC-Zelladhäsion in mit bispezifischem Antikörperkonstrukt beschichteten porcinen Blutgefäßexplantaten ist hierbei zu beobachten. Bispezifisches Antikörperkonstrukt (Glykoprotein-VI - CD133) im Vergleich zum Gemisch Glykoprotein-VI + CD133 und zu den Einzelkomponenten. $P < 0,0001$. $N = 5$.

Abbildung 3-23 zeigt auf der Ordinate die Anzahl der intraluminal adhärennten endothelialen Vorläuferzellen im porcinen Blutgefäß. Auf der Abszisse sind die unterschiedlichen Beschichtungskonditionen für die porcinen Blutgefäße aufgetragen. Die Beschichtung mit dem Antikörperkonstrukt führt zu einer signifikant erhöhten endothelialen Vorläuferzellen-Adhäsionsneigung gegenüber den Einzelkomponenten sowie dem nicht verbundenem Gemisch der beiden Antikörperkonstrukt-Komponenten. PBS: 2,1 +/- 0,75; GPVI: 1,25 +/- 0,6; CD133: 4,0 +/- 0,8; Gemisch (GPVI + CD133) 4,0 +/- 1,0; bispezifisches Antikörperkonstrukt: 48,0 +/- 2,2; (Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts). $P < 0,000$. $N = 5$. Funktional ist dadurch der Nachweis erbracht, dass eine Anwendung des bispezifischen Antikörperkonstrukts auch im Blutgefäßexplantat eine deutlich höhere Zelladhäsion gegenüber den Kontrollen vermittelt.

3.2.3. Untersuchung der AKT-Aktivierung durch das Antikörperkonstrukt

Da Zelladhäsionen *in vivo* oftmals mit Signalwegaktivierungen einhergehen (Chen, Xu et al. 2015, Hynes 1992, Hynes 1992), sollte untersucht werden, ob und inwieweit, durch die Adhäsion der Endothelvorläuferzellen auf mit bispezifischen Antikörpern beschichteten Oberflächen, eine intrazelluläre Signalwegaktivierung induziert wird. Dazu wurden (CD34⁺ bzw. CD133⁺) Endothelvorläuferzellen isoliert und auf beschichteten Zellkulturschalen kultiviert. Die Beschichtungen umfassten hierbei das bispezifische Antikörperkonstrukt, CD133 allein, GPVI allein, Kollagen allein, ein nicht gekoppeltes Gemisch aus CD133 und GPVI sowie eine PBS-Kontrolle, ohne jegliche Beschichtung. An Tag 0, Tag 1, Tag 3, Tag 5, Tag 7 der Zellkultivierung wurden ein Proteinnachweis der Endothelvorläuferzellen per Western-Blot gegen das Protein *AKT* bzw. dessen phosphorylierte Form Phospho-*AKT* erstellt (Abb. 56). *AKT* ist als ubiquitäres Protein in zahlreiche Zellsignalwege und -zustände wie „microvascular patterning“, Zell-Transitionsvorgänge aber auch Apoptose involviert (Adini, Rabinovitz et al. 2003, Fitzgerald, Shepherd et al. 2008, Meadows, Iyer et al. 2009, Phung, Ziv et al. 2006, Sun, Phung et al. 2005). *AKT* konnte im Rahmen der durchgeführten Western-Blots in allen Zellen, zu allen Zeitpunkten für sämtliche Beschichtungen nachgewiesen werden (Abb. 3-24).

Ergebnisse

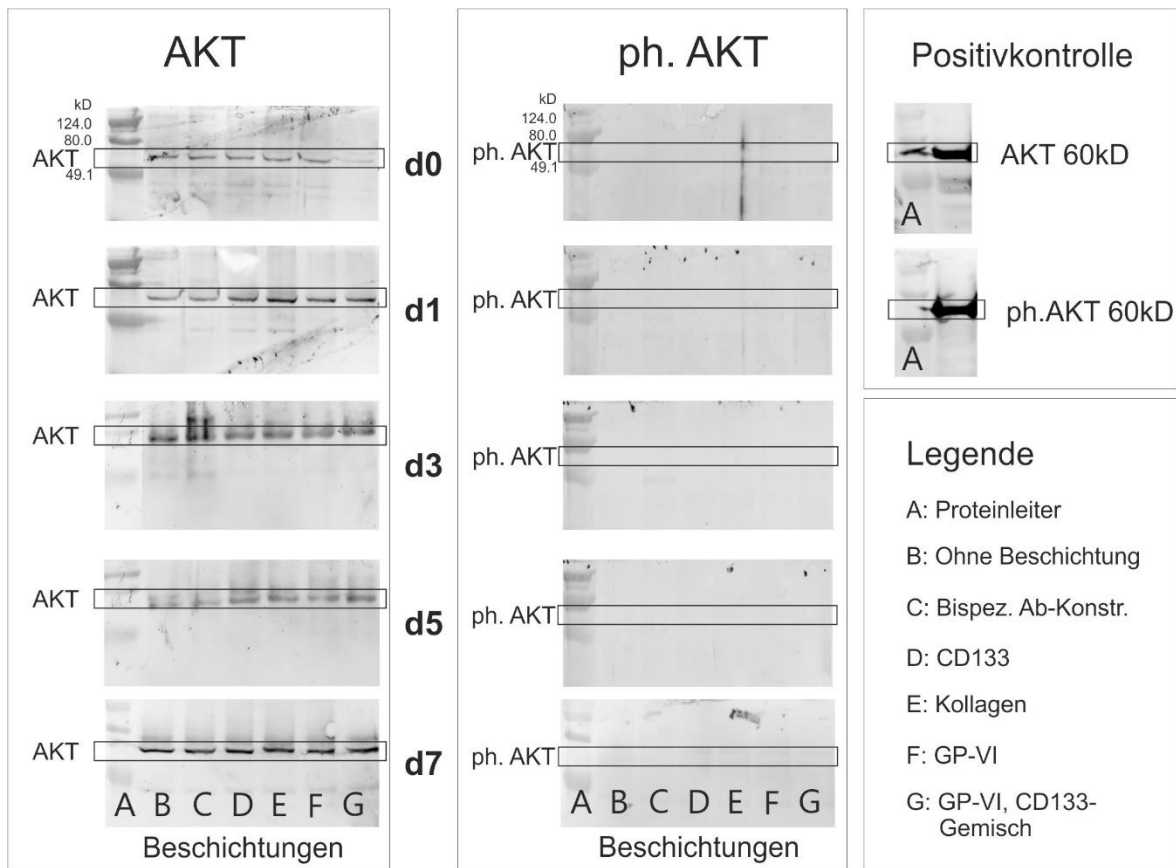


Abbildung 3-24: Ergebnisse der Western-Blots für AKT, resp. ph.AKT.

Hierzu wurden endotheliale Vorläuferzellen auf unterschiedlichen Beschichtungen (siehe Legende) kultiviert. Zu den Zeitpunkten Tag 0, Tag 1, Tag 3, Tag 5 und Tag 7 wurden die Zellen jeweils auf die Proteine *AKT* und Phospho-*AKT* hin analysiert. Ziel der Analyse war es, eine mögliche Zell-Aktivierung aufgrund der Adhäsion von endothelialen Vorläuferzellen durch das bispezifische Antikörperkonstrukt zu untersuchen. Das *AKT*-Protein mit seiner ca. 60 kDa großen Bande ist zu allen Zeitpunkten d0, d1, d3, d5 und d7 für alle Beschichtungen nachweisbar. Die phosphorylierte Form Phospho-*AKT* hingegen konnte zu keinem der Entnahmezeitpunkte und Beschichtungsuntergründe in den EPCs gezeigt werden.

Die aktivierte Form von *AKT* über den Nachweis von Phospho-*AKT* in den endothelialen Vorläuferzellen wurde hingegen zu keinem Zeitpunkt und für keine Beschichtung beobachtet, wodurch davon auszugehen ist, dass keine adhäsionsbedingte intrazelluläre Beeinflussung stattfand, die sich in einer Aktivierung des *AKT*-Signalwegs in den endothelialen Vorläuferzellen widerspiegeln würde.

4. DISKUSSION

Das für Vertebraten typische geschlossene Herzkreislaufsystem, in dem das Blut in ständiger Bewegung in einem eigenen Gefäßsystem aus Arterien und Venen zirkuliert, bildet den zentralen Bestandteil ohne den unser Körper nicht lebensfähig wäre. Über dieses System erfolgt der Austausch aller lebenswichtigen Substanzen wie Blutgase (O₂, CO₂), Nährstoffe, Metaboliten, Elektrolyte, Wärme und Wasser im Gewebe (Bassingthwaighte 1970, Kubanek 1980, Spaet 1966).

Pathologische Veränderungen des Blutgefäßsystems können zu Ablagerungen an der Blutgefäßwand führen, die das Gefäßlumen vermindern. Ist das Lumen über ein kritisches Ausmaß hinaus eingeengt, droht häufig ein Totalverschluss - der sogenannte ischämische Infarkt. Dieser führt meist zum Gewebeuntergang im Versorgungsgebiet hinter dem Gefäßverschluss (Esmon 2009, Lopez, Kearon et al. 2004, Neumann 2008). Sauerstoffsensible Gewebe, wie Nerven- oder Herzmuskelzellen reagieren auf einen solchen Versorgungsmangel besonders rasch und drastisch und haben häufig erhebliche Folgen für die Betroffenen. Seit mehr als 10 Jahren führen Herzkreislauferkrankungen die Spitze der häufigsten Todesursachen in Deutschland an und bilden damit die höchste Mortalitätsrate (Stat.Bundesamt 2014). Die Erforschung und Entwicklung erfolgreicher therapeutischer Behandlungsmethoden von Gefäßverschlüssen ist daher ein aktuelles und wichtiges Feld der Medizin und Wissenschaft.

Im Falle von akuten Stenosen und Thrombosen sieht der Therapieansatz häufig den Einsatz einer perkutanen transluminalen Angioplastie (PTA) vor. Im Gegensatz zur mehrstündigen Bypass-Operation am schlagenden Herzen, wie sie bei schwerwiegenden Fällen nach wie vor üblich und erforderlich ist, wird bei milden Stenosen meist minimal-invasiv mittels Dilatation eines Ballonkatheters oder ablativ die Ablagerung im Bereich des Gefäßverschlusses entfernt und somit der Blutfluss wieder hergestellt (Carr 2006, Cooper, Signy et al. 1987, Dussailant, Mintz et al. 1996, Gruntzig, Senning et al. 1979, Kelsey, Mullin et al. 1984, Lanvin, Conkey et al. 2015, Rao 1989, Reidy 1987, Zhang, Dong et al. 2015).

Oftmals wird eine perkutane Angioplastie (PTA) mit der Transplantation von Gefäßstützen (sog. Stents) kombiniert (Garg and Serruys 2010, Garg and Serruys 2010). Die Stents haben hierbei die Aufgabe, das Blutgefäß nach Anwendung der perkutanen transluminalen Angioplastie, bei der das komplette Blutgefäß lokal dilatiert wird, abzustützen und das Lumen vor einem Kollaps zu bewahren. Trotz

der mittlerweile über zwanzigjährigen Erfahrung mit Stent-Angioplastien bleibt ein nicht zu unterschätzendes Risiko für auftretende Komplikationen. Zum einen sind während der Intervention aufgrund der Ablösung von Plaques und/oder Thromben Folgeinfarkte/Embolien möglich (Agirbasli, Hillegass et al. 1998), zum anderen besteht auch das Risiko eines auftretenden Wiederverschlusses des Gefäßbereiches, der sogenannten Re-Stenose. (Cox and Gotlieb 1986, Touze, Trinquart et al. 2009, Windecker and Meier 2007). Das Risiko eine solche Re-Stenose zu erleiden, liegt je nach Studie und verwendeten Stents zwischen 3% und 40% (Gogas 2014, Inoue, Croce et al. 2011, Park, Kang et al. 2012, Seo, Fujii et al. 2007). Als Lösungsansatz der Re-Stenoseproblematik wurden Mitte der Neunziger Jahre sogenannte „drug eluting stents“ (DES) entwickelt. Mit diesen pharmakologisch beschichteten Stents sollten stark proliferierende Zellen an der Zellteilung gehindert und hierdurch das Zuwachsen des gestenteten Bereichs, wie es im Rahmen der neointimalen Hyperplasie bei einer Re-Stenose geschieht, verhindert werden (Anis and Karsch 2006, Ozaki, Violaris et al. 1996, Violaris, Ozaki et al. 1997). Verwendet wurden daher hauptsächlich Substanzen aus der Krebsforschung (Paclitaxel) und der Immuntherapie wie beispielsweise Cortisol oder Rapamycin (Moses, Leon et al. 2003). Diese Substanzen hemmen entweder den intrazellulären Mikrotubuli-Auf- und Abbau (De Brabander, Geuens et al. 1981, Kumar 1981) oder aber greifen über wichtige Synthesepfade in den Zellstoffwechsel, und somit in die Zellteilung ein (Li, Kim et al. 2014, Schmelzle and Hall 2000, Zheng, Florentino et al. 1995). Beide Substanzklassen haben dabei eines gemeinsam; sie inhibieren unselektiv die Proliferation aller Zellen, auch die der Endothelzellen (Inoue, Croce et al. 2011). Jedoch spielen die Endothelzellen bzw. deren Vorläufer (EPC) im Blut eine Schlüsselrolle für die Funktionsfähigkeit des Blutgefäßes. Beide Zelltypen tragen zur physiologisch erforderlichen, intraluminal geschlossenen Endothelzellschicht bzw. deren Erhalt, und damit zur antithrombotischen Funktion des Blutgefäßes bei (Aicher, Zeiher et al. 2005, Devanesan, Laughlan et al. 2009, Du, Zhou et al. 2012, Jujo, li et al. 2008, Kawamoto and Asahara 2007, Mund, Ingram et al. 2009).

Hier wäre eine zelltypspezifisch wirkende Substanz von therapeutischem Vorteil. Das Pharmazeutikum Shikonin, ein Naphtochinonderivat, findet auf dem europäischen Kontinent bereits seit dem 5. – 4. vorchristlichen Jahrhundert Anwendung. Aber auch in der traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) wurde

Shikonin bereits über Jahrhunderte hinweg für medizinische Zwecke bspw. zur Behandlung offener Wunden und Verbrennungen genutzt (Papageorgiou 1999). Der stark farbige rote Extrakt wurde aus „Zicao“, den getrockneten Wurzeln der Pflanze *Lithospermum erythrorhizon* (echter Steinsamen) gewonnen und fand in Form von Tees, Aufgüssen und Suden Anwendung (Papageorgiou, Assimopoulou et al. 2008). Wissenschaftliche Untersuchungen der Substanz Shikonin der vergangenen 40 Jahre belegen ein weitaus breiteres Wirkungsspektrum. Dieses reicht von allgemein wundheilenden (Ozaki, Ohno et al. 1994, Pierce and Mustoe 1995), über anti-inflammatorische (Tanaka, Tajima et al. 1986, Wang, Bai et al. 1994), anti-bakterielle (Kuo, Hsia et al. 2004), fungizide (Sasaki, Abe et al. 2002) und anti-virale (Chen, Yang et al. 2003) Wirkungen. Vielfache Nachweise gibt es zu apoptotischen Effekten, die häufig im Kontext mit einer anti-cancerogenen Wirkung stehen (Chen, Lin et al. 2012, Kim, Kim et al. 2014, Liu, Yin et al. 2014, Matthaiou, Barar et al. 2014, Moon, Koh et al. 2014, Wang, Zhou et al. 2014, Wiench, Eichhorn et al. 2012). Zusätzlich umfasst das Spektrum sowohl anti-angiogenetische (Hisa, Kimura et al. 1998, Lee, Magesh et al. 2008, Xu, Xu et al. 2014) als auch Angiogenese-induzierende (Sakaguchi, Tsujimura et al. 2001) Effekte. Aufgrund dieser vielfältigen dokumentierten Wirkungen wurde Shikonin in dieser Arbeit als möglicherweise erfolgreiche Substanz zur Beschichtung endovaskulärer Gefäßstützen (DES) untersucht. Die gewünschte und hierauf untersuchte Wirkung der Substanz Shikonin wäre eine spezifische Zellinhibierung – in diesem Fall die Inhibition, der besonders proliferativen und damit Re-Stenose-induzierenden Zelltypen, wie glatten Muskelzellen und Fibroblasten. Das Ziel wäre eine bevorzugte und verbesserte Re-Endothelialisierungsquote nach erfolgter Stentimplantation (Inoue, Croce et al. 2011, Zhao, Luo et al. 2008).

