

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Inneren Medizin
Medizinische Klinik III (Kardiologie, Angiologie)
Direktor: Prof. Dr. Andreas M. Zeiher

**"Die Rolle von Junctional Adhesion Molecule-C bei der
Interaktion zwischen Thrombozyten und CD34⁺ Zellen"**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Viktoria Panagiota

aus Rhodos, Griechenland

Frankfurt am Main, 2017

Dekan: Prof. Dr. Josef Pfeilschifter
Referent: Prof. Dr. Konstantinos Stellos
Korreferent: Prof. Dr. Ralf Brandes
Tag der mündlichen Prüfung: 07.09.2017

Für meine Familie

Επιστήμη ποιητική ευδαιμονίας

Plátōn, 428-348 v. Chr.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Myokardinfarkt	1
1.1.1 Pathophysiologie der Atherosklerose	2
1.1.2 Therapie des Myokardinfarktes.....	6
1.1.3 Stammzellen	7
1.2 Die Rolle der Thrombozyten im akuten Myokardinfarkt	13
1.2.1 Thrombozyten und atherosklerotische Plaques.....	13
1.2.2 Plättchenadhäsion, -sekretion und Thrombusentstehung.....	15
1.3 Thrombozyten und Wundheilung	17
1.4 Thrombozyten und Gefäßintegrität	18
1.5 Thrombozyten und bioaktive Mediatoren	18
1.6 Entzündung nach Myokardinfarkt	19
1.6.1 Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten	19
1.6.2 Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothelzellen	23
1.8 Chemokine	28
1.8.1 CXCL12/CXCR4 Achse	29
1.9 Integrine und Immunglobuline	31
1.10 JAM-Familie	33
1.10.1 Nomenklatur, Struktur und biochemische Eigenschaften	33
1.10.2 Gewebeverteilung und Zellexpression.....	35
1.10.3 Die JAMs Interaktionen	36
1.10.4 Junctional Adhesion Molecule C.....	38
2. ZIELSETZUNG	45
3. MATERIAL UND METHODIK	46
3.1 Patienten	46
3.2 Blutentnahme	47
3.3 Durchflusszytometrie	47
3.3.1 Theoretische Grundlange.....	47
3.3.2 Praktische Durchführung und Auswertung	51
3.3.3 Vollblut Durchflusszytometrie.....	52
3.3.4 Durchflusszytometrie von Thrombozyten.....	52

3.3.5 Durchflusszytometrie von endothelialen Progenitorzellen	53
3.4 Isolierung von humanen Thrombozyten	54
3.5 Isolierung und Kultivierung von humanen CD34⁺ Zellen.....	54
3.6 Isolierung und Kultivierung humaner arterieller Endothelzellen.....	55
3.7 Adhäsionsassays unter statischen und dynamischen Bedingungen	55
3.8 Colony Forming Unit Assay	57
3.9 Immunofluoreszenzmikroskopie	57
3.10 Co-culture assays und Differenzierung in Makrophagen/Schaumzellen	58
3.11 Datenpräsentation und statistische Berechnungen	58
4. ERGEBNISSE	62
4.1 Klinische Eigenschaften der Patientenkohorte	62
4.2 Die Expression von JAM-C auf der Oberfläche von humanen Thrombozyten ist nach Thrombozytenaktivierung erhöht.....	64
4.3 Die Expression von JAM-C auf der Oberfläche von humanen Thrombozyten korreliert mit der P-Selektin-Expression bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung.	65
4.4 Die Adhäsion von humanen CD34 ⁺ Progenitorzellen über immobilisierten Thrombozyten wird unter statischen Bedingungen durch JAM-C/MAC-1-Interaktionen vermittelt.....	66
4.5 Die Adhäsion von humanen CD34 ⁺ Progenitorzellen über immobilisierten Thrombozyten wird, auch unter dynamischen Bedingungen, durch die JAM-C/MAC-1-Interaktionen vermittelt.	69
4.6 JAM-C hat <i>in vitro</i> keinen Einfluss auf die thrombozytenvermittelte CD34 ⁺ Zelldifferenzierung zu Endothelzellen oder Makrophagen/Schaumzellen.	72
5. DISKUSSION.....	78
5.1 Wichtige Ergebnisse	78
5.2 Die Rolle der Thrombozyten in der vaskulären Homöostase und Inflammation	78
5.2.1 Thrombozyten adhärieren an verletztem Endothel	78
5.2.2 Thrombozyten interagieren mit der Gefäßwand	80

5.2.3	Differenzielle Plättchensekretion reguliert Wundheilung und Angiogenese	81
5.2.4	Thrombozyten interagieren mit den Progenitorzellen	82
5.2.5	Thrombozyten rekrutieren Progenitorzellen an der Gefäßwand	84
5.2.6	Thrombozyten unterstützen die Differenzierung von Progenitorzellen zu Endothelzellen.....	86
5.2.7	Defekte in der Interaktion zwischen Thrombozyten und Progenitorzellen bei Patienten mit vaskulären Erkrankungen	88
5.3	Myokardinfarkt: Prognose und Therapie	89
5.3.1	Traditionelle Antiplättchensubstanzen für kardiokoronare Prävention und Verhinderung vor Rethrombosen	90
5.3.3	Junctional Adhäsionsmoleküle als neue Zielstrukturen	93
5.3.4	Thrombozyten und Regeneration	94
5.3.5	Knochenmarkzellen, CD34 ⁺ Zellen und kardiale Regeneration	96
5.4	Schlussfolgerung und Ausblick	100
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	102
7.	ABSTRACT	103
8.	LITERATURVERZEICHNIS	104
9.	ANHANG	144
9.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	144
9.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	150
9.3	TABELLENVERZEICHNIS	151
10.	DANKSAGUNG	152
11.	PUBLIKATIONEN	153
12.	LEBENS LAUF.....	160
13.	SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG.....	162

1. EINLEITUNG

1.1 Myokardinfarkt

Der Myokardinfarkt basiert auf einem akuten thrombotischen Verschluss eines Koronargefäßes und zählt zu einer der häufigsten Todesursachen in Industrieländern. Das Statistische Bundesamt (Destatis) gab bekannt (Pressemitteilung Nr. 022 vom 19.01.2017), dass im Jahr 2015, ähnlich wie in den Vorjahren, Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems die häufigste Todesursache mit 39% aller Sterbefälle in Deutschland darstellten. Allein im Jahr 2015 verstarben in Deutschland 50.948 Menschen an einem Herzinfarkt.

Laut dem Deutschen Herzbericht von 2015 beträgt die Inzidenz des Myokardinfarkts in Deutschland 250-300/100.000 Einwohner pro Jahr. Ähnliche Inzidenzen wurden in den Niederlanden, Nordamerika, Österreich, und Polen beobachtet. Trotz dieser Ähnlichkeit zeigen die Gesamtdaten der Weltgesundheitsorganisation (WHO World Health Organisation) große geographische Unterschiede in der Inzidenz.

Zu den kardiovaskulären Risikofaktoren gehören insbesondere: Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2, metabolisches Syndrom, familiäre Belastung, verminderte Stresstoleranz, geringe körperliche Aktivität und Alter (1). Das Risiko einen Myokardinfarkt zu erleiden steigt bei Männern ab dem 40. Lebensjahr und bei Frauen ab dem 50. Lebensjahr signifikant an. Mit zunehmendem Alter steigt das Risiko eines Myokardinfarktes an und erreicht seinen Höhepunkt in der Altersgruppe der 65- bis 74-Jährigen (2). Sowohl bei Männern als auch bei Frauen werden Herzinfarkte durch die Blockierung eines oder mehrerer Koronargefäße ausgelöst, die physiologischerweise das Myokard mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen (3). Die Ruptur von atherosklerotischen Plaques oder die Erosion des Epithels auf dessen Oberfläche mit daraus folgender Verlegung einer Koronararterie durch einen Thrombus ist in der Regel bei Männern die Ursache eines Myokardinfarkts. Bei Frauen überwiegt als häufigste Ursache der Koronarspasmus (4).

1.1.1 Pathophysiologie der Atherosklerose

Die Pathophysiologie des akuten Myokardinfarktes basiert im Wesentlichen auf der Entstehung und dem Remodeling atherosklerotischer Plaques. Der Begriff der Atherosklerose entstammt der griechischen Sprache (athära=Grütze, skleros=hart) und wurde 1904 von Marchand (Leipzig) eingeführt. Bei der Atherosklerose handelt es sich laut Definition der Weltgesundheitsorganisation um eine variable Kombination von morphologischen Intimaveränderungen der Arterien, die aus einer herdförmigen Anhäufung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen sowie Bindegewebe und Kalkablagerungen besteht und mit Mediaveränderungen verbunden sein kann.

Im 19. Jahrhundert wurden die Inkrustationshypothese von Rokitansky und die Lipidhypothese von Virchow zur Erklärung der Pathogenese der Atherosklerose favorisiert (5). Diese zwei Hypothesen fasste dann Ross in der sogenannten "Response-to-injury"-Theorie zusammen. Bei dieser Theorie initiiert eine Verletzung der inneren Arterienwandschicht das atherosklerotische Geschehen gefolgt von einer starken entzündlichen Antwort. Trotz zahlreicher Studien gibt es allerdings bis heute keine einheitliche pathogenetische Kaskade für die Pathogenese der Atherosklerose.

Die Atherosklerose ist ein mehrstufiger, chronisch-inflammatorischer Prozess. Anfangs kommt es zur Formation früher Läsionen und im späteren Verlauf zu komplexen Läsionen, die durch ihre Größenzunahme das Gefäßvolumen zunehmend einengen und zu einer Minderperfusion des nachfolgenden Gewebes führen.

Das Initialstadium (Abb.1A) der Atherombildung bei Dyslipidämie besteht aus einer erhöhten endothelialen Transzytose von Plasmalipoproteinen (Lp) und ihrer Ablagerung im Subendothel sowie aus einem Wechsel der Zellen zu einem sekretorischen Phänotyp, der für die Entwicklung einer hyperplastischen Basallamina verantwortlich ist. Innerhalb des Subendothels interagieren Lipoproteine mit der extrazellulären Matrix und durch Oxidation und Glykierung dieser, findet eine Modifikation zu hoch atherogenen, oxidierten Lipoproteinen (mLp) statt. Insbesondere Low Density Lipoprotein (LDL) diffundiert passiv durch die *tight junctions* der Endothelzellen und wird in der Tunica intima durch

reaktive Sauerstoffspezies (ROS; reactive oxygen species) zu oxidativ modifiziertem LDL (oxLDL) umgewandelt (1).

Sowohl luminal durch die Veränderung der Plasma-Homöostase als auch abluminal durch die Ablagerung der modifizierten Lipoproteine, initiieren die Endothelzellen einen entzündlichen Prozess, der durch die Expression neuer oder vermehrter Zelladhäsionsmoleküle, Zytokine und Chemokine als Hinweis der endothelialen Dysfunktion (Abb.1B) manifestiert wird.

Sowohl ROS als auch oxLDL bewirken eine Aktivierung von NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), infolgedessen die endotheliale mRNA-Expression verschiedener atherogener Moleküle induziert wird (Abb.1C) (6). Dazu zählen die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (CD54; intercellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (CD106; vascular cellular adhesion molecule-1) und E-Selektin, die verantwortlich für die Rekrutierung der zirkulierenden Leukozyten im Subendothel sind, sowie das Chemokin MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), das die Chemotaxis von Monozyten beeinflusst (7).

Monozyten und T-Zellen haften an aktivierten/dysfunktionellen Endothelzellen und unterliegen einer gerichteten Diapedese in die Intima (8). Die adhärenen Thrombozyten unterstützen die Leukozytenmigration. Neben der vermehrten Adhäsion und Migration von Leukozyten führt oxLDL zu einer gesteigerten Bildung von M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), der die Proliferation der Monozyten zu Makrophagen steuert (1). Die Makrophagen exprimieren Scavengerrezeptoren, von denen der Scavenger Rezeptor A und CD36 (ein Scavenger Rezeptor der Klasse B) die wichtigsten Rezeptoren für die Aufnahme von modifizierten Lipoproteinen und die anschließende Bildung von Schaumzellen darstellen (8). Durch Ansammlung und Apoptose der Schaumzellen entsteht ein nekrotisches, lipidreiches Zentrum in der Gefäßwand. Die Sekretion weiterer proinflammatorischer Zytokine und ROS, durch die entstandenen Schaumzellen, erhält die Entzündungsreaktion aufrecht (9).

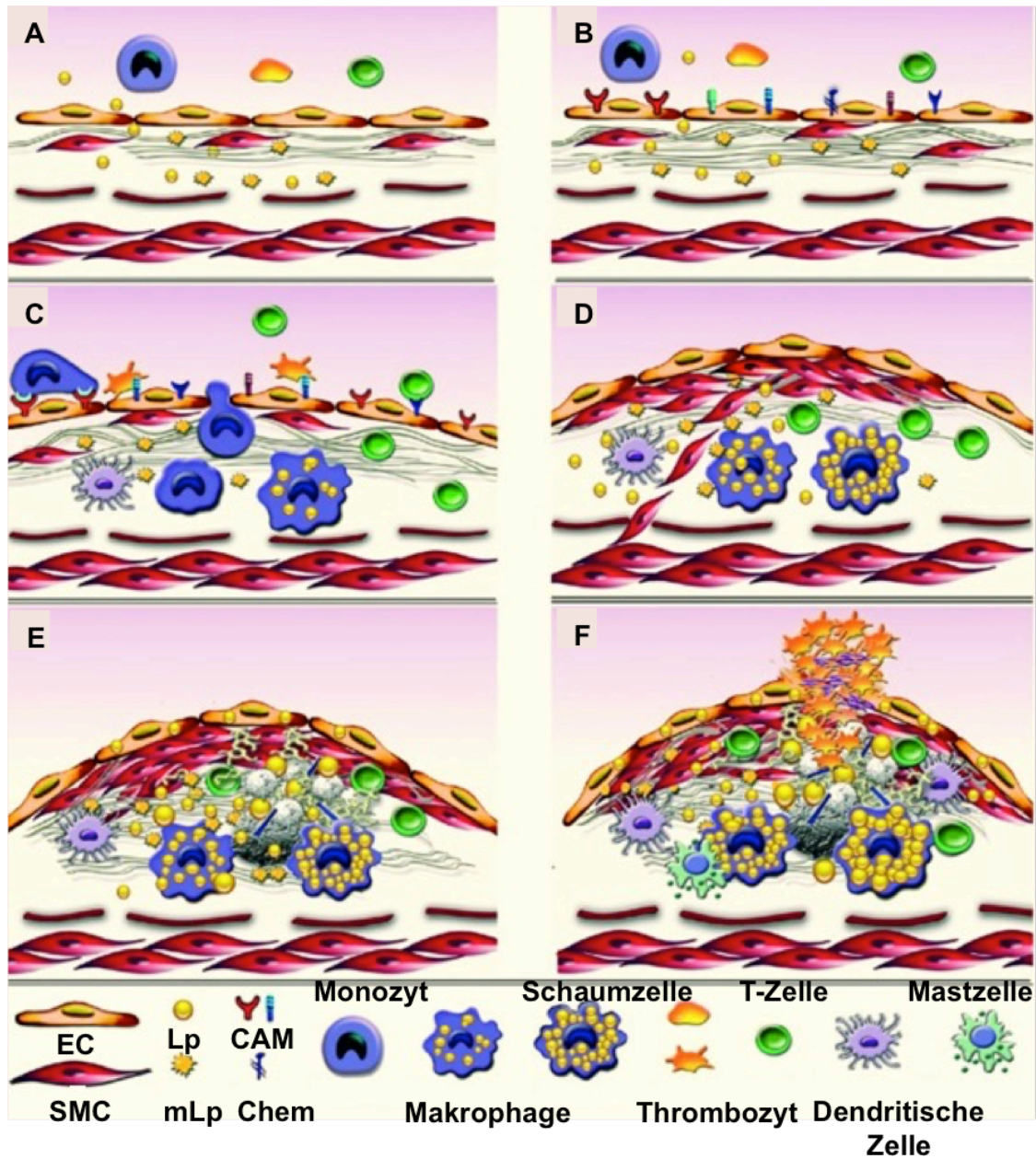


Abbildung 1 Die Stadien der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen. (A) Stadium I. Endothelzellaktivierung/-modulation. (B) Stadium II. Endotheliale Dysfunktion. (C) Stadium III. Rekrutierung von Immunzellen und Beginn einer starken entzündlichen Reaktion. (D) Stadium IV. Plaquebildung durch die glatten Muskelzellen. (E) Stadium V. Bildung einer verkalkten fibrösen Lipidplaque durch residenten und Immunzellen sowie sezernierenden Faktoren. (F) Stadium VI. Die instabile fibröse Lipidplaque: Ruptur und Thrombose. *Adaptiert von Manduteanu I et al. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2012 (10).*

Lymphozyten entwickeln sich zu aktivierten proinflammatorischen (Th1; T-Helferzelle Typ 1) und antiinflammatorischen (Th2; T-Helferzelle Typ 2 und TREG; regulatorische T-Zellen) Zellen, die ebenfalls Zytokine und Chemokine sezernieren. Die direkte oder indirekte Wechselwirkung zwischen residenten und migrierten Zellen innerhalb der Intima bestimmt die weitere Läsionsprogression. Die aktivierten dendritischen Zellen tragen zur T-Zell-Rekrutierung und -Aktivierung innerhalb der Plaque bei (9).

Bei der Plaquebildung (Abb.1D) stimulieren proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren die Migration glatter Muskelzellen (SMC; smooth muscle cells) von der Tunica media in die Tunica intima. Die Proliferation der Intima-residenten SMC und der SMC, die von der Media zu der Intima wandern, führt zur Bildung einer faserigen Kappe. Zur weiteren Stabilisierung einer Plaque bilden die glatten Muskelzellen Kollagen (1, 9). Glatte Muskelzellen, Schaumzellen, von apoptotischen Zellen abgeleitete Lipide und Kalzifizierungszentren bilden einen fettreichen nekrotischen Kern (Abb.1E).

Bei der Plaquebildung unterscheidet man zwischen instabilen und stabilen Plaques (11). Durch fortschreitende Inflammation und Dyslipidämie vergrößert sich der lipidreiche Kern. Proinflammatorische Zytokine wie TNF- α (Tumornekrosefaktor- α), IL-1 β (Interleukin-1 β) und IFN- γ (Interferon-gamma) hemmen die Kollagensynthese der SMC, während spezielle Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die von Makrophagen, Endothelzellen und SMC produziert werden, die extrazelluläre Matrix abbauen. Daraus entstehen instabile Plaques, die einen großen Lipidkern mit dünner fibröser Kappe aufweisen (Abb.1F) und somit eine erhöhte Entzündungsaktivität und ein hohes Rupturrisiko zeigen. Im Gegensatz dazu besitzen die stabilen Plaques mit ihrem kleinen Lipidkern und der dicken fibrösen Kappe ein geringeres Risiko einer Plaqueruptur. Die Anfälligkeit für eine Plaqueruptur nimmt bei hämodynamischem Stress weiter zu und kann im Verlauf in einem Plaqueabriss enden (1, 9). Diesem folgt der direkte Kontakt zwischen Gewebefaktoren, zirkulierenden Thrombozyten und Blutkoagulationskomponenten mit anschließender Thrombusbildung, die zu einer partiellen oder kompletten Unterbrechung des Blutflusses führt (10, 11). Die dadurch bedingte myokardiale Ischämie kann klinisch als „akutes Koronarsyndrom“ (ACS; acute coronary

syndrom) manifestiert werden. Nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (www.dkg.org) werden unter dem Begriff ACS die lebensbedrohlichen Phasen der koronaren Herzerkrankung zusammengefasst. Neben dem plötzlichen Herztod sind hierunter die instabile Angina, der Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI) und der ST-Hebungsinfarkt (STEMI) zu verstehen (12). In der Praxis sind die Übergänge der klinischen Symptomatik dieser Formen fließend.

1.1.2 Therapie des Myokardinfarktes

Die notfallmäßige Behandlung des akuten Myokardinfarktes basiert auf einer raschen Wiederherstellung der Myokardperfusion und einer Minimierung der Infarktausdehnung. Für die schnellstmögliche Wiederherstellung der Myokardperfusion sind gerinnungs- und thrombozytenaggregationshemmende Medikamente (Heparin, Aspirin, Clopidogrel) (13) essenziell. Zu der Akuttherapie gehören ebenfalls eine symptomorientierte Behandlung mit Sauerstoffgabe, eine ausreichende Analgosedierung z.B mit Morphin und Benzodiazepinen sowie eine Senkung der Vorlast mit Nitraten und Betablockern, soweit keine Kontraindikationen vorhanden sind. Nach Abschluss der Akutmaßnahmen ist die schnellstmögliche Durchführung einer Koronarangiographie anzustreben, um befundabhängige weitere Maßnahmen, wie eine Ballon- oder Stentimplantation, einzuleiten (14). Bei schweren klinischen Fällen von Atherosklerose, bei denen mittelgroße bis große Gefäße betroffen sind, kommen auch chirurgische Interventionen in Frage, um weitere Risiken eines ischämischen Gewebes Schadens zu verringern (15).

Ziel der Folgetherapie ist das Fortschreiten der Herzinsuffizienz zu verhindern und damit die kardiale Morbidität und Mortalität zu senken. Aus diesem Grund stellt die Eindämmung des Remodeling Effektes nach stattgehabten Myokardinfarkt eines der wichtigsten Therapieziele dar (16). Für eine verbesserte Langzeitprognose ist die Optimierung des kardiovaskulären Risikoprofils (Lebensstiländerung, Gewichtsreduktion, Nikotinkarenz, körperliche Aktivität, Stressreduktion) des Patienten von großer Bedeutung. Pharmakologische Maßnahmen wie die Betablockertherapie zur Senkung des myokardialen Sauerstoffbedarfs und zum Schutz vor ventrikulären Arrhythmien, die Gabe von ACE-Hemmern und Spironolacton (14, 17) sowie die Gabe von

Statine zur Cholesterinsenkung (18), begünstigen den weiteren Verlauf von Infarktpatienten.

Ziel aller Therapieansätze ist eine aus einem Myokardinfarkt resultierende Einschränkung der Pumpfunktion zu minimieren. Allerdings ist die medikamentöse Therapie eher palliativ, da die Wiederherstellung physiologischer und funktionsfähiger Kardiomyozyten mit folgender Angiogenese hierunter nicht möglich ist (19). Im Endstadium einer schweren chronischen Herzinsuffizienz besteht als kurativer Therapieansatz die Möglichkeit einer Herztransplantation. Aufgrund der begrenzten Anzahl der Organe bleibt diese aber nur für wenige Patienten eine Option (20). Angesichts dieser Therapieeinschränkungen werden neue alternative Therapien erforscht, beispielsweise Gen-, Protein- und Stammzelltherapien (21).

1.1.3 Stammzellen

1.1.3.1 Stammzellpopulationen

Stammzellen sind definiert als Zellen, die sich erneuern können und Tochterzellen bilden, die zudem die Fähigkeit der Differenzierung in verschiedene Zelltypen besitzen (Abb.2) (22). Abhängig von der Stammzellklasse besitzen sie das Potential sämtliche Körperzellen oder lediglich bestimmte Zelltypen hervorzubringen (Abb.2). Man unterscheidet je nach Herkunft zwischen embryonalen, fetalen und adulten Stammzellen (Abb.2). Embryonale Stammzellen (aus dem Embryo) besitzen das Potential sich in Zellen jedes Keimblattes (Endoderm, Ektoderm, Mesoderm) und in Keimbahnzellen auszudifferenzieren (Abb.2). Sie können sich somit in nahezu jeden Zelltyp des menschlichen Körpers differenzieren und werden daher als pluripotent bezeichnet (Abb.2) (23). Embryonale Stammzellen können durch drei verschiedene Methoden isoliert werden: 1) aus überzähligen Embryonen 2) aus abgetriebenen Föten sowie 3) durch das sogenannte therapeutische Klonen (Zellkerntransfer). Nach neueren Erkenntnissen lassen sie sich außerdem aus bereits ausdifferenzierten Zellen gewinnen, wenn diese mit bestimmten Methoden "umprogrammiert" werden.

Während embryonale Stammzellen eindeutig die Fähigkeit besitzen sich in eine Vielzahl von Zelltypen zu differenzieren und dadurch zum Entstehen von

Gewebe und Organen beitragen, sind die meisten adulten Stammzellen spezifisch auf einen bestimmten Gewebetyp festgelegt und haben dadurch ein reduziertes Entwicklungspotential (Abb.2). Diese Einschränkung nennt man „Multipotenz“ (24, 25). Pluripotente adulte Stammzellen sind selten und meist in einer geringen Zahl vorhanden, jedoch konnten sie in Nabelschnurblut und anderen Geweben nachgewiesen werden (26, 27). Adulte Stammzellen sind im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen schwer aufzufinden, zu isolieren und in Kultur zu halten. Des Weiteren besitzen Stammzellen eine beschränkte Vermehrfähigkeit und sind somit nur begrenzt lebensfähig. Allerdings ist die Gewinnung und Verwendung von adulten Stammzellen ethisch weniger bedenklich. Der unbestreitbare Vorteil, den adulte Stammzellen bieten ist, dass sie sich aus autologen und somit immunkompatiblen Zelltransplantaten herstellen lassen.