Der zweite, gänzlich andere Ansatz dieser Arbeit verfolgt hingegen das Ziel, die während einer perkutanen transluminalen Angioplastie von Endothelzellen befreite und freigelegte Matrix des Blutgefäßes in möglichst rascher Zeit durch eine aktiv induzierte Adhäsion von zirkulierenden Endothelvorläuferzellen (EPCs) aus dem Blutkreislauf wiederzubesetzen (Hristov, Zerneck et al. 2007). Hierdurch soll noch vor Start neointimaler Zellproliferation die funktionelle Endothelschicht auf den behandelten Blutgefäßabschnitten wiedererlangt werden (Bigalke, Langer et al. 2007, Massberg, Gawaz et al. 2003, Schulz, Penz, Hoffmann, Langer, Gillitzer, Schneider, Brandl, Seidl, Massberg, Pichler, Kremmer, Stellos, Schönberger et al.

2008). Für die Umsetzung des stammzelltherapeutischen Lösungsansatzes wurde von den Arbeitsgruppen Gawaz und Jung ein bispezifisches Antikörperkonstrukt entwickelt. Dies gelang über die Koppelung von zwei unterschiedlichen Bindungsproteinen (Baumer, Leder et al. 2012, Langer, Von Der Ruhr, Daub, Schoenberger, Stellos, May, Schnell, Gauss, Hafner, Lang, Schumm, Bühring et al. 2010). Das Fängermolekül mit den zwei unterschiedlichen Bindungsstellen, bindet zum einen mittels Glykoprotein-VI (GPVI) selektiv an physiologische Kollagenfasern (Bigalke, Langer et al. 2007, Massberg, Gawaz et al. 2003, Schulz, Penz, Hoffmann, Langer, Gillitzer, Schneider, Brandl, Seidl, Massberg, Pichler, Kremmer, Stellos, Schönberger et al. 2008). Das gegenüberliegende Ende stellt den Antikörper für den Stammzellmarker Proliminin (CD133) dar. CD133 positive Zellen bilden den Zellpool der endothelialen Vorläufer-Zellen, die sich in geringer Anzahl frei im Blutstrom befinden (Baumer, Leder et al. 2012, Salven, Mustjoki et al. 2003, Vu, Masuda et al. 2009). Die Funktion der endothelialen Vorläuferzellen besteht darin, sich an geschädigte Endothelbereiche anzuheften, um diese Zelllücken durch folgende Proliferations- und Differenzierungsprozesse zu Endothelzellen zu schließen (He, Smith et al. 2004, Li, Tjwa et al. 2005).

Ziel der Untersuchungen die im Rahmen dieser Dissertation stattfanden, war es, sowohl den pharmazeutischen Ansatzpunkt mit Shikonin als Beschichtungssubstanz für den Einsatz von endovaskulären Gefäßstützen (Stents), wie auch den molekularbiologischen Ansatz unter Verwendung des speziell entwickelten bispezifischen Antikörperkonstrukts zur selektiven Bindung von Endothelvorläuferzellen auf ihre erfolgreiche Anwendbarkeit hin zu überprüfen.

4.1. Pharmakologischer Therapie-Ansatz mit der Substanz Shikonin

Aufgrund der vielfältigen mitunter basalen Wirkungen auf zelluläre Stoffwechselwege birgt Shikonin inhibitorisches Potenzial in sich (Tian, Li et al. 2015, Zhang, Hu et al. 2015, Zhao, Assimopoulou et al. 2015). Daher wurde Shikonin als möglicher Kandidat zur Stentbeschichtung auf sein inhibitorisches Wirkungsspektrum hin untersucht. Die Zellanalytik erfolgte nach 48-stündiger Kultivierung auf den in unterschiedlicher Konzentration mit Pharmaka beschichteten Edelstahlzellträgern.

Zellviabilität / MTT-Assay

Der MTT-Assay zeigt mit zunehmender Stoffwechselaktivität der Zellen eine steigende Farbintensität und hierdurch die Viabilität der Zellen an (Mosmann 1983). Im Vergleich von Shikonin zu Rapamycin für den gewählten Dosisbereich von 0 μM bis 16 μM erkennt man eine deutliche erhöhte Viabilitätsabnahme für eine Beschichtung der Edelstahlzellträger mit dem Pharmakon Shikonin. Das Naphtochinonderivat (Shikonin) inhibierte deutlich früher und auch stärker den Zellstoffwechsel im Vergleich zum zur Stentbeschichtung etablierten Pharmakon, Rapamycin (Abb. 3-4 vs. 3-6). Beobachtbare Unterschiede in der Viabilitätsabnahme traten auch zwischen den einzelnen Zelltypen auf. Dies umfasste die Dosisbereiche (1 μM , 2 μM , 16 μM). Bei geringen Beschichtungskonzentrationen (1 μM , 2 μM) reagierten die Fibroblasten mit höheren Viabilitätseinbußen auf das Pharmakon Shikonin als die aortalen Endothel- und glatten Muskelzellen. Der bei 16 μM beobachtete Viabilitätsvorteil der aortalen glatten Muskelzellen gegenüber den aortalen Endothelzellen und Fibroblasten zeigt eine stärkere Viabilitätsbeeinflussung der letzten beiden, dürfte aber aufgrund der allgemein fortgeschrittenen Inhibition aller Zellen bereits ohnehin nicht als therapeutisch sinnvoll erachtet werden.

Shikonin wirkt wie bereits erwähnt über vielfältige Wege auf den Zellstoffwechsel. Unter anderem sind dies basale Stoffwechselwege wie AKT, MAPK (ERK) (Zhao, Assimopoulou et al. 2015), jedoch auch via TNF- α und NF κ B (Tian, Li et al. 2015, Zhang, Hu et al. 2015). Bezüglich der, in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen ist beispielsweise nachgewiesen, dass Shikonin eine inhibierende Wirkung auf aortale glatte Muskelzellen ausübt (Zhang, Hu et al. 2015, Zhang, Cao et al. 2005, Zhao, Luo et al. 2008). Auch Endothelzellen werden durch Shikonin beeinflusst. Shikonin unterdrückt in diesen via Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) die „low density lipoprotein“ (LDL) vermittelte Monozytenadhäsion und wirkt dadurch anhand des Antioxidantien-aktivierenden Potenzials inhibitorisch auf „reactive oxygen species“ (ROS). Diese sind wesentlich an Angiogenese-Vorgängen beteiligt, wodurch eine anti-atherogene Wirkung von Shikonin zustande kommt (Huang, Lin et al. 2015).

Das Vergleichspharmakon Rapamycin zeigte im Gegensatz zu Shikonin in den untersuchten Konzentrationsbereichen und weiter bis 288 μM Beschichtung keine Wirkung auf die Zellviabilität, obgleich bezüglich der Wirkung in der Literatur

ebenfalls mehrere Effekte für Rapamycin beschrieben sind (Hay and Sonenberg 2004, Laplante and Sabatini 2012, Laplante and Sabatini 2012, Schmelzle and Hall 2000). Ein zentraler Signalweg wird beispielsweise über den, in allen Zellen vorhandenen, Signalmolekülrezeptor mTOR vermittelt. Dieser greift regulierend in den Sauerstoff-, Energie- und Nährstoffhaushalt ein, beeinflusst aber auch Wachstumsfaktoren und deren Wirkung (Li, Kim et al. 2014). Somit ist Rapamycin als mTor-Inhibitor direkt in das intrazelluläre Geschehen bei der Protein-, Nukleotid- und Lipidsynthese involviert und an der Regulation der Zelladhäsion, des Zellwachstums, der Proliferation und des Zellüberlebens beteiligt. Ob und in wieweit Rapamycin seine zellulär inhibierende Wirkung erst bei höheren Dosen $>280 \mu\text{M}$ Beschichtung induziert oder, ob es an einer verzögerten Pharmakokinetik im Vergleich zu Shikonin liegt, dass Rapamycin vergleichsweise kaum inhibierende Wirkung auf die Zellviabilität ausübte, bliebe hierbei zu klären. Für beide Pharmaka gilt, dass letztlich aufgrund der Applikation als Stentbeschichtung jedoch auch die physiologische Schichtung im Blutgefäß eine wesentliche Rolle spielt, die *in vitro* nicht abgebildet werden kann. Direkt nach der Dilatation der Stents kommt zunächst das Endothel mit den Pharmaka in Kontakt. Dieses wird dadurch beim *in vivo*-Einsatz pharmakologisch am stärksten beeinflusst. Hingegen werden einwandernde glatte Muskelzellen und Fibroblasten aus unteren Strukturen durch die Diffusion und den Wirkstoffgradienten dem Wirkstoff in geringerer Konzentration ausgesetzt. Die *in vitro* erzielten Daten lieferten somit wichtige Hinweise die vor therapeutischer Anwendung jedoch im *in vivo*-Tiermodell genauer eruiert werden müssten.

PI-Assay

Mittels des PI-Assays wurde untersucht, inwieweit die, auf den mit Pharmaka beschichteten Edelstahlzellträgern kultivierten Zellen Anzeichen von Letalität in Form von intrazellulärer PI-Einlagerung zeigen. Die Ergebnisse des PI-Assays unterstützen die gewonnenen Erkenntnisse des MTT-Assays, dass es sich bei Shikonin um ein potentes Pharmakon *in puncto* Inhibition/Toxizität handelt. Das inhibitorische Potenzial das beobachtet werden konnte, lag hierbei im Bereich zwischen $0 \mu\text{M}$ und $64 \mu\text{M}$ Shikonin-Beschichtung der Edelstahlzellträger und wies dort signifikante Raten PI-positiver Zellen auf. Die steigende Anzahl letaler also PI-positiver Zellen mit wachsender Beschichtungskonzentration galt hier jedoch nur

für Zellen gleichen Typs über die unterschiedlichen Konzentrationen und nicht innerhalb eines Dosisbereiches für verschiedene Zelltypen. Es konnten somit keine dosisselektiven Unterschiede zwischen den Zelltypen vermerkt werden, wie sie der MTT-Assay zeigte. Interessant wäre hierbei zu untersuchen, ob Shikonin bereits inhibitorisch auf die Adhäsion von Zellen wirkt, was Ursache für die beobachtete Streuung sein könnte, da nur adhärente Zellen mikroskopisch dargestellt werden können. Belege für eine abschwächende Zelladhäsion, beispielsweise über eine Integrin-Beeinflussung wurden bereits nachgewiesen (Wang, Wu et al. 2013). Auch hat Shikonin durch seine Wirkung auf den Tumor-Nekrosefaktor-alpha- (TNF- α)-Signalweg in glatten Muskelzellen inhibierenden Einfluss auf deren Auswuchsverhalten (Zhang, Hu et al. 2015). Vor diesen Hintergründen wären möglicherweise Folgeuntersuchungen zum Auswuchsverhalten zielführend.

Eine weitere mögliche Ursache für die abweichende Dosis-Wirkung zwischen dem MTT und dem PI Assay liegt in dem unterschiedlichen Auflösungsvermögen der beiden verwendeten Methoden. Während beim MTT-Assay bereits graduelle Unterschiede über die metabolische Aktivität mitochondrialer Enzyme erfasst und dargestellt werden können, erfolgt die Auswertung beim PI-Assay über die visuelle Detektion der gefärbten letalen Zellen im Mikroskop.

4.2. Molekularbiologischer Ansatz mit Fängermolekülen

Zahlreiche Studien belegen eine wichtige Rolle endothelialer Vorläuferzellen in Bezug auf Reparaturmechanismen nach Verletzung und Schädigung der Endothelschicht in Blutgefäßen (Aicher, Brenner et al. 2003, Briasoulis, Tousoulis et al. 2010, Devanesan, Laughlan et al. 2009, Du, Zhou et al. 2012). Ziel war es daher, die geschädigten Bereiche des Blutgefäßabschnitts nach therapeutischen Interventionen, wie bspw. einer perkutanen transluminalen Angioplastie, durch den Einsatz von Fängermolekülen mit autologen endothelialen Vorläuferzellen zu besiedeln, um hierdurch möglichst rasch eine funktionsfähige und antithrombotische Endothelzellschicht intraluminal zu etablieren.

Antikörper-induzierte Zelladhäsion (Protein-G + IgG-Ab.)

Im Rahmen der „proof of principle“ Untersuchung einer Kombination aus Protein-G und IgG-Antikörper induzierter Zelladhäsion konnte erfolgreich gezeigt werden, dass es möglich ist, mittels Vorbeschichtung und handelsüblichen IgG Antikörpern eine künstlich vermittelte Zelladhäsion *in vitro* auszulösen. Die zur Analyse der Zelladhäsion verwendete periphere mononukleäre Zellfraktion (PBMC) wurden aus humanem Leukapherese-Filtrat isoliert.

Protein-G befindet sich ursprünglich im Proteinstoffwechsel von Bakterien der Gattung Streptococcus. Diese exprimieren das Protein, das mit hoher Affinität IgG-Antikörper von Säugern an ihrer Fc-terminalen Region bindet (Bjorck, Kastern et al. 1987, Murphy, Van Alstin et al. 1992, Sjobring, Bjorck et al. 1991). Die signifikanten Unterschiede der Prot.G + IgG-vermittelten Zelladhäsion antigen-tragender Zellen im Flusskammer-Modell mit den höheren Anteilen an CD133 und CD105 adhäsiven Zellen im Vergleich zur Protein-G-Beschichtung (Kontrolle) belegten die prinzipielle Möglichkeit eine IgG-Antikörper-induzierte Zelladhäsion auf mit Protein-G vorbeschichteten Untergründen auszulösen. Der ebenfalls signifikant höhere Anteil an CD133 und CD105 adhäsiven Zellen im Vergleich zu CD34 verwunderte hierbei zunächst, da CD34 (Sialmucin) als grundlegender und früher Marker der gesamten hämatopoietischen Vorläuferzellfraktion bekannt ist (Steen and Egeland 1998, Young, Baumhueter et al. 1995). CD133 (Prominin) und CD105 (Endoglin) stellen hingegen nur eine zahlenmäßig geringe Fraktion der hämatopoietischen Vorläuferzellfraktion dar (Case, Mead et al. 2007, Prater, Case et al. 2007). Ein möglicher Klärungsansatz hierfür könnte in den unterschiedlichen CD34 Antikörper-Epitopen liegen. Da verschiedene Epitope (I, II, und III) für CD34 existieren (Steen and Egeland 1998), die sich in einer unterschiedlichen Sensitivität niederschlagen, wäre es denkbar, dass bei der Aktivierung mit CD34 ein Antikörper mit verminderter Sensitivität zur Anwendung kam und somit eine verminderte Zelladhäsionen von CD34⁺ Zellen stattfinden konnte. Eine weitere Erklärung hierfür bietet die Expressionshäufigkeit der CD-Epitope bei den verwendeten Zellen, zu der noch keine ausreichenden Daten bekannt sind. Es wäre daher möglich, dass eine starke CD-Epitop-Expression in der Zellmembran auch zu einer vermehrten Zelladhäsion führt, da es dort häufiger zu Antikörper-Antigenreaktionen kommen kann, im Vergleich zu Zellen mit einer geringen Expressionsrate.

Funktional konnte gezeigt werden, dass es ist möglich antigenträgende Zellen mittels IgG-Antikörpern auf Protein-G beschichteten Oberflächen aktiv zur Adhäsion zu bringen, selbst wenn die Zahl adhärenter Zellen, je nach verwendetem Epitop hierbei Schwankungen unterlag. Die erfolgreiche Protein-G + IgG-Antikörper induzierte Zelladhäsion war ein wichtiger Schritt, um im Anschluss daran die Adhäsionseigenschaften des bispezifischen Antikörperkonstrukts näher in den Fokus zu rücken und auf dessen Einsatzfähigkeit hin zu untersuchen.

Bispezifisches Antikörperkonstrukt induz. Zelladhäsion (*in vitro*)

Analog zu den *in vitro* Ergebnissen der antikörperinduzierten Zelladhäsion folgten ebenfalls *in vitro* die Adhäsionsversuche mit dem bispezifischen Antikörperkonstrukt. Dieses wurde in Kooperation der Arbeitsgruppen Gawaz und Jung konzipiert und erstellt. Es besteht aus per „crosslinker“ gekoppelten Bindungsdomänen GPVI mit CD133 IgG-Antikörpern. GPVI stellt einen relevanten Marker dar der in der Membran von Blutplättchen zu finden ist und im Rahmen akuter Koronarerkrankungen nachgewiesen werden kann (Bigalke, Lindemann et al. 2006, Bigalke, Stellos et al. 2010, Massberg, Gawaz et al. 2003, Moroi and Jung 2004). Das lösliche GPVI bindet hierbei nachweislich an physiologische Kollagenfasern, wie sie bei intraluminalen Schädigungen der Gefäßwand auftreten (Bigalke, Pohlmeier et al. 2011, Schulz, Penz, Hoffmann, Langer, Gillitzer, Schneider, Brandl, Seidl, Massberg, Pichler, Kremmer, Stellos, Schonberger et al. 2008). Ferner wurde 2004 gezeigt, dass es der Einsatz von GPVI-Dimere ermöglicht, sowohl eine Blutplättchenadhäsion an geschädigte Bereiche, als auch deren Aggregation zu verhindern und dadurch die Thrombenbildung zu senken (Massberg, Konrad et al. 2004). Diese Bindungswirkung gepaart mit den positiven Eigenschaften der endothelialen Vorläuferzellen im Rahmen einer Re-Endothelialisierung ergab die Basis zur Entwicklung des bispezifischen Antikörperkonstrukts bestehend aus GPVI und CD133. Die *in vitro*-Bindung des bispezifischen Antikörperkonstrukts über die GPVI Bindungsstelle erfolgte daher auf Kollagen vorbeschichteten Flusskammer-Deckgläsern. Die Funktionalität des Konstrukts wurde nachfolgend anhand induzierter Zelladhäsion auf „microarray spots“, die von der AG. Gauklitz realisiert wurden, im PeCon-Flusskammer-Modell untersucht. Als *in vitro*-Kontrolle dienten hierbei sowohl ein Gemisch der beiden Immunglobuline (nicht per „crosslinker“ verbunden) als auch eine Kollagen-

beschichtung alleine. Die Analyse der Zelladhärenz auf den funktionalisierten Oberflächen und ihren Kontrollen erfolgte mit per MACS für das Epitop CD105 bzw. CD133 aufgereinigten Zellen. Die Zellkulturexperimente, bei denen das bispezifische Antikörperkonstrukt im Flusskammer-Modell verwendet wurde, zeigten eine deutliche Zunahme der Zelladhäsion von Endothelvorläuferzellen auf mit Kollagen-I beschichteten Deckgläschen. Inwieweit sich diese Antikörperkonstrukt-vermittelte Zelladhäsion auf die Situation im Blutgefäß übertragen lässt, wurde nachfolgend in Untersuchungen an *ex vivo*-Blutgefäßexplantaten analysiert.

Bispezifisches Antikörperkonstrukts induz. Zelladhäsion (*ex vivo*)

Für die *ex vivo*-Untersuchungen wurden porcine Blutgefäßexplantate in einem Koaxialglasreaktor auf Stützen befestigt und vor Beschichtung einer, der therapeutischen Intervention von akuten Blutgefäßverschlüssen entsprechenden Prozedur unterzogen. Hierbei wurde mittels Ballonkatheter das Gefäß lokal überdilatiert und dadurch die Intima sowie das Endothel mechanisch geschädigt, was als Denudation bezeichnet wird. Der Vorbehandlung folgte die Beschichtung mit den Untersuchungssubstanzen. Ebenso wie in den Zellkulturversuchen wurde auch in Blutgefäßexplantaten mit Antikörperkonstruktbeschichtung gegenüber den Kontrollen ein deutlich erhöhtes Anheftungspotenzial humaner Endothelvorläuferzellen beobachtet was die Basis für weiterführende *in vivo*-Versuchsansätze im Mausmodell bildete, die von der Arbeitsgruppe Gawaz durchgeführt wurden (Langer, Von Der Ruhr, Daub, Schoenberger, Stellos, May, Schnell, Gauss, Hafner, Lang, Schumm, Buhning et al. 2010). Zusammenfassend lässt die erfolgreiche Adhäsionsinduktion endothelialer Vorläuferzellen an geschädigte Bereiche im Blutgefäß den Rückschluss eines wichtigen Schrittes auf dem Weg zu einer neuen und vielversprechenden Therapieoption zur Behandlung von Endothelläsionen nach Stenose-Interventionen mittels perkutaner transluminaler Angioplastie zu. Für zukünftige Therapieverfahren wäre ebenfalls die Kombination aus Stentangioplastie mit Antikörperkonstrukt-funktionalisierten Gefäßstützen zur Verbesserung einer Re-Endothelialisierung der Stent-Streben nach Transplantation denkbar. Bezüglich einer Anwendung am Menschen sind jedoch noch weitere detaillierte Studien notwendig, um ein sicheres und standardisiertes Therapeutikum für die Behandlung bei perkutanen transluminalen Angioplastien zu entwickeln.

Untersuchung des *AKT*-Signalwegs

Die Untersuchung zur Signalwegaktivierung von *AKT*/Phospho-*AKT* diente dem Nachweis, inwieweit die Konstrukt-vermittelte Adhäsion eine intrazelluläre Signalwegaktivierung in den Endothelvorläuferzellen auslöst. Hierzu wurden CD34-positive endotheliale Vorläuferzellen isoliert und *in vitro* auf den Untersuchungssubstanzen in beschichteten Kulturschalen kultiviert. An Tag 0, Tag 1, Tag 3, Tag 5, und Tag 7 erfolgte ein Nachweis per Western-Blot gegen das Protein *AKT* bzw. dessen phosphorylierte Form Phospho-*AKT*. Die konsistente *AKT*-Expression der endothelialen Vorläuferzellen, die unabhängig von den Beschichtungen der Kulturschalen und der Kultivierungsdauer erhalten bleibt, sowie dass über den gesamten Zeitraum nachweisbar fehlende Protein des aktivierten *AKT*, (Phospho-*AKT*) legt nahe, dass es durch die aktiv vermittelte Zelladhäsion des Antikörperkonstrukts zu keiner messbaren Phosphorylierung von *AKT* kommt. Dies ist insofern vorteilhaft, da eine Aktivierung von *AKT* durch vielfältige „downstream“-Effekte via mTor (Wang, Kim et al. 2009), Twist1 (Xue, Restuccia et al. 2012), Tie2 (Niu, Perruzzi et al. 2004) oder TGF- β (Xue, Restuccia et al. 2012) mitunter drastische Zellregulierungen nach sich ziehen kann. Sie reichen von Zelleigenschaftsveränderungen im Rahmen von Transitions (Meadows, Iyer et al. 2009), über die Förderung von Tumormetastasen (Xue, Restuccia et al. 2012), Induktion von Ischämien (Wang, Kim et al. 2009) bis hin zur Einleitung der Apoptose (Niu, Perruzzi et al. 2004). Dabei ist *AKT* sowohl ein Schlüsselprotein in der Regulation des Zellüberlebens während der vaskulären Entwicklung, als auch für die Zellmotilität verantwortlich (Adini, Rabinovitz et al. 2003, Xue and Hemmings 2013). Zudem werden auch eminente Entwicklungen, wie die EPC-Differenzierung über Statine reguliert, die direkt auf den *AKT*-Pathway Einfluss nehmen (Dimmeler, Aicher et al. 2001).

Die unterbliebene Aktivierung des *AKT*/PKB Signalwegs nach einer Antikörperkonstrukt-vermittelten Zelladhäsion endothelialer Vorläuferzellen in der Zellkultur weist darauf hin, dass keine Zelltransitionsvorgänge oder apoptotische Kaskaden durch das Antikörperkonstrukt in den Endothelvorläuferzellen gestartet werden. Was wiederum eine wichtige Grundlage für den sicheren Einsatz am Menschen darstellt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Herz-Kreislauf-Erkrankungen bilden seit mehr als 10 Jahren in Deutschland die höchste Mortalitätsrate. Meist sind es Störungen des Blutflusses aufgrund ischämischer Infarkte, die zur Minderversorgung bzw. zum Gewebeuntergang führen. Die therapeutische Behandlung solcher Infarkte sieht häufig den Einsatz einer perkutanen transluminalen Angioplastie vor, die den Engpass beheben und die Durchblutung wiederherstellen soll. Oft wird die Angioplastie mit der Implantation einer Gefäßstütze (Stent) kombiniert, um das Lumen vor einem möglichen Kollaps zu schützen. Da Stentimplantationen jedoch das Risiko eines Rezidivs in Form einer in-Stent-Re-Stenose in sich bergen, wurden Pharmakabeschichtete Stents entwickelt, die die neointimalen Hyperplasien einer Re-Stenose unterdrücken sollen. Die *bis dato* hierbei verwendeten Pharmaka hemmen jedoch unselektiv die Zellteilungen aller Zellen, wodurch auch die für die Funktionalität des Blutgefäßes wichtigen Endothelzellen in ihrer Teilung inhibiert werden. Da dies den Heilungsprozess verzögert ist die medizinische Forschung auf der Suche nach selektiv wirkenden Pharmaka, wobei Shikonin ein solches Pharmakon sein könnte. Shikonin birgt aus wissenschaftlicher Sicht vielfältiges inhibierendes und zeitgleich gesundheitsförderndes Potenzial in sich, weswegen es im Rahmen dieser Arbeit auf seine zellinhibierende Eigenschaft hin untersucht wurde. Hierzu fand eine Zellkultivierung auf mit Shikonin beschichteten Metallzellträgern aus chirurgischem Edelstahl statt. Gefolgt wurde diese von unterschiedlichen Analysen der Zellviabilität, sowie einem immunzytochemischen Nachweis zur Zellmorphologie. Die Ergebnisse gaben Aufschluss darüber, dass Shikonin bereits ab einer Konzentration von 8 μM eine deutlich inhibierende Wirkung auf die Zellviabilität ausübt. Im Dosisbereich von 1 μM und 2 μM konnte eine selektive Inhibition einzelner Zelltypen, mit einem Viabilitätsvorteil für aortale Endothel- und glatte Muskelzellen gegenüber Fibroblasten beobachtet werden. Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der immunzytochemischen Zytoskelettfärbung des Vimentin unterstützte qualitativ die Aussage des MTT-Assays der inhibitorischen Wirksamkeit ab 8 μM Beschichtung. Zusammenfassend kann der Substanz Shikonin somit *in vitro* eine deutliche, zellinhibierende Wirkung auf Re-Stenose-relevante Zelltypen, jedoch nur eine geringe validierte Dosis-selektive Inhibition mit Vorteil für Endothelzellen zugeschrieben werden.

Ergänzend zur Entwicklung neuer Pharmazeutika halten in den letzten Jahren auch zunehmend molekularbiologische Behandlungsansätze Einzug in die Forschung. Diese fallen oft in den Bereich der Immuntherapie und versuchen mit Hilfe von Antikörperanwendungen, therapeutische Wirkungen zu erzielen. Anhand einer anfänglich durchgeführten Machbarkeitsstudie mit Protein-G und IgG-Antikörpern konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass eine antikörpervermittelte Zelladhäsion *per se* möglich ist. Dieser „proof of principle“ stellte die Basis für den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten molekularbiologischen Lösungsansatz dar, der den Einsatz eines künstlich erstellten bispezifischen Fängermoleküls verfolgte. Realisiert wurde das bispezifische Antikörperkonstrukt¹ durch die gerichtete Koppelung zweier Bindungsmoleküle aneinander. Das bispezifische Antikörperkonstrukt soll mittels aktiver Adhäsion frei zirkulierender endothelialer Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Blutkreislauf an kollagenreiche Läsionen die geschädigten Regionen in kurzer Zeitdauer mit autologen Endothelzellen wiederbesiedeln. Überschießende neointimale Proliferationen, wie sie im Rahmen von intraluminalen Hyperplasien nach perkutanen transluminalen Angioplastien häufig stattfinden, könnten hierdurch verhindert werden. *In vitro* gelang es im Flusskammermodell eine solche Adhäsionsvermittlung durch den Einsatz des bispezifischen Antikörperkonstrukts auf isolierte Endothelvorläuferzellen zu induzieren. Auch die Translation der *in vitro*-Ergebnisse auf das realitätsnahe *ex vivo*-Modell verlief erfolgreich. Die mit bispezifischem Antikörperkonstrukt beschichteten Blutgefäßexplantate zeigten eine deutlich erhöhte Zelladhäsion. Die adhäsionsinduzierende Eigenschaft des bispezifischen Antikörperkonstrukts auf Endothelvorläuferzellen konnte somit sowohl in der Zellkultur als auch an Blutgefäßexplantaten nachgewiesen werden. Darüber hinaus belegten Western-Blot-Analysen, dass die Induktion der Antikörperkonstrukt-vermittelten Adhäsion keine *AKT*-Signalweg aktivierenden Einflüsse auf den Zellstoffwechsel der endothelialen Vorläuferzellen ausübt, wodurch Proliferationsentartung, apoptotische Vorgänge oder eine erhöhte Zellmotilität nicht zu erwarten sind. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Erkenntnisse stellen hierdurch eine wichtige Grundlage für mögliche Entwicklungen neuer immunologischer Therapeutika zur Behandlung von Angioplastien dar.

¹ CD133 - Glykoprotein-VI (entwickelt und erstellt durch AG. Gawaz und AG. Jung)

6. LITERATUR

- Abe, S., B. U. Steinmann, L. M. Wahl and G. R. Martin (1979). "High cell density alters the ratio of type III to I collagen synthesis by fibroblasts." Nature **279**(5712): 442-444.
- Adini, I., I. Rabinovitz, J. F. Sun, G. C. Prendergast and L. E. Benjamin (2003). "RhoB controls Akt trafficking and stage-specific survival of endothelial cells during vascular development." Genes Dev **17**(21): 2721-2732.
- Adinolfi, M. and M. H. Lessof (1972). "Development of humoral and cellular immunity in man." J Med Genet **9**(1): 86-91.
- Agirbasli, M., W. B. Hillegass, Jr., G. D. Chapman and B. C. Brott (1998). "Stent procedure complicated by thrombus formation distal to the lesion within a muscle bridge." Cathet Cardiovasc Diagn **43**(1): 73-76.
- Aicher, A., W. Brenner, M. Zuhayra, C. Badorff, S. Massoudi, B. Assmus, T. Eckey, E. Henze, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2003). "Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling." Circulation **107**(16): 2134-2139.
- Aicher, A., A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2005). "Mobilizing endothelial progenitor cells." Hypertension **45**(3): 321-325.
- Alon, R. and S. Rosen (2007). "Rolling on N-linked glycans: a new way to present L-selectin binding sites." Nat Immunol **8**(4): 339-341.
- Anis, R. R. and K. R. Karsch (2006). "The future of drug eluting stents." Heart **92**(5): 585-588.
- Armulik, A., A. Abramsson and C. Betsholtz (2005). "Endothelial/pericyte interactions." Circ Res **97**(6): 512-523.
- Asadi, H., B. Yan, R. Dowling, S. Wong and P. Mitchell (2014). "Advances in medical revascularisation treatments in acute ischemic stroke." Thrombosis **2014**: 714218.
- Asahara, T., H. Masuda, T. Takahashi, C. Kalka, C. Pastore, M. Silver, M. Kearne, M. Magner and J. M. Isner (1999). "Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization." Circ Res **85**(3): 221-228.