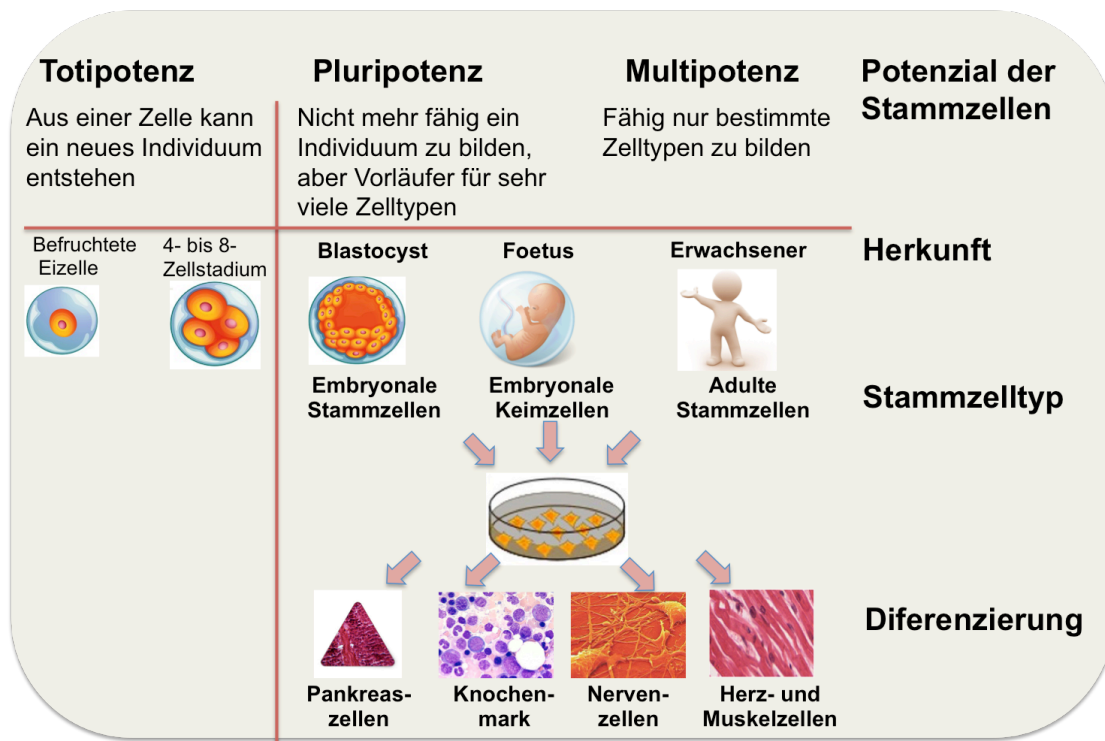


Abbildung 2 Herkunft und Entwicklungsmöglichkeiten von Stammzellen für medizinische Anwendungen. *Adaptiert von S. Dimmeler, Vortrag für die Gesellschaft Deutscher Chemiker*

Adulte Stammzellen lassen sich in mindestens 3 verschiedene Gruppen unterteilen: Knochenmarkstammzellen, zirkulierende Stamm- oder Progenitorzellen, die alle zumindest teilweise dem Knochenmark entstammen und gewebsresidente Stammzellen (Abb.3). Die Knochenmarkstammzellen sind am besten charakterisiert und wurden bis jetzt in der Mehrheit der bisherigen klinischen Studien verwendet. Knochenmark enthält ein komplexes Sortiment von Progenitorzellen, einschließlich hämatopoetischen Stammzellen (HSC), Side-Population-Zellen (SP-Zellen Rhodamin ausschleusende Zellen), (28) mesenchymale Stammzellen (MSCs) oder Stromazellen (29) und multipotenten adulten Progenitorzellen (MAPCs), eine Untergruppe von MSCs (Abb.3) (26). In mehreren Studien wurde die Verwendung dieser verschiedenen Knochenmark-Stammzellen in ischämischem Gewebe untersucht und es scheint, dass diese Zellen einen Schutz vor ischämischen Gewebsschäden bieten.

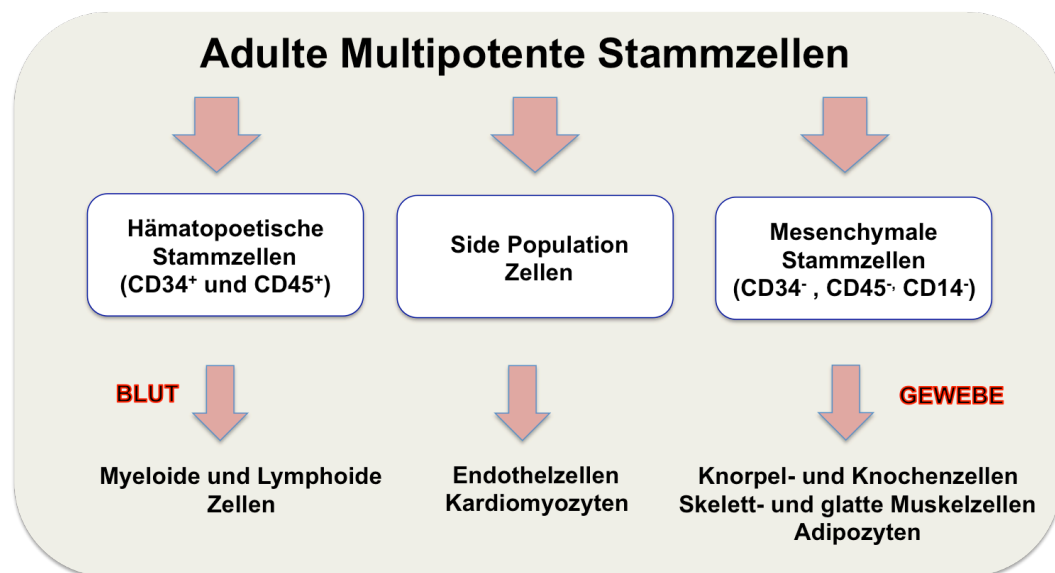


Abbildung 3 Differenzierung multipotenter Stammzellen.

Eine weitere Population von Progenitorzellen von denen ebenfalls gezeigt wurde, dass sie therapeutisches Potential aufweisen, ist der Pool von Progenitorzellen die im Blut zirkulieren. Progenitorzellen wurden auf der Suche nach proangiogenen Zellen für die therapeutische Vaskulogenese entdeckt. Asahara und Isner isolierten die sogenannten "endothelialen Progenitorzellen". Ihre Funktion ist definiert durch die Bildung neuer Blutgefäße, insbesondere bei

der Verbesserung der Neovaskularisation nach Ischämie (30, 31). In der Annahme, dass diese Zellen erwachsene Hämangioblasten repräsentieren können, wurden sie durch die Expression von mindestens zwei hämatopoetischen Stammzellmarkern (CD133⁺ oder CD34⁺) und dem Endothelmarker VEGF-R2 (vascular endothelial growth factor receptor 2; auch bekannt als KDR; kinase insert domain receptor oder flk-1; fetal liver kinase 1) charakterisiert.

1.1.3.2 Was ist das CD34-Antigen?

Das CD34-Antigen ist Mitglied einer Familie von Single-Pass-Transmembranproteinen, es hat ein Molekulargewicht von 116 kD und wird in primitiven hämatopoetischen Stammzellen, Kapillarendothelien und embryonalen Fibroblasten gebildet. Die Expression von CD34 ist mit zunehmender Reifung rückläufig. Akute myeloische, akute lymphoblastische sowie undifferenzierte Leukämien können eine CD34-Expression aufweisen. Unter den Weichgewebstumoren zeigen insbesondere Gefäßtumoren eine CD34-Positivität. CD34 ist ebenfalls ein Marker für die Darstellung von Kapillarendothelien zum Beweis einer Lymph- oder Hämangiosis carcinomatosa (32-35). Obwohl das CD34-Antigen seit Ende der 1980er untersucht wird (36, 37), wurden seine genauen Funktionen bisher nicht ausreichend identifiziert. Das CD34-Protein spielt vermutlich eine Rolle bei verschiedenen Prozessen, wie z.B:

- Identifikation der hämatopoetischen Stammzellen
- Förderung der Proliferation von hämatopoetischen Vorläuferzellen (38)
- Förderung der Lymphozyten-Adhäsion an das vaskuläre Endothel über die Bindung an L-Selektin (39)
- Verbesserung der Zelladhäsion (40-42)
- Verhinderung der Aktivierung von Integrinen und der Integrin vermittelten Adhäsion von hämatopoetischen Stammzellen (43)
- Beteiligung in der Hämatopoese (nach Engraftment mit Knochenmark von CD34-null-Mäusen wurden kleine hämatopoetische Defekte beobachtet) (38)
- Beteiligung an der Wanderung von hämatopoetischen Zellen (44, 45)

1.1.3.3 CD34⁺ Zellen und Myokardinfarkt

Die CD34⁺ Knochenmarkszellen repräsentieren eine gut charakterisierte Population von Stammzellen, die traditionell klinisch verwendet wurden, um das hämatopoetische System nach Strahlung oder Chemotherapie zu regenerieren (46-48). Es wurde vor kurzem gezeigt, dass CD34⁺ Zellen die therapeutische Angiogenese in verschiedenen Tiermodellen von myokardialer, peripherer und zerebraler Ischämie induzieren. Dabei spielen sowohl die direkte Inkorporation der Zellen in das expandierende Gefäßsystem als auch die parakrine Sekretion von angiogenen Wachstumsfaktoren, die die Entwicklung von Mikrogefäßen unterstützt, eine wesentliche Rolle. Allerdings bleibt der genaue Mechanismus durch den CD34⁺ Zellen die therapeutische Angiogenese fördern, nicht vollständig verstanden.

Neben natürlich vorkommenden Ereignissen und pharmakologischer Induktion führen bestimmte pathophysiologische ischämische Bedingungen zu einer akuten Mobilisierung von CD34⁺ Zellen aus dem Knochenmark. Sowohl eine myokardiale Ischämie (49, 50) als auch eine periphere Ischämie (51) stimulieren endogen die CD34⁺ Zellmobilisierung. Nach ihrer Mobilisierung erreichen die CD34⁺ Zellen die ischämischen Zonen. Die Anzahl der zirkulierenden CD34⁺ Zellen scheint als ein Indikator für das kardiovaskuläre Outcome in vielen klinischen Situationen zu dienen: die Anzahl der zirkulierenden CD34⁺ Zellen ist in der Regel umgekehrt proportional zu der Schwere der Erkrankung und zum Alter des Patienten (52-54). Hohes Alter und chronische kardiovaskuläre Erkrankungen verringern sowohl die Funktionalität als auch die Gesamtanzahl von CD34⁺ Zellen (55). Diese letzte Feststellung lässt vermuten, dass es eine natürliche zeitabhängige Abnahme des angiogenetischen Potentials der CD34⁺ Progenitorzellen gibt.

Viele Umweltfaktoren scheinen ebenfalls die Dichte von zirkulierenden CD34⁺ Zellen in menschlichen Patienten zu beeinflussen. Gesundheitsrisikofaktoren wie Nikotin- und Alkoholabusus weisen einen negativen Effekt auf die Anzahl der CD34⁺ Zellen auf (56, 57). CD34⁺/KDR⁺ Zellen sind bei Patienten mit Hypercholesterinämie (58) und chronischen kardiovaskulären Erkrankungen (59) reduziert. Chatzichristos et al. zeigte zum ersten Mal, dass Patienten mit gemischter Dyslipidämie eine geringere Anzahl von CD34⁺ und CD34⁺/KDR⁺

Progenitorzellen im peripheren Blut sowie eine geringere Fähigkeit zur Bildung von Kolonie-bildenden-Endothelzellen im Vergleich zu Kontrollproben aufweisen. Rosuvastatin allein oder in Kombination mit Omega-3-Fettsäuren reduzierte den LDL-Cholesterol- und Triglyzerid-Spiegel und beeinflusste positiv die Anzahl der CD34⁺ und CD34⁺/KDR⁺ Progenitorzellen im peripheren Blut sowie ihre Fähigkeit zur Bildung von Endothelzellen (60). Zudem führen körperliche Bewegung und die Verbesserung des kardiovaskulären Risikoprofils in der Regel zu einer Erhöhung des CD34⁺ Zell-Spiegels (61, 62).

Der Glaube, dass die CD34⁺ Zellen in der Behandlung von ischämischen Erkrankungen nützlich sein könnten, besteht vor allem aus der Tatsache, dass das CD34-Antigen sowohl auf endothelialen Progenitorzellen als auch auf ausdifferenzierten Endothelzellen exprimiert wird (63-66). Es wurde gezeigt, dass ein kleiner Anteil von zirkulierenden CD34⁺ Zellen den KDR-Rezeptor (CD34⁺/KDR⁺) exprimiert, der sich auch auf der Oberfläche der Endothelzellen befindet (67). KDR ist ein Typ III Tyrosinkinase Rezeptor, der auch als VEGFR-2 bekannt ist. CD34⁺/KDR⁺ Vorläuferzellen haben ein starkes Interesse als mögliche diagnostische und prognostische Biomarker und als neue therapeutische Option für chronisch kardiovaskuläre Erkrankungen erzeugt (58, 68). Die Annahme, dass CD34⁺ Zellen schließlich eine endotheliale Rolle übernehmen und somit die therapeutische Angiogenese initiieren können, bildet die Grundlage dieses neuen Ansatzes zur Bekämpfung kardiovaskulärer Erkrankungen.

Es wird zudem vermutet, dass bestimmte aus Knochenmark stammende Stammzellen die Fähigkeit besitzen sich terminal in Kardiomyozyten zu differenzieren und somit das Myokard nach einem Myokardinfarkt- oder Herzinsuffizienz- bedingtem Zelltod regenerieren zu können (Abb.4) (69). Aktuelle Erkenntnisse deuten darauf hin, dass CD34⁺ Zellen: 1. sich in Kardiomyozyten transdifferenzieren (70-73), 2. mit bereits existenten Kardiomyozyten fusionieren (74, 75) und 3. sich in verschiedene endotheliale Zelllinien differenzieren (51, 76, 77).

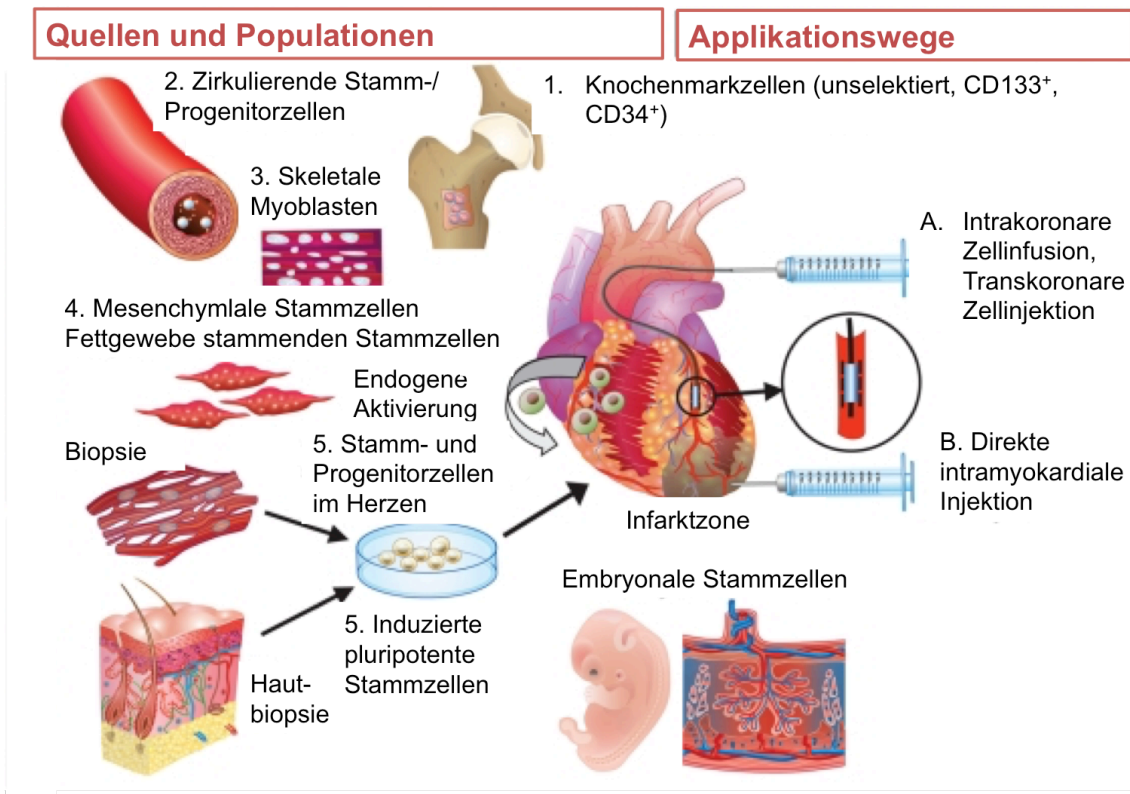


Abbildung 4 Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt. Zahlreiche experimentelle Studien untersuchen das Potenzial verschiedener Stammzelltypen über verschiedene Applikationswege zur Neovaskularisation und zu kardialer Reparatur oder Regeneration (78, 79). *Adaptiert von Tongers J et al. Eur Heart J. 2011 (79).*

1.2 Die Rolle der Thrombozyten im akuten Myokardinfarkt

1.2.1 Thrombozyten und atherosklerotische Plaques

Thrombozyten spielen eine bedeutende Rolle im Prozess der Atherosklerose und Atherothrombose. Thrombozyten regulieren die proinflammatorische IL-1 β -Produktion und können für eine lange Zeit innerhalb der atherosklerotischen Plaques aktiviert bleiben (80). Eine erhöhte Thrombozytenaktivierung im Rahmen einer koronaren Herzerkrankung (81) sowie der Nachweis von PF4 (platelet factor 4), anderen platelet-derived Chemokinen und Wachstumsfaktoren in menschlichen arteriosklerotischen Plaques (82, 83), zeigen nachweislich einige Verbindungen zwischen Thrombozyten und Atherosklerose.

Thrombozyten beeinflussen die Pathophysiologie der Atherosklerose sowohl in den frühen Stadien z.B. im Rahmen der endothelialen Dysfunktion (84, 85) als auch in den späteren Stadien bis zur Plaqueruptur (86) durch Chemokinfreisetzung (87-89), thrombozytäres oxLDL (90), Freisetzung von Mikropartikeln (91) und inflammatorischen Mediatoren (92) sowie direkte Zell-Zell-Interaktionen (93, 94). Eine der wichtigsten Funktionen der Thrombozyten in der Atherosklerose ist die Rekrutierung von Leukozyten durch direkte Rezeptor-Ligand-Interaktionen oder durch freigesetzte Faktoren wie Chemokine (94, 95).

Thrombozyten sind von großer Relevanz bei der Initiierung der Atherosklerose. Während Ihrer Aktivierung in der Mikroumgebung der atherosklerotischen Plaques oder sogar in sehr frühen Stadien der Atherogenese in Bereichen mit hoher Scherspannung exprimieren Thrombozyten einen höheren Spiegel von proinflammatorischen Adhäsionsrezeptoren (ICAM-1, GPIIb/IIIa; Glykoprotein IIb/IIIa, α IIb β 3; Glykoprotein α IIb β 3). Die TLR (Toll-like receptors)-vermittelte Signalisierung kann über die Bindung von Lipopolysacchariden (LPS), die Leukozyten-Wechselwirkung oder die Bindung von Karboxyalkylpyrrolen (CAPs) als Einleitung der Atherosklerose mitwirken (96).

Auch das Komplementsystem trägt zur Atherogenese bei. Die Komplementaktivierung ist wichtig für inflammatorische Zustände, die mit einer vaskulären Verletzung einhergehen (97, 98). Interessanterweise exprimieren Thrombozyten eine Anzahl von Komplementrezeptoren, die für die Thrombozytenfunktion und deren Interaktion mit der lokalen Mikroumgebung relevant sind (99). Mehrere Komplementkomponenten sind an der Plättchenoberfläche gebunden (100, 101). Neuere Untersuchungen zeigten, dass die Expression von Komplementanaphylatoxinrezeptoren auf Thrombozyten eine starke und positive Korrelation mit Thrombozytenaktivierungsmarkern wie P-Selektin bei Patienten mit Atherosklerose aufweist (102).

Thrombozyten steuern das Fortschreiten der Atherosklerose durch Chemokinablagerung und Leukozytenrekrutierung (103). Einige erhaltene nukleäre Funktionen der Thrombozyten, wie die Fähigkeit mRNA zu

translatieren und zu modifizieren, fördern die Entzündung und die endotheliale Polarisation. Die Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und antigenpräsentierenden dendritischen Zellen tragen, durch das Einbinden von Adhäsionsrezeptoren und löslichen Mediatoren, ebenfalls zur Atheroprogession bei.

Desweiteren wirken Thrombozyten bei der Plaqueruptur auf unterschiedliche Art und Weise und sind dafür bekannt die Angiogenese zu modulieren, welches einen entscheidenden Faktor für die Plaque-Stabilität darstellt. Außerdem fördern Thrombozyten die Rekrutierung der glatten Muskelzellen (SMC) über den CXCR4-SDF-1 α -Signalweg. SMCs sind verantwortlich für die Erstellung der extrazellulären Matrix, die die fibröse Kappe der Plaques stabilisiert. Die Thrombusbildung in Bereichen der rupturierten Faserkappe wird nach Exposition mit Komponenten der extrazellulären Matrix durch Plättchen initiiert (104, 105).

1.2.2 Plättchenadhäsion, -sekretion und Thrombusentstehung

Nach atherosklerotischer Plaqueruptur und Freilegung der subendothelialen Matrix fangen Thrombozyten an im Bereich der verletzten Gefäßwand zu adhären und aggregieren (106, 107). Auf diese Weise initiieren Thrombozyten den akuten mechanischen Gefäßverschluss und leiten die klinische Manifestation der Atherosklerose ein. Thrombozyten exprimieren dabei eine Vielzahl membranständiger Adhäsionsmoleküle, die prinzipiell eine Adhäsion, trotz der in der arteriellen Strombahn vorherrschenden hohen Scherraten, ermöglichen (108).

Der erste Kontakt zwischen Thrombozyt und Gefäßwand, das sogenannte „Tethering“, wird insbesondere durch die hoch-affine Interaktion zwischen subendotheliale von-Willebrand-Faktor“ (vWF) und thrombozytärem GPIb-V-IX Komplex initiiert (Abb.5) (109, 110). Der thrombozytäre Kollagenrezeptor GPVI spielt dabei ebenfalls eine Rolle (111). Dieser erste Kontakt führt zu einer Aktivierung der thrombozytären Integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Fibrinogenrezeptor) und $\alpha_2\beta_1$ (Kollagenrezeptor) (Abb.5). Die Interaktion von $\alpha_{IIb}\beta_3$ und $\alpha_2\beta_1$ mit extrazellulären Proteinen ermöglicht dann eine feste Adhäsion der Thrombozyten (Abb.5) (112, 113).

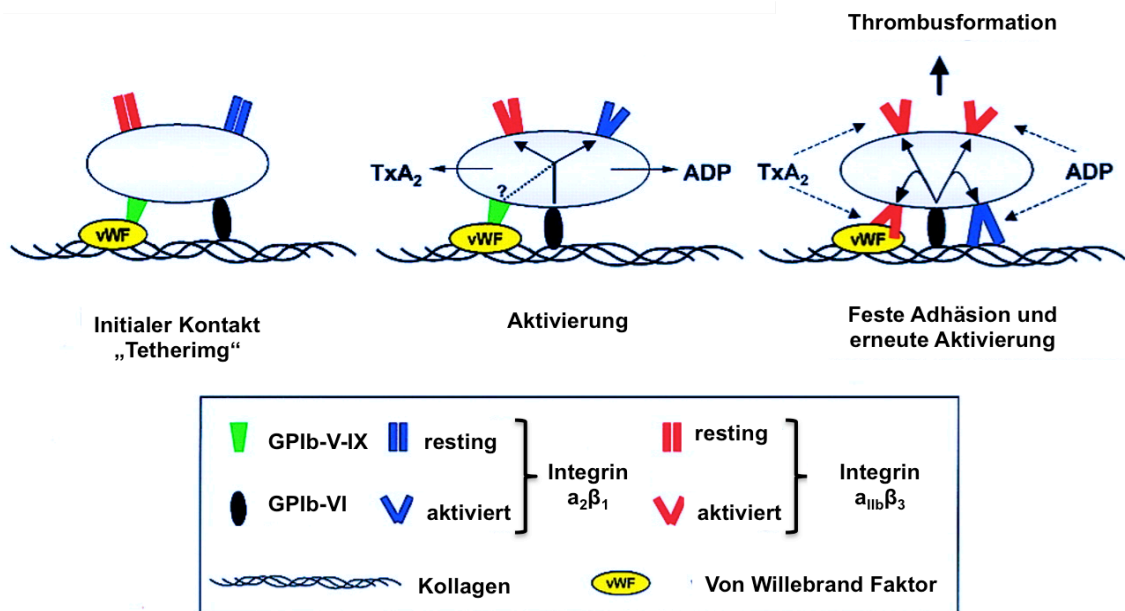


Abbildung 5 Adhäsion von Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand.

Adaptiert von Nieswandt B et al. Blood. 2003 (114)

Die feste Integrin-vermittelte Thrombozytendhäsion hat als Folge eine weitere Aktivierung und Formänderung der Thrombozyten. Die Blutplättchen bilden Pseudopodien und verschließen damit effektiv die Gefäßläsion. Die fest adhären und aktivierten Thrombozyten bilden Thromboxan und setzen ADP (Adenosindiphosphat) frei, das die Aktivierungs- und Aggregationsprozesse weiter verstärkt (Abb.5) (115). Die zirkulierenden Thrombozyten bilden mit den adhären Thrombozyten Mikroaggregate. Diese Interaktion erfolgt über „lose“ Fibrinogenbrücken zwischen den GP-IIb-IIIa-Rezeptoren (116). Auf die primäre reversible Aggregation folgt innerhalb von Sekunden bis Minuten später eine irreversible Sekundäraggregation. Ferner katalysiert die Formation von Mikropartikeln im Bereich der Thrombozytenaggregate die Entstehung von Thrombin und damit von Fibrin, das den wachsenden Thrombus stabilisiert.

1.3 Thrombozyten und Wundheilung

Die Hauptaufgabe des Hämostasesystems mit seinen Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten ist, eine gelungene Wundheilung zu ermöglichen. Thrombozyten tragen durch die Förderung der Thrombinbildung und die Sekretion einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen, die direkt die Reparaturmechanismen beeinflussen, zur Wundheilung bei (117). Thrombin wirkt, neben seiner prokoagulatorischen Aktivität bei der Transformation von Fibrinogen in Fibrin, als chemischer Lockstoff (Chemoattraktans) für Makrophagen, Stromazellen und Endothelzellen (118-120). Außerdem besitzt Thrombin in seiner Eigenschaft als Wachstumsfaktor eine mitogene Wirkung und unterstützt die Angiogenese (121).

Ein wichtiger Mediator bei der Wundheilung und beim Remodeling ist der platelet-derived SDF-1 α (stromal cell-derived factor 1a), der CD34⁺ Progenitorzellen aus dem Knochenmark mobilisiert, zum Ort der Verletzung rekrutiert und deren Differenzierung in endotheliale Vorläuferzellen vermittelt (122-124). Die Hemmung der Bindung von SDF-1 α an seinen Rezeptor CXCR4 führte in experimentellen Modellen, durch die Beeinträchtigung der Zellmigration und gleichzeitig durch eine prolongierte Entzündungsreaktion, zu einer verzögerten Wundheilung (125). Die thrombozyten-vermittelte Differenzierung von CD34⁺ Vorläuferzellen in reife Schaumzellen ist auch bei der atherosklerotischen Plaquebildung von besonderer Bedeutung (126).

SDF-1 α ist ein potenter proangiogener Mediator, der die Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen sowie die Angiogenese *in vitro* und *in vivo* fördert (127-129). Andere pro- und antiangiogene Faktoren, wie VEGF (vascular endothelial growth factor) und Endostatin, werden auch aus Blutplättchen freigesetzt und besitzen eine entscheidende Rolle bei der Revaskularisierung des beschädigten Gewebes (130).

Zusätzlich zu den angiogenen Faktoren, speichern und sezernieren Thrombozyten antiapoptotische Moleküle sowie eine Reihe von TNF- α -verwandten Apoptoseregulatoren, wie CD95, Apo2 Ligand und Apo3 Ligand, die Entzündungsreaktionen und Apoptose in anderen zirkulierenden Zellen induzieren können (131). Das Gleichgewicht zwischen proapoptotischen und

antiapoptotischen Molekülen, innerhalb dessen das Überleben oder das Beseitigen der Zellen aus der Wundstelle gefördert wird, ist für die Regulierung der Heilung von entscheidender Bedeutung.

1.4 Thrombozyten und Gefäßintegrität

Die letzten Schritte der hämostatischen Reaktion auf äußere Verletzungen oder Ruptur von atherosklerotischen Plaques im arteriellen Kreislauf sind mit der Wiederherstellung der Integrität der Gefäßwand verbunden. Dieser Prozess beinhaltet die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen (SMCs), Fibroblasten und Endothelzellen. Thrombozyten besitzen eine enorme Bedeutung bei der Regulierung dieser Prozesse.

Der „Platelet derived growth factor“ (PDGF) nimmt, sowohl im arteriellen als auch im venösen Kreislauf bei der Regulierung der SMC-Proliferation und der Migration eine besonders wichtige Rolle ein (132). Eine Neointimahyperplasie und eine Restenose, die oft nach einer Ballonangioplastie auftreten, werden wie bereits vor 25 Jahren gezeigt von PDGF vermittelt (133). Trotz der vielversprechenden Tiermodelle erwies sich allerdings die PDGF Hemmung beim Menschen noch nicht als wirksam (134).

Die Thrombozyten überwachen die Gefäßintegrität nicht nur während physiologischer Heilungsprozesse, sondern auch unter pathologischen Bedingungen, wie zum Beispiel Tumorangiogenese (135) und Entzündungen (136). Thrombozyten regulieren die Angiogenese und halten die endotheliale Barrierefunktion in entzündeten- und Tumorgefäßen aufrecht.

1.5 Thrombozyten und bioaktive Mediatoren

Thrombozyten weisen keine eigene DNA (deoxyribonucleic acid) auf, sondern erben von ihrer Mutterzelle, dem Megakaryozyt, genetische Informationen in Form von RNA (ribonucleic acid). Die Blutplättchen besitzen mehrere einzigartige extranukleäre Mechanismen zur Translation von mRNA (messenger RNA) für die Bildung von Proteinen, wie zum Beispiel Interleukin β und Gewebefaktor, die die Hämostase mit Entzündungsprozessen verknüpfen (137). Thrombozyten dienen nicht nur als Speicher für bioaktive Moleküle, sondern auch für Lipid-abgeleitete Mediatoren wie Thromboxan A₂ und sie beteiligen sich somit am transzellulären Stoffwechsel, der zur Produktion von

proinflammatorischen als auch antiinflammatorischen Molekülen beiträgt. Thrombozyten setzen zahlreiche bioaktive Mediatormoleküle frei, die die Zellen des angeborenen Immunsystems modulieren, Endothelzellen aktivieren und systemische Immunantworten beeinflussen können.

1.6 Entzündung nach Myokardinfarkt

Bei einem Myokardinfarkt sterben Herzmuskelzellen ab. Nach einem Herzinfarkt muss der Körper abgestorbenes Herzmuskelgewebe durch eine stabile Narbe ersetzen. Daraufhin wandern Zellen des Immunsystems in das geschädigte Gewebe ein und lösen eine Entzündungsreaktion aus, in deren Verlauf Immunzellen das abgestorbene Gewebe abbauen. Dabei spielen die Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten mit dem inflammatorischen Endothel eine entscheidende Rolle.

1.6.1 Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten

Leukozyten können auf adhärenen Thrombozyten rollen, fest adhären und transmigrieren (138, 139). Das Rollen und die Adhäsion von Leukozyten auf Thrombozyten werden durch adhäsive Rezeptoren, Zellgeometrie und Scherkräfte, die innerhalb des fließenden Bluts erzeugt werden, reguliert (140). Die Selektin Familie der adhäsiven Rezeptoren vermittelt die Anfangsphase des Zellrollens (141). P-Selektin spielt eine wesentliche Rolle bei den Thrombozyten-Leukozyten-Interaktionen (Abb.6). Der am besten charakterisierte Leukozyt-Ligand für P-Selektin ist der P-selektin glycoprotein Ligand (PSGL-1), der mit allen Selektin-Subtypen unter inflammatorischen Bedingungen interagieren kann (142). Die Ligation des P-Selektins mit dem PSGL-1 verbindet nicht nur die Leukozyten mit den aktivierten Thrombozyten sondern liefert auch Signale, die die Integrin-Aktivierung, Genexpressionswege und andere funktionelle Antworten von Leukozyten triggern (143). Die zytoplasmatische Domäne von PSGL-1 ist einerseits unnötig für das Rollen der Leukozyten, andererseits aber essenziell für die Aktivierung des leukozytären $\beta 2$ Integrins (144).

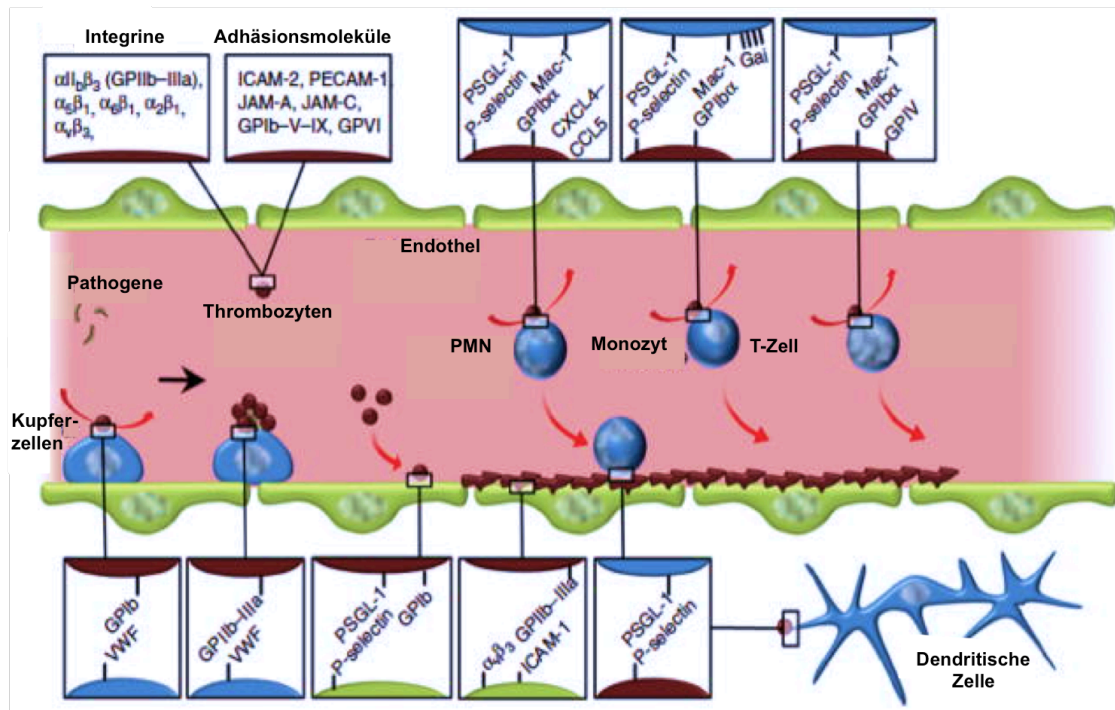


Abbildung 6 Adhäsive Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten. Thrombozyten (rot), Leukozyten (blau), Endothelzellen (grün). *Adaptiert von Lam FW et al. Comprehensive Physiology. 2015 (145).*

Immobilisierte und freigesetzte Chemokine sind auch für die feste Adhäsion und den Arrest von Leukozyten erforderlich. In rekonstituierten Systemen lösen immobilisierte Chemokine, vor allem aufgrund der Aktivierung von G-Proteingekoppelten Rezeptoren (GPCRs), den Leukozyten-Arrest innerhalb von einer Sekunde aus (146, 147). Unter den von Thrombozyten freigesetzten Chemokinen, die die Leukozytenfunktion und die Thrombozyten-Leukozyten-Wechselwirkungen beeinflussen, nehmen PF4/CXCL4, RANTES (durch Aktivierung reguliert, von normalen T-Zellen exprimiert und sezerniert; CCL5) und das wachstumsbedingte Onkogen- α eine prominente Rolle ein (88, 148).

Wenn Leukozyten von aktiviertem PSGL-1 und von GPCRs gleichzeitig Signale empfangen, wird die Expression von Transkriptionsfaktoren, Cytokinen und Chemokinen erhöht (149-152). Die Leukozytenaktivierung erhöht die Festigkeit der Integrin-Bindungen. Dies führt zu einer festen Adhäsion, vermittelt durch die $\alpha_M\beta_2$ -Integrin (MAC-1) Bindung an GPIb und/oder anderen Liganden sowie Fibrinogen gebunden an $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integrin auf der Plättchenoberfläche (137). Die

Signalisierung durch die Src-Familie-Kinasen (SFKs) ist erforderlich um die β_2 -Integrin-Aktivierung zu erhalten. Ein wichtiger downstream-Mediator der SFK-abhängigen Signalisierung kann Pyk2 sein, der bei der Adhäsion von Leukozyten an Blutplättchen phosphoryliert wird und erforderlich ist, um die Thrombozyten-Neutrophilen-Adhäsion in murinen und humanen Zellen zu erhalten (153). Leukozyten, die den Übergang von Rollen zu fester Haftung unterziehen, werden durch Clustering von L-Selektin und PSGL-1 polarisiert. Dies fördert eine weitere Rekrutierung von Leukozyten durch Leukozyten-Leukozyten-Wechselwirkungen (154, 155).

Die Bindung von aktivierten Thrombozyten an Leukozyten erhöht ihre Adhäsion an das Endothel und fördert die Transmigration. Dies ist ein wichtiger Mechanismus, wobei die Akkumulation von Neutrophilen und Monozyten in entzündeten oder verletzten Gefäßen und Geweben erleichtert wird (156). Laut neuer Studienergebnisse verbessern Thrombozyten *in vitro* die Adhäsion von $CD14^{high}CD16^+$ Monozyten an Endothelzellen (157), erleichtern die Transmigration von humanen und murinen Neutrophilen über einem IL-1 β -aktivierten Endothelmonolayer (145) und verstärken selektiv die Rekrutierung von Monozyten an das Endothel in verschiedenen Mensch- und Tiermodellen mit vaskulärer Inflammation (158).

Die Thrombozyten-Leukozyten-Wechselwirkungen tragen zur pathologischen vaskulären Inflammation und Thrombose, in einer Vielzahl von experimentellen und klinischen Syndromen, bei. Aktivierte Thrombozyten binden auch an zirkulierende Leukozyten und bilden mehrzellige heterotypische Aggregate (156, 159). In jedem dieser Wechselwirkungen stellt sich weiterhin die Bindung von P-Selektin auf der Plasmamembran der aktivierten Thrombozyten an den leukozytären PSGL-1 als dominantes molekulares Ereignis dar.

Thrombozyten-Monozyten Aggregate und Thrombozyten-Neutrophilen-Aggregate kommen im Blut von Menschen im Rahmen zahlreicher inflammatorischer Erkrankungen vor. Diese Aggregate könnten auch als Träger für den lokalen und systemischen Transport der Gerinnungsfaktoren dienen (160, 161). Beobachtungen am Menschen- und Mausmodellen zeigen, dass Thrombozyten-Neutrophilen-Aggregate zu einer erhöhten pulmonalen

vaskulären Permeabilität und einem chronischen Entzündungszustand bei Patienten mit Sichelzellanämie führen (162). Die Thrombozyten-Monozyten Aggregate sind, zum Teil wegen der differenziellen Regulation von PSGL-1, stabiler als die Thrombozyten-Neutrophilen-Komplexe (163, 164). Somit könnte sich die Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten als eine der empfindlichsten und dauerhaftesten Marker der *in vivo* Thrombozytenaktivierung unter experimentellen und klinischen Bedingungen darstellen (86).

Die Interaktionen zwischen aktivierten Thrombozyten mit Lymphozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen beeinflussen die adaptive Immunantwort und nehmen eine essenzielle Rolle bei vielen chronischen Entzündungs- und Immunprozessen ein (Abb.7) (165). Durch die Entdeckung, dass Thrombozyten CD40L exprimieren und sezernieren, gewannen die Blutplättchen weitere Anerkennung als Effektorzellen des adaptiven Immunsystems. CD40L ist ein Signalmolekül von zentraler immunologischer Bedeutung. Als Zelloberflächenrezeptor aus der Familie der Tumornekrosefaktoren wird CD40L konstitutiv von antigenpräsentierenden Zellen wie Monozyten/Makrophagen, aber auch von Nicht-Immunzellen wie Endothelzellen exprimiert. CD40L besitzt eine besondere Bedeutung bei dem T-Zell-abhängigen Isotypenswitch, bei der Produktion von Antikörper-Unterklassen von B-Zellen und bei der dendritischen Zellaktivierung. Außerdem verstärken die Aktivitäten von Thrombozyten, wie die Synthese von IL-1 β , ferner die Hypothese, dass Blutplättchen adaptive Immunwege initiieren, verstärken oder ändern könnten (166-168).

Diese Ergebnisse liefern Hinweise, dass die Wechselwirkungen von aktivierten Thrombozyten mit Leukozyten, neben ihren physiologischen inflammatorischen Konsequenzen, auch Ereignisse wie mikrovaskuläre Okklusion, Thrombose und Entzündungsausbreitung beeinflussen könnten (169, 170).

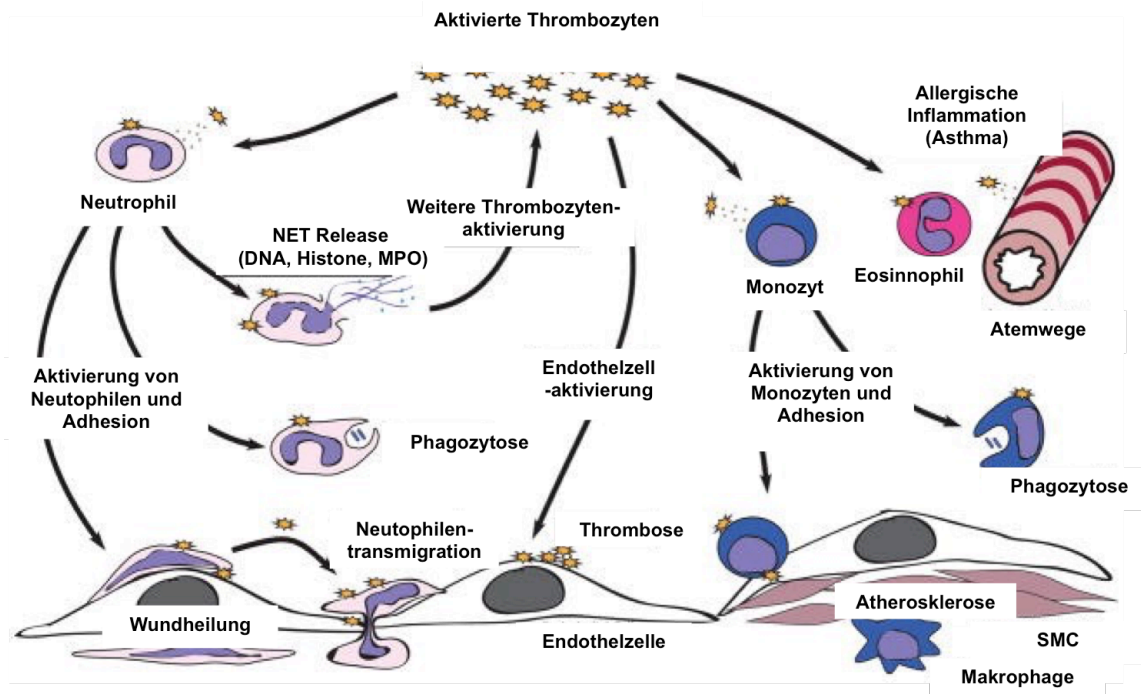


Abbildung 7 Interaktionen zwischen Thrombozyten und Immunzellen. Ausgewählte Beispiele für pro-inflammatorische Wirkungen von Thrombozyten, die zu funktionellen Konsequenzen auf Leukozyten führen. Thrombozyten interagieren mit Leukozyten sowohl durch Adhäsionsmechanismen als auch durch Freisetzung von Zytokinen/Chemokinen. Dies führt zu einer Leukozyten-Aktivierung und einer verstärkten Leukozyten-Endothel-Adhäsion. Durch diese Mechanismen nehmen Thrombozyten an mehreren normalen und pathologischen Immunfunktionen teil, einschließlich mikrobieller Tötung, Leukozytenhoming, Wundheilung, allergischer Entzündung und Atherosklerose. *Adaptiert von Lam FW et al. Comprehensive Physiology. 2015 (145).*

1.6.2 Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothelzellen

Analog zu den Wechselwirkungen zwischen Leukozyten und Thrombozyten können Leukozyten auch mit den Endothelzellen interagieren (138, 139). Die Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen wird über verschiedene Zelladhäsionsmoleküle, die zu den Selektinen, den Integrinen und der Immunglobulin Superfamilie gehören, reguliert (Abb.8) (171). Obwohl sich einige der Rezeptor-Liganden-Paare und Signalmoleküle, die die Wechselwirkungen zwischen Leukozyten und Endothelzellen vermitteln, von

denjenigen, die an den Thrombozyten-Leukozyten Interaktionen (139) beteiligt sind, unterscheiden, sind viele der grundsätzlichen Aspekte ähnlich.

Die Leukozyten müssen aus dem zirkulierenden Blut in das Gewebe gelangen, um ihre Funktion am Entzündungsort zu erfüllen. Dies geschieht in einem mehrstufigen Prozess, der sogenannten Leukodiapedese (von altgriechisch $\delta\acute{\iota}\alpha$ dia „durch“, „hindurch“, „zwischen“, „auseinander“ und altgriechisch $\pi\eta\delta\acute{\alpha}\nu$ pedan „springen“, „hüpfen“), bei dem die Leukozyten mit dem Endothel in den postkapillären Venolen interagieren.

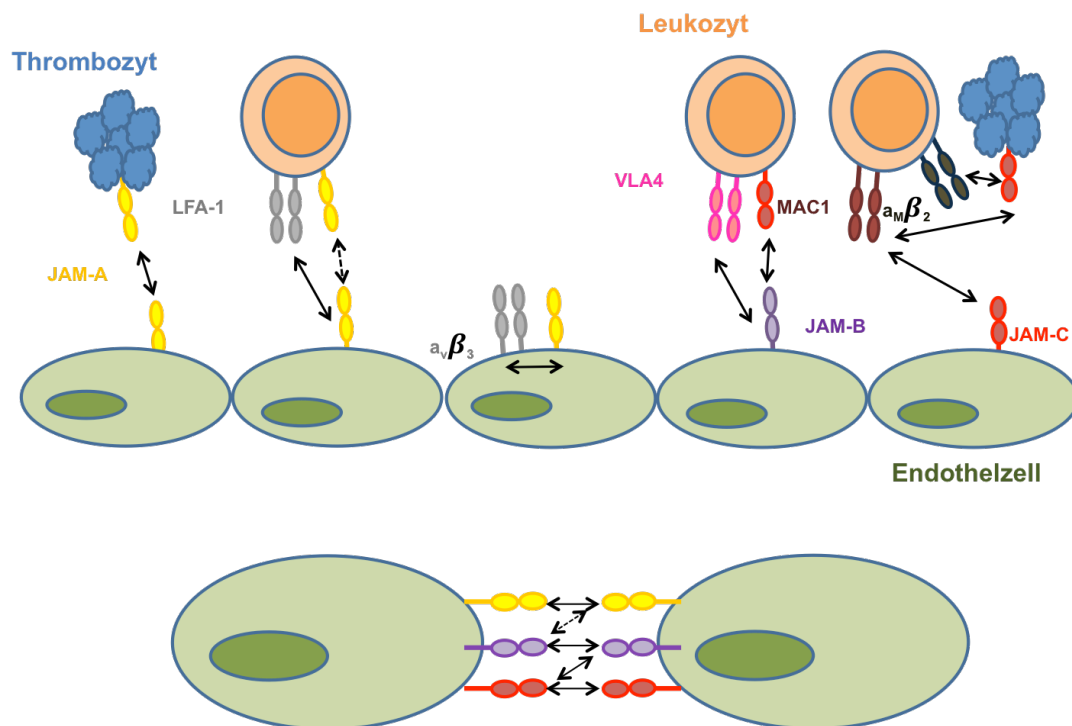


Abbildung 8 Leukozyten-Endothel Kontakt durch Interaktionen von JAMs mit Integrinen. *Adaptiert von Weber C et al. Nature Reviews Immunology 2007 (172).*

Initial kommt es zu einem reversiblen Anhaften (tethering) von Leukozyten an der Gefäßwand. Die Leukozyten bilden mit dem Gefäßendothel der postkapillären Venolen temporäre Kontakte aus, sodass sie wiederholt an Endothelzellen binden und sich wieder ablösen. Dies führt zu einem intravaskulären Rollen (rolling). Die Schritte der reversiblen Anhaftung und des Rollens werden von Selektinen, ihren glykosylierten Liganden und niederaffinen

Integrinen vermittelt (173, 174). Folglich kommt es zu einer Verlangsamung der Rollbewegung der Leukozyten. Für das Leukozytenrollen sind vorwiegend Interaktionen zwischen PSGL-1 und P-Selektin (175), sowie das β 2-Integrin LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$, CD11a/CD18; leukocyte function associated antigen-1) oder das β 1-Integrin VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$, CD49d/CD29; very late antigen-4) verantwortlich (176, 177). Die durch Selektine vermittelte Interaktion von Leukozyten und Endothel zeigt eine geringe Bindungsstärke und ist reversibel. Für eine stabile Adhäsion ist die Aktivierung der Leukozyten durch Chemokine essenziell. Durch die Bindung von Chemokine an den spezifischen Rezeptoren, die auf den Leukozyten lokalisiert sind, kommt es zu einer Aktivierung von Integrinen (171). Die stabile Adhäsion von Leukozyten und Endothelzellen wird hauptsächlich durch Wechselwirkungen zwischen leukozytären Integrinen und endothelialen Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie wie ICAM-1 (CD54; intercellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (CD106; vascular cellular adhesion molecule-1), PECAM-1 (CD31 platelet endothelial cell adhesion molecule-1) und JAMs (junctional adhesion molecules) vermittelt. Anschließend erfolgt die Transmigration der Leukozyten über den trans- oder parazellulären Weg durch die Gefäßwand in extravaskuläres Gewebe. Die Diapedese setzt eine regulierte Öffnung und Wiederverschluß der Endothelzellverbindungen voraus. Dabei spielt das Adhäsionsmolekül VE-Cadherin (vascular endothelial-cadherin), welches Endothelzellen homophil miteinander verbindet und damit die Endothelzellkontakte stabil hält, die Hauptrolle. Diese Funktion wird zusätzlich von der Phosphatase VE-PTP, die ausschließlich auf der Oberfläche der Endothelzellen zu finden ist, unterstützt. Vor kurzem wurde gezeigt, dass die Anheftung von Leukozyten an das Endothel eine Dissoziation der VE-PTP von VE-Cadherin bewirkt, die die Öffnung der Endothelzellkontakten ermöglicht (178). Nach dem Überwinden der Endothelbarriere müssen die Leukozyten die darunterliegende Basalmembran, die aus extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagen IV besteht durchqueren, um in den Entzündungsherd einzudringen (179). Die Leukozyten wandern dann ins Interstitium aus und werden chemotaktisch zu den Orten der Infektion oder Verletzung geleitet (Chemorheotaxis), um dort als Effektorzellen zu fungieren (180, 181). Diese Vorgänge werden von Integrinen und Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie kontrolliert (182).