- Asahara, T., T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schatteman and J. M. Isner (1997). "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis." Science **275**(5302): 964-967.
- Asscher, A. W. and J. H. Jones (1965). "CAPILLARY PERMEABILITY TO PLASMA PROTEINS." Postgrad Med J **41**: 425-434.
- Bailey, A. S. and W. H. Fleming (2003). "Converging roads: evidence for an adult hemangioblast." Exp Hematol **31**(11): 987-993.
- Balligand, J.-L., O. Feron and C. Dessy (2009). "eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues." Physiol Rev **89**(2): 481-534.
- Bartel, H. and A. Lametschwandtner (2000). "Intussusceptive microvascular growth in the lung of larval *Xenopus laevis* Daudin: a light microscope, transmission electron microscope and SEM study of microvascular corrosion casts." Anat Embryol (Berl) **202**(1): 55-65.
- Bassingthwaighe, J. B. (1970). "Blood flow and diffusion through mammalian organs." Science **167**(3923): 1347-1353.
- Baumer, Y., C. Leder, M. Ziegler, T. Schönberger, C. Ochmann, A. Perk, H. Degen, B. Schmid-Horch, M. Elvers, G. Münch, M. Ungerer, B. Schlosshauer and M. Gawaz (2012). "The recombinant bifunctional protein α CD133-GPVI promotes repair of the infarcted myocardium in mice." J Thromb Haemost **10**(6): 1152-1164.
- Beck, G. C., N. Rafat, B. Yard and C. Hanusch (2007). "[The role of endothelial progenitor cells in sepsis]." Anaesthetist **56**(5): 423-428.
- Beck, L., Jr. and P. A. D'Amore (1997). "Vascular development: cellular and molecular regulation." Faseb j **11**(5): 365-373.
- Beebe, D. C. (2008). "Maintaining transparency: a review of the developmental physiology and pathophysiology of two avascular tissues." Semin Cell Dev Biol **19**(2): 125-133.
- Bellik, L., F. Ledda and A. Parenti (2005). "Morphological and phenotypical characterization of human endothelial progenitor cells in an early stage of differentiation." FEBS Lett **579**(12): 2731-2736.

- Benjamin, L. E., I. Hemo and E. Keshet (1998). "A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF." Development **125**(9): 1591-1598.
- Betsholtz, C., P. Lindblom and H. Gerhardt (2005). "Role of pericytes in vascular morphogenesis." Exs(94): 115-125.
- Bigalke, B., H. Langer, T. Geisler, S. Lindemann and M. Gawaz (2007). "Platelet glycoprotein VI: a novel marker for acute coronary syndrome." Semin Thromb Hemost **33**(2): 179-184.
- Bigalke, B., S. Lindemann, R. Ehlers, P. Seizer, K. Daub, H. Langer, T. Schonberger, E. Kremmer, D. Siegel-Axel, A. E. May and M. Gawaz (2006). "Expression of platelet collagen receptor glycoprotein VI is associated with acute coronary syndrome." Eur Heart J **27**(18): 2165-2169.
- Bigalke, B., I. Pohlmeier, T. Schonberger, C. M. Griessinger, M. Ungerer, R. M. Botnar, B. J. Pichler and M. Gawaz (2011). "Imaging of injured and atherosclerotic arteries in mice using fluorescence-labeled glycoprotein VI-Fc." Eur J Radiol **79**(2): e63-69.
- Bigalke, B., K. Stellos, T. Geisler, S. Lindemann, A. E. May and M. Gawaz (2010). "Glycoprotein VI as a prognostic biomarker for cardiovascular death in patients with symptomatic coronary artery disease." Clin Res Cardiol **99**(4): 227-233.
- Billing, B. H. and M. Black (1969). "Bilirubin metabolism." Gut **10**(4): 250-254.
- Bir, S. C., Y. Xiong, C. G. Kevil and J. Luo (2012). "Emerging role of PKA/eNOS pathway in therapeutic angiogenesis for ischaemic tissue diseases." Cardiovasc Res **95**(1): 7-18.
- Birbrair, A., T. Zhang, Z. M. Wang, M. L. Messi, A. Mintz and O. Delbono (2015). "Pericytes at the intersection between tissue regeneration and pathology." Clin Sci (Lond) **128**(2): 81-93.
- Bishop, E. T., G. T. Bell, S. Bloor, I. J. Broom, N. F. Hendry and D. N. Wheatley (1999). "An in vitro model of angiogenesis: basic features." Angiogenesis **3**(4): 335-344.

- Bjorck, L., W. Kastern, G. Lindahl and K. Wideback (1987). "Streptococcal protein G, expressed by streptococci or by Escherichia coli, has separate binding sites for human albumin and IgG." Mol Immunol **24**(10): 1113-1122.
- Bodine, D. M., N. E. Seidel and D. Orlic (1996). "Bone marrow collected 14 days after in vivo administration of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor to mice has 10-fold more repopulating ability than untreated bone marrow." Blood **88**(1): 89-97.
- Booth, R. E., J. P. Johnson and J. D. Stockand (2002). "Aldosterone." Adv Physiol Educ **26**(1-4): 8-20.
- Boron, W. F. (2004). "Regulation of intracellular pH." Adv Physiol Educ **28**(1-4): 160-179.
- Bourantas, C. V., Y. Zhang, V. Farooq, H. M. Garcia-Garcia, Y. Onuma and P. W. Serruys (2012). "Bioresorbable scaffolds: current evidence and ongoing clinical trials." Curr Cardiol Rep **14**(5): 626-634.
- Briasoulis, A., D. Tousoulis, C. Antoniades, C. Stefanadis and N. Papageorgiou (2010). "The Role of Endothelial Progenitor Cells in Vascular Repair after Arterial Injury and Atherosclerotic Plaque Development." Cardiovasc Ther.
- Cardwell, J. C. (1905). "The Development of Animal Physiology: Some of the Physiologic Teachings of Praxagoras of Cos." Med Library Hist J **3**(4): 275-282.
- Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." Nat Med **6**(4): 389-395.
- Carr, J. A. (2006). "The results of catheter-based therapy compared with surgical repair of adult aortic coarctation." J Am Coll Cardiol **47**(6): 1101-1107.
- Case, J., L. E. Mead, W. K. Bessler, D. Prater, H. A. White, M. R. Saadatzadeh, J. R. Bhavsar, M. C. Yoder, L. S. Haneline and D. A. Ingram (2007). "Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors." Exp Hematol **35**(7): 1109-1118.
- Chapman, J. (2007). "[Statins and antiplatelet agents: complementary mechanisms of action at the coronary artery level]." Am J Cardiovasc Drugs **7 Spec No 1**: 5-8.

- Chapman, M. J. (2007). "From pathophysiology to targeted therapy for atherothrombosis: a role for the combination of statin and aspirin in secondary prevention." Pharmacol Ther **113**(1): 184-196.
- Chen, C. H., M. L. Lin, P. L. Ong and J. T. Yang (2012). "Novel multiple apoptotic mechanism of shikonin in human glioma cells." Ann Surg Oncol **19**(9): 3097-3106.
- Chen, L., B. Xu, L. Liu, C. Liu, Y. Luo, X. Chen, M. Barzegar, J. Chung and S. Huang (2015). "Both mTORC1 and mTORC2 are involved in the regulation of cell adhesion." Oncotarget **6**(9): 7136-7150.
- Chen, X., L. Yang, N. Zhang, J. A. Turpin, R. W. Buckheit, C. Osterling, J. J. Oppenheim and O. M. Howard (2003). "Shikonin, a component of chinese herbal medicine, inhibits chemokine receptor function and suppresses human immunodeficiency virus type 1." Antimicrob Agents Chemother **47**(9): 2810-2816.
- Cheng, Y. F. and R. H. Kramer (1989). "Human microvascular endothelial cells express integrin-related complexes that mediate adhesion to the extracellular matrix." J Cell Physiol **139**(2): 275-286.
- Choi, I., S. Lee and Y. K. Hong (2012). "The new era of the lymphatic system: no longer secondary to the blood vascular system." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(4): a006445.
- Cogle, C. R., D. A. Wainman, M. L. Jorgensen, S. M. Guthrie, R. N. Mames and E. W. Scott (2004). "Adult human hematopoietic cells provide functional hemangioblast activity." Blood **103**(1): 133-135.
- Conover, J. C., F. Doetsch, J. M. Garcia-Verdugo, N. W. Gale, G. D. Yancopoulos and A. Alvarez-Buylla (2000). "Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone." Nat Neurosci **3**(11): 1091-1097.
- Cooper, I. C., M. Signy, M. M. Webb-Peploe and D. J. Coltart (1987). "Coronary angioplasty." Postgrad Med J **63**(739): 327-335.
- Coppolino, G., D. Bolignano, S. Campo, S. Loddo, D. Teti and M. Buemi (2008). "Circulating progenitor cells after cold pressor test in hypertensive and uremic patients." Hypertens Res **31**(4): 717-724.

- Cox, J. L. and A. I. Gotlieb (1986). "Restenosis following percutaneous transluminal angioplasty: clinical, physiologic and pathological features." Cmaj **134**(10): 1129-1132.
- Daopin, S., K. A. Piez, Y. Ogawa and D. R. Davies (1992). "Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily." Science **257**(5068): 369-373.
- De Brabander, M., G. Geuens, R. Nuydens, R. Willebrords and J. De Mey (1981). "Taxol induces the assembly of free microtubules in living cells and blocks the organizing capacity of the centrosomes and kinetochores." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(9): 5608-5612.
- De Maria, G. L., I. Porto, F. Burzotta, M. F. Brancati, C. Trani, G. Pirozzolo, A. M. Leone, G. Niccoli, F. Prati and F. Crea (2015). "Dual role of circulating endothelial progenitor cells in stent struts endothelialisation and neointimal regrowth: a substudy of the IN-PACT CORO trial." Cardiovasc Revasc Med **16**(1): 20-26.
- deMello, D. E., D. Sawyer, N. Galvin and L. M. Reid (1997). "Early fetal development of lung vasculature." Am J Respir Cell Mol Biol **16**(5): 568-581.
- Devanesan, A. J., K. A. Laughlan, H. R. Girn and S. Homer-Vanniasinkam (2009). "Endothelial progenitor cells as a therapeutic option in peripheral arterial disease." Eur J Vasc Endovasc Surg **38**(4): 475-481.
- Dimmeler, S., A. Aicher, M. Vasa, C. Mildner-Rihm, K. Adler, M. Tiemann, H. Rutten, S. Fichtlscherer, H. Martin and A. M. Zeiher (2001). "HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway." J Clin Invest **108**(3): 391-397.
- Dingemans, K. P., N. Jansen and A. E. Becker (1981). "Ultrastructure of the normal human aortic media." Virchows Arch A Pathol Anat Histol **392**(2): 199-216.
- Dor, Y., R. Porat and E. Keshet (2001). "Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis." Am J Physiol Cell Physiol **280**(6): C1367-1374.
- Drake, T. A., J. H. Morrissey and T. S. Edgington (1989). "Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis." Am J Pathol **134**(5): 1087-1097.

- Du, F., J. Zhou, R. Gong, X. Huang, M. Pansuria, A. Virtue, X. Li, H. Wang and X.-F. Yang (2012). "Endothelial progenitor cells in atherosclerosis." Front Biosci (Landmark Ed) **17**: 2327-2349.
- Dussaillant, G. R., G. S. Mintz, A. D. Pichard, K. M. Kent, L. F. Satler, J. J. Popma and M. B. Leon (1996). "Effect of rotational atherectomy in noncalcified atherosclerotic plaque: a volumetric intravascular ultrasound study." J Am Coll Cardiol **28**(4): 856-860.
- Eilken, H. M. and R. H. Adams (2010). "Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis." Curr Opin Cell Biol **22**(5): 617-625.
- Elezi, S., A. Kastrati, F. J. Neumann, M. Hadamitzky, J. Dirschinger and A. Schomig (1998). "Vessel size and long-term outcome after coronary stent placement." Circulation **98**(18): 1875-1880.
- Ergun, S. and U. M. Gehling (2007). "Non-bone-marrow-derived endothelial progenitor cells: what is their exact location?" Circ Res **101**(3): e31.
- Esmon, C. T. (2009). "Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis." Blood Rev **23**(5): 225-229.
- Esser, S., K. Wolburg, H. Wolburg, G. Breier, T. Kurzchalia and W. Risau (1998). "Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro." J Cell Biol **140**(4): 947-959.
- Fara, P. (2007). "William Harvey, an Aristotelian anatomist." Endeavour **31**(2): 43-44.
- Fiedler, U., S. Christian, S. Koidl, D. Kerjaschki, M. S. Emmett, D. O. Bates, G. Christofori and H. G. Augustin (2006). "The sialomucin CD34 is a marker of lymphatic endothelial cells in human tumors." Am J Pathol **168**(3): 1045-1053.
- Fierlbeck, W., A. Liu, R. Coyle and B. J. Ballermann (2003). "Endothelial cell apoptosis during glomerular capillary lumen formation in vivo." J Am Soc Nephrol **14**(5): 1349-1354.
- Fitzgerald, T. N., B. R. Shepherd, H. Asada, D. Teso, A. Muto, T. Fancher, J. M. Pimiento, S. P. Maloney and A. Dardik (2008). "Laminar shear stress

stimulates vascular smooth muscle cell apoptosis via the Akt pathway." J Cell Physiol **216**(2): 389-395.

Flamme, I. and W. Risau (1992). "Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro." Development **116**(2): 435-439.

Folkman, J. (1984). "What is the role of endothelial cells in angiogenesis?" Lab Invest **51**(6): 601-604.

Folkman, J. and C. Haudenschild (1980). "Angiogenesis in vitro." Nature **288**(5791): 551-556.

Fonsatti, E., H. J. M. Nicolay, M. Altomonte, A. Covre and M. Maio (2009). "Targeting cancer vasculature via endoglin/CD105: a novel antibody-based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumours." Cardiovascular Research.

Frame, M. D., G. B. Chapman, Y. Makino and I. H. Sarelius (1998). "Shear stress gradient over endothelial cells in a curved microchannel system." Biorheology **35**(4-5): 245-261.

Furcht, L. T. (1986). "Critical factors controlling angiogenesis: cell products, cell matrix, and growth factors." Lab Invest **55**(5): 505-509.

Gamble, J. R., L. J. Matthias, G. Meyer, P. Kaur, G. Russ, R. Faull, M. C. Berndt and M. A. Vadas (1993). "Regulation of in vitro capillary tube formation by anti-integrin antibodies." J Cell Biol **121**(4): 931-943.

Garg, S. and P. W. Serruys (2010). "Coronary stents: current status." J Am Coll Cardiol **56**(10 Suppl): S1-42.

Garg, S. and P. W. Serruys (2010). "Coronary stents: looking forward." J Am Coll Cardiol **56**(10 Suppl): S43-78.

Gebb, S. A. and J. M. Shannon (2000). "Tissue interactions mediate early events in pulmonary vasculogenesis." Dev Dyn **217**(2): 159-169.

Gilbert, S. F. (2000). Developmental Biology. Sunderland (MA): , Sinauer Associates; .