1.7 Selektine

Selektine haben eine gemeinsame Domänenstruktur. Sie besteht aus einer am N-Terminus kalziumabhängigen Lektindomäne vom C-Typ (CTLD; c-type lectin-like domain), gefolgt von einer EGF- Domäne, 2-9 Wiederholungssequenzen, so genannte „short consensus repeats“ (SCR), einer Transmembrandomäne und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne (183). Die Selektine binden an eine einfache Zuckerdeterminante (sialyl Lewis x, sLe^x genannt). Patienten mit einem Defekt in ihrem Glucosestoffwechsel, die keine sLe^x-Determinanten auf ihren Zellen exprimieren können, leiden an sogenannten rekurrenten bakteriellen Infektionen, sind geistig retardiert und kleinwüchsig (184, 185). Die Familie der Selektinrezeptoren besteht aus drei Mitgliedern: Nämlich P-, E- und L-Selektin (186). Diese drei Formen von Typ I-Transmembranglykoproteinen sind auf unterschiedlichen Zellen exprimiert.

L-Selektin (auch als Mel-14, CD62L oder LAM-1 bezeichnet) wird konstitutiv auf den Mikrovilli aller zirkulierenden Leukozyten, bis auf Gedächtniszellen, exprimiert und verschwindet nach der Aktivierung schnell wieder von ihrer Oberfläche (173).

E-Selektin (auch als CD62E oder ELAM-1 bezeichnet) wird auf aktivierten vaskulären Endothelzellen exprimiert (187). Die Expression von E-Selektin wird durch Aktivierung von Endothelzellen mit Zytokinen, insbesondere durch IL-1 β , TNF- α oder Lipopolysacchariden (LPS) induziert. E-Selektin wird *de novo* synthetisiert und erreicht deswegen seine maximale Konzentration erst nach zwei bis 4 Stunden. Nach 24 Stunden fällt die Konzentration auf ihren Ausgangszustand zurück.

P-Selektin (auch als PADGEM; platelet activation-dependent granule to external membrane protein, CD62P oder GMP-140; granule membrane protein 140 bezeichnet) ist auf Thrombozyten und aktivierten Endothelzellen exprimiert (188). P-Selektin liegt gespeichert in einer funktionsfähigen Form in den Weibel-Palade-Körpern der Endothelzellen und α -Granula der Thrombozyten vor. Als Antwort auf Mediatoren entzündlicher Reaktionen wie Thrombin, Histamin, Leukotrien LTB₄ oder Komplementfaktor C5a, werden sie rasch zur Zelloberfläche transportiert, wo sie an neutrophile Granulozyten und Monozyten binden. Ebenfalls konnte eine Induktion der mRNA für P-Selektine gezeigt werden. Zellaktivierung mit Zytokinen oder Lipopolysacchariden (LPS)

induzieren die Neusynthese von P-Selektin (189). P-Selektin erreicht innerhalb von 5-10 Minuten nach Stimulation seine maximale Konzentration und sinkt innerhalb der nächsten 30-60 Minuten wieder stark ab. Das Protein wird dabei durch Endozytose internalisiert (190).

Zu allen Selektinen sind spezialisierte Liganden bekannt. P-selektin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1), der von Leukozyten exprimiert wird, ist der Hauptvertreter der Liganden die an Selektinen andocken (151). Die Bindung von P-Selektin an PSGL-1 vermittelt eine Reihe von Zell-Zell-Interaktionen (Abb. 9).

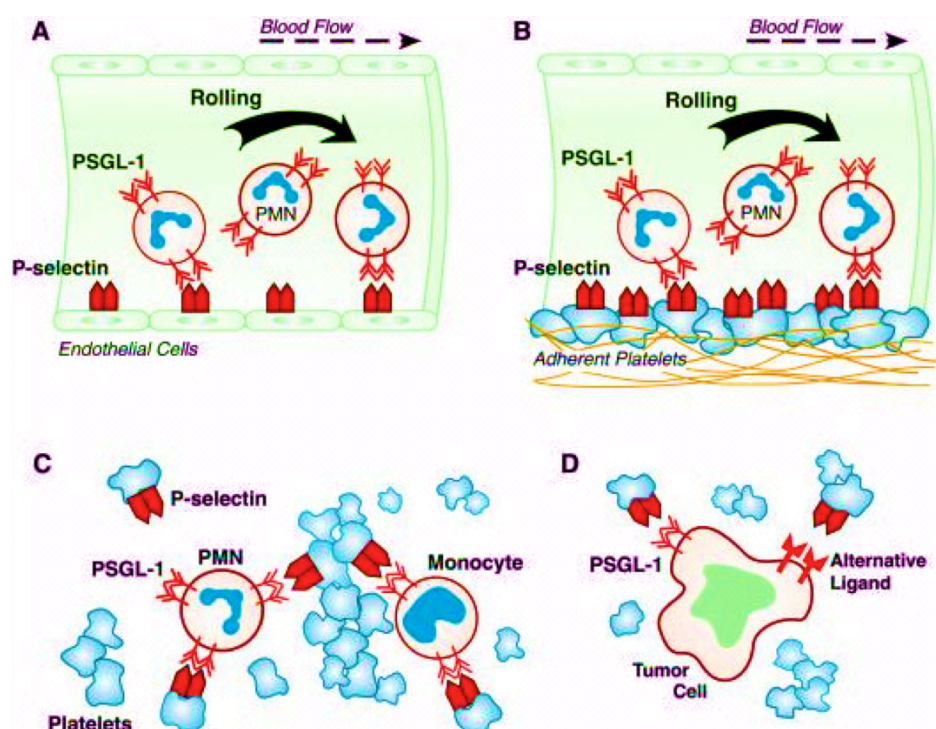


Abbildung 9 Zell-Zell-Interaktionen vermittelt durch P-Selektin und PSGL-

1. Die Bindung von P-Selektin an PSGL-1 vermittelt: 1. das Rollen von Leukozyten auf entzündeten Endothelzellen (A) oder adhärenz aktivierte Thrombozyten (B), 2. die Adhäsion von Thrombozyten an myeloische Leukozyten, welches zur Bildung von gemischten Zellaggregaten führt (C) und 3. die Adhäsion von einigen Tumorzellen an Thrombozyten und Endothelzellen (D). *Adaptiert von Zimmerman GA et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001 (191).*

1.8 Chemokine

Der Name Chemokin ist aus den Begriffen „chemotaktisch“ und „Cytokin“ abgeleitet. Chemokine sind 8-12kDa lange Zytokine, bestehend aus 75-125 Aminosäuren. Als Signalproteine vermitteln sie in Geweben die Chemotaxis und die transendotheliale Migration der Leukozyten (Haptotaxis). Darüber hinaus besitzen Chemokine eine Schlüsselfunktion in dem Bereich der immunologischen Abwehr (192) und in einer Vielzahl von anderen pathologischen und physiologischen Prozessen wie z.B. Hämatopoese, Embryogenese, Angiogenese und Tumormetastasierung (193, 194). Es lassen sich homöostatische (konstitutive) und inflammatorische (induzierbare) Chemokine unterscheiden. Die meisten Chemokine sind inflammatorische Zytokine. Dies bedeutet, dass ihre Produktion zum Beispiel durch Verletzung, Infektion oder Entzündung nach Stimulation mit LPS, TNF- α oder IL-1 ausgelöst wird. Chemokine wirken über Rezeptoren auf ihren Zielzellen (195). Die meisten Chemokine binden an mehreren Rezeptortypen, genauso wie die meisten Rezeptoren durch verschiedene Chemokine angesprochen werden können (Pleiotropie). Leukozyten tragen verschiedene Chemokinrezeptoren auf ihrer Oberfläche und binden in der Regel mehr als ein Chemokin gleichzeitig (196, 197).

Die Chemokinrezeptoren werden, durch die an ihnen bindenden Liganden, in C-, CC-, CXC- und CX3C- Chemokinrezeptoren eingeteilt. Mehrere Studien konnten die Hochregulation und die vermehrte Zirkulation von Chemokinen der CXC- und CC-Familie im Rahmen einer myokardialen Ischämie nachweisen (198). Chemokine fördern das Remodeling des Myokards (199) und sind bei der Aktivierung des Rekrutierungsvorgangs von Progenitor-/Stammzellen entscheidend (200).

1.8.1 CXCL12/CXCR4 Achse

CXCR4 wurde, aufgrund seiner Beteiligung an der Chemotaxis von Leukozyten in spezifischen Entzündungszuständen, intensiv bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen, einschließlich rheumatoider Arthritis, systemischem Lupus erythematoses und autoimmunen Erkrankungen des zentralen Nervensystems wie z.B. Multiple Sklerose, untersucht (201, 202). Der Chemokinrezeptor CXCR4 und sein Ligand CXCL12, auch als stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) bekannt, spielen eine entscheidende Rolle beim Homing von Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark und steuern ihre Mobilisierung in das periphere Blut und Gewebe unter homöostatischen Bedingungen sowie nach Gewebeverletzung oder Stress. Die Hochregulation von SDF-1 unter hypoxischen Bedingungen, mit der anschließenden Mobilisierung von CXCR4-positiven Stamm- und Vorläuferzellen (203), inspirierte die Forscher die Rolle und den therapeutischen Wert der Vorläuferzellen und der CXCL12/CXCR4-Achse in verschiedenen Modellen von ischämischen Verletzungen, einschließlich Herz, Niere, Lunge und Gehirn, zu untersuchen. Zusätzlich wurde die CXCL12/CXCR4-vermittelte Mobilisierung von Vorläuferzellen in Gefäßverletzungs-induzierten-Restenose Modellen, wie z.B. nach Organtransplantation, Ballondilatation oder Stent-Implantation, untersucht (204).

1.8.1.1 Die CXCL12/CXCR4-Achse vermittelt Homing von Progenitorzellen

Im Blut von gesunden Erwachsenen Menschen zirkuliert unter normalen Bedingungen nur eine geringe Anzahl von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (HSPCs). Die überwiegende Zahl befindet sich in einer Ruhenische im Knochenmark. Verschiedene endogene und exogene Substanzen können eine verstärkte Mobilisierung aus dem Knochenmark bewirken und dadurch die Anzahl der zirkulierenden HSPCs steigern (205). Zu den endogenen Stimuli gehören Zytokine, die bei Entzündungen sezernierte G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) (206, 207) oder GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) (51), das vom ischämischen Gewebe freigesetzte SDF-1 (208, 209), Wachstumsfaktoren, z.B. VEGF (210) und Angiopoietin (211) sowie Hormone, wie Erythropoetin (212) und Östrogene (213). Beispiele für exogene Stimuli sind hauptsächlich Medikamente, wie Cholesterinsenker (214) oder auch Sport (61).

Die CXCL12/CXCR4-Achse spielt eine entscheidende Rolle beim Homing und der Retention der HSPCs in den Stammzellnischen des Knochenmarks (215). Das durch sinusoidale Endothelzellen des Knochenmarks sezernierte CXCL12 triggert die Rekrutierung der zirkulierenden CXCR4⁺ HSPCs durch CXCR4-vermittelte Integrin-Aktivierung (216). Anschließend, nach vaskulärer Extravasation, finden HSPCs spezielle Knochenmarknischen, die optimale Bedingungen für ihr Überleben, ihre Selbsterneuerung, ihre Differenzierung und ihre Funktion besitzen (217). Eine hohe Expression von CXCL12 aus Knochenmarkstromazellen wirkt als wichtiger Haftungsmechanismus der CXCR4⁺ HSPCs im Knochenmark.

1.8.1.2 Die CXCL12/CXCR4-Achse vermittelt Stress-induzierte Mobilisierung von Progenitorzellen

Unter Stressbedingungen oder bei Verletzungen verlassen HSPCs ihre Nischen und werden zunehmend in die Peripherie mobilisiert (215). Die CXCL12/CXCR4-Achse spielt eine Schlüsselrolle bei der HSPC Mobilisierung. Beispielsweise reduziert G-CSF, ein häufig in der Klinik verwendetes Zytokin zur Stammzellmobilisation, die CXCL12 Expression aus Knochenmark-Osteoblasten. Dies erfolgt durch Depletion der endostalen Makrophagen, die die osteoblastische Funktion unterstützen (218).

Weiterhin ist G-CSF mit der proteolytischen Inaktivierung von CXCR4 auf HCPCS im Knochenmark assoziiert (219). Dies erfolgt trotz der verstärkten Oberflächenexpression von CXCR4 auf Knochenmarkszellen während einer G-CSF-Behandlung (220). Zusätzlich setzt eine G-CSF-induzierte Mobilisierung von HSPCs die Aktivität der Protease Dipeptidylpeptidase-4 (DPP4, auch als CD26 bekannt) voraus, die CXCL12 durch Proteolyse inaktiviert (221, 222). Eine ähnliche Rolle bei der CXCL12 Destabilisierung während HSPC Mobilisierung spielen die Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9) sowie die neutrophile Elastase und Cathepsin G. Obwohl diese Proteasen während der Behandlung mit G-CSF im Knochenmark hochreguliert werden (223), konnte eine kombinierte Hemmung einer breiten Palette von Metalloproteinasen und Neutrophilen Serinproteasen- einschließlich MMP9, neutrophiler Elastase und Cathepsin G, die G-CSF-induzierte Mobilisierung von HSPCs nicht signifikant beeinflussen (224).

1.9 Integrine und Immunglobuline

Integrine sind Adhäsionsmoleküle, die auf Leukozyten und vielen anderen Zellarten exprimiert werden. Sie vermitteln Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen und gewährleisten somit die Adhäsion, sowohl zwischen unterschiedlichen (heterotype Adhäsion) als auch zwischen gleichen Zelltypen (homotype Adhäsion). Integrine bestehen aus α -(CD11)- und β -(CD18)-Untereinheiten, die nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Nach Stimulation wechseln Integrine rapide von niederaffinen zu hochaffinen Integrinen, mit anschließender Ligandenbindung und Zellaktivierung (225). Integrine fördern die Adhäsion von Zellen an Matrixproteine, wie Fibronectin, Laminin, Tenascin sowie Vitronectin, an zelluläre Zielrezeptoren und an viele andere Substrate (226).

Integrine sind von großer Bedeutung in mehreren Prozessen, zum Beispiel: Embryogenese, Angiogenese, Aggregation von Thrombozyten, neoplastische Transformation und Metastasenbildung. Auch bei Infektionen, indem sie als Andockstellen für Invasine fungieren und damit das Eindringen der Erreger in die Zelle ermöglichen, spielen Integrine eine wichtige Rolle. Zusätzlich spielen die Interaktionen zwischen Integrinen und Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-(Ig)-Superfamilie einer Entzündung eine große Rolle.

Für die Adhäsion sind vorallem folgende Integrine und Liganden von großer Bedeutung (171):

LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$, CD11a/CD18; leukocyte function associated antigen-1) ist auf allen Leukozyten konstitutiv exprimiert und vermittelt die Leukozytenadhäsion am Endothel durch die Bindung an seinem Liganden ICAM-1, -2, -3 (227-229).

MAC-1 ($\alpha_M\beta_2$, CD11b/CD18; macrophage antigen-1) ist auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert und fördert die Leukozytenadhäsion am Endothel durch ICAM-1 und iC3b (230, 231).

ICAM-1 (CD54, intercellular adhesion molecule-1) ist ein Adhäsionsrezeptor der Ig-Superfamilie, der konstitutiv auf Endothelzellen vorkommt und nach Aktivierung der Zelle mit IL-1 oder TNF- α verstärkt exprimiert wird (232).

VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$; CD49d; very late antigen-4) ist auf Lymphozyten, Monozyten und eosinophilen Granulozyten exprimiert. Der Name „very late antigen“ zeigt: VLA-4 wird in der späten Phase der T-Zell Aktivierung synthetisiert (233). Durch Bindung an VCAM-1 nimmt es eine wichtige Rolle bei der Adhäsion von Leukozyten am Endothel ein (234).

VCAM-1 (CD106; vascular cell adhesion molecule-1) ist ein Adhäsionsrezeptor der Ig-Superfamilie und unterstützt die Adhäsion von Leukozyten am Endothel durch seine Interaktion mit VLA-4 (234).

1.10 JAM-Familie

1.10.1 Nomenklatur, Struktur und biochemische Eigenschaften

Die junctionalen Adhäsionsmoleküle (Junctional Adhesion Molecules=JAMs) sind Glykoproteine, die zur Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) gehören (235). JAMs sind transmembrane Glykoproteine vom Typ I und bestehen aus zwei extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen (V-C2 Typ Ig-Domäne), einem Transmembransegment und einem zytoplasmatischen Teil von variabler Länge mit einem PDZ-Domäne-Bindungsmotiv (Phe-Leu-Val). Eine kurze Linker-Sequenz Val-Leu-Val verbindet die zwei Immunglobulinindomänen, sodass eine gebogene Konformation entsteht (Abb. 12). Das Dimerisierungsmotiv [Arg- (Val/Leu/Ile) -Glu] in der distalen Membrandomäne ist essenziell für die Homodimerbildung.

Die Geschichte der PDZ-Domänen begann in 1991. Seitdem wurden mehrere Proteine die PDZ-Domänen besitzen identifiziert, wie z.B das synaptische Protein PSD95 (post synaptic density 95), auch als SAP90 (synapse associated protein 90) bekannt, das Tight junction Protein-1, auch ZO1 (Zonula occludens-1) genannt, das SJ (Septate junction)-Dlg (Discs large) Protein aus der Drosophila melanogaster das AF6 (Afadin-6), das PARD3 (partitioning defective 3) sowie die CASK (Calcium-Calmodulin-abhängige Serinproteinkinase).

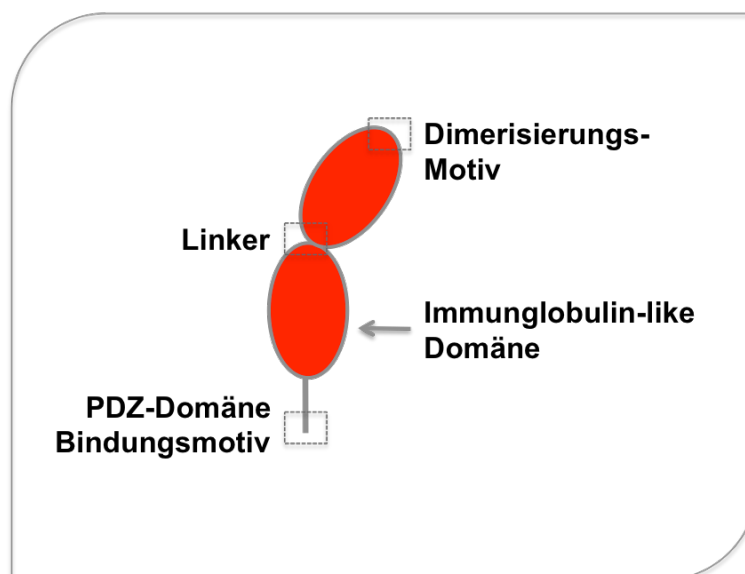


Abbildung 10 Chemische Struktur der Junctional-Adhäsionsmoleküle.

Die JAM-Familie besteht aus drei klassischen Mitgliedern: JAM-A (236, 237), JAM-B (238, 239) und JAM-C (240, 241) und außerdem aus einer Untergruppe von nicht mit den klassischen JAMs verwandten Proteinen: JAM4 (242), das JAM-like (JAM-L) Protein (243), der Coxsackie und Adenovirus-Rezeptor (CAR) (244), das CAR-ähnliche Membranprotein (CLMP) (245) und das Endothelzell-selektive Adhäsionsmolekül (ESAM) (246). Die 3 klassischen JAMs sind bezüglich der Aminosäuresequenz zu 32-38% identisch (241) und haben eine kurze intrazelluläre Domäne von variabler Länge (40-50 Residuen), die ein Klasse-II-PDZ-Bindungsmotiv am C-Terminus enthält (247). Die nicht klassischen JAMs besitzen stattdessen einen langen Zytoplasmaschwanz (98-120 Residuen), der, ausgenommen des JAM-L und CLMP, mit einem Klasse-I-PDZ-Bindemotiv endet (245, 247).

Klasse I- und II- PDZ-Bindungsmotive zeigen eine Wechselwirkung mit diversen Gerüstproteinen, die mit dem Aktinzytoskelett und mehreren Signalwegen verbunden sind. Aufgründessen können JAMs mit unterschiedlichsten zytoplasmatischen Proteinen, mit diversen Funktionen, interagieren.

1.10.2 Gewebeverteilung und Zellexpression

Wie in Tabelle 1 zusammengefasst, zeigen JAMs eine breite Gewebeverteilung und Zellexpression (adaptiert von Arcangeli ML et al. Arch Immunol Ther Exp 2013) (248).

Tabelle 1: JAMs: Gewebeverteilung und Zellexpression.

Molekül	Gewebeexpression	Zellexpression
JAM-A	Blut, Knochenmark, Gehirn, Herz, Darm, Niere, Leber, Lunge, Bauchspeicheldrüse, Haut, Milz, Hoden	Endothel, Epithel, Monozyten, Neutrophilen, Lymphozyten, dendritische Zellen, HSC, Thrombozyten, Makrophagen, Spermatozoen / Sertoli-Zellen
JAM-B	Herz, Niere, Lymphknoten, Darm, Hoden	HEV, lymphatische Zellen, Sertoli Zellen, HSC, NSC, ESC
JAM-C	Gehirn, Knochenmark, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz, Hoden, Nerven	Monozyten, Lymphozyten, dendritische Zellen, NK-Zellen, Thrombozyten, HEV, HSC, lymphatische Zellen, Schwann Zellen, Spermatide, Fibroblasten
JAM4	Blut, Knochenmark, Darm, Niere, Leber, Testis	Epithelzellen, HSC, Spermatogonien
JAM-L	Blut, Haut	Monozyten, Neutrophilen, Lymphozyten, intraepitheliale Lymphozyten
CAR	Gehirn, Niere, Leber, Lunge, Darm, Haut, Hoden	Endothelzellen, Epithelzellen, lymphatische Zellen, Spermatozoen
CLMP	Fettgewebe, Gehirn, Herz, Darm, Niere, Lunge, Hoden	Epithelzellen
ESAM	Knochenmark, Herz, Lunge, Leber, Lymphknoten	Thrombozyten, HEV, HSC, lymphatische Zellen

1.10.3 Die JAMs Interaktionen

JAMs interagieren miteinander und sind an unterschiedlichen zellulären Wechselwirkungen beteiligt (Tabelle 2). Wenn zwei gleichartige Moleküle aneinander binden, wird von homophiler Interaktion gesprochen. Bei einer heterophilen Interaktion interagieren dagegen zwei unterschiedliche Moleküle miteinander. Eine Wechselwirkung von Molekülen, die sich auf einer gegenüberliegenden Zellmembran befinden, wird als trans-Interaktion bezeichnet. Bei einer cis-Interaktion interagieren die Proteine in der gleichen Membran. Sowohl trans-als auch cis interaktionen können homophil oder heterophil sein.

Alle JAM-Mitglieder sind potentiell fähig homophile cis- und trans- Interaktionen zu bilden. Heterophile cis -und trans-interaktionen können allerdings nur zwischen spezifischen Mitgliedern der JAM-Familie untereinander oder mit Integrin-Partnern vorkommen. JAM-A geht sowohl homophile (JAM-A–JAM-A) als auch heterophile Liganden Interaktionen ein, z.B. mit LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$, CD11a/CD18) oder mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ (249). In *tight junctions* interagiert JAM-A vor allem homophil mit JAM-A [253]. Diese homophile Interaktion wird vermutlich während der Leukozytentransmigration durch eine heterophile Liganden-Interaktion abgelöst.

Tabelle 2: JAMs-Liganden Interaktionen und ihre Funktionen.

Molekül	Liganden	Funktion
JAM-A	JAM-A (250) LFA-1 (251) $\alpha_v\beta_3$ (249)	Leukozytentransmigration (252, 253) Aufrechterhaltung der Tight Junctions (254) Epitheliale Polarität (255) Migration der DCs in die Lymphknoten (256)
JAM-B	JAM-C (240) $\alpha_4\beta_1$ (257)	Leukozytentransmigration (258) Regulation der Homöostase der HSCs (259, 260)
JAM-C	JAM-B, -C (240) $\alpha_M\beta_2$ (261), $\alpha_X\beta_2$ (262) $\alpha_v\beta_3$ (263), CAR (264)	Leukozytentransmigration (265), Zellpolarität (266) Blut-Hirn-Schranke Stabilität (267) Zelladhäsion und Polarität (268)
JAM4	Unbekannt	Unbekannt (269)
JAM-L	CAR (270), $\alpha_4\beta_1$ (271)	Leukozytenmigration (272, 273)
CAR	JAM-C (264) JAML (270)	Eintritt von Coxsackie- und Adenovirus (274, 275) Leukozytenmigration (270, 276)
ESAM	ESAM	Leukozytentransmigration (277-279)

1.10.4 Junctional Adhesion Molecule C

1.10.4.1 Gewebeverteilung und Zellexpressionsmuster von JAM-C

JAM-C ist reichlich auf Endothelzellen von bestimmten Gefäßen, wie hochendothelialen Venolen und Lymphgefäßen, vorhanden (239). JAM-C ist auf humanen Zellen, wie Thrombozyten, Monozyten, natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen, B-Zellen und Untergruppen von T-Zellen, exprimiert (262, 265, 280). Allerdings konnte JAM-C nicht auf Mausleukozyten detektiert werden (265, 281).

Bei Endothel- und Epithelzellen sind JAMs an interzellulären Kontakten beteiligt: Insbesondere an dem Aufbau und der Aufrechterhaltung von „junctions“, an dem „signalling“ zu Zytoskelett-assoziierten Proteinen und an der Rekrutierung von Zellpolaritäts-Proteinen, über ihr PDZ-Domänen-Bindungsmotiv, zu den „junctions“. Obwohl JAM-C an Desmosomen von Epithelzellen detektiert wurde (282), deutet die Assoziation von JAM-C mit ZO1 oder PARD3 (par-3 family cell polarity regulator 3) darauf hin, dass JAM-C eine Schlüsselfunktion an *tight junctions* von Endothelzellen besitzt (241). Eine Mutation des Serinrestes an Position 281 des JAM-C Zytoplasmaschwanzes führte zu einem Verlust der JAM-C-Position an *tight junctions* und zu einem Verlust der Zellpolarität, während die Integrin-vermittelte Zellmigration stimuliert wurde (268).

1.10.4.2 JAM-C Expression auf Leukozyten: Eine „Junktions-Affäre“?

Die funktionelle Bedeutung der JAM-C-Expression auf humanen Leukozyten ist divers. Eine Hypothese ist, dass die JAM-C-Expression auf humanen Lymphozyten-Populationen die Transmigration und das konstitutive „Lymphozyten-Trafficking“ in das Gefäßsystem und die Lymphgefäße ermöglicht. Dies beruht auf Beobachtungen, dass eine Blockade der JAM-C-Funktion, unter Verwendung von löslichem JAM-C, die reverse- und wiederholte Transmigration auf kultiviertem Endothelium erhöht (283). Die Expression von JAM-C auf bestimmten T- und B-Zellen ermöglicht einer Einzelzelle, durch Ersetzen der JAM-B/-C Interaktionen mit JAM-C/-C-Interaktionen, die endothelialen Junctions zu öffnen und bidirektional mehrere endotheliale Barrieren zu durchwandern. Vermehrte JAM-C/-C Interaktionen an den

Endothel-Junctions führen zu einer erhöhten Permeabilität der endothelialen Monoschicht.

1.10.4.3 Die Rolle von JAM-C bei der transendothelialen Migration

JAM-C ist an Leukozytenadhäsion, Rolling und transendothelialer Migration beteiligt (265, 284). In den meisten Studien wurde die Rolle von JAM-C bei der Leukozytentransmigration, durch Verwendung von löslichen rekombinanten Proteinen und anti-JAM-C blockierenden Antikörper, untersucht. Viele Forschungsgruppen beschäftigten sich mit der Rolle von JAM-C bei der Regulierung der Leukozytenmigration in verschiedenen Krankheitskontexten.

Bei rheumathoiden Arthritispatienten und Tiermodellen wurde eine JAM-C Überexpression auf Endothelzellen beobachtet, die für die Leukozytenadhäsion und Retention innerhalb des entzündeten Synoviums sehr von Bedeutung war (285). In einem Diabetes-Typ-I-Modell (RIP-LCMV; rat insulin promoter-lymphocytic choriomeningitis) vermittelte JAM-C die Rekrutierung von pathogenen T-Lymphozyten in Langerhans'schen Inseln (286). Die Transgenenmäuse, die ein Protein des lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMV) in β -Zellen exprimieren, bekommen nach einer LCMV-Virus-Infektion einen Diabetes. Die Autoren haben herausgefunden, dass bei dieser Infektion JAM-C-Protein in der Nähe der Inselzellen hochreguliert wurde. Hingegen konnte eine JAM-C-Blockade, mit einem neutralisierenden anti-JAM-C-Antikörper, das Auftreten von Typ-1-Diabetes verringern.

In einem Ischämie- und Reperusionsmodell zeigte sich die Leukozyten-Adhäsion und Transmigration bei JAM-C-defizienten Mäusen unterdrückt und bei JAM-C überexprimierenden Mäusen erhöht (287). Zusätzlich wurde eine verringerte Lymphozytentransmigration in humanen Endothelzellen aus der Umbilicalvene (HUVECs) beobachtet, die mit einem anti-JAM-C blockierenden Antikörper oder mit einem rekombinanten löslichen JAM-C-Protein vorbehandelt wurden. Wenn hingegen HUVECs JAM-C überexprimierten, zeigte sich eine gesteigerte Lymphozyten Transmigration (265). In ähnlicher Weise führte die *in vitro* Behandlung von humanen Epithelzellen mit anti-JAM-C-Antikörper zu einer verringerten neutrophilen transepithelialen Migration (282, 288, 289).

Im Gegensatz zu den Schlussfolgerungen der statischen Transmigrationsassays zeigten die unter Strömung durchgeführte Experimente, dass JAM-C *in vitro*, wenn überhaupt, eine minimale Rolle in der neutrophilen oder monozytären transendothelialen Migration (TEM) spielt (290). Allerdings inhibierte die pharmakologische Blockade von JAM-C die Rekrutierung von Leukozyten in verschiedenen inflammatorischen Mausmodellen und erhöhte die Häufigkeit der reversen transmigrierten Monozyten (283, 291, 292). Dies hat Woodfin et al. veranlasst die Funktion von JAM-C bei der neutrophilen Transmigration *in vivo*, unter Verwendung von Einzelstrahl-Laser, konfokaler Mikroskopie und dreidimensionale Bildgebung in Echtzeit, zu revidieren (293).

In dieser Studie zeigten die Autoren, dass *in vivo* drei unterschiedliche Arten der neutrophilen parazellulären TEM vorhanden sind und zwar eine normale TEM in eine lumenale-abluminale Richtung, eine verzögerte multidirektionale TEM und eine reverse TEM, in denen Leukozyten durch endotheliale Junctions in eine abluminale-luminale Richtung wandern. Diese drei Modi der TEM koexistieren und ihre Relevanz zu der gesamten neutrophilen Rekrutierung ist vom Entzündungsreiz abhängig. Die verzögerte TEM und die reverse TEM zeigen allerdings eine gewisse Prädominanz bei einer Ischämie-Reperfusionverletzung. Der Anteil der Neutrophilen, die sich einer verzögerten und reversen- TEM unterziehen, korreliert mit dem Verschwinden von JAM-C von interendothelialen Kontakten und ist in Mäusen erhöht, bei denen die JAM-C-Expression auf interendothelialen Kontakten unterbrochen ist. Dies deutet darauf hin, dass JAM-C eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Polarität der luminal-abluminalen Leukozyten-TEM spielt.

1.10.4.4 Die Rolle von JAM-C bei den Interaktionen von Thrombozyten mit Leukozyten und Endothelzellen

JAM-C ist auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimiert. Thrombozytäres JAM-C interagiert mit dem leukozytären MAC-1 (und dem Integrin $\alpha_X\beta_2$) und fördert damit die Thrombozyten-Leukozyten Interaktionen. Zusammen mit dem Glykoprotein Iba dient JAM-C als ein sehr wichtiger heterotypischer Ligand für MAC-1, der für die Thrombozyten-Leukozyten-Adhäsion verantwortlich ist. Die Adhäsion kann durch lösliches JAM-C oder einen spezifischen Antikörper gegen JAM-C inhibiert werden [269]. MAC-1 ist der Hauptrezeptor, der die

Anhaftung von Leukozyten an adhärenente Thrombozyten vermittelt. JAM-C scheint somit eine größere Relevanz bei der direkten adhäsiven Interaktion mit Leukozyten, als bei der Regulation der Immunfunktionen von Thrombozyten, zu besitzen (294).

1.10.4.5 Die Rolle von JAM-C bei der Inflammation und der vaskulären Pathogenese

Die Rolle von JAMs bei der Inflammation und der vaskulären Pathogenese, wie zum Beispiel die Neointimahyperplasie, wurde in verschiedenen *in vivo* Modellen untersucht (Tabelle 3). JAM-A und JAM-C wurden in einem Mausmodell einer akuten Thioglykolat-induzierten Peritonitis untersucht, wobei sowohl die JAM-A Defizienz, als auch die JAM-C-spezifische Antikörper Blockierung die inflammatorische Leukozytenrekrutierung reduzierte (254, 289). In einem weiteren „endotoxin-induzierten akuten Lungenentzündungs“ Modell konnte gezeigt werden, dass eine JAM-C Überexpression unter der Kontrolle eines endothelzellspezifischen Promoters zu einer gesteigerten alveolären und perivaskulären Rekrutierung von Monozyten und Granulozyten führte (281). Dieser Anstieg wurde durch einen JAM-C spezifischen Antikörper blockiert und für die Interleukin-1 β -induzierte Neutrophilenadhäsion und -transmigration in Venolen des M. cremaster beobachtet.

Tabelle 3: JAMs in verschiedenen Modellen von Inflammation, Ischämie-Reperfusion und vaskulärer Pathogenese.

Gewebe	Modell	Effekte
Peritoneum	Peritonitis	Antikörper oder lösliches JAM-C reduzierten die Neutrophilen Extravasation
Lunge	Pulmonale Inflammation	Leukozyten Rekrutierung wurde durch Antikörper vermindert und durch Überexpression von JAM-C in Endothelzellen gesteigert
Blutgefäße	Angiogenese und Tumorwachstum	Antikörper verringerten die Angiogenese und das Tumorwachstum
Blutgefäße und Haut	Hypoxie-induzierte retinale Angiogenese und Permeabilität	Lösliches JAM-C verminderte die Angiogenese und die Permeabilität

Adaptiert von Weber C et al. Nat Rev Immunol. 2007 (172)

1.10.4.6 Die Rolle von JAM-C bei Atherogenese

JAMs steuern die Atherogenese nicht nur durch die Rekrutierung von mononukleären Zellen, sondern auch, aufgrund ihrer Expression auf Thrombozyten, durch andere zusätzlichen Mechanismen. Thrombozytäres JAM-C fördert, durch seine Bindung am Integrin MAC-1, die Atherothrombose, indem es Interaktionen zwischen Leukozyten und Thrombozyten vermittelt (262).

Bei Apolipoprotein E (APOE)-defizienten Mäuse, die eine fettreiche Diät erhielten, konnte, durch oxidierte Lipoproteine (aber nicht Zytokine) und unter hyperlipidämischen Bedingungen, eine vermehrte JAM-C Expression sowohl in Proteinebene, als auch in Transkriptebeobachtet werden (295). Neben der erhöhten JAM-C Expression, wurde, entfernt von den endothelialen Zell junctions in Richtung apikal, eine inflammatorische Repositionierung beobachtet. Diese hat die JAM-C Verfügbarkeit für seine leukozytären Counterrezeptoren gesteigert. Dieses Phänomen wurde ebenfalls bei einem Ischämie- und Reperusionsmodell gezeigt (287).

Die Evidenz für die Rolle von JAM-C bei der Atherosklerose wurde gesteigert als Shagdarsuren et al. zeigte, dass die Blockierung von JAM-C eine Neointimahyperplasie nach Carotidenverletzung vermindert (296). Die Daten von Langer et al. deuteten ebenfalls in diese Richtung. In dieser Studie führte eine MAC-1/JAM-C vermittelte Interaktion zwischen Thrombozyten und dendritischen Zellen zur Aktivierung der dendritischen Zellen, Rekrutierung im verletzten Gefäß und Thrombozytenphagozytose (297). Sircar et al. konnte *in vitro* allerdings weder eine erhöhte JAM-C Expression noch eine JAM-C vermittelte Adhäsion und Transmigration von Neutrophilen nach einem inflammatorischen Stimulus bestätigen. Nur bei Blockade von PECAM-1, ICAM-1 und CD99, neben der JAM-C Blockade, wurde die Neutrophilenmigration beeinflusst (290).

1.10.4.7 Die Rolle von JAM-C bei der Regulierung der CXCR4/CXCL12 Achse in Entzündung und Hämatopoese

Neutrophile Granulozyten zirkulieren im Blut und wandern im Falle einer Entzündung zum Ort des Geschehens, also verlassen die Blutbahn in Richtung des entzündeten Gewebes. Neutrophile Granulozyten werden durch einen weitgehend unverstandenen homöostatischen Feedback-Mechanismus reguliert. Diese Regulation richtet sich nach dem Bedarf in der Peripherie. Es wird sozusagen nur die Anzahl an Neutrophilen produziert bzw. freigesetzt, die wirklich benötigt wird (298). Imhof et al entdeckte, dass JAM-C-defiziente Mäuse, aufgrund einer homöostatischen Dysregulation der neutrophilen Granulozyten und ihrer CXCR4-Expression, ein schlechtes Überleben zeigten. Da JAM-C auf Mausgranulozyten nicht exprimiert wird, wird vermutet, dass JAM-C die CXCR4-Expression in einer parakrinen Weise, durch die Regulierung der CXCL12 Produktion in Stromazellen der peripheren Gewebe, kontrollieren kann (299). Frontara et al zeigte, dass eine Inhibierung der JAM-C Expression in Stromazellen von Lymphknoten zu einer vermehrten Sekretion von CXCL12 führt (300).

In einer anderen Studie wurde bei JAM-C-defizienten Mäusen eine vermehrte Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen (HSC) in myeloiden Progenitorzellen beobachtet (301). Da dieser Differenzierungsprozess durch Zytokine und Wachstumsfaktoren kontrolliert ist, wird vermutet, dass JAM-C, welches auf der Oberfläche von HSCs exprimiert ist, das Gleichgewicht zwischen ihrer Selbsterneuerung und Differenzierung beeinflusst.

Dies ist in Übereinstimmung mit der Entdeckung, dass JAM-B, welches ein Counter-Rezeptor von JAM-C ist, auf Knochenmarkendothelzellen, auf einem Teil von mesenchymalen Stammzellen (MSC) mit dem Phänotyp CD45⁻ CD31⁻ Sca-1⁺ Integrin α_v^+ und auf einem Teil von fibroblasten-ähnlichen Stromazellen mit dem Phänotyp CD45⁻ CD31⁻ Sca-1⁻ Integrin α_v^+ , exprimiert wird. Diese Stromazellen sind die Quelle von CXCL12, dass eine wesentliche Rolle bei der Homöostase und der Retention von HSCs innerhalb der Knochenmarkmikroumgebung besitzt (302, 303). Dies wird zusätzlich durch die Tatsache bestätigt, dass die Hemmung der CXCR4/CXCL12 Achse die Mobilisierung der hämatopoetischen Stammzellen induziert (127).

2. ZIELSETZUNG

Nach einem ischämischen Ereignis oder einer vaskulären Läsion ist die schnelle Geweberegeneration entscheidend, um dauerhafte Schäden zu vermeiden. Im peripheren Blut zirkulieren hämatopoetische Progenitorzellen, die, durch ihre Ansiedlung in verletzten Gefäßabschnitten und Geweben, Vaskulogenese, Angiogenese und Neovaskularisation induzieren und anschließend unterstützen (304, 305). Die genauen Prozesse, wie Progenitorzellen sich an Orten der akuten und chronischen Gefäß- und Gewebeschädigung ansiedeln, sind bisher nur teilweise bekannt (304, 306). Die Ansiedlung von Progenitorzellen im Gewebe erfolgt in zahlreichen Schritten zu denen Chemotaxis und Adhäsion der Zellen am Endothel oder aber an der subendothelialen Matrix gehören. Anschließend erfolgt das Durchwandern der Basalmembran und die Invasion in das Zielgewebe (307).

JAM-C ist ein Zelladhäsionsmolekül, welches auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert ist. JAM-C hat eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten an die Gefäßwand, der Gefäßpermeabilität und der vaskulären Inflammation (262, 283, 308). JAM-C ist auf der Oberfläche von Thrombozyten konstitutiv exprimiert (283, 297). JAM-C ist auf der Mehrheit menschlicher Thrombozyten, jedoch nicht auf murinen Thrombozyten exprimiert (297). Die Expression von JAM-C auf Thrombozyten vermittelt ihre Interaktion sowohl mit Leukozyten (283) als auch mit dendritischen Zellen (309) und moduliert außerdem deren Funktion. Thrombozytäres JAM-C ist ein Counterrezeptor für das β 2-Integrin MAC-1 (283), das auf der Oberfläche von humanen $CD34^+$ Zellen exprimiert wird (310). Allerdings wurde bisher noch nicht beschrieben, ob eine potentielle Rolle der JAM-C/MAC-1-Achse bei der Interaktion von Thrombozyten mit Progenitorzellen existiert.

Das Ziel der vorliegenden Studie war: 1. Die Untersuchung der Rolle von JAM-C bei der Adhäsion von humanen $CD34^+$ Zellen über immobilisierten Thrombozyten unter statischen und dynamischen Bedingungen, 2. die Untersuchung der Rolle von JAM-C *in vitro* bei der Differenzierung von $CD34^+$ Zellen in späte auswachsende proangiogenetische Zellen oder Makrophagen/Schaumzellen sowie 3. die Evaluation der JAM-C Expression auf der Oberfläche von Thrombozyten bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit.

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1 Patienten

Für diese Studie wurden insgesamt 73 Patienten ausgewählt, die eine symptomatische Herzerkrankung aufwiesen. Unter den Probanden wurde, wie zuvor beschrieben, bei 41 Patienten eine stabile Angina Pectoris (SAP) und bei 32 Patienten ein akutes Koronarsyndrom (ACS) (311) diagnostiziert. Die Klinik der stabilen Angina pectoris ist nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie durch anfallsartigen thorakalen, meist retrosternalen Schmerz, Enge oder Druckgefühl charakterisiert. Die pectanginösen Beschwerden treten anfallsartig auf, sind von gleicher Intensität und dauern in der Regel wenige Minuten. Diese Episoden können üblicherweise durch körperliche Belastung, Emotionen oder andere Belastungen getriggert werden und bessern sich durch Ruhe oder Nitroglyzeringabe.

Die Studiengruppe hat sich einer perkutanen Koronarangiographie (PCI) unterzogen, die je nach Krankheitsbild und -verlauf notfallmäßig oder elektiv innerhalb von 6 Stunden nach Einlieferung in die Notaufnahme des Universitätsklinikums Tübingen erfolgte. Die Rekrutierung der Patienten erfolgte wie zuvor beschrieben (311). Ein Alter unter 18 Jahre sowie eine Ablehnung der Teilnahme an der Studie galten als Ausschlusskriterien. Die Blutproben des Patienten wurden gesammelt und innerhalb der ersten Stunde nach Kapitel 3.2 und 3.3 bearbeitet und ausgewertet. Patientenbezogene Daten wie aktuelle Medikation, Vorerkrankungen und kardiovaskuläre Risikofaktoren wurden ebenfalls gesammelt und analysiert. Eine tabellarische Aufstellung der Patientencharakteristika befindet sich in der Tabelle 6. Alle verwendeten Versuchsmaterialien und Geräte werden inklusive ihrer Produktbezeichnung und inklusive Hersteller in der Tabelle 5 zusammengefasst. Unsere Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Tübingen überprüft und genehmigt. Eine schriftliche Einverständniserklärung von allen Studienteilnehmern liegt vor.

3.2 Blutentnahme

Arteriell Blut, aus der Femoralarterie, wurde zu Beginn des koronaren Eingriffs und nach Verabreichung von 2500I.E. unfraktioniertem Heparin abgenommen. Das arterielle Blut wurde in 5ml CPDA-S-Monovetten inkubiert und mittels Durchflusszytometrie nach Standardmethoden analysiert (109, 124, 312-315).

3.3 Durchflusszytometrie

3.3.1 Theoretische Grundlange

Die Durchflusszytometrie wurde 1968 von Wolfgang et al. [Patent DE1815352: Flow through chamber for photometers to measure and count particles in a dispersion medium; angemeldet am 18. Dezember 1968, Erfinder: Wolfgang Dittrich, Wolfgang Göhde] an der Universität Münster patentiert und von Herzenberg et al. (316) in die Routine eingeführt und weiterentwickelt. „Die Durchflusszytometrie (FACS=Fluorescence Activated Cell Sorting) erlaubt das Zählen und die Analyse verschiedener physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom“ (316). In der Regel handelt es sich bei diesen Partikeln um Zellen. Diese werden als Einzelzellen in einer Suspension, hydrodynamisch fokussiert, angelehnt an das Bernoulli Gesetz und zur Analyse wie Perlen an einer Perlenkette entlang eines gebündelten Laserstrahl vorbei gelenkt (Abb.11) (317).

Daraus entsteht einerseits Streulicht und andererseits Fluoreszenzlicht, wenn die Zelle mit einem entsprechenden Fluorochrom (Fluoreszenzfarbstoff) markiert ist. Das emittierte Fluoreszenzlicht verhält sich proportional zur Menge der gebundenen Fluorochrommoleküle je Zelle (Abb.12).

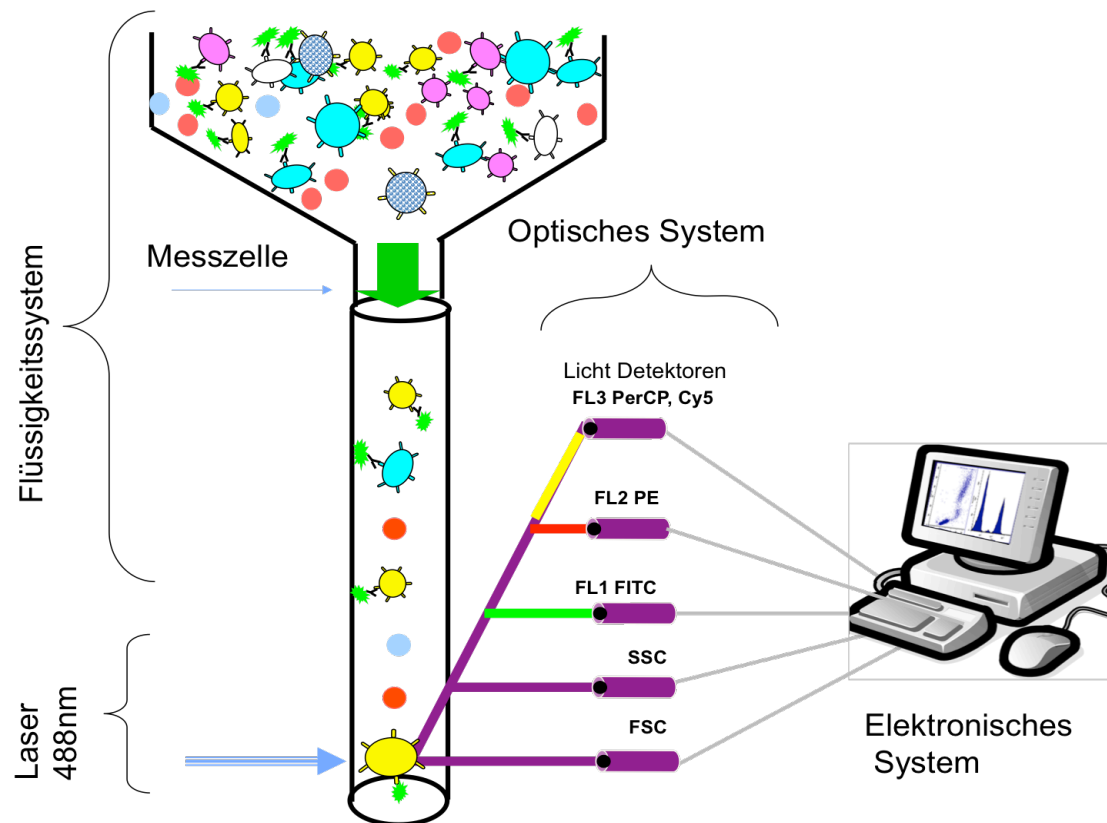


Abbildung 11 Aufbau eines Durchflusszytometers. Das Flüssigkeitssystem ist für den Transport und die hydrodynamische Fokussierung der Zellen in der Messzelle verantwortlich. In der Messzelle trifft der Laserstrahl immer genau auf eine einzelne Zelle. Daraus ergibt sich Streu-/Fluoreszenzlicht, welches über das optische System mittels verschiedener Spiegel und Filter in einzelne Wellenlängenpakete unterteilt und zu den verschiedenen Detektoren geleitet wird. Dort erfolgt eine Umwandlung des Lichtes in elektronische Signale, die durch einen Computer ausgewertet werden. *Adaptiert von <http://flow.csc.mrc.ac.uk>.*

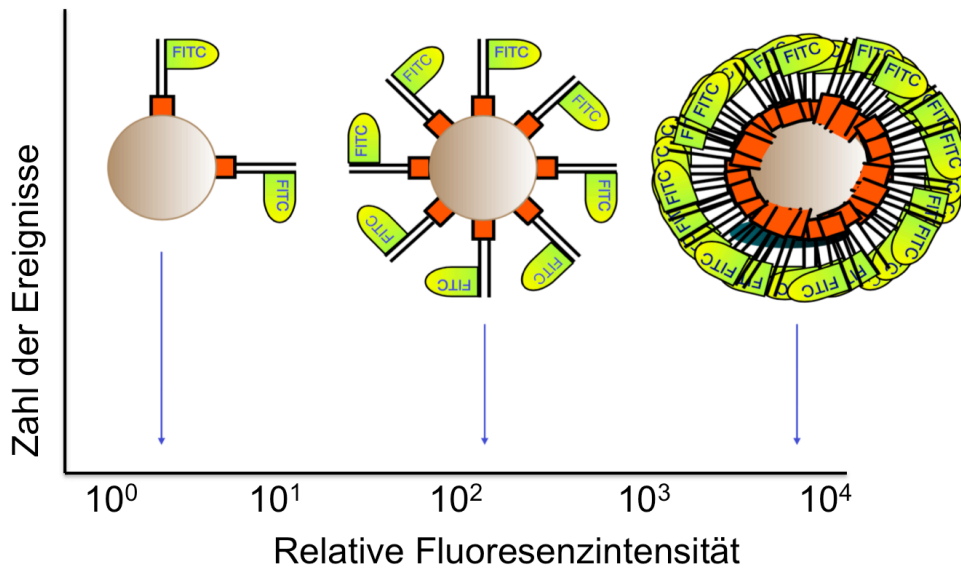


Abbildung 12 Die emittierte Photonenkonzentration ist proportional zur Zahl an gebundenen Antikörpern pro Zelle. *Adaptiert von www.bdbiosciences.com.*

Jedes Durchflusszytometer verfügt über zwei Streulichtdetektoren („Scatter“). Der Forward Scatter (FSC) liegt in derselben Ebene wie der Laserstrahl, detektiert dort die Beugung des Lichts an der Zelloberfläche und erfasst dadurch annäherungsweise die Größe der Zellen. Der Side Scatter (SSC) detektiert das durch Beugung an Membranen und Vesikeln im Zellinneren entstandene Streulicht, das im 90° Winkel von der Zelle abstrahlt. Er kann somit Auskunft über die Granularität der Zellen geben. Die Zellen werden nach ihrem Vorwärtsstreulicht und nach ihrem Seitwärtsstreulicht in einem Diagramm, dem sogenannten Dot-Plot, dargestellt.