- Gogas, B. D. (2014). "Bioresorbable scaffolds for percutaneous coronary interventions." Glob Cardiol Sci Pract **2014**(4): 409-427.
- Gormley, K., Y. Dong and G. A. Sagnella (2003). "Regulation of the epithelial sodium channel by accessory proteins." Biochem J **371**(Pt 1): 1-14.
- Grundy, S. M. (1978). "Cholesterol metabolism in man." West J Med **128**(1): 13-25.
- Gruntzig, A. R., A. Senning and W. E. Siegenthaler (1979). "Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty." N Engl J Med **301**(2): 61-68.
- Guo, X. P., X. Y. Zhang and S. D. Zhang (1991). "[Clinical trial on the effects of shikonin mixture on later stage lung cancer]." Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi **11**(10): 598-599, 580.
- Haas, L. F. (1999). "Papyrus of Ebers and Smith." J Neurol Neurosurg Psychiatry **67**(5): 578.
- Hall, J. E. (1991). "Control of blood pressure by the renin-angiotensin-aldosterone system." Clin Cardiol **14**(8 Suppl 4): IV6-21; discussion IV51-25.
- Hamilos, M. I., M. Ostojic, B. Beleslin, D. Sagic, L. Mangovski, S. Stojkovic, M. Nedeljkovic, D. Orlic, B. Milosavljevic, D. Topic, N. Karanovic, W. Wijns and N. C. Investigators (2008). "Differential effects of drug-eluting stents on local endothelium-dependent coronary vasomotion." J Am Coll Cardiol **51**(22): 2123-2129.
- Hay, E. D. (1999). "Biogenesis and organization of extracellular matrix." Faseb j **13 Suppl 2**: S281-283.
- Hay, N. and N. Sonenberg (2004). "Upstream and downstream of mTOR." Genes Dev **18**(16): 1926-1945.
- He, T., L. A. Smith, S. Harrington, K. A. Nath, N. M. Caplice and Z. S. Katusic (2004). "Transplantation of circulating endothelial progenitor cells restores endothelial function of denuded rabbit carotid arteries." Stroke **35**(10): 2378-2384.
- Heiss, C., A. Schanz, N. Amabile, S. Jahn, Q. Chen, M. L. Wong, T. Rassaf, Y. Heinen, M. Cortese-Krott, W. Grossman, Y. Yeghiazarians and M. L.

- Springer (2010). "Nitric oxide synthase expression and functional response to nitric oxide are both important modulators of circulating angiogenic cell response to angiogenic stimuli." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(11): 2212-2218.
- Hemmings, B. A. and D. F. Restuccia (2012). "PI3K-PKB/Akt pathway." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(9): a011189.
- Hirschi, K. K., S. A. Rohovsky and P. A. D'Amore (1997). "Cell-cell interactions in vessel assembly: a model for the fundamentals of vascular remodelling." Transpl Immunol **5**(3): 177-178.
- Hisa, T., Y. Kimura, K. Takada, F. Suzuki and M. Takigawa (1998). "Shikonin, an ingredient of *Lithospermum erythrorhizon*, inhibits angiogenesis in vivo and in vitro." Anticancer Res **18**(2A): 783-790.
- Hristov, M., A. Zerneck, E. A. Liehn and C. Weber (2007). "Regulation of endothelial progenitor cell homing after arterial injury." Thromb Haemost **98**(2): 274-277.
- Huang, C.-S., A.-H. Lin, T.-C. Yang, K.-L. Liu, H.-W. Chen and C.-K. Lii (2015). "Shikonin inhibits oxidized LDL-induced monocyte adhesion by suppressing NFκB activation via up-regulation of PI3K/Akt/Nrf2-dependent antioxidation in EA.hy926 endothelial cells." Biochem Pharmacol **93**(3): 352-361.
- Hynes, R. O. (1992). "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion." Cell **69**(1): 11-25.
- Hynes, R. O. (1992). "Specificity of cell adhesion in development: the cadherin superfamily." Curr Opin Genet Dev **2**(4): 621-624.
- Iivanainen, E., V. M. Kahari, J. Heino and K. Elenius (2003). "Endothelial cell-matrix interactions." Microsc Res Tech **60**(1): 13-22.
- Inoue, T., K. Croce, T. Morooka, M. Sakuma, K. Node and D. I. Simon (2011). "Vascular inflammation and repair: implications for re-endothelialization, restenosis, and stent thrombosis." JACC Cardiovasc Interv **4**(10): 1057-1066.
- Inoue, T., T. Shinke, H. Otake, M. Nakagawa, H. Hariki, T. Osue, M. Iwasaki, Y. Taniguchi, R. Nishio, N. Hiranuma, A. Konishi, H. Kinutani, J. Shite and K. Hirata (2014). "Neoatherosclerosis and mural thrombus detection after sirolimus-eluting stent implantation." Circ J **78**(1): 92-100.

- Jain, R. K. (2003). "Molecular regulation of vessel maturation." Nat Med **9**(6): 685-693.
- James, A. H. (2009). "Pregnancy-associated thrombosis." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 277-285.
- Jaszai, J., C. A. Fargeas, M. Florek, W. B. Huttner and D. Corbeil (2007). "Focus on molecules: prominin-1 (CD133)." Exp Eye Res **85**(5): 585-586.
- Jenkins, J. S. and P. Michael (2014). "Deep Venous Thrombosis: An Interventionalist's Approach." Ochsner J **14**(4): 633-640.
- Johannes, S. (2010). Atlas der Anatomie des Menschen. München, Elsevier Urban & Fischer.
- Jose, P. A., J. R. Raymond, M. D. Bates, A. Aperia, R. A. Felder and R. M. Carey (1992). "The renal dopamine receptors." J Am Soc Nephrol **2**(8): 1265-1278.
- Jujo, K., M. Li and D. W. Losordo (2008). "Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium." J Mol Cell Cardiol **45**(4): 530-544.
- Jung, S. M. and M. Moroi (2004). "Ligand-binding assays for collagen." Methods Mol Biol **273**: 105-114.
- Kalka, C., T. Asahara, W. Krone and J. M. Isner (2000). "Angiogenesis and vasculogenesis. Therapeutic approaches for stimulation of post-natal neovascularization." Herz **25**(6): 611-622.
- Kastrati, A., J. Mehilli, J. Pache, C. Kaiser, M. Valgimigli, H. Kelbaek, M. Menichelli, M. Sabaté, M. J. Suttrop, D. Baumgart, M. Seyfarth, M. E. Pfisterer and A. Schömig (2007). "Analysis of 14 trials comparing sirolimus-eluting stents with bare-metal stents." N Engl J Med **356**(10): 1030-1039.
- Kastrati, A., A. Schomig, S. Elezi, H. Schühlen, M. Wilhelm and J. Dirschinger (1998). "Interlesion dependence of the risk for restenosis in patients with coronary stent placement in multiple lesions." Circulation **97**(24): 2396-2401.

- Katare, R. G. and P. Madeddu (2013). "Pericytes from human veins for treatment of myocardial ischemia." Trends Cardiovasc Med **23**(3): 66-70.
- Kawamoto, A. and T. Asahara (2007). "Role of progenitor endothelial cells in cardiovascular disease and upcoming therapies." Catheter Cardiovasc Interv **70**(4): 477-484.
- Kelsey, S. F., S. M. Mullin, K. M. Detre, H. Mitchell, M. J. Cowley, A. R. Gruentzig and K. M. Kent (1984). "Effect of investigator experience on percutaneous transluminal coronary angioplasty." Am J Cardiol **53**(12): 56c-64c.
- Kim, S. J., J. M. Kim, S. H. Shim and H. I. Chang (2014). "Shikonin induces cell cycle arrest in human gastric cancer (AGS) by early growth response 1 (Egr1)-mediated p21 gene expression." J Ethnopharmacol **151**(3): 1064-1071.
- Kramer, R. H. (1985). "Extracellular matrix interactions with the apical surface of vascular endothelial cells." J Cell Sci **76**: 1-16.
- Kramer, R. H., K. G. Bensch, P. M. Davison and M. A. Karasek (1984). "Basal lamina formation by cultured microvascular endothelial cells." J Cell Biol **99**(2): 692-698.
- Kramer, R. H., G. M. Fuh, K. G. Bensch and M. A. Karasek (1985). "Synthesis of extracellular matrix glycoproteins by cultured microvascular endothelial cells isolated from the dermis of neonatal and adult skin." J Cell Physiol **123**(1): 1-9.
- Kubanek, B. (1980). "[Physiology of blood (homeostasis of cellular blood components)]." Klin Anasthesiol Intensivther **21**: 1-15.
- Kumar, N. (1981). "Taxol-induced polymerization of purified tubulin. Mechanism of action." J Biol Chem **256**(20): 10435-10441.
- Kuo, H. M., T. C. Hsia, Y. C. Chuang, H. F. Lu, S. Y. Lin and J. G. Chung (2004). "Shikonin inhibits the growth and N-acetylation of 2-aminofluorene in *Helicobacter pylori* from ulcer patients." Anticancer Res **24**(3a): 1587-1592.
- Kurz, H., J. Korn, P. S. Egli, R. Huang and B. Christ (2001). "Embryonic central nervous system angiogenesis does not involve blood-borne endothelial progenitors." J Comp Neurol **436**(3): 263-274.

- Lammert, E., O. Cleaver and D. Melton (2001). "Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels." Science **294**(5542): 564-567.
- Langer, H. F., J. W. von der Ruhr, K. Daub, T. Schoenberger, K. Stellos, A. E. May, H. Schnell, A. Gauss, R. Hafner, P. Lang, M. Schumm, H. J. Buhning, K. Klingel, S. Conrad, M. Schaller, M. van Zandvoort, G. Jung, S. Dimmeler, T. Skutella and M. Gawaz (2010). "Capture of endothelial progenitor cells by a bispecific protein/monoclonal antibody molecule induces reendothelialization of vascular lesions." J Mol Med **88**(7): 687-699.
- Lanvin, T., D. B. Conkey, A. Frobert, J. Valentin, J. J. Goy, S. Cook, M. N. Giraud and D. Psaltis (2015). "Subsurface ablation of atherosclerotic plaque using ultrafast laser pulses." Biomed Opt Express **6**(7): 2552-2561.
- Laplante, M. and D. M. Sabatini (2012). "mTOR Signaling." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(2).
- Laplante, M. and D. M. Sabatini (2012). "mTOR signaling in growth control and disease." Cell **149**(2): 274-293.
- Lee, H. J., V. Magesh, D. Nam, E. O. Lee, K. S. Ahn, M. H. Jung, D. K. Kim, J. Y. Kim and S. H. Kim (2008). "Shikonin, acetylshikonin, and isobutyrylshikonin inhibit VEGF-induced angiogenesis and suppress tumor growth in lewis lung carcinoma-bearing mice." Yakugaku Zasshi **128**(11): 1681-1688.
- Lefrère, J.-J. and P. Berche (2010). "[Andreas Vesalius, pionnier of the human anatomy]." Presse médicale (Paris, France : 1983) **39**(6): 713-721.
- Leone, A. M., M. Valgimigli, M. B. Giannico, V. Zacccone, M. Perfetti, D. D'Amario, A. G. Rebuzzi and F. Crea (2009). "From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endothelial progenitor cells." Eur Heart J **30**(8): 890-899.
- Li, J., S. G. Kim and J. Blenis (2014). "Rapamycin: one drug, many effects." Cell Metab **19**(3): 373-379.
- Li, X., M. Tjwa, L. Moons, P. Fons, A. Noel, A. Ny, J. M. Zhou, J. Lennartsson, H. Li, A. Luttun, A. Ponten, L. Devy, A. Bouche, H. Oh, A. Manderveld, S. Blacher, D. Communi, P. Savi, F. Bono, M. Dewerchin, J. M. Foidart, M. Autiero, J. M. Herbert, D. Collen, C. H. Heldin, U. Eriksson and P. Carmeliet (2005). "Revascularization of ischemic tissues by PDGF-CC via effects on endothelial cells and their progenitors." J Clin Invest **115**(1): 118-127.

- Lienau, J., H. Schell, G. N. Duda, P. Seebeck, S. Muchow and H. J. Bail (2005). "Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability." J Orthop Res **23**(3): 639-645.
- Lin, J., M. Li, Z. Wang, S. He, X. Ma and D. Li (2010). "The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in macrophage-derived foam-cell formation." J Lipid Res **51**(5): 1208-1217.
- Lindahl, P., B. R. Johansson, P. Leveen and C. Betsholtz (1997). "Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice." Science **277**(5323): 242-245.
- Lippert, H. (2006). Lehrbuch Anatomie: 184 Tabellen. München, Jena, Elsevier Urban & Fischer.
- Liu, C., L. Yin, J. Chen and J. Chen (2014). "The apoptotic effect of shikonin on human papillary thyroid carcinoma cells through mitochondrial pathway." Tumour Biol **35**(3): 1791-1798.
- Löffler, G. (2001). Basiswissen Biochemie: Mit Pathobiochemie; mit 120 Tabellen. Berlin, Heidelberg, Springer.
- Lopez, J. A., C. Kearon and A. Y. Lee (2004). "Deep venous thrombosis." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 439-456.
- Maier, C. L., B. R. Shepherd, T. Yi and J. S. Pober (2010). "Explant outgrowth, propagation and characterization of human pericytes." Microcirculation **17**(5): 367-380.
- Manly, D. A., J. Boles and N. Mackman (2011). "Role of tissue factor in venous thrombosis." Annu Rev Physiol **73**: 515-525.
- Massague, J. (2000). "How cells read TGF-beta signals." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(3): 169-178.
- Massagué, J. (2012). "TGF- β signaling in development and disease." FEBS Lett **586**(14): 1833.
- Massague, J., S. W. Blain and R. S. Lo (2000). "TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders." Cell **103**(2): 295-309.

- Massague, J., S. Cheifetz, M. Laiho, D. A. Ralph, F. M. Weis and A. Zentella (1992). "Transforming growth factor-beta." Cancer Surv **12**: 81-103.
- Massagué, J. and Q. Xi (2012). "TGF- β control of stem cell differentiation genes." FEBS Lett **586**(14): 1953-1958.
- Massberg, S., M. Gawaz, S. Grüner, V. Schulte, I. Konrad, D. Zohlhöfer, U. Heinzmann and B. Nieswandt (2003). "A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo." J Exp Med **197**(1): 41-49.
- Massberg, S., I. Konrad, A. Bultmann, C. Schulz, G. Munch, M. Peluso, M. Lorenz, S. Schneider, F. Besta, I. Müller, B. Hu, H. Langer, E. Kremmer, M. Rudelius, U. Heinzmann, M. Ungerer and M. Gawaz (2004). "Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo." Faseb j **18**(2): 397-399.
- Matsumoto, K., H. Yoshitomi, J. Rossant and K. S. Zaret (2001). "Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function." Science **294**(5542): 559-563.
- Matthaiou, E.-I., J. Barar, R. Sandaltzopoulos, C. Li, G. Coukos and Y. Omid (2014). "Shikonin-loaded antibody-armed nanoparticles for targeted therapy of ovarian cancer." Int J Nanomedicine **9**: 1855-1870.
- McGeachie, J., P. Campbell, S. Simpson and F. Prendergast (1982). "Arterial vasa vasorum: a quantitative study in the rat." J Anat **134**(Pt 2): 193-197.
- Meadows, K. N., S. Iyer, M. V. Stevens, D. Wang, S. Shechter, C. Perruzzi, T. D. Camenisch and L. E. Benjamin (2009). "Akt promotes endocardial-mesenchyme transition." J Angiogenes Res **1**: 2.
- Mekjavic, I. B. and O. Eiken (2006). "Contribution of thermal and nonthermal factors to the regulation of body temperature in humans." J Appl Physiol (1985) **100**(6): 2065-2072.
- Michel, C. C. and F. E. Curry (1999). "Microvascular permeability." Physiol Rev **79**(3): 703-761.
- Mignatti, P. and D. B. Rifkin (1996). "Plasminogen activators and angiogenesis." Curr Top Microbiol Immunol **213** (Pt 1): 33-50.