In dieser Arbeit wurde das Vollblut der Patienten untersucht und es konnten folgende Zellpopulationen unterschieden werden: Monozyten, Granulozyten, Lymphozyten und „Zellschrott“ (Abb. 13).

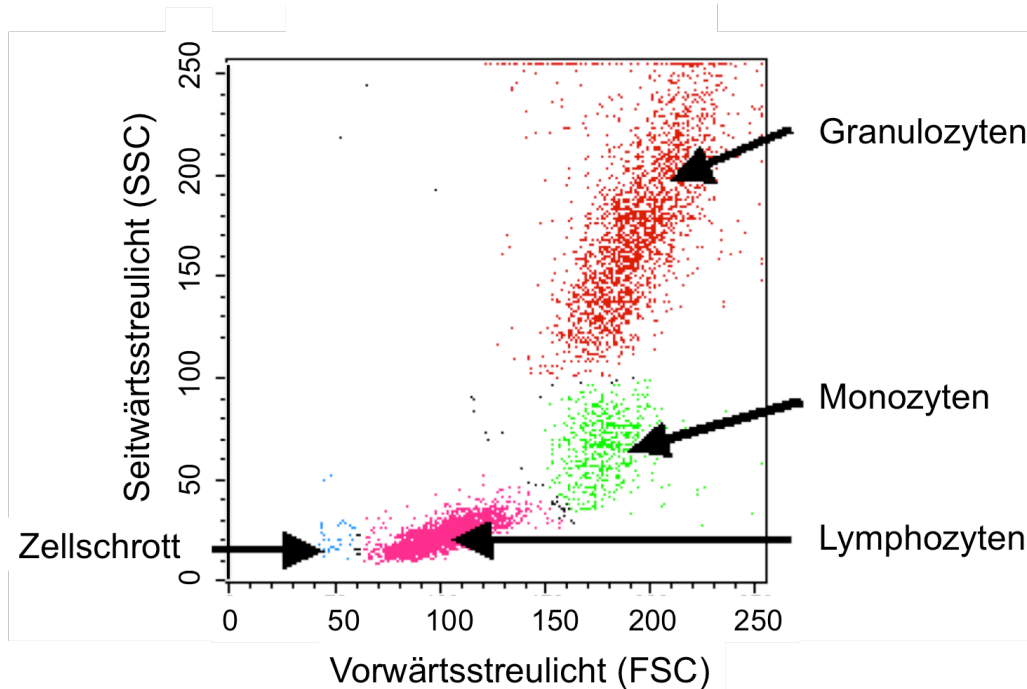


Abbildung 13 Streulicht 2D-Dot-Plot. Morphologische Charakterisierung des Vollblutes anhand des Streulichts. Jeder Punkt entspricht einer gemessenen Zelle bzw. einem gemessenen Ereignis.

Neben einer morphologischen Charakterisierung durch die Auswertung des Streulichts kann ein modernes Durchflusszytometer Fluoreszenzlicht messen und somit die Untersuchung einer Vielzahl von Zelleigenschaften ermöglichen (318). Hierzu dienen die Fluoreszenzdetektoren. Analog zum FSC und SSC absorbieren die Fluoreszenzdetektoren Lichtenergie in einem für sie definierten Wellenlängenbereich (Absorptionsspektrum) und emittieren dann Licht in einem energieärmeren und längerwelligen Bereich (Emissionsspektrum). Eine gleichzeitige durchflusszytometrische Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, eine sogenannte Mehrfarbenfluoreszenzanalyse, ist heutzutage möglich und unerlässlich bei der Darstellung von Subpopulationen sowie bei der Untersuchung der Zelldifferenzierung, der Zellproliferation und der Proteinexpression. Die Tabelle 4 zeigt beispielhaft eine Auswahl der (Haupt-) Fluoreszenzfarbstoffe.

Tabelle 4: Die (Haupt-) Fluoreszenzfarbstoffe in der Durchflusszytometrie.

Fluorochrom	Abkürzung	Absorptions- max. [nm]	Emmissions- max. [nm]
APC-Cy7	PharRed	743	767
Fluoreszeinisothiozyanat	FITC	459	519
PE-Cy5	CyChrome, Red670	480; 565; 649	670
PerCP	Peridin Chlorophyll	490	675
Phycoerythrin	PE	480;565	578
Propidiumjodid	PI	550	650

3.3.2 Praktische Durchführung und Auswertung

Für unsere durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde ein FACSCalibur (1995) mit einem Powermac G4 und G5 (jeweils Apple, Cupertino, USA) und die dazugehörige Messsoftware Cellquest pro Version 5.2.1 (Becton-Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, USA) verwendet. Die ausgewerteten Daten wurden auf einem PC Pentium 4 (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) mit Windows XP weiterverarbeitet. Vor Beginn jeder FACS-Analyse wurde eine Kalibrierung mit einer Isotypenkontrolle, entsprechend den Angaben des Herstellers, durchgeführt. Zur Minimierung einer möglichen Überlappung der Signale der PE und FITC Antikörper erfolgte anschließend eine Kompensation. Damit für alle Proben möglichst gleiche Voraussetzungen gelten, wurden die Einstellungen gespeichert und vor jeder Messung neu geladen. Vor jeder Messung wurden die FACS Röhren kurz gevortext, damit die Zelllösung ihre Homogenität erhält. Bei jeder Probe wurde die gleiche Anzahl von Ereignissen aufgezeichnet, die sich innerhalb des voreingestellten Fensters fanden. Die Daten jeder einzelnen Probe wurden bis zur Auswertung gespeichert. Die

mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) stellte sich in einem logarithmischen Histogramm dar.

3.3.3 Vollblut Durchflusszytometrie

10µl CPDA-Blut wurden mit 490µl PBS (phosphatgepufferter Salzlösung) in einem Eppendorf-Cup resuspendiert. Für die anschließende Immunfluoreszenzfärbung wurde ein FACS-Röhrchen mit der Patientenummer und den verwendeten Antikörpern beschriftet. Jeweils 35µl von dem verdünnten Blut und 5µl PBS wurden mittels einer Eppendorf-Pipettierhilfe in das beschriftete FACS-Röhrchen pipettiert. Nun wurden 5µl von den entsprechenden konjugierten Antikörpern (P-Selektin=CD62P-FITC, anti-human JAM-C-PE) in die jeweiligen FACS-Röhrchen pipettiert und anschließend für 30 Minuten in Raumtemperatur bei Dunkelheit inkubiert, sodass die Leuchtfähigkeit der verschiedenen Antikörper erhalten bleibt. CD42b-FITC/PE diente als Kontrollantikörper, um die Thrombozytenpopulation im Vollblut zu identifizieren. Als Isotypkontrollen wurden mouse-IgG1-FITC sowie Mouse-IgG1-PE verwendet. Nach der Inkubationszeit wurde 1ml PBS zugegeben. Die Lösung wurde dann gevortext und anschließend für 5 Minuten mit 1200rpm und Bremse zentrifugiert. Um die nicht gebundenen Antikörper möglichst aus der Zelllösung zu entfernen, wurde schließlich der Überstand abgegossen. Nach der Färbung wurden die markierten Zellen abgedeckt im Kühlschrank bei 4°C mit 0,5% PFA (Paraformaldehyd) bis zur Durchführung der FACS-Analyse mit dem FACS-Calibur Fluss-Zytometer fixiert und gelagert.

3.3.4 Durchflusszytometrie von Thrombozyten

Um die Expression von JAM-C auf ruhenden und aktivierten, isolierten Thrombozyten zu bestimmen, wurde, wie bereits durch uns beschrieben (124, 319), eine Einfarben-Analyse mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Thrombozyten wurden entweder mit ADP (20µM) oder TRAP (25µM) aktiviert. Zusammengefasst: Es wurde ein konjugierter monoklonaler Antikörper dazu benutzt um die Oberflächenexpression von JAM-C (PE markierten anti-human JAM-C) auf der Oberfläche von Thrombozyten zu bestimmen. Der Status der Thrombozytenaktivierung wurde durch die Mitbestimmung der Oberflächenexpression von P-Selektin ermittelt (anti-CD62P-FITC).

3.3.5 Durchflusszytometrie von endothelialen Progenitorzellen

Zur Evaluation des endothelialen Phänotyps, der aus Colony Forming Unit Assays hervorgegangenen endothelialen Progenitorzellen, untersuchten wir die Expression von CD146 (anti-human MCAM/CD146-FITC), CD31 (anti-CD31-FITC), CD34 (anti-CD34-FITC; clone 8G12) und CD45 (anti-CD45-PE) auf isolierten CD34⁺ Zellen, humanen arteriellen Endothelzellen und aus Colony Forming Unit Assays hervorgegangenen endothelialen Progenitorzellen (induziert durch CD34⁺ Zellkultur auf immobilisiertem JAM-C), wie bereits vorher verschriftlicht (124, 319).

Um die Aktivierungsfähigkeit der neu ausdifferenzierten endothelialen Progenitorzellen zu bewerten, wurde, wie bereits beschrieben, die Expression von CD54 (anti-CD54-FITC) und CD106 (anti-CD106-PE) auf ruhenden und mit TNF- α (50ng/ml) und INF- γ (20ng/ml) aktivierten, spät auswachsenden Endothelzellen (124, 319), gemessen. Nach der Färbung von CD54 und CD106 wurden die Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Monoklonale Immunglobuline, murines IgG1-FITC und IgG1-PE (BD Biosciences, San Jose, USA) dienten als isotype Kontrollantikörper. Spezifische monoklonale Antikörperbindung wurde als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) exprimiert und als quantitative Messung der Oberflächenexpression von thrombozytärem JAM-C (PE markierten anti-human JAM-C) und P-Selektin (anti-CD62P-FITC) verwendet.

3.4 Isolierung von humanen Thrombozyten

Humane Thrombozyten wurden, wie bereits durch unsere Gruppe beschrieben, isoliert (124, 319). Venöses humanes Vollblut (ca. 20ml) wurde von gesunden Probanden entnommen und in 4ml Acid-Citrate-Dextrose (ACD)-Puffer-Behältern gesammelt. Nach Zentrifugation bei 430g für 20 Minuten bei Raumtemperatur ohne Bremse, wurde das plättchenreiche Plasma (PRP) abpipettiert, in Falcons überführt und mit Tyrodes-HEPES Puffer (HEPES 2,5 mM/L, NaCl 150 mM/L, KCl 1 mM/L, NaHCO₃ 2,5 mM/L, NaH₂PO₄ 0,36 mM/L, Glucose 5,5 mM/L, BSA (Bovines Serum Albumin) 1 mg/ml, pH 6,5) verdünnt. Anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 900g für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit Bremse. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Thrombozyten-Pellet am Boden wurde in 200-500µl Tyrodes-HEPES Puffer resuspendiert (pH=6,5;0,1%BSA/Glucose). Für die anschließende Zellzahlbestimmung stellten wir eine Verdünnung aus 20µl Zelllösung und 180µl PBS (Phosphat Buffered Saline) her. Die Analyse erfolgte dann in einem automatischen Hämatologie-Analysator (KX-21N, Sysmex Corporation, Kobe Japan). Im letzten Schritt wurde die Zellsuspension mit 500µl Tyrodes-Puffer (pH7,4 ergänzt mit 1mM/L CaCl₂ und 1mM/L MgCl₂) neutralisiert und auf die entsprechende Konzentration eingestellt.

3.5 Isolierung und Kultivierung von humanen CD34⁺ Zellen

Hämatopoetische Stammzellen können aus Nabelschnurblut, aus dem Knochenmark oder aus peripherem Blut isoliert werden. In dieser Arbeit wurden humane CD34⁺ Zellen entweder aus humanem Nabelschnurblut oder aus Knochenmarkblut isoliert und, wie bereits durch unsere Arbeitsgruppe publiziert, kultiviert (124, 319).

Hierfür wurde die Dichtegradient-Zentrifugation auf Biocoll Auftrennungslösung (Biochrom, Berlin, Deutschland) bei 600g für 15 Minuten bei Raumtemperatur angewendet. CD34⁺ Zellen wurden nach Angaben des Herstellers durch immunoaffine Selektion angereichert (CD34-Progenitor Cell Isolation Kit). Eine sehr hohe Reinheit der CD34⁺ Zellen wurde, durch mehrere Isolierungs- und Waschschriffe hintereinander geschaltet, erreicht. Die isolierten Zellen waren ≥95% positiv für CD34. Wir verifizierten die Reinheit mittels durchflusszytometrischer Bestimmungen.

Für Zellkulturen wurde IMDM Medium (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) mit Glutamax verwendet und zusätzlich mit 5% fetalem kardialem inaktiviertem Kälberserum, 100U/ml Penicillin-Streptomycin, 1% MEM Vitaminen und 1% nichtessentiellen Aminosäuren supplementiert (allesamt erworben von Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland).

3.6 Isolierung und Kultivierung humaner arterieller Endothelzellen

Humane arterielle endotheliale Zellen (HaECs) wurden uns freundlicherweise durch die Gruppe von Frau Prof. Dr. Siegel-Axel für unsere weiteren Experimente zur Verfügung gestellt. HaECs wurden, so wie bereits veröffentlicht, aus Proben humaner Iliakalarterien von Bypass Empfängern nach mechanischer Entfernung isoliert und weiter kultiviert (124, 319). HaECs wurden durch immunzytochemische Färbung gegen den von-Willebrand Faktor (Boehringer, Mannheim, Deutschland) und durch ihr charakteristisches „Pflasterstein“-Wachstumsmuster mittels Kontaktinhibition zwischen den Zellen identifiziert. Dazu wurden Routinefärbungen mit dem DNA Farbstoff DAPI (4', 6-Diamino-2-Phenylindol- Dihydrochlorid) verwendet, um eine Kontamination durch Mycoplasmen auszuschließen.

3.7 Adhäsionsassays unter statischen und dynamischen Bedingungen

Die Adhäsion von CD34⁺ Zellen an immobilisierten Thrombozyten und an immobilisiertem JAM-C-Fc wurde, wie bereits durch Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe beschrieben, unter statischen und dynamischen Bedingungen (Flusskammer) untersucht (124, 319-321). Für die statischen Adhäsionsassays wurden isolierte Thrombozyten (2×10^8 /ml) auf eine 96-Well Platte gegeben. Die 96-Well Platte war mit Kollagen Typ I (20µg/ml) vorbeschichtet. Anschließend ließen wir die Thrombozyten, während einer zweistündigen Inkubationszeit, auf der kollagenbeschichteten Platte adhären. Der Überschuß der Thrombozyten wurde dann vorsichtig mit Tyrodes-Hepes Puffer (pH 7,4 ergänzt mit 1mM/L CaCl₂ und 1mM/L MgCl₂) abgewaschen, sodass ein Monolayer immobilisierter Thrombozyten entstand. Dieser Thrombozytenmonolayer diente als Grundlage unserer Adhäsionsexperimente. JAM-C-Fc (10µg/ml) wurde auf die gleiche Weise, während einer zweistündigen Inkubationszeit, auf 96-Well Platten immobilisiert. Im Anschluss konnte durch die Blockierung der respektiven 96-Well Platten mit Bovinem Serum-Albumin (BSA2%) für 30 Minuten, einer

unspezifischen Adhäsion vorgebeugt werden. Danach folgte das Hinzufügen der in IMDM Medium resuspendierten isolierten CD34⁺ Zellen und ihre weitere Inkubation in den Wells für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach zwei vorsichtigen Waschschrinen mit PBS wurden die verbliebenen adhärenen CD34⁺ Zellen mittels direkter Phasenkontrastmikroskopie ausgezählt. Als Negativkontrolle wurden ähnliche Experimente mit CD34⁺ Zellen auf Kollagen (20µg/ml) durchgeführt. Wo indiziert, wurden die adhärenen Thrombozyten oder die CD34⁺ Zellen mit JAM-C-Fc, anti-JAM-C (each 10µg/ml), anti-MAC-1 (10µg/ml) für 30 Minuten vorinkubiert. Als Negativkontrollen wurden adhärenen Thrombozyten oder die CD34⁺ Zellen mit Control-Fc (10µg/ml), isotype control IgG1 (R&D Systems; Minneapolis, USA; clone11711; 20µg/ml) vorinkubiert.

Um die Adhäsion von CD34⁺ Zellen an immobilisierten Thrombozyten unter Flussbedingungen zu evaluieren, beschichteten wir in gleicher Weise, wie bereits oben beschrieben, Deckgläser mit Kollagen und ließen anschließend Thrombozyten darauf adhären. Diese Deckgläser wurden im Anschluss jedoch in einer Flusskammer (Oligene, Berlin, Deutschland) verwendet. Einer unspezifischen Bindung wurde, durch eine Blockierung der respektiven 96-Well Platten mit Bovinem Serum-Albumin (BSA2%) für 30 Minuten, vorgebeugt. Die adhärenen Thrombozyten wurden für 30 Minuten mit Control-Fc oder JAM-C-Fc (jeweils 20µg/ml) vorinkubiert, bevor der Flusskammer-Versuch begann. Die Perfusionsexperimente wurden unter Schergeschwindigkeiten von 2000 s⁻¹ durchgeführt (hohe Scherspannung).

Um die Adhäsion von CD34⁺ Zellen auf das entzündete Endothel zu untersuchen, immobilisierten wir HaECs und kultivierten die CD34⁺ Zellen bis zur Konfluenz auf dem Deckgläschen. Endothelzellen wurden mit 50ng/mL TNF-α und 20ng/mL INF-γ aktiviert. Danach folgte das Hinzufügen der in IMDM Medium resuspendierten isolierten CD34⁺ Zellen und eine weitere Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Control-Fc oder JAM-C-Fc (jeweils 20µg/ml). Es folgte der Flusskammerversuch. Alle Experimente wurden in Echtzeit auf Video-CD aufgenommen und anschließend ausgewertet.

3.8 Colony Forming Unit Assay

Um die Rolle von JAM-C auf die Differenzierung von CD34⁺ Zellen zu endothelialen Progenitorzellen zu untersuchen, wurden, wie bereits durch unsere Arbeitsgruppe beschrieben wurde, CD34⁺ Zellen entweder auf einen Thrombozytenmonolayer, auf eine Kollagenmatrix (10µg/ml) oder auf immobilisiertes JAM-C-Fc appliziert (124, 319). Immobilisierte Thrombozyten dienten als Positivkontrolle und Control-Fc als Negativkontrolle. Wo indiziert, wurden die adhärennten Thrombozyten mit Control-Fc oder JAM-C-Fc (jeweils 20µg/ml) vorinkubiert. Die Zellen wurden anschließend für mehrere Tage in Endothelial Cell Growth Medium MV2 kultiviert, welches 5% fetales kardiales inaktiviertes Kälberserum, 5ng/ml Epidermal Growth Factor, 0,2µg/ml Hydrocortison, 0,5µg/ml Vascular Endothelial Growth Factor, 10ng/ml Basic Fibroblast Factor, 20ng/ml R3 Insulin-like Growth Factor-1 und 1µg/ml Ascorbinsäure (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) enthielt. Die Anzahl der endothelialen Kolonien (Endotheliale Colony Forming Units) aus den Progenitorzellen wurde zwischen Tag 5 und Tag 10 gezählt. Um die Expression endothelialer Oberflächenantigene zu beweisen, wurden die Zellen abgelöst, in PBS resuspendiert, mit Polyglobin für 15 Minuten inkubiert, erneut gewaschen und dann mit den respektiven gelabelten Antikörpern für 30 Minuten bei Raumtemperatur, wie bereits unter „Durchflusszytometrie“ in „Material und Methoden“ beschrieben, inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschschrift. Die Zellen wurden dann mittels eines FACS-Calibur Durchflusszytometer analysiert (BD Biosciences, San Jose, USA).

3.9 Immunfluoreszenzmikroskopie

Um die Differenzierung von CD34⁺ Zellen zu endothelialen Progenitorzellen zu untersuchen, benutzten wir einen anti-humanen monoklonalen Antikörper vom Kaninchen gegen den von-Willebrand-Faktor (Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland) und einem sekundären anti-Kaninchen Antikörper vom Schaf (Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland). Die CD34⁺ Zellen wurden entweder mit Medium oder Thrombozyten für 10 Tage auf Objektträgern co-inkubiert und anschließend unter dem Immunfluoreszenzmikroskop analysiert. Jedem Inkubationsschritt folgte ein vorsichtiger Waschschrift mit PBS.

3.10 Co-culture assays und Differenzierung in Makrophagen/Schaumzellen

CD34⁺ Progenitorzellen (50,000 Zellen) wurden, wie zuvor beschrieben, mit Thrombozyten (2x10⁸/ml) in einer 96-well Platte vorbeschichtet und mit 0,2% Gelatin bei 37°C und 5% CO₂ für 10 Tage kokultiviert (124, 126, 319). Die Entwicklung von Schaumzellen wurde, wie bereits veröffentlicht, in sechs Fenstern durch Phasenkontrastmikroskopie gezählt (124, 319).

3.11 Datenpräsentation und statistische Berechnungen

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert mit \pm Standardabweichung (SD, "Standard Deviation") angegeben. Alle statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe eines Statistikprogramms (SPSS® Version 20 für MAC) durchgeführt. Stetige Variablen wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung untersucht. Für paarweise Vergleiche zwischen Mittelwerten von kontinuierlichen Variablen mit Normalverteilung wurde ein zweiseitiger unpaariger T-Test verwendet. Der Mann-Whitney-U-Test diente zur Beurteilung signifikanter Unterschiede, wenn keine Normalverteilung vorlag. Mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests wurden kategoriale Variablen verglichen. Korrelationen wurden an Hand des Pearson Korrelationskoeffizienten bewertet. Für multiple Vergleiche zwischen drei oder mehreren Gruppen, wurde eine univariante Varianzanalyse (Analysis of variance, ANOVA) mit anschließendem Scheffé-Test angewandt. Alle statistischen Analysen wurden auf ihre Signifikanz hin überprüft. Dabei gilt ein P-Wert von $P < 0,05$ als signifikant.

Tabelle 5: Produktbezeichnung der Versuchsmaterialien und Geräte.

Versuchsmaterialien/ Geräte	Hersteller
ADP	Chrono-Par, Havertown, USA
Biocoll Auftrennungslösung	Biochrom, Berlin, Deutschland
CD34-Progenitor Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CPDA-S-Monovetten (Citrat-Phosphat- Dextrose-Adenin)	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland)
DAPI	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Endothelial Cell Growth	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Endothelial Cell Growth Medium	Vasculife, Lifeline Cell Technology, Walkersville, USA
Eppendorf-Pipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS Calibur (Fluss-Zytometer)	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
5 % fetalem kardialem inaktiviertem Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Flusskammer	Oligene, Berlin, Deutschland
Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Gemrmany
IMDM Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
INF- γ	Peptotech Inc., New Jersey, USA
Kollagen Typ I	BD Biosciences, San Jose, USA
Kulturflaschen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
MEM Vitaminen	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Monoklonaler Antikörper mouse-anti-human CD31-FITC	Immunotec, Marseille, France
Monoklonaler Antikörper mouse-anti-human anti-CD34-FITC	BD Biosciences, San Jose, USA
Monoklonaler Antikörper mouse-	Immunotech, Beckman Coulter,

anti-human anti-CD42b-PE	Inc.Brea, USA
Monoklonaler Antikörper mouse- anti-human anti-CD45- PE:	Immunotec, Marseille, France
Monoklonaler Antikörper mouse- anti-human anti-CD54-FITC	Immunotec, Marseille, France
Monoklonaler Antikörper mouse- anti-human anti-CD62P-FITC; Klon CLB-Thromb/6	Immunotec, Marseille, Frankreich;
Monoklonaler Antikörper mouse- anti-human anti-CD106-PE	BD Biosciences, San Jose, USA
Monoklonaler Antikörper mouse- anti-human MCAM/CD146-FITC:	R&D Systems, Minneapolis, USA
Monoklonaler Antikörper mouse- anti-human IgG1-FITC; Klon MOPC-21	BD Biosciences, San Jose, USA
Monoklonaler Antikörper mouse- anti-human IgG1-FITC	R&D Systems; Minneapolis, USA
Monoklonaler Antikörper mouse- anti-human IgG1-PE; Klon X40	BD Biosciences, San Jose, USA
Monoklonaler Antikörper mouse- anti-human JAM-C-FITC	R&D Systems, Minneapolis, USA
Monoklonaler Antikörper mouse- anti-human JAM-C-PE	BD Biosciences, San Jose, USA
Monoklonaler Antikörper mouse- anti-human-MAC-1	BioLegend, San Diego, USA
Monoklonaler Antikörper rabbit-anti- human-vWF	Dakocytomation, Hamburg, Deutschland
Monoklonaler Antikörper sheep- anti-rabbit-vWF	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland

NaCl 150 mM/L, KCl 1 mM/L, NaHCO ₃ 2,5 mM/L, NaH ₂ PO ₄ 0,36 mM/L, Glucose 5,5 mM/L	Sigma, Steinheim, Deutschland
nichtessentiellen Aminosäuren	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PBS (phosphatgepufferter Salzlösung)	Invitrogen Corporation Paisley, Schottland, UK
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
0,5% PFA (Paraformaldehyd)	Merck, Darmstadt, Deutschland)
Polyglobin	Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland
Sysmex (KX-21N; Hämatologie Analysator)	Sysmex Corporation, Kobe Japan
TNF- α	Peptotech Inc., New Jersey, USA
TRAP	Sigma, Steinheim, Deutschland

4. ERGEBNISSE

4.1 Klinische Eigenschaften der Patientenkohorte

Die Zusammenfassung der Patientendaten findet sich in Tabelle 6 wieder. Für diese Studie wurden insgesamt 73 Patienten untersucht, die eine symptomatische Herzerkrankung aufwiesen.