- Min, R., Z. Zun, Y. Min, D. Wenhua, Y. Wenjun and Z. Chenping (2010). "Shikonin inhibits tumor invasion via down-regulation of NF-kappaB-mediated MMP-9 expression in human ACC-M cells." Oral Dis.
- Montell, C. and M. J. Caterina (2007). "Thermoregulation: channels that are cool to the core." Curr Biol **17**(20): R885-887.
- Moon, J., S. S. Koh, W. Malilas, I. R. Cho, C. Kaewpiboon, S. Kaowinn, K. Lee, B. H. Jhun, Y. W. Choi and Y. H. Chung (2014). "Acetylshikonin induces apoptosis of hepatitis B virus X protein-expressing human hepatocellular carcinoma cells via endoplasmic reticulum stress." Eur J Pharmacol **735**: 132-140.
- Moore, D. H. and H. Ruska (1957). "The fine structure of capillaries and small arteries." J Biophys Biochem Cytol **3**(3): 457-462.
- Mordasini, P., C. Brekenfeld, J. V. Byrne, U. Fischer, M. Arnold, M. R. Heldner, R. Lüdi, H. P. Mattle, G. Schroth and J. Gralla (2013). "Technical feasibility and application of mechanical thrombectomy with the Solitaire FR Revascularization Device in acute basilar artery occlusion." AJNR Am J Neuroradiol **34**(1): 159-163.
- Moroi, M. and S. M. Jung (2004). "Platelet glycoprotein VI: its structure and function." Thromb Res **114**(4): 221-233.
- Morrison, S. J., N. M. Shah and D. J. Anderson (1997). "Regulatory mechanisms in stem cell biology." Cell **88**(3): 287-298.
- Moses, J. W., N. Kipshidze and M. B. Leon (2002). "Perspectives of drug-eluting stents: the next revolution." Am J Cardiovasc Drugs **2**(3): 163-172.
- Moses, J. W., M. B. Leon, J. J. Popma, P. J. Fitzgerald, D. R. Holmes, C. O'Shaughnessy, R. P. Caputo, D. J. Kereiakes, D. O. Williams, P. S. Teirstein, J. L. Jaeger and R. E. Kuntz (2003). "Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery." N Engl J Med **349**(14): 1315-1323.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.

- Müller W.A., H. M. (2012). Entwicklungsbiologie und Reproduktionsbiologie des Menschen. Berlin Springer Verlag.
- Mund, J. A., D. A. Ingram, M. C. Yoder and J. Case (2009). "Endothelial progenitor cells and cardiovascular cell-based therapies." Cytotherapy **11**(2): 103-113.
- Murakami, M. and M. Simons (2009). "Regulation of vascular integrity." J Mol Med (Berl) **87**(6): 571-582.
- Murphy, D. A., W. Van Alstin, T. Bowersock and C. Burgos (1992). "Binding of a recombinant form of streptococcal protein G to porcine IgG." J Vet Diagn Invest **4**(4): 469-470.
- Napolitano, M., G. Mariani and M. Lapecorella (2010). "Hereditary combined deficiency of the vitamin K-dependent clotting factors." Orphanet J Rare Dis **5**: 21.
- Neufeld, G., T. Cohen, S. Gengrinovitch and Z. Poltorak (1999). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors." Faseb j **13**(1): 9-22.
- Neufeld, G., T. Cohen, H. Gitay-Goren, Z. Poltorak, S. Tessler, R. Sharon, S. Gengrinovitch and B. Z. Levi (1996). "Similarities and differences between the vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants." Cancer Metastasis Rev **15**(2): 153-158.
- Neumann, F.-J. (2005). "Sirolimus-eluting stents: safe and effective in the treatment of in-stent restenosis." Catheter Cardiovasc Interv **66**(2): 163-164.
- Neumann, F.-J. (2008). "[Coronary artery stenosis 2008: what are the indications for stent implantation and what kind of stent?]." Dtsch Med Wochenschr **133**(12): 583.
- Nicosia, R. F. and S. Villaschi (1999). "Autoregulation of angiogenesis by cells of the vessel wall." Int Rev Cytol **185**: 1-43.
- Nijijima, A. (1989). "Neural mechanisms in the control of blood glucose concentration." J Nutr **119**(6): 833-840.
- Nikinmaa, M. (1997). "Oxygen and carbon dioxide transport in vertebrate erythrocytes: an evolutionary change in the role of membrane transport." J Exp Biol **200**(Pt 2): 369-380.

- Niu, Q., C. Perruzzi, D. Voskas, J. Lawler, D. J. Dumont and L. E. Benjamin (2004). "Inhibition of Tie-2 signaling induces endothelial cell apoptosis, decreases Akt signaling, and induces endothelial cell expression of the endogenous anti-angiogenic molecule, thrombospondin-1." Cancer Biol Ther **3**(4): 402-405.
- Obi, S., K. Yamamoto, N. Shimizu, S. Kumagaya, T. Masumura, T. Sokabe, T. Asahara and J. Ando (2009). "Fluid shear stress induces arterial differentiation of endothelial progenitor cells." J Appl Physiol **106**(1): 203-211.
- Ontario, H. Q. (2010). "Stenting for peripheral artery disease of the lower extremities: an evidence-based analysis." Ont Health Technol Assess Ser **10**(18): 1-88.
- Onuma, Y., J. Ormiston and P. W. Serruys (2011). "Bioresorbable scaffold technologies." Circ J **75**(3): 509-520.
- Orlov, S. N. and A. A. Mongin (2007). "Salt-sensing mechanisms in blood pressure regulation and hypertension." Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(4): H2039-2053.
- Ozaki, Y., A. Ohno, Y. Saito and M. Satake (1994). "Accelerative effect of shikonin, alkannin and acetylshikonin on the proliferation of granulation tissue in rats." Biol Pharm Bull **17**(8): 1075-1077.
- Ozaki, Y., A. G. Violaris and P. W. Serruys (1996). "New stent technologies." Prog Cardiovasc Dis **39**(2): 129-140.
- Paku, S. (1998). "Current concepts of tumor-induced angiogenesis." Pathol Oncol Res **4**(1): 62-75.
- Papageorgiou, V. P. (1999). "Chemie und Biologie von Alkannin, Shikonin und verwandten Naphthazarin- Naturstoffen." Angew. Chem. Int. Ed. **38**(111): 280-311,;
- Papageorgiou, V. P., A. N. Assimopoulou and A. C. Ballis (2008). "Alkannins and shikonins: a new class of wound healing agents." Curr Med Chem **15**(30): 3248-3267.

- Park, S. J., S. J. Kang, R. Virmani, M. Nakano and Y. Ueda (2012). "In-stent neoatherosclerosis: a final common pathway of late stent failure." J Am Coll Cardiol **59**(23): 2051-2057.
- Patan, S. (2000). "Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling." J Neurooncol **50**(1-2): 1-15.
- Patan, S. (2004). "Vasculogenesis and angiogenesis." Cancer Treat Res **117**: 3-32.
- Pearce, J. M. (2007). "Malpighi and the discovery of capillaries." Eur Neurol **58**(4): 253-255.
- Peters, K., D. Troyer, S. Kummer, C. J. Kirkpatrick and J. Rauterberg (2002). "Apoptosis causes lumen formation during angiogenesis in vitro." Microvasc Res **64**(2): 334-338.
- Phung, T. L., K. Ziv, D. Dabydeen, G. Eyiah-Mensah, M. Riveros, C. Perruzzi, J. Sun, R. A. Monahan-Earley, I. Shiojima, J. A. Nagy, M. I. Lin, K. Walsh, A. M. Dvorak, D. M. Briscoe, M. Neeman, W. C. Sessa, H. F. Dvorak and L. E. Benjamin (2006). "Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin." Cancer Cell **10**(2): 159-170.
- Pierce, G. F. and T. A. Mustoe (1995). "Pharmacologic enhancement of wound healing." Annu Rev Med **46**: 467-481.
- Prangsaengtong, O., J. Y. Park, A. Inujima, Y. Igarashi, N. Shibahara and K. Koizumi (2013). "Enhancement of Lymphangiogenesis In Vitro via the Regulations of HIF-1 α Expression and Nuclear Translocation by Deoxyshikonin." Evid Based Complement Alternat Med **2013**: 148297.
- Prater, D. N., J. Case, D. A. Ingram and M. C. Yoder (2007). "Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells." Leukemia **21**(6): 1141-1149.
- Przybylowski, C. J., D. Ding, R. M. Starke, C. R. Durst, R. W. Crowley and K. C. Liu (2014). "Evolution of endovascular mechanical thrombectomy for acute ischemic stroke." World J Clin Cases **2**(11): 614-622.
- Rafii, S. and D. Lyden (2003). "Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration." Nat Med **9**(6): 702-712.

- Randall, D. J. (2000). Tierphysiologie. Stuttgart, New York, Thieme.
- Rao, P. S. (1989). "Balloon angioplasty of aortic coarctation: a review." Clin Cardiol **12**(11): 618-628.
- Reidy, J. F. (1987). "Angioplasty in peripheral vascular disease." Postgrad Med J **63**(740): 435-438.
- Resnick, N., T. Collins, W. Atkinson, D. T. Bonthron, C. F. Dewey, Jr. and M. A. Gimbrone, Jr. (1993). "Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(16): 7908.
- Risau, W. (1995). "Differentiation of endothelium." FASEB J **9**(10): 926-933.
- Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." Nature **386**(6626): 671-674.
- Risau, W. and I. Flamme (1995). "Vasculogenesis." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 73-91.
- Robert, B. and D. R. Abrahamson (2001). "Control of glomerular capillary development by growth factor/receptor kinases." Pediatr Nephrol **16**(3): 294-301.
- Rodríguez, D., C. J. Morrison and C. M. Overall (2010). "Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1803**(1): 39-54.
- Sakaguchi, I., M. Tsujimura, N. Ikeda, M. Minamino, Y. Kato, K. Watabe, I. Yano and K. Kaneda (2001). "Granulomatous tissue formation of shikon and shikonin by air pouch method." Biol Pharm Bull **24**(6): 650-655.
- Salven, P., S. Mustjoki, R. Alitalo, K. Alitalo and S. Rafii (2003). "VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells." Blood **101**(1): 168-172.
- Sasaki, K., H. Abe and F. Yoshizaki (2002). "In vitro antifungal activity of naphthoquinone derivatives." Biol Pharm Bull **25**(5): 669-670.

- Sawada, N., A. Jiang, F. Takizawa, A. Safdar, A. Manika, Y. Tesmenitsky, K. T. Kang, J. Bischoff, H. Kalwa, J. L. Sartoretto, Y. Kamei, L. E. Benjamin, H. Watada, Y. Ogawa, Y. Higashikuni, C. W. Kessinger, F. A. Jaffer, T. Michel, M. Sata, K. Croce, R. Tanaka and Z. Arany (2014). "Endothelial PGC-1alpha mediates vascular dysfunction in diabetes." Cell Metab **19**(2): 246-258.
- Schmelzle, T. and M. N. Hall (2000). "TOR, a central controller of cell growth." Cell **103**(2): 253-262.
- Schmidt, R. F. T. (2000). Physiologie des Menschen. Berlin, Heidelberg /// Berlin, Springer.
- Schneeberger, E. E. and R. D. Lynch (2004). "The tight junction: a multifunctional complex." Am J Physiol Cell Physiol **286**(6): C1213-1228.
- Schrimpf, C., O. E. Teebken, M. Wilhelmi and J. S. Duffield (2014). "The role of pericyte detachment in vascular rarefaction." J Vasc Res **51**(4): 247-258.
- Schulz, C., S. Penz, C. Hoffmann, H. Langer, A. Gillitzer, S. Schneider, R. Brandl, S. Seidl, S. Massberg, B. Pichler, E. Kremmer, K. Stellos, T. Schonberger, W. Siess and M. Gawaz (2008). "Platelet GPVI binds to collagenous structures in the core region of human atheromatous plaque and is critical for atheroprogession in vivo." Basic Res Cardiol **103**(4): 356-367.
- Schwartz, S. M., R. L. Heimark and M. W. Majesky (1990). "Developmental mechanisms underlying pathology of arteries." Physiol Rev **70**(4): 1177-1209.
- Semenza, G. L. (2000). "HIF-1: using two hands to flip the angiogenic switch." Cancer Metastasis Rev **19**(1-2): 59-65.
- Seo, A., T. Fujii, T. Inoue, S. Onoda, A. Koga, Y. Tanaka, K. Chin, T. Kurusu, K. Takikawa, T. Shibata, M. Taniguchi and S. Mochizuki (2007). "Initial and long-term outcomes of sirolimus-eluting stents for calcified lesions compared with bare-metal stents." Int Heart J **48**(2): 137-147.
- Sheppard, D. (2000). "In vivo functions of integrins: lessons from null mutations in mice." Matrix Biol **19**(3): 203-209.
- Sick, P., S. Grieshammer and G. Schuler (2001). "[Rate of restenosis after coronary stent implantation depending on regional left ventricular function]." Z Kardiol **90**(10): 745-750.

- Sidney, S., D. B. Petitti, G. A. Soff, D. L. Cundiff, K. K. Tolan and C. P. Quesenberry, Jr. (2004). "Venous thromboembolic disease in users of low-estrogen combined estrogen-progestin oral contraceptives." Contraception **70**(1): 3-10.
- Siqueira, A. F., D. S. Abdalla and S. R. Ferreira (2006). "[LDL: from metabolic syndrome to instability of the atherosclerotic plaque]." Arq Bras Endocrinol Metabol **50**(2): 334-343.
- Sjobring, U., L. Bjorck and W. Kastern (1991). "Streptococcal protein G. Gene structure and protein binding properties." J Biol Chem **266**(1): 399-405.
- Spaet, T. H. (1966). "Hemostatic homeostasis." Blood **28**(1): 112-123.
- Stat.Bundesamt (2014). "Ausführliche vierstellige ICD-10 Klassifikation." **Fachserie 12**(Reihe 4.).
- Staudinger, J. L. and K. Lichti (2008). "Cell signaling and nuclear receptors: new opportunities for molecular pharmaceuticals in liver disease." Mol Pharm **5**(1): 17-34.
- Steen, R. and T. Egeland (1998). "CD34 molecule epitope distribution on cells of haematopoietic origin." Leuk Lymphoma **30**(1-2): 23-30.
- Steinbrecher, U. P. (1991). "Role of lipoprotein peroxidation in the pathogenesis of atherosclerosis." Clin Cardiol **14**(11): 865-867.
- Sun, J. F., T. Phung, I. Shiojima, T. Felske, J. N. Upalakalin, D. Feng, T. Kornaga, T. Dor, A. M. Dvorak, K. Walsh and L. E. Benjamin (2005). "Microvascular patterning is controlled by fine-tuning the Akt signal." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(1): 128-133.
- Tanaka, S., M. Tajima, M. Tsukada and M. Tabata (1986). "A comparative study on anti-inflammatory activities of the enantiomers, shikonin and alkannin." J Nat Prod **49**(3): 466-469.
- Tian, R., Y. Li and M. Gao (2015). "Shikonin causes cell cycle arrest and induces apoptosis by regulating the EGFR/NF- κ B signaling pathway in human epidermoid carcinoma A431 cells." Biosci Rep.