Das mediane Alter der Patienten betrug 67,01 Jahre. 67,12% (n=49) der Patienten waren Männer und stellten somit die Mehrheit des Patientenkollektives dar (Tabelle 6). Anamnestisch konnten bei Aufnahme die kardiovaskulären Risikofaktoren (z.B arterielle Hypertonie, Adipositas, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Nikotinabusus, positive Familienanamnese), sowie die Hausmedikation erhoben werden. Weiterhin wurden laborchemisch sowohl bei Aufnahme als auch im Rahmen des weiteren stationären Aufenthaltes Troponin-I, CK, CK-MB, CRP, Kreatinin und der Lipidstatus (Cholesterin, Triglyzeride, LDL und HDL) bestimmt.

Alle Patienten unterzogen sich einer elektiven oder notfallmäßigen Koronarangiographie. Unter den Probanden wurde bei 56,16% der Patienten eine stabile Angina Pectoris (SAP) und bei 43,84% der Patienten ein akutes Koronarsyndrom (ACS) (311) diagnostiziert (Tabelle 6). Die SAP Patienten unserer Studie zeigten neben den typischen klinischen Symptomen einen pathologischen Belastungstest.

Zusätzlich wurden die Schwere der koronaren Herzerkrankung sowie die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) bestimmt. Bei 68,49% der Patienten zeigte sich eine normale linksventrikuläre Pumpfunktion (LVEF>55%). 30,14% der Probanden wiesen eine leicht- bis mittelschwer eingeschränkte linksventrikuläre Pumpfunktion (LVEF 35-55%) und 1,37% eine stark reduzierte LVEF (<35%) auf. (Tabelle 6).

Tabelle 6: Klinische Eigenschaften der Patientenkohorte.

Grunddaten	Gesamt
Anzahl der Patienten (n)	73
Alter (Durchschnitt \pm Standardabweichung)	67,01 \pm 11,72
Männer	49 (67,12%)
Frauen	24 (32,88%)
BMI \pm Standardabweichung	27,81 \pm 4,85
Akutes Koronarsyndrom (ACS)	32 (43,84%)
Stabile Angina Pectoris (SAP)	41 (56,16%)
Linksventrikuläre Pumpfunktion	
Normal (>55%)	50 (68,49%)
Leichtgradig reduziert (45-55%)	5 (6,84%)
Mittelgradig reduziert (35-45%)	17 (23,3%)
Stark reduziert (<35%)	1 (1,37%)
Kardiovaskuläre Risikofaktoren	
Arterielle Hypertonie	57 (78,08%)
Diabetes mellitus	21 (28,77%)
Hyperlipidämie	52 (71,23%)
Rauchen	26 (35,62%)
Positive Familienanamnese	15 (20,55%)
Myokardinfarkt in der Vorgeschichte	19 (26,03%)

4.2 Die Expression von JAM-C auf der Oberfläche von humanen Thrombozyten ist nach Thrombozytenaktivierung erhöht.

JAM-C ist auf der thrombozytären Oberfläche konstitutiv exprimiert (283, 297). Die Vorinkubation von Thrombozyten gesunder junger Probanden mit Thrombinrezeptor aktivierendem Peptid-6 (TRAP-6; 25µM), der spezifisch den PAR-1 Thrombinrezeptor aktiviert, ergab eine signifikante Steigerung der thrombozytären JAM-C-Expression ($P=0,05$ für TRAP-6 gegen PBS, Abb.14). Bei einer Vorinkubation mit Adenosindiphosphat (ADP; 20µM) blieb die JAM-C-Expression unbeeinflusst (Abb.14).

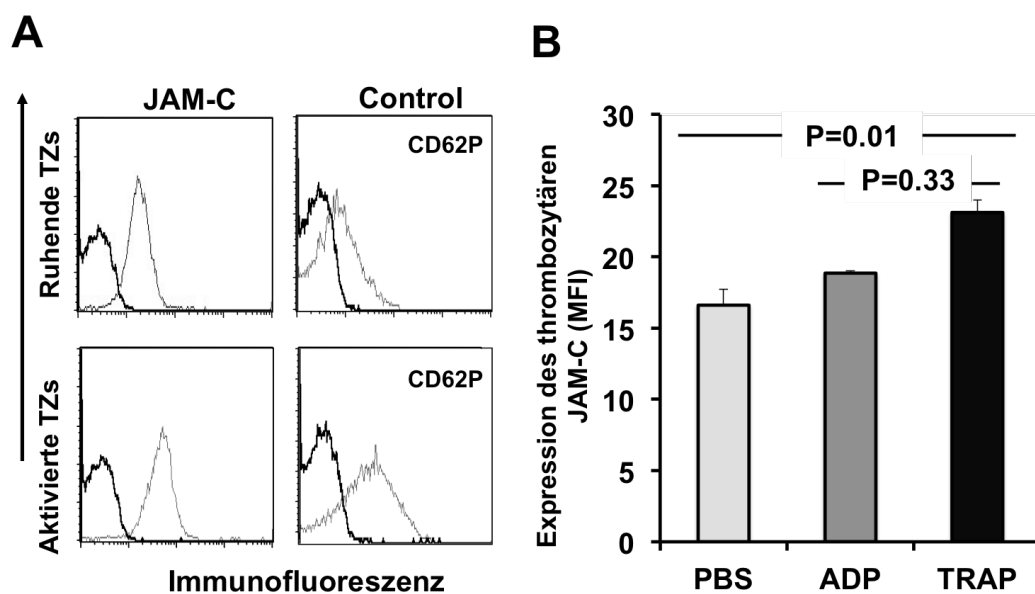


Abbildung 14 Humane Thrombozyten exprimieren JAM-C. (A) Repräsentative Durchflusszytometrie-Histogramme stellen die Expression von JAM-C Expression (linke Spalte) und P-Selektin (CD62P, rechte Spalte) in Ruhe und nach Thrombozytenaktivierung mit TRAP-6 bei gesunden jungen Probanden dar. (B) Der Mittelwert und SD werden gezeigt. ***Diese Daten sind bereits publiziert: Stellos K, Panagiota V et al., Cell Physiol Biochem. 2012 (322).***

4.3 Die Expression von JAM-C auf der Oberfläche von humanen Thrombozyten korreliert mit der P-Selektin-Expression bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung.

Thrombozytäres P-Selektin (CD62P) wurde ebenfalls mituntersucht, um die Thrombozytenaktivierung zu verifizieren. Thrombozytäres JAM-C korrelierte mit der thrombozytären P-Selektin-Expression bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (n=73, r=0,301, P=0,01; Abb.15). Diese Ergebnisse waren unabhängig von Alter, Geschlecht, kardiovaskulären Risikofaktoren und Hausmedikation.

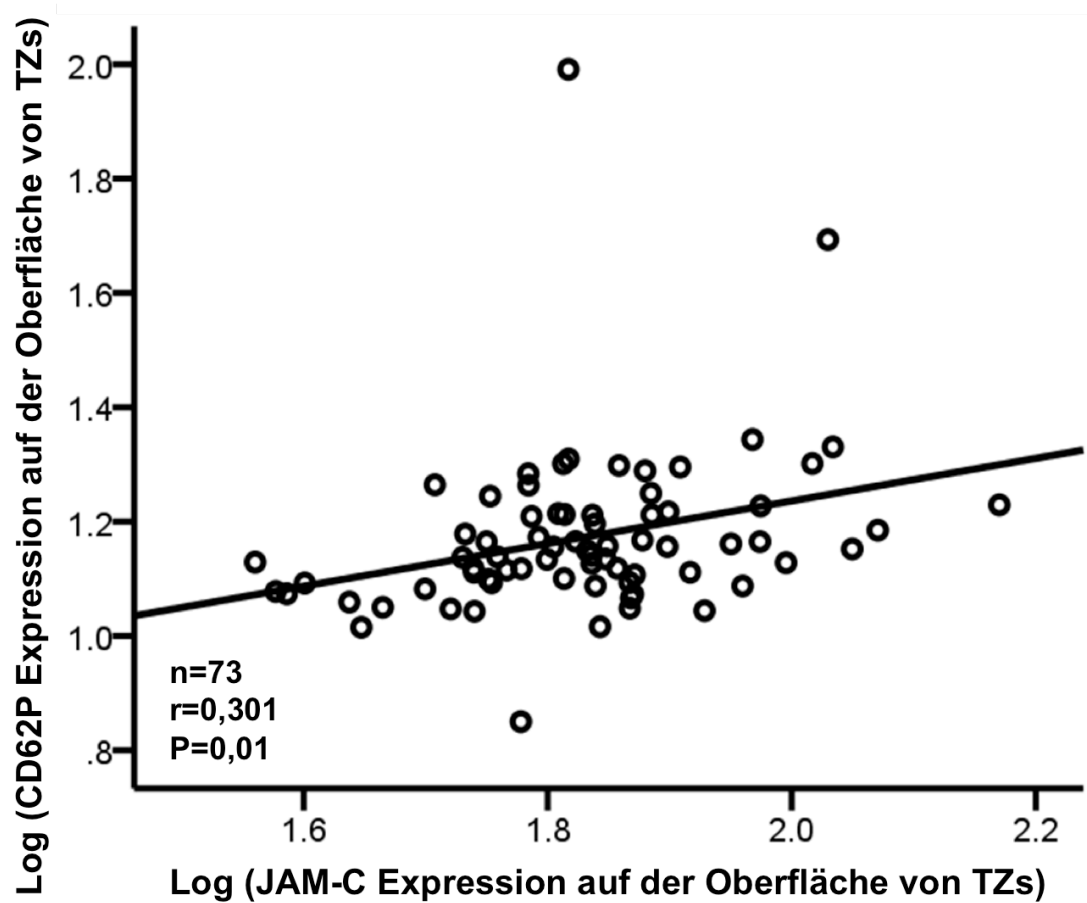


Abbildung 15 Thrombozytäres JAM-C korreliert mit der P-Selektin-Expression bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit. Nach logarithmischer Transformation der Daten wurde der Pearson Korrelationskoeffizient angewendet. Dieser zeigte eine signifikante Korrelation zwischen thrombozytärem-JAM-C und der P-Selektin-Expression bei 73 Patienten mit koronarer Herzkrankheit (41 Patienten mit stabiler Angina pectoris und 32 Patienten mit akutem Koronarsyndrom).

4.4 Die Adhäsion von humanen CD34⁺ Progenitorzellen über immobilisierten Thrombozyten wird unter statischen Bedingungen durch JAM-C/MAC-1-Interaktionen vermittelt.

Es wurde gezeigt, dass die Bindung von β 2-Integrin MAC-1 ($\alpha_M\beta_2$) zu JAM-C die Interaktionen zwischen Leukozyten mit Thrombozyten und Endothelzellen verstärkt (262, 283, 308). Da JAM-C bei der Zelladhäsion und Transmigration essenziell ist, untersuchten wir, ob thrombozytäres JAM-C *in vitro* eine Rolle bei der Rekrutierung von zirkulierenden CD34⁺ Progenitorzellen spielt.

Als erstes untersuchten wir die Adhäsion von CD34⁺ Progenitorzellen auf immobilisierten Thrombozyten unter statischen Bedingungen. Die Adhäsion von CD34⁺ Progenitorzellen auf immobilisierten Thrombozyten wurde in Gegenwart von löslichem JAM-C-Fc, jedoch nicht vom Control-Fc, signifikant reduziert (P=0,05; Abb.16). In ähnlicher Weise verringerten, im Gegensatz zum Isotypkontroll IgG1, neutralisierende monoklonale Antikörper (mAb) gegen JAM-C und β 2- Integrin MAC-1 (CD11/bCD18) die Adhäsion von CD34⁺ Zellen auf immobilisierten Thrombozyten (P=0,05; Abb.16).

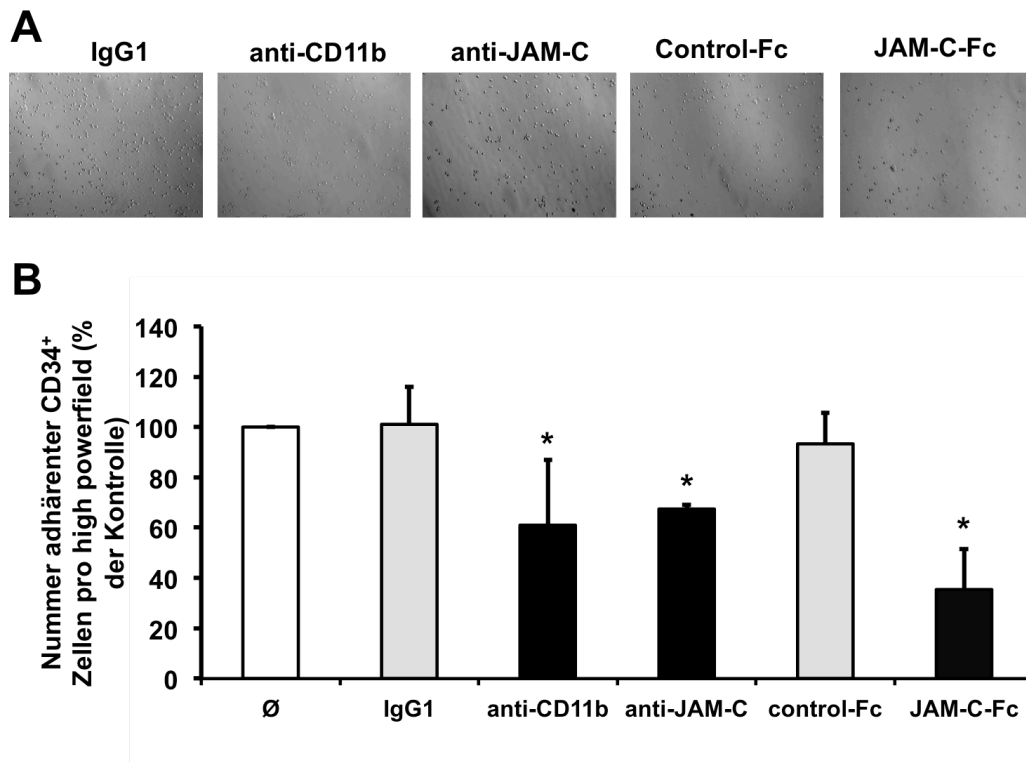


Abbildung 16 Die Thrombozyten-vermittelte Adhäsion von CD34⁺ Zellen wird durch JAM-C/MAC-1-Interaktionen unter statischen Bedingungen vermittelt. (A) Repräsentative Phasenkontrastbilder adhärenter CD34⁺ Zellen an immobilisierten Thrombozyten unter statischen Bedingungen. CD34⁺ Zellen adhären an immobilisierten Thrombozyten, wie im methodischen Teil bereits dargestellt. Wie angegeben, wurden Zellen mit sJAM-C-Fc, anti-MAC-1, anti-JAM-C oder den jeweiligen Isotypkontrollen vorinkubiert. Blockierungen des an Thrombozyten gebundenen JAM-C oder des an CD34⁺ Zellen gebundenen β 2-Integrin MAC-1 (CD11b) führten zu einer signifikanten Abnahme der an immobilisierten Thrombozyten adhärenter CD34⁺ Zellen. Scheffé-Post-hoc-Analyse: *P \leq 0,05 vs. Control IgG1 oder Control-Fc. (B) Darstellung von Mittelwert und SD von drei unabhängigen statischen Adhäsionsversuchen. ***Diese Daten sind bereits publiziert: Stellos K, Panagiota V et al., Cell Physiol Biochem. 2012 (322).***

Wir benutzten einen weiteren Static Adhesion Assay und beobachteten, dass CD34⁺ Zellen fest an immobilisiertem JAM-C adhärten (P=0,05; Abb. 17A). Die Adhäsion von CD34⁺ Zellen an immobilisiertem JAM-C wurde erheblich durch die Zugabe von löslichem JAM-C-Fc, jedoch nicht vom Control-Fc reduziert (P≤ 0,05; Abb.17).

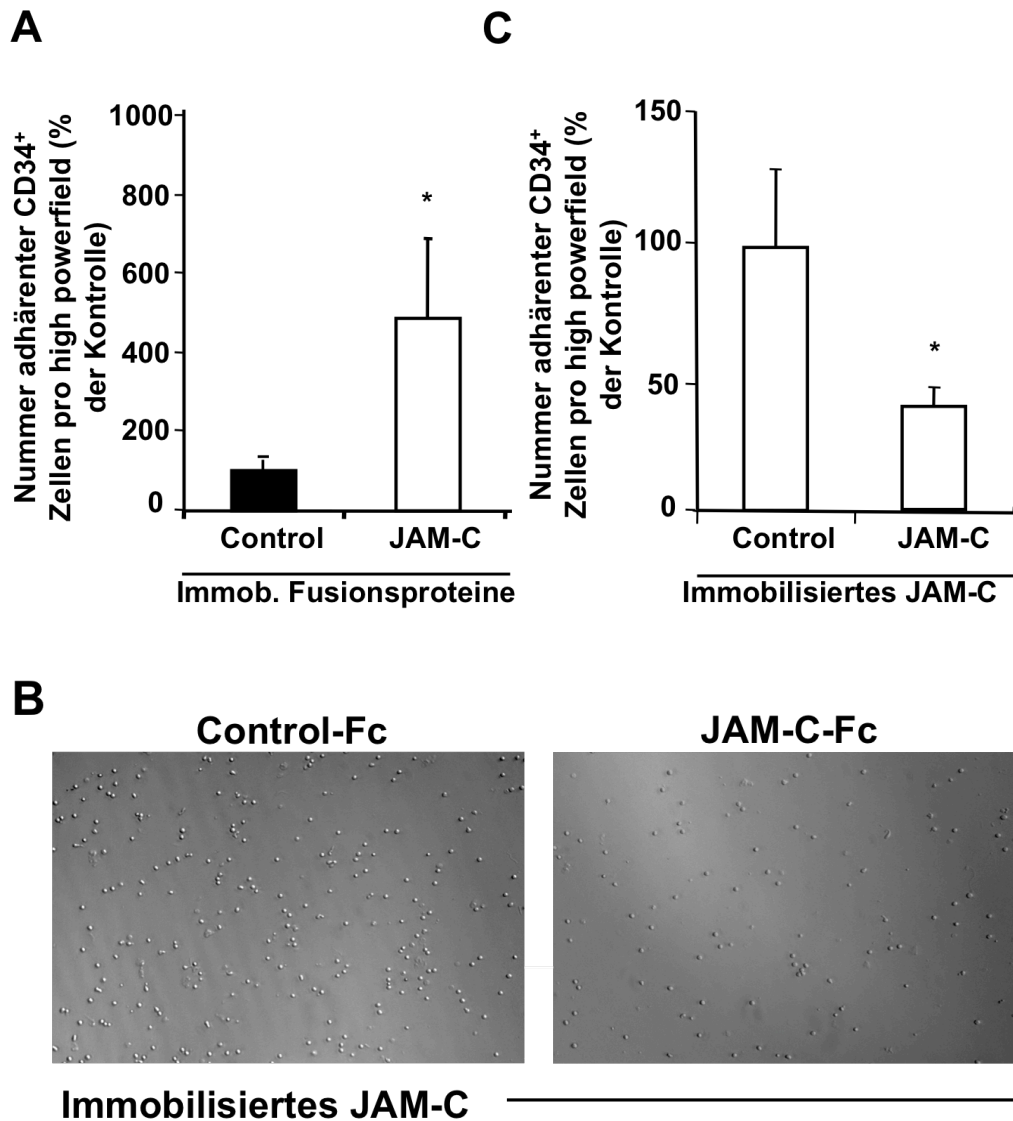


Abbildung 17 Lösliches JAM-C-Fc reduziert die Adhäsion von CD34⁺ Zellen an immobilisiertem JAM-C. Adhäsion von humanen CD34⁺ Zellen an immobilisiertem JAM-C-Fc vs. Control-Fc (A) und in Gegenwart von neutralisierendem löslichem JAM-C-Fc oder Control-Fc (B,C) wurde unter statischen Bedingungen bewertet. *P≤0,05 vs. Control. ***Diese Daten sind bereits publiziert: Stellos K, Panagiota V et al., Cell Physiol Biochem. 2012 (322).***

4.5 Die Adhäsion von humanen CD34⁺ Progenitorzellen über immobilisierten Thrombozyten wird, auch unter dynamischen Bedingungen, durch die JAM-C/MAC-1-Interaktionen vermittelt.

Um unsere Ergebnisse unter hohen Scherbedingungen, ähnlich der arteriellen Strömung, zu überprüfen, führten wir Perfusionsexperimente von CD34⁺ Zellen über adhärenenten Thrombozyten in einer Flusskammer durch, wobei eine Wandscherrate von 2.000^s erzeugt wurde (Abb.18A,B). Eine bemerkenswerte Anzahl von perfundierten CD34⁺ Zellen verwandelte sich schnell in rollende und später in fest-adhärenente Zellen. Eine Vorinkubation von immobilisierten Thrombozyten mit löslichem JAM-C-Fc, aber nicht mit Control-Fc, reduzierte die feste Adhäsion von CD34⁺ Zellen über Thrombozyten unter hoher Scherspannung (Control-Fc gegen JAM-C-Fc: Mittelwert±SD: 90±8,69 vs. 60,17±11,55; P=0,05; n=3; Abb.18A,B). In Bezug auf die rollenden CD34⁺ Zellen wurde keine Wirkung beobachtet (Control-Fc gegen JAM-C-Fc: Mittelwert±SD: 137,67±6,98 vs. 132±5,65; n=3; Abb.18C).

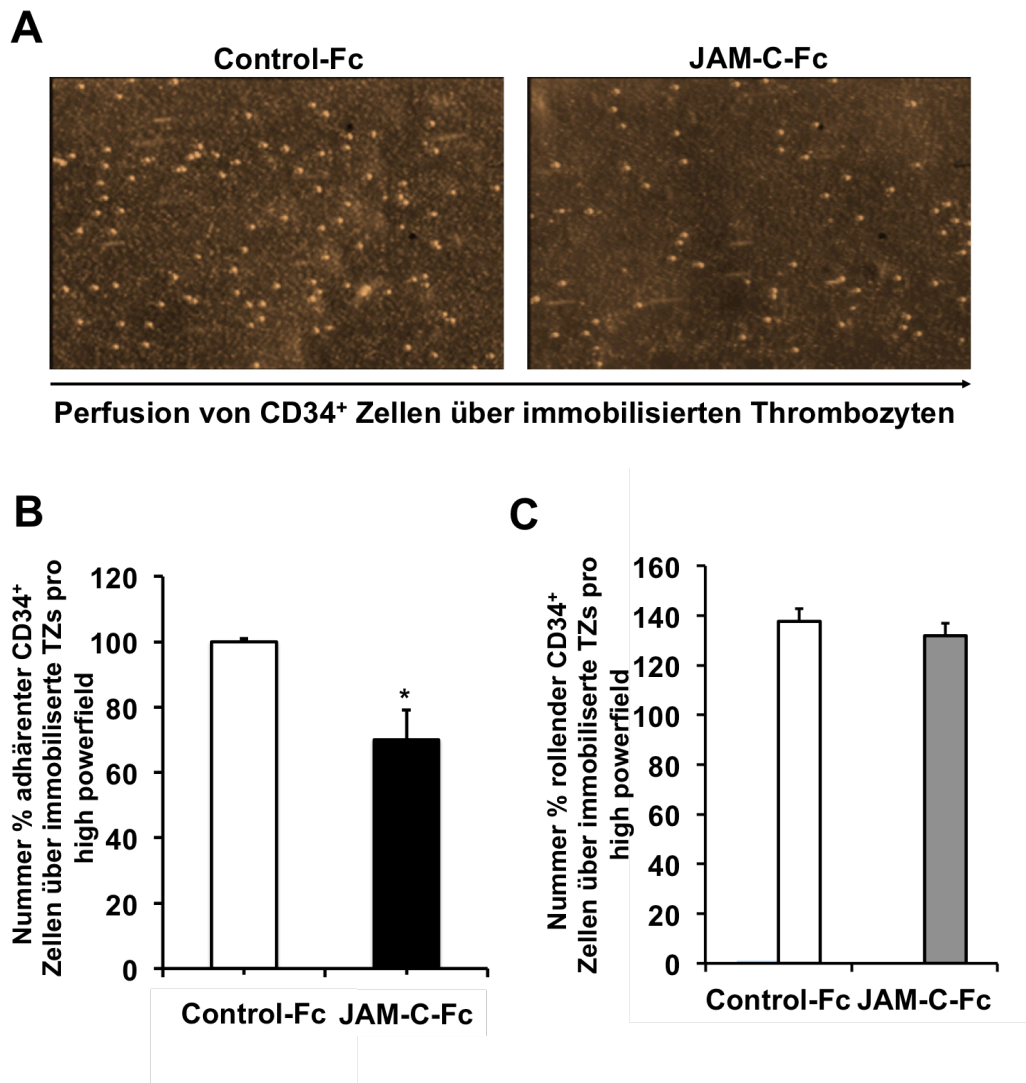


Abbildung 18 Thrombozytäres und nicht endotheliales JAM-C vermittelt die Adhäsion von CD34⁺ Zellen unter hoher Scherspannung. Deckgläser wurden mit Kollagen Typ I vorbeschichtet und zusätzlich mit frisch isolierten Thrombozyten vorinkubiert. Daraus entstanden adhärenente Thrombozytenzellschichten, wie im methodischen Teil dargestellt. Immobilisierte Thrombozyten wurden anschließend mit sJAM-C-Fc oder Control-Fc vorinkubiert. Resuspendierte CD34⁺ Zellen wurden über diese Deckgläser perfundiert. (A) Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen von adhärenenten CD34⁺ Zellen an immobilisierten Thrombozyten unter hoher Scherspannung. (B) Mittelwert und SD von drei unabhängigen Flusskammerexperimenten. Students' t-Test: *P=0,05 vs. Control-Fc. (C) Mittelwert und SD von drei unabhängigen Flusskammerexperimenten. **Diese Daten sind bereits publiziert: Stellos K, Panagiota V et al., Cell Physiol Biochem. 2012 (322).**

Um eine potentielle Rolle von endothelialem JAM-C bei der Adhäsion von CD34⁺ Zellen gegenüber mit TNF- α (50ng/ml) und INF- γ (20ng/ml) aktivierten Endothelzellen zu bewerten, wurden weitere Perfusionsexperimente durchgeführt. Diese zeigten, dass endotheliales JAM-C keinen Einfluss auf die Adhäsion von humanen CD34⁺ Zellen auf aktivierten Endothelzellen hat (P n.s. (nicht signifikant); Abb.19A,B).