- Tilling, T., C. Engelbertz, S. Decker, D. Korte, S. Huwel and H. J. Galla (2002). "Expression and adhesive properties of basement membrane proteins in cerebral capillary endothelial cell cultures." Cell Tissue Res **310**(1): 19-29.
- Toricelli, A. A., V. Singh, M. R. Santhiago and S. E. Wilson (2013). "The corneal epithelial basement membrane: structure, function, and disease." Invest Ophthalmol Vis Sci **54**(9): 6390-6400.
- Touze, E., L. Trinquart, G. Chatellier and J. L. Mas (2009). "Systematic review of the perioperative risks of stroke or death after carotid angioplasty and stenting." Stroke **40**(12): e683-693.
- Trappmann, B., J. E. Gautrot, J. T. Connelly, D. G. Strange, Y. Li, M. L. Oyen, M. A. Cohen Stuart, H. Boehm, B. Li, V. Vogel, J. P. Spatz, F. M. Watt and W. T. Huck (2012). "Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate." Nat Mater **11**(7): 642-649.
- Triggle, C. R., S. M. Samuel, S. Ravishankar, I. Marei, G. Arunachalam and H. Ding (2012). "The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways." Can J Physiol Pharmacol **90**(6): 713-738.
- Urbich, C. and S. Dimmeler (2005). "Risk factors for coronary artery disease, circulating endothelial progenitor cells, and the role of HMG-CoA reductase inhibitors." Kidney Int **67**(5): 1672-1676.
- van Aken, B. E., D. Seiffert, T. Thinnes and D. J. Loskutoff (1997). "Localization of vitronectin in the normal and atherosclerotic human vessel wall." Histochem Cell Biol **107**(4): 313-320.
- Vesalius, A. (1543). De humani corporis fabrica libri septem.
- Veyssier-Belot, C. and P. Cacoub (1999). "Role of endothelial and smooth muscle cells in the physiopathology and treatment management of pulmonary hypertension." Cardiovasc Res **44**(2): 274-282.
- Violaris, A. G., Y. Ozaki and P. W. Serruys (1997). "Endovascular stents: a 'break through technology', future challenges." Int J Card Imaging **13**(1): 3-13.
- Vokes, S. A. and P. A. Krieg (2002). "Endoderm is required for vascular endothelial tube formation, but not for angioblast specification." Development **129**(3): 775-785.

- Vu, D. M., H. Masuda, T. A. Yokoyama, S. Fujimura, M. Kobori, R. Ito, K. Sawada, A. Saito and T. Asahara (2009). "CD133+ endothelial progenitor cells as a potential cell source for a bioartificial glomerulus." Tissue Eng Part A **15**(10): 3173-3182.
- Wang, C. Y., H. H. Kim, Y. Hiroi, N. Sawada, S. Salomone, L. E. Benjamin, K. Walsh, M. A. Moskowitz and J. K. Liao (2009). "Obesity increases vascular senescence and susceptibility to ischemic injury through chronic activation of Akt and mTOR." Sci Signal **2**(62): ra11.
- Wang, H., C. Wu, S. Wan, H. Zhang, S. Zhou and G. Liu (2013). "Shikonin attenuates lung cancer cell adhesion to extracellular matrix and metastasis by inhibiting integrin beta1 expression and the ERK1/2 signaling pathway." Toxicology **308**: 104-112.
- Wang, W. J., J. Y. Bai, D. P. Liu, L. M. Xue and X. Y. Zhu (1994). "[The antiinflammatory activity of shikonin and its inhibitory effect on leukotriene B4 biosynthesis]." Yao Xue Xue Bao **29**(3): 161-165.
- Wang, Y., M. Nakayama, M. E. Pitulescu, T. S. Schmidt, M. L. Bochenek, A. Sakakibara, S. Adams, A. Davy, U. Deutsch, U. Luthi, A. Barberis, L. E. Benjamin, T. Makinen, C. D. Nobes and R. H. Adams (2010). "Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis." Nature **465**(7297): 483-486.
- Wang, Y., Y. Zhou, G. Jia, B. Han, J. Liu, Y. Teng, J. Lv, Z. Song, Y. Li, L. Ji, S. Pan, H. Jiang and B. Sun (2014). "Shikonin suppresses tumor growth and synergizes with gemcitabine in a pancreatic cancer xenograft model: Involvement of NF-kappaB signaling pathway." Biochem Pharmacol **88**(3): 322-333.
- Watson, T., P. K. Goon and G. Y. Lip (2008). "Endothelial progenitor cells, endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress in hypertension." Antioxid Redox Signal **10**(6): 1079-1088.
- Watt, F. M. and B. L. Hogan (2000). "Out of Eden: stem cells and their niches." Science **287**(5457): 1427-1430.
- Weigmann, A., D. Corbeil, A. Hellwig and W. B. Huttner (1997). "Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12425-12430.

Weir, I. (2006). "Coronary artery bypass." Ann R Coll Surg Engl **88**(2): 99-102.

Welsch, U. (2010). Lehrbuch Histologie, Elsevier GmbH.

Wiench, B., T. Eichhorn, M. Paulsen and T. Efferth (2012). "Shikonin directly targets mitochondria and causes mitochondrial dysfunction in cancer cells." Evid Based Complement Alternat Med **2012**: 726025.

Windecker, S. and B. Meier (2007). "Late coronary stent thrombosis." Circulation **116**(17): 1952-1965.

Wu, M. Y. and C. S. Hill (2009). "Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis." Dev Cell **16**(3): 329-343.

Xu, J., D. Rodriguez, E. Petitclerc, J. J. Kim, M. Hangai, Y. S. Moon, G. E. Davis and P. C. Brooks (2001). "Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo." J Cell Biol **154**(5): 1069-1079.

Xu, Y., X. Xu, X. Gao, H. Chen and L. Geng (2014). "Shikonin suppresses IL-17-induced VEGF expression via blockage of JAK2/STAT3 pathway." Int Immunopharmacol **19**(2): 327-333.

Xue, G. and B. A. Hemmings (2013). "PKB/Akt-dependent regulation of cell motility." J Natl Cancer Inst **105**(6): 393-404.

Xue, G., D. F. Restuccia, Q. Lan, D. Hynx, S. Dirnhofer, D. Hess, C. Ruegg and B. A. Hemmings (2012). "Akt/PKB-mediated phosphorylation of Twist1 promotes tumor metastasis via mediating cross-talk between PI3K/Akt and TGF-beta signaling axes." Cancer Discov **2**(3): 248-259.

Yin, A. H., S. Miraglia, E. D. Zanjani, G. Almeida-Porada, M. Ogawa, A. G. Leary, J. Olweus, J. Kearney and D. W. Buck (1997). "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells." Blood **90**(12): 5002-5012.

Young, J. A. and B. S. Freedman (1971). "Renal tubular transport of amino acids." Clin Chem **17**(4): 245-266.

Young, P. E., S. Baumhueter and L. A. Lasky (1995). "The sialomucin CD34 is expressed on hematopoietic cells and blood vessels during murine development." Blood **85**(1): 96-105.

- Zhang, X., W. Hu, F. Wu, X. Yuan and J. Hu (2015). "Shikonin inhibits TNF-alpha-induced growth and invasion of rat aortic vascular smooth muscle cells." Can J Physiol Pharmacol: 1-10.
- Zhang, Y., H. Dong, Y. Xu, R. Shi, J. Gu, H. Lang, J. Gao and W. W. Zhang (2015). "External ultrasound for carotid atherosclerotic plaque treatment." J Ultrasound Med **34**(3): 451-459.
- Zhang, Z. Q., X. C. Cao, L. Zhang and W. L. Zhu (2005). "[Effect of shikonin, a phytochemical from *Lithospermum erythrorhizon*, on rat vascular smooth muscle cells proliferation and apoptosis in vitro]." Zhonghua Yi Xue Za Zhi **85**(21): 1484-1488.
- Zhao, Q., A. N. Assimopoulou, S. M. Klauk, H. Damianakos, I. Chinou, N. Kretschmer, J. L. Rios, V. P. Papageorgiou, R. Bauer and T. Efferth (2015). "Inhibition of c-MYC with involvement of ERK/JNK/MAPK and AKT pathways as a novel mechanism for shikonin and its derivatives in killing leukemia cells." Oncotarget **6**(36): 38934-38951.
- Zhao, Y. X., Y. L. Luo, W. Y. Lai, J. Xu, D. Q. Ren and Z. X. Li (2008). "[Shikonin inhibits the proliferation of human airway smooth muscle cells]." Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao **28**(5): 805-807.
- Zheng, X. F., D. Florentino, J. Chen, G. R. Crabtree and S. L. Schreiber (1995). "TOR kinase domains are required for two distinct functions, only one of which is inhibited by rapamycin." Cell **82**(1): 121-130.
- Zieman, S. J., V. Melenovsky and D. A. Kass (2005). "Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(5): 932-943.
- Zierler, K. (1999). "Whole body glucose metabolism." Am J Physiol **276**(3 Pt 1): E409-426.

7. ANHANG

7.1. ABBILDUNGSVERZEICHNIS:

ABBILDUNG 1-1: ZELLULÄRE ZUSAMMENSETZUNG DES BLUTES PRO μL . (LIPPERT 2006)	3
ABBILDUNG 1-2: STAMMBAUM DER CD34-POSITIVEN HÄMATOPOETISCHEN STAMMZELLE.....	3
ABBILDUNG 1-3: SKIZZE DES MORPHOLOGISCHEN DREISCHICHTIGEN BLUTGEFÄßAUFBAUS	5
ABBILDUNG 1-4: ZELL-ZELLKONTAKTE UND INTEGRINE (ADAPTIERT AUS BALLIGAND, FERON ET AL. 2009). 15	
ABBILDUNG 1-5: NICHE UND DIFFERENZIERUNG DER ENDOTHELIALEN	18
ABBILDUNG 1-6: CD34 SIALOMUCIN.....	20
ABBILDUNG 1-7: CD133/PROMININ.....	20
ABBILDUNG 1-8: VEGF-REZEPTOR-2 AKTIVIERUNG.....	21
ABBILDUNG 1-9: AKTIVIERUNG DES ENOS SIGNALWEGS (ADAPTIERT AUS BIR, XIONG ET AL. 2012)	22
ABBILDUNG 1-10: TGF- β SIGNALING UND ENDOGLIN (ADAPTIERT AUS FONSATTI 2009).....	23
ABBILDUNG 1-11: ÜBERSICHT TGF- β SIGNALWEG, (ADAPTIERT AUS CELL-SIGNALING).....	24
ABBILDUNG 1-12: AKT-SIGNALWEG (ADAPTIERT UND EXZERPIERT AUS SAB SIGNALWAY ANTIBODY)	25
ABBILDUNG 1-13: TODESURSACHEN NACH KRANKHEITSARTEN	26
ABBILDUNG 1-14: STENOSE-INDUKTION DURCH LDL-MIGRATION AUS DEM BLUT IN DIE.....	29
ABBILDUNG 1-15: ABLAUFSHEMA EINER STENT-ANGIOPLASTIE.	31
ABBILDUNG 1-16: „BARE METAL STENTS“ IN EINER PETRISCHALE	31
ABBILDUNG 1-17: STRUKTURFORMEL, CHEM. FORMEL UND MOLEKULARGEWICHT VON TAXOL (LINKS), ...	34
ABBILDUNG 1-18: STRUKTURFORMEL, CHEM. FORMEL UND MOLEKULARGEWICHT VON SHIKONIN.....	34
ABBILDUNG 1-19: SCHEMA DES GPVI-MOLEKÜLS,.....	36
ABBILDUNG 1-20: SCHEMA GPVI CD133-MOLEKÜL.....	36
ABBILDUNG 2-1: TABELLE MIT DER KONZENTRATIONSAUSWAHL DER PHARMAZEUTISCHEN SUBSTANZEN	48
ABBILDUNG 2-2: UNTERSUCHTE BESCHICHTUNGSMATERIALIEN FÜR DIE PHARMAKONSTUDIE.....	49
ABBILDUNG 2-3: SCHEMA DER UNTERSUCHUNGEN ZUR PHARMAZEUTISCHEN ZELLINHIBITION	50
ABBILDUNG 2-4: IMMUNZYTOCHEMISCHE DARSTELLUNG DES VIMENTINZYTOSKELETTS	52
ABBILDUNG 2-5: SCHRITTE DER PBMC-ISOLIERUNG MITTELS DICHTEGRAIDENTENZENTRIFUGATION.	53
ABBILDUNG 2-6: ABLAUF DER MACS ISOLIERUNG MIT LS-SÄULE [®] UND MIDI-MAGNET [®]	54
ABBILDUNG 2-7: DARSTELLUNG DER PECON-FLUSSKAMMER (GESCHLOSSENER ZUSTAND).	57
ABBILDUNG 2-8: DARSTELLUNG DER PECON-FLUSSKAMMER IN ZERLEGTEM ZUSTAND.	57
ABBILDUNG 2-9: SCHEMA DER <i>IN VITRO</i> -ADHÄSIONSEXPERIMENTE IM PECON FLUSSKAMMERMODELL MIT ZELLAPPLIKATION PER SPRITZENPERFUSOR [®]	58
ABBILDUNG 2-10: SCHEMA DER ENTNAHMEREIONEN DER VERWENDETEN PORCINEN BLUTGEFÄßE FÜR DIE <i>EX VIVO</i> -EXPLANTATVERSUCHE.	60
ABBILDUNG 2-11: KOAXIALGLASZYLINDER ZUR VERSORGUNG UND PERFUSION VON BLUTGEFÄßEXPLANTATEN FÜR DIE <i>EX VIVO</i> -EXPLANTATVERSUCHE	61
ABBILDUNG 2-12: DARSTELLUNG DES DENUDATIONSPRINZIPS.	62

Abbildungsverzeichnis:

ABBILDUNG 2-13: SKIZZE EINES AGAROSE-GELS MIT DNS-LEITERN.....	70
ABBILDUNG 2-14: SKIZZE EINER DOT-BLOT-ANALYSE:	72
ABBILDUNG 2-15: SKIZZE DER PROTEINÜBERTRAGUNG AUS DEM SDS-GEL AUF DIE PVDF MEMBRAN	73
ABBILDUNG 3-1: MIKROSKOPISCHE PHASENKONTRASTAUFNAHME DER ZUR PHARMAZEUTISCHEN UNTERSUCHUNG VERWENDETEN HUMANEN ZELLTYPEN.	75
ABBILDUNG 3-2: TABELLE DES KONZENTRATIONSBEREICHES.	76
ABBILDUNG 3-3: SCHEMA DES UNTERSUCHUNGSABLAUFS ZUR PHARMAZEUTISCHEN ZELLINHIBITION.....	77
ABBILDUNG 3-4: EXTINKTIONSWERTE DES MTT-ASSAYS IM VERGLEICH ZUR KONTROLLE, DER FÜR 48 STUNDEN AUF SHIKONIN KULTIVierten ZELLEN.	78
ABBILDUNG 3-5: PROZENTUALE EXTINKTIONSWERTE DES MTT-ASSAYS IM VERGLEICH ZUR KONTROLLE AUS ABBILDUNG 3-4 FÜR DIE KONZENTRATIONEN 1 µM, 2 µM UND 16 µM (SHIKONIN).	79
ABBILDUNG 3-6: PROZENTUALE EXTINKTIONSWERTE DES MTT-ASSAYS IM VERGLEICH ZUR KONTROLLE (RAPAMYCIN).....	80
ABBILDUNG 3-7: QUANTIFIZIERUNG DES ZELLTODS (PI-EINLAGERUNG) IN ABHÄNGIGKEIT ZUR BESCHICHTUNGSKONZENTRATION MIT SHIKONIN.	81
ABBILDUNG 3-8: IMMUNZYTOCHEMISCHE FÄRBUNG DES ZYTOSEKELLETS (VIMENTIN)	83
ABBILDUNG 3-9: IMMUNZYTOCHEMISCHE FLUORESCENZFÄRBUNG DER DREI ZELLTYPEN NACH 48 STÜNDIGER KULTIVIERUNG AUF SHIKONIN-BESCHICHTETEN EDELSTAHLPLÄTTCHEN.....	83
ABBILDUNG 3-10: IMMUNZYTOCHEMISCHE FLUORESCENZFÄRBUNG DER DREI ZELLTYPEN NACH 48- STÜNDIGER KULTIVIERUNG AUF MIT RAPAMYCIN BESCHICHTETEN EDELSTAHLPLÄTTCHEN.	84
ABBILDUNG 3-11: REM-AUFNAHME VON MIT HAECs BESIEDELTEN STENTS.	85
ABBILDUNG 3-12: REM-DETAILAUFNAHME EINER STRUT-BIEGUNG.	85
ABBILDUNG 3-13: IMMUNFLUORESCENZ-DARSTELLUNG VON <i>IN VITRO</i> MIT EPCS BESIEDELTEN STENTS. ...	86
ABBILDUNG 3-14: DIE TABELLARISCHE ÜBERSICHT ÜBER DIE UNTERSUCHTEN PARAMETER ZUR ISOLATION UND KULTIVIERUNG VON ENDOTHELIALEN VORLÄUFERZELLEN.	87
ABBILDUNG 3-15: ERFOLGREICHE ISOLATION VON EPCS AUS LEUKAPHERESE-FILTRAT.	88
ABBILDUNG 3-16: DARGESTELLT IST ZEITLICHE VERLAUF DER EPC-DIFFERENZIERUNG IN DER ZELLKULTUR. 89	
ABBILDUNG 3-17: DIE IMMUNZYTOCHEMISCHE FÄRBUNG DER MARKER: ENDOGLIN (CD105), VON WILLEBRAND FAKTOR (VWF) SOWIE DES VEGF-REZEPTORS-II (VEGF-RII)	90
ABBILDUNG 3-18: IMMUNZYTOCHEMISCHE FÄRBUNG VON ANGEHAFTETEN EPC'S AUF MIT PROTEIN-G UND IGG-ANTIKÖRPER BESCHICHTETEN DECKGLÄSERN.	91
ABBILDUNG 3-19: MITTELWERTE DER IGG-VERMITTELTEN ZELLADHÄSION AUF PROTEIN-G VORBESCHICHTETEN DECKGLÄSERN IM PECON-FLUSSKAMMER-MODELL	92
ABBILDUNG 3-20: MIKROSKOPISCHE PHASENKONTRASTDARSTELLUNG DER ANTIKÖRPERKONSTRUKT- VERMITTELTEN ZELLADHÄSION AUF „MICROARRAY SPOTS“	93
ABBILDUNG 3-21: MITTLERE ANZAHL ADHÄRENTER ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT DER JEWEILIGEN BESCHICHTUNG DER „MICROARRAY SPOTS“.	94
ABBILDUNG 3-22: EPC ADHÄSIONS-NACHWEIS IN PORCINEN BLUTGEFÄßEXPLANTATEN MITTELS <i>IN SITU</i> - HYBRIDISIERUNG (ISH) FÜR HUMANSPEZIFISCHE ALU-SEQUENZEN.....	95
ABBILDUNG 3-23: DARGESTELLT IST DIE ANZAHL DER INTRALUMINAL ADHÄRENTEN ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER BESCHICHTUNG DER BLUTGEFÄßEXPLANTATE.....	96
ABBILDUNG 3-24: ERGEBNISSE DER WESTERN-BLOTS FÜR AKT, RESP. PH.AKT.....	98

7.2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikro-Molar
Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AKT	Gen der Phosphokinase B (PKB)
AoSM	Engl. "aortic smooth muscle cells" = aortale glatte Muskelzellen
APC	Engl. "activating protein c"
AS	Aminosäure
ASC	adulte Stammzellen
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	Engl. "basic fibroblast growth factor"
BMP	Engl. "bone morphogenic protein"
BMS	Engl. "bare metal stents"
bp	Engl. "base pair" = Basenpaar (Längenangabe der RNS/DNS)
BRS	Engl. "bio resorbable stents" = biologisch resorbierbaren Stents
BSA	bovines Serum Albumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calzium-Ion
ca.	circa
CD	Engl. "cluster of differentiation"
CD105	Endoglin
CD133	Prominin (Stammzell-Marker)
CD34	Sialomucin (Marker für hämatopoetische Stammzellen)
CD36	Thrombospondin Rezeptor
Cl ⁻	Chlorid-Ion
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter

Abkürzungsverzeichnis

CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRP	C- reaktives Protein
DAXX	Engl. "death associated protein 6"
ddH ₂ O	2fach destilliertes Wasser
DES	Engl. "drug eluting stents"
DMEM	Engl. "Dulbeco's Modified Eagle Medium"
DMSO	Engl. "Dimethylsulfoxide"
DNAse	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EBM	Endothel Medium
ECM	Engl. "extracellular matrix" = Extrazelluläre Matrix
eNOS	Engl. "endothelial nitric oxide synthase"
EPC	Engl. "endothelial progenitor cells"
ESC	embryonale Stammzellen
ERK	Engl. "extracellular signal-regulated kinases"
EtOH	Ethanol
<i>ex vivo</i>	Lat. „außerhalb des Körpers“; Versuche außerhalb des Körpers
FCS	Engl. "fetal calf serum"
FF239	Engl. "foreskin fibroblasts 239"
G- CSF	Engl. "granulocyte stimulating factor"
GP	Glykoprotein
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HAEC	Engl. "human aortic endothelial cells" = human aortale Endothelzellen
HBSS	Engl. "Hanks buffered salt solution"
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxilin-Eosin -(Färbung)
HIF	Engl. "hypoxia inducible factor"
ICD-10	Engl. "international statistical classification of diseases"
IgG	Immunglobulin G
<i>in vitro</i>	Lat. "im Glas"; Versuche die in Zellkulturgefäßen stattfinden
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
K ⁺	Kalium-Ion
kD	kilo Dalton (Einheit der Proteingröße)
l	Liter

Abkürzungsverzeichnis

LDL	Engl. "low density lipoprotein"
m	Meter
MACS	Engl. "magnetic cell separation"
MAPK	Engl. "microtubule-associated protein kinase" (ursprünglich ERK)
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium Ion
Min.	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP-S	Matrix-Metallo-Proteinasen-System
mTOR	Engl. "mammalian target of Rapamycin"
MTT	Zellviabilitätsassay auf Formazan Basis
MW	Mittelwert
n. Chr.	nach Christus
N ₂	molekularer Stickstoff
Na ⁺	Natrium Ion
NaCl	Natrium Chlorid = Kochsalz
NAD/ NADH	Nicotinamid- Adenin- Dinucleotid /(hydroxiliert)
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaOH	Natrimhydroxid
NFκβ	Engl. "nuclear factor kappa beta"
ng	Nanogramm
NGF	Engl. "nerve growth factor"
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Engl. "nitric oxide synthase"
O ₂	molekularer Sauerstoff
oxLDL	Engl. "oxidized low density lipoprotein"
PA-S	Plasminogen-Aktivator-System
PBMC	Periphere- Mononukleäre- Blutzellen
PBS	Engl. "phosphate bufferd saline"
PCR	Engl. "polymerase chain reaction" = Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Engl. "Plateled derived growth factor"
PDGF-BB	Engl. "platelet derived growth factor-BB"

<i>per se</i>	Lat. „an sich, für sich“
PFA	Paraformaldehyd
phospho AKT	aktiviertes /phosphoryliertes Gen der Phosphokinase B (PKB)
PI	Propidium Iodid
PIGF	Engl. "Phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F protein"
PLA	Engl. "poly lactic acid"
Prot.G	Protein G
PTA	Perkutane transluminale Angioplastie
resp.	respektive
RNAse	Ribonuklease
ROS	Engl. "reactive oxygen species"
SDF	Engl. "stromal derived factor"
SDF1	Engl. "stromal derived factor 1"
SDS	Engl. „Sodium-dodecylsulfate“
Sek.	Sekunde
SMAD	Protein (benannt nach SMA (aus <i>C.elegans</i>) und MAD aus (<i>Drosophila</i>))
SmBM	Engl. "smooth muscle cell basal medium" = glattes Muskelzell Medium
Std.	Stunde
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin
TF	Engl. "tissue factor"
TGF- α	Engl. "transforming growth factor-alpha"
TGF- β	Engl. "transforming growth factor-beta"
Tie2	Tyrosin Kinase Rezeptor 2
TNF- α	Engl. "tumor necrosis factor-alpha"
t-PA	Engl. "tissue Plasmin Activator"
Twist1	Genprodukt eines in der Embryonalentwicklung aktiven Master-Gens
v. Chr.	vor Christus
VEGF-A	Engl. "vascular endothelial growth factor -a"
VEGFR	Engl. "vascular endothelial growth factor receptor"

7.3. DANKSAGUNG

Angefertigt wurde diese Arbeit zwar von mir, passiv im Hintergrund waren am erfolgreichen Gelingen jedoch weitaus mehr Personen beteiligt als nur ich. All jenen möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

An erster Stelle steht hier natürlich das Anatomische Institut Tübingen mit seiner wechselnden Leitung. Einerseits für die Vergabe des durchweg spannenden Promotionsthemas, andererseits auch für die Möglichkeit dieses, in der Gruppe rund um Prof. Dr. Hirt vollenden zu können.
„Vielen herzlichen Dank dafür Beppo!“

Weiterhin gilt mein Dank Frau Dr. Wizenmann die mir im Rahmen ihrer Betreuung stets mit Rat und guten Ideen zur Seite stand und mich unterstützte. Herrn Prof. Dr. Kohler und Frau Prof. Dr. Schenke-Layland möchte ich hier für die Begutachtung der Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Just danke ich für seine geduldige, freundschaftliche und zurückhaltende doch fachlich stets zielgerichtete Beurteilung meiner Arbeit. Seine Ratschläge und Einschätzungen waren mir zu jeder Zeit wichtig und äußerst wertvoll.

Ähnliches gilt für meine Familie und Andrea – Beide bildeten in all den Jahren Anker und Ruhepol, wann immer ich ihn suchte und brauchte. Nicht zuletzt sie haben mich auf meinem Weg bis hierhin begleitet und dabei immer unterstützt, wie auch motiviert. Ihnen und ihrer unendlichen Geduld verdanke ich einen wesentlichen Teil der Kraft für diese Arbeit. Eure Hilfe und Euer Rat bedeuten mir unvorstellbar viel, wofür ich Euch hier zutiefst danken möchte.

Darüber hinaus gilt mein Dank natürlich allen meinen Freunden, Kollegen und Bekannten. All diejenigen die mich während der Höhen und Tiefen der letzten Jahre ertragen, und mich wieder aufgebaut haben.

7.4. LEBENSLAUF

7.5. PUBLIKATIONEN

Kongressbeiträge:

2009:

Visualisierung eisenmarkierter endothelialer Vorläuferzellen im dynamischen in-vitro Modell

RöFo - Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren;

(Fortschr Röntgenstr) © Georg Thieme Verlag KG 2015; Ausgabe 03, 2009

Schmehl, J.; Bantleon, R.; Kehlbach, R.; **von der Ruhr, JW**; Wiesinger, B.; Claussen, C.; Wiskirchen, J.; Tepe, G.:

2010:

Stentbeschichtung mit dem Naphtachinon-Derivat Shikonin zur Restenoseprophylaxe nach Stentimplantation

RöFo - Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren;

(Fortschr Röntgenstr) © Georg Thieme Verlag KG 2015; Ausgabe 182 · March 2010

J Schmehl ¹, **JW von der Ruhr** ², P Mahdavi ¹, B Behnisch ³, T Skutella ², C Claussen ¹, G Tepe ⁴

Poster:

2007:

3rd World conference on regenerative medicine; WCRM; 17. - 20. Oktober 2007, Leipzig,

Deutschland

Improved vascular regeneration and impeding of re-stenosis by Shikonin based stent coatings

J.W. von der Ruhr¹, J. Schmehl², S. Conrad¹, T. Skutella¹

2008:

BioStar 2008; 3rd Congress on Regenerative Biology and Medicine; 9.- 11. Oktober 2008. Stuttgart,

Deutschland

Improved Vascular Regeneration and Impeding of Re-stenosis by Shikonin Based Stent Coatings

J.W. von der Ruhr¹, J. Schmehl², S. Conrad¹, T. Skutella¹

2009:

Deutsche Gesellschaft für Kardiologie; 75. Jahrestagung, 16. April 2009, Mannheim, Deutschland

Capture of endothelial progenitor cells by a bispecific protein/monoclonal antibody molecule induces re-endothelialization of vascular lesions

H.F. Langer¹, **J.W. von der Ruhr**², K. Daub¹, T. Schönberger¹, K. Stellos¹, A.E. May¹, A. Gauss¹, R. Hafner¹, H.-J. Buehring³, K. Klingel⁴, S. Conrad², M. Schaller⁵, M. van Zaandvort⁶, G. Jung⁷, T. Skutella¹, M. Gawaz¹

4th World conference on regenerative medicine; WCRM, 28.10. – 01.11. 2009, Leipzig

Capture of endothelial progenitor cells (EPC) by a bispecific protein/monoclonal antibody molecule induces re-endothelialization of vascular lesions

H.F. Langer¹, **J.W. von der Ruhr**², K. Daub¹, T. Schönberger¹, K. Stellos¹, A.E. May¹, A. Gauss¹, R. Hafner¹, H.-J. Buehring³, K. Klingel⁴, S. Conrad², M. Schaller⁵, M. van Zaandvort⁶, G. Jung⁷, T. Skutella¹, M. Gawaz¹

2010:

BioStar 2008; 4th Congress on Regenerative Biology and Medicine; 13.- 15. Oktober 2010

Stuttgart, Deutschland

Shikonin Coating – Prophylaxis of Re-Stenosis after Stenting?

J.W. von der Ruhr¹, J. Schmehl², P. Mahdavi², B. Behnisch, C.D. Claussen², G. Tepe⁴, T. Skutella⁵

2011:

5th World conference on regenerative medicine; WCRM; 02.- 04. November 2011, Leipzig

Different Therapeutic Approaches to Improve Re-Endothelialization in Order to Avoid Re-Stenosis

Jürgen W. von der Ruhr^{1*}, Harald F. Langer^{2*}, Sabine Conrad¹, Karin Daub², Tanja Schoenberger², Konstantinos Stellos², Andreas E May², Alexandra Gauß², Ramona Hafner², Peter Lang³, Michael Schumm³, Hans-Jörg Bühring⁴, Karin Klingel⁵, Martin Schaller⁶, Marc van Zandvoort⁷, Gundram Jung⁸, Stefanie Dimmeler⁹, Meinrad Gawaz² & Thomas Skutella^{1*}

2014:

Joint meeting of Anatomical Societies; 24.- 27. September. 2014, Salzburg, Austria

Aerosol Based Cell and Tissue Cultivation: An Alternative Cell Culture Technique

J.W. von der Ruhr¹, K. Seid¹, T. Schmidt², D. Abendrot³, B. Hirt¹, L. Just¹

2015:

110th Annual Meeting / 31. Arbeitstagung of the Anatomical Society, Würzburg, Germany 23.- 25. September. 2015, Würzburg, Deutschland

- Culturing in Aerosol - A New Dimension in Cell and Tissue Culture Technology

J.W. von der Ruhr¹, K. Seid¹, P. Neckel¹, T. Schmidt², D. Abendrot³, B. Hirt¹, L. Just¹

Publikationen:

2010:

Capture of endothelial progenitor cells by a bispecific protein/monoclonal antibody molecule induces reendothelialization of vascular lesions.

J Mol Med (Berl). 2010 Jul;88(7):687-99. doi: 10.1007/s00109-010-0614-5. Epub 2010 Apr 23.

PMID: 20414631

Langer HF¹, von der Ruhr JW², Daub K¹, Schoenberger T¹, Stellos K¹, May AE¹, Schnell H¹, Gauss A¹, Hafner R¹, Lang P³, Schumm M³, Bühring HJ⁴, Klingel K⁵, Conrad S², Schaller M⁶, van Zandvoort M⁷, Jung G⁸, Dimmeler S⁹, Skutella T², Gawaz M¹.

2013:

Balloon coating with rapamycin using an on-site coating device.

Cardiovasc Intervent Radiol. 2013 Jun;36(3):756-63. doi: 10.1007/s00270-013-0583-5. Epub 2013 Feb 22. PMID: 23435745

Schmehl J¹, von der Ruhr J², Dobratz M¹, Kehlbach R¹, Braun I³, Greiner TO, Claussen CD¹, Behnisch B³.