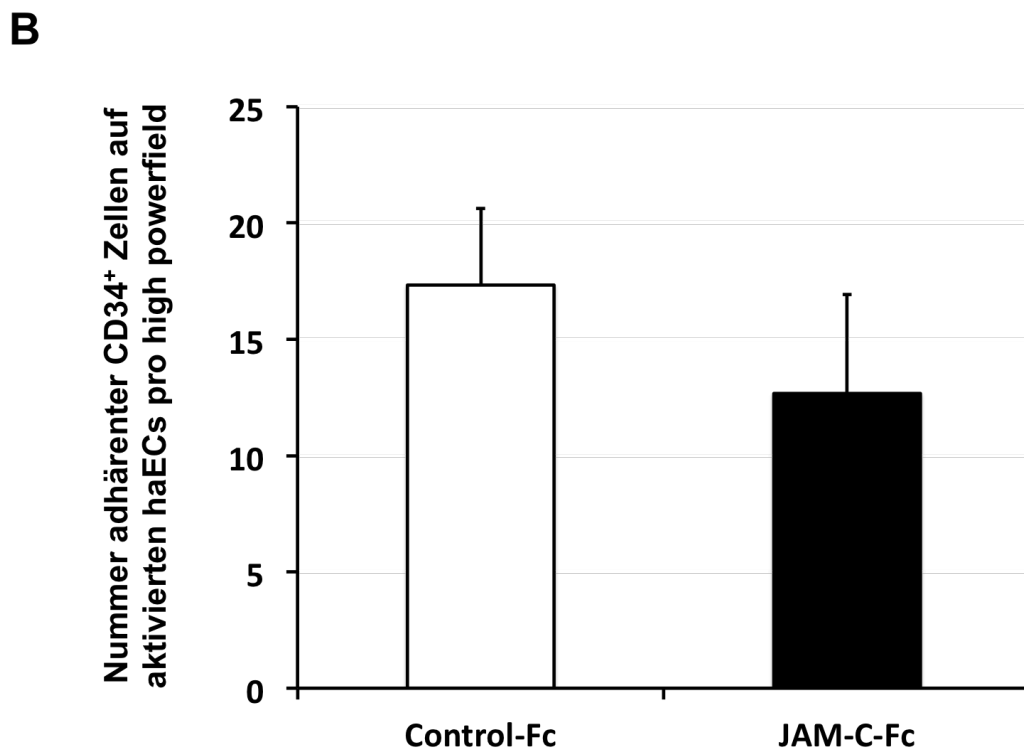
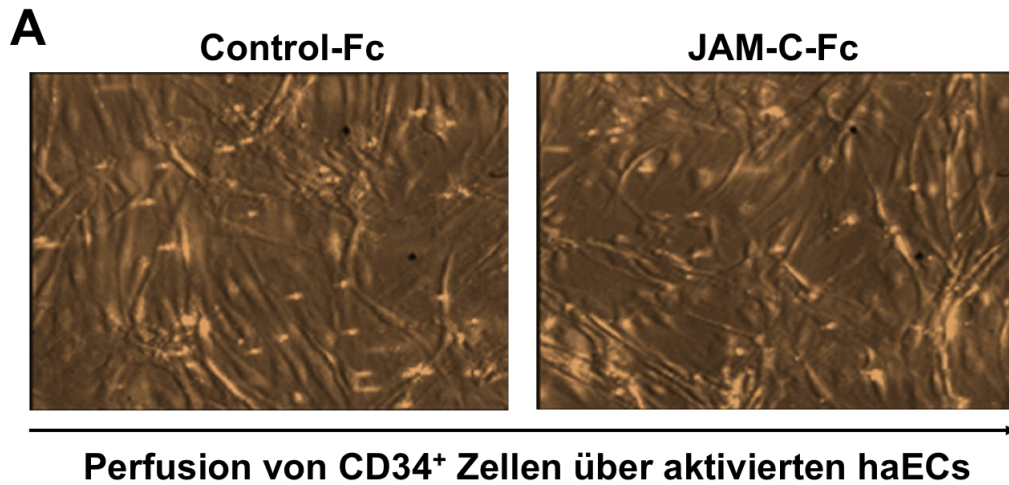


Abbildung 19 Endotheliales JAM-C hat keinen Einfluss auf die Adhäsion von menschlichen CD34⁺ Zellen auf aktivierten Endothelzellen. Deckgläser wurden mit menschlichen arteriellen Endothelzellen (HUVECs) vorbeschichtet und zusätzlich mit TNF- α (50ng/ml) und INF- γ (20ng/ml) für 6 Stunden, vor Beginn der Perfusionsexperimente mit humanen CD34⁺ Zellen, vorinkubiert. (A) Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen von adhärennten CD34⁺ Zellen auf aktivierten HaECs unter hoher Scherspannung. (B) Mittelwert und SD von drei unabhängigen Flusskammerexperimenten. Students'-t-Test: P-Wert nicht-signifikant vs. Control-Fc. ***Diese Daten sind bereits publiziert: Stellos K, Panagiota V et al., Cell Physiol Biochem. 2012 (322).***

4.6 JAM-C hat *in vitro* keinen Einfluss auf die thrombozytenvermittelte CD34⁺ Zelldifferenzierung zu Endothelzellen oder Makrophagen/Schaumzellen.

Um die Rolle von JAM-C bei der thrombozytenvermittelten Differenzierung von Progenitorzellen zu Endothelzellen zu untersuchen, wurden, wie im methodischen Teil zuvor beschrieben, CD34⁺ Zellen auf immobilisierten Thrombozyten bis zur Festadhärenz inkubiert und anschließend mit Endothelial Cell Growth Medium kultiviert. Dementsprechend wurde dieses Zellkultursystem mit sJAM-C-Fc oder Control Fc vorbereitet. Die thrombozytenvermittelte Formation von endothelialen Kolonien aus CD34⁺ Zellen blieb in Anwesenheit von s-JAM-C-Fc, im Vergleich zu Control-Fc, unverändert (Control-Fc versus sJAM-C-Fc: mittlere Anzahl der Kolonien \pm SD: 11 \pm 1,4 vs. 10,5 \pm 2,1; P>0.05; n=3; Abb.20 A,B).

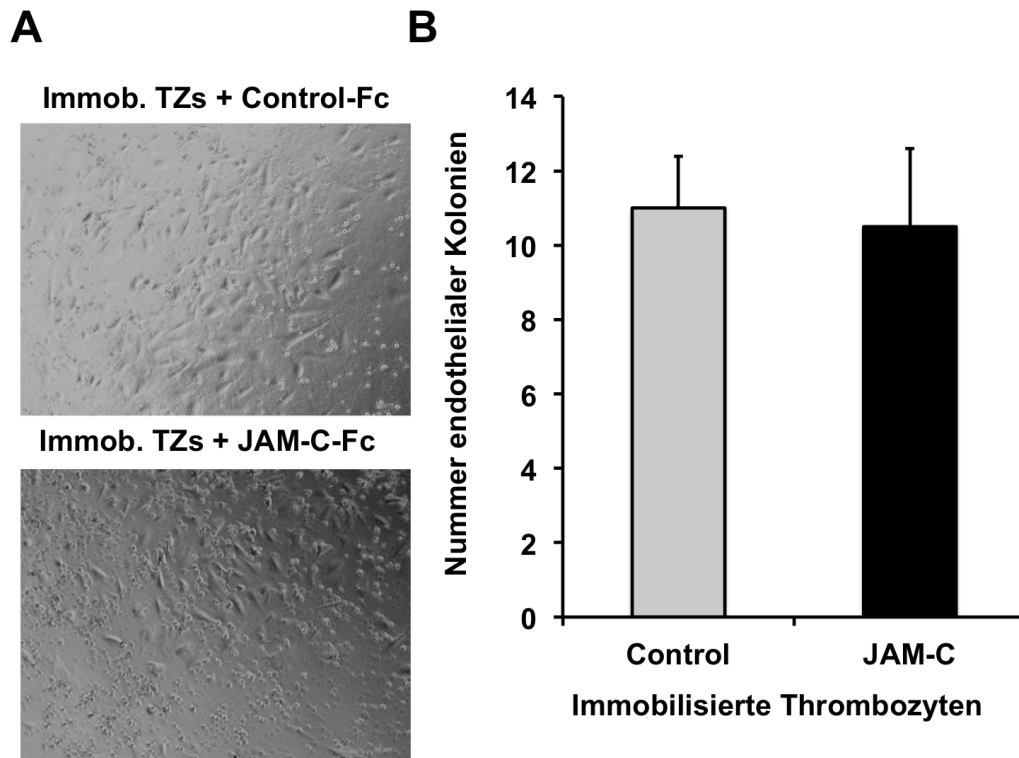


Abbildung 20 Thrombozytäres JAM-C beeinflusst nicht die Differenzierung von CD34⁺ Zellen zu Endothelzellen oder Makrophagen/Schaumzellen. CD34⁺ Zellen wurden über immobilisierten Thrombozyten in der Gegenwart von s-JAM-C-Fc oder Control-Fc kultiviert. Eine Vorinkubation der immobilisierten Thrombozyten mit s-JAM-C-Fc veränderte, im Vergleich zu Control-Fc, die Zahl der aus CD34⁺ Zellen stammenden endothelialen Kolonien nicht. (A) Repräsentative Phasenkontrastbilder sind hier dargestellt. (B) Die endothelialen Kolonien wurden zwischen Tag 5 und 10 gezählt. Mittelwert und SD von drei unabhängigen Experimenten werden gezeigt. ***Diese Daten sind bereits publiziert: Stellos K, Panagiota V et al., Cell Physiol Biochem. 2012 (322).***

Um die Rolle von JAM-C bei der Differenzierung von CD34⁺ Zellen zu Endothelzellen weiter zu konkretisieren, inkubierten wir diesmal CD34⁺ Zellen auf immobilisiertem JAM-C-Fc oder Control-Fc. Immobilisiertes JAM-C förderte, im Gegensatz zu Control-Fc, die Bildung von endothelialen Kolonien aus CD34⁺ Zellen leicht, aber signifikant (immobilisiertes Control-Fc versus immobilisiertes JAM-C-Fc: mittlere Anzahl von endothelialen Kolonien \pm SD: $0,3 \pm 0,6$ vs. $2,3 \pm 0,6$; $P=0,05$; $n=3$; Abb.21A,B). Colony forming Units wurden weiter bis zur

Konfluenz kultiviert. Lichtmikroskopische Fotos, um die Differenzierung zu spindelförmigen Endothelzellen zu zeigen, wurden aufgenommen (Abb. 21C).

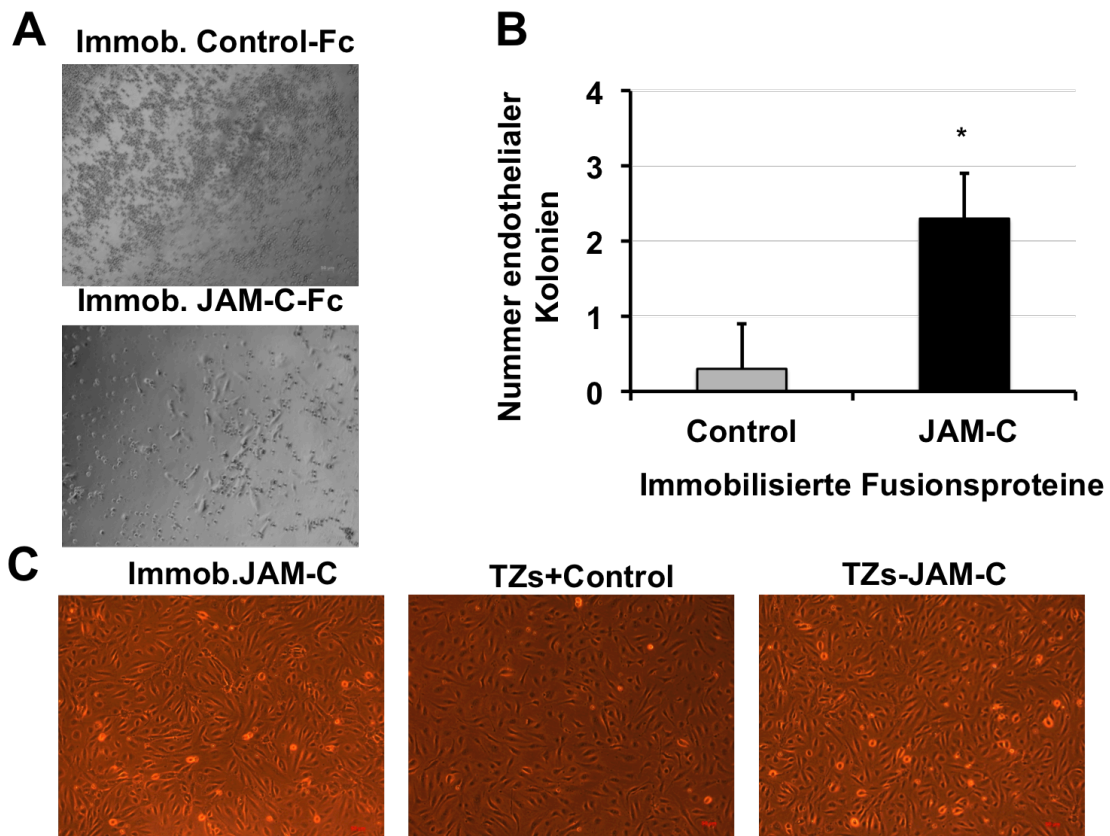


Abbildung 21 Immobilisiertes JAM-C fördert die Bildung von endothelialen Kolonien aus CD34⁺ Zellen. (A,B) CD34⁺ Zellen wurden, wie im methodischen Teil zuvor verschriftlicht, auf immobilisiertem Control-Fc oder immobilisiertem JAM-C-Fc kultiviert. Die Kultivierung von humanen CD34⁺ Zellen über immobilisiertem JAM-C führte zu einem leichten Anstieg der endothelialen Koloniebildung. (C) Repräsentative Phasenkontrastbilder werden hier gezeigt. (D) Mittelwert und SD von drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. *P=0,05 vs. Control-Fc. ***Diese Daten sind bereits publiziert: Stellos K, Panagiota V et al., Cell Physiol Biochem. 2012 (322).***

Um die Differenzierung von CD34⁺ Zellen zu endothelialen Progenitorzellen zu bestätigen, wurden weitere Oberflächenantigene von uns untersucht. Im Einzelnen: Die Expression von CD146, PECAM-1 (CD31), CD34, und CD45 wurde auf isolierten CD34⁺ Zellen, humanen arteriellen Endothelzellen und auf, aus Colony Forming Unit Assays hervorgegangenen, endothelialen Progenitorzellen, (entweder durch Thrombozyten induziert oder durch JAM-C-induziert) mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Wurden CD34⁺ Zellen kultiviert, um Colony Forming Units auf immobilisiertem JAM-C zu bilden, zeigten sie die typischen Oberflächenantigene von primären Endothelzellen, wie zum Beispiel CD146 und CD31. Es gab keinen Hinweis auf die Leukozyten-Marker CD45 oder die Stammzellmarker CD34 (Abb.22). Nach 10 Tagen änderte sich die Morphologie der initial runden CD34⁺ Zellen, sowohl auf JAM-C als auch auf den Thrombozyten, in adhärenente spindelförmige Zellen, die positiv für den von-Willebrand-Faktor (vWF) waren, wie wir durch eine Immunfluoreszenzfärbung beweisen konnten.

Als nächstes analysierten wir, ob aus CD34⁺ Zellen entstandene endotheliale Progenitorzellen aktiviert werden können und diese aktivierungsabhängige Oberflächenantigene wie ICAM-1 (CD54) und VCAM-1 (CD106) exprimieren. Wir beobachteten, dass die Stimulation der spät auswachsenden (late-outgrowth) Endothel-Kolonie-bildenden Zellen mit TNF- α /INF- γ Zytokinen eine vermehrte Expression von CD54 und CD106 zur Folge hatte (Abb.22).

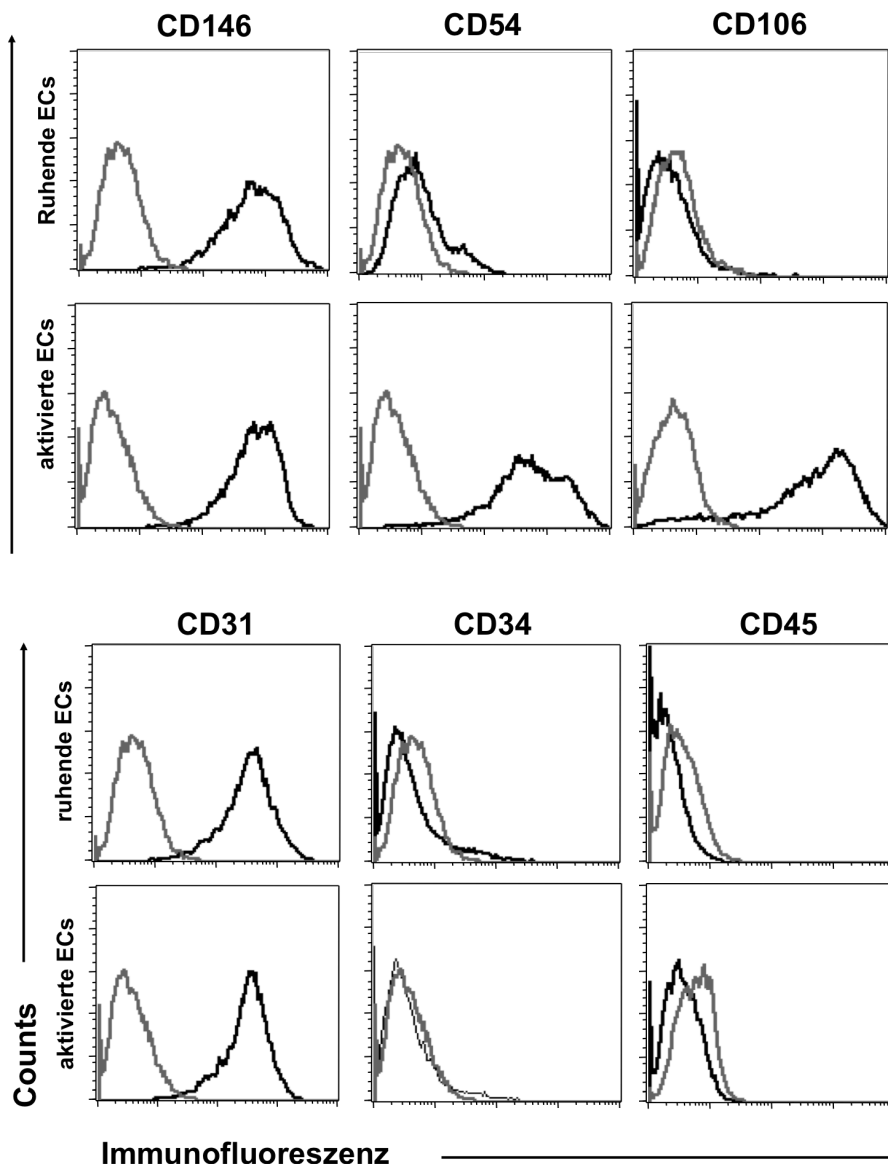


Abbildung 22 Die aus $CD34^+$ Zellen entstandenen endothelialen Progenitorzellen weisen typischen Oberflächenantigene von primären Endothelzellen auf. Repräsentative Durchflusszytometrie Histogramme (von $n=3$) der Oberflächenmarker CD146, CD54, CD106, CD31, CD34 und CD45 (schwarze Linie) gegen Isotypkontrollen IgG (graue Linie), die auf der Oberfläche ruhender und aktivierter Endothelzellen, die aus von immobilisiertem JAM-C gebildeten endothelialen Kolonien stammen, exprimiert sind. Zwei endotheliale Aktivierungsmarker, CD54 (ICAM-1) und CD106 (VCAM-1), wurden ebenfalls einerseits auf ruhenden und andererseits auf $TNF-\alpha/INF-\gamma$ aktivierten, aus $CD34^+$ stammenden Endothelzellen, bewertet. **Diese Daten sind bereits publiziert: Stellos K, Panagiota V et al., Cell Physiol Biochem. 2012 (322).**

Um *in vitro* die Differenzierung von CD34⁺ Zellen in Makrophagen/Schaumzellen zu evaluieren, wurden, wie zuvor beschrieben, thrombozytäre Thromben 10 Tage lang mit CD34⁺ Zellen kultiviert [92,331]. In Übereinstimmung mit den CFU Ergebnissen hatte JAM-C keinen Einfluss auf die Thrombozyten-Phagozytose und Schaumzellbildung (Abb.23A,B).

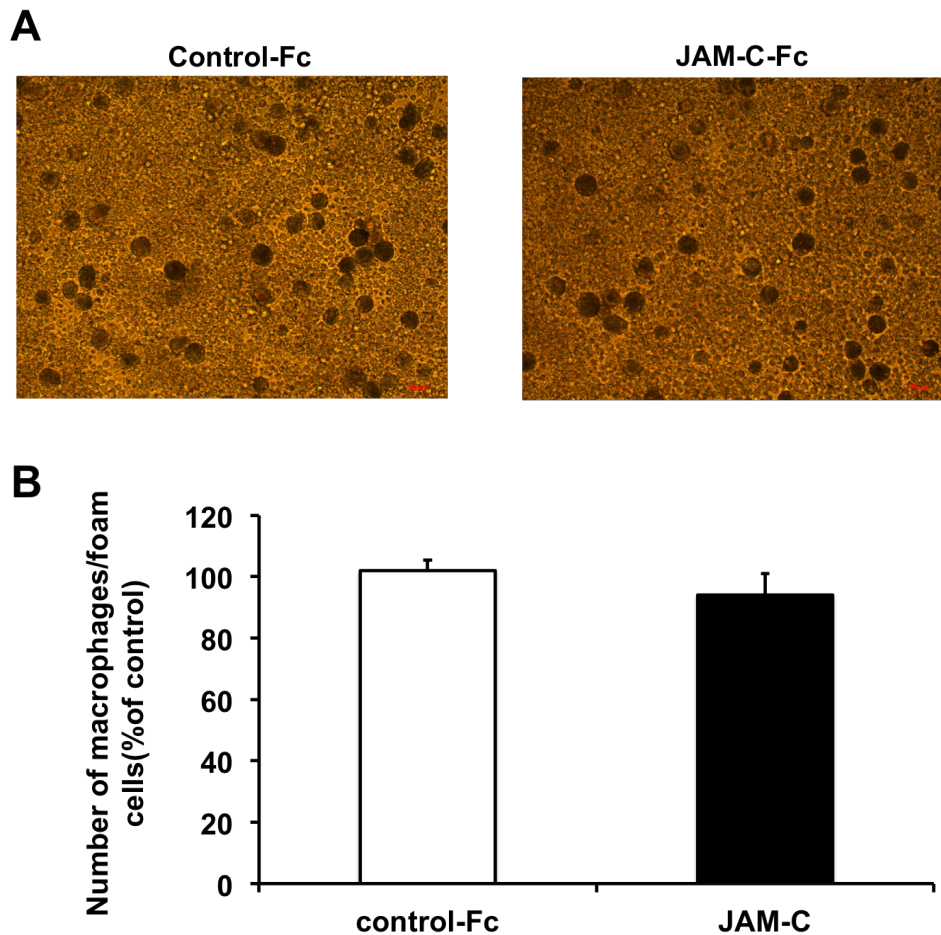


Abbildung 23 JAM-C hat keinen Einfluss auf die Schaumzellbildung. Co-kultur-Experimente von thrombozytären Thromben mit humanen CD34⁺ Zellen wurden angewendet, um die Differenzierung der CD34⁺ Zellen zu Makrophagen/Schaumzellen zu untersuchen. (A,B) Co-Inkubation und Co-Kultur-Experimente mit s-JAM-C-Fc zeigten, im Vergleich zu Control-Fc, keinen Einfluss auf die Anzahl der von CD34⁺ Zellen abgeleiteten Makrophagen/Schaumzellen. ***Diese Daten sind bereits publiziert: Stellos K, Panagiota V et al., Cell Physiol Biochem. 2012 (322).***

5. DISKUSSION

5.1 Wichtige Ergebnisse

Die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Studie sind: 1. Die JAM-C Expression auf Thrombozyten ist nach Thrombozytenaktivierung erhöht und korreliert mit der P-Selektin Expression bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung; 2. Die thrombozytenvermittelte Adhäsion von humanen CD34⁺ Progenitorzellen wird, durch die Bindung des thrombozytären JAM-C an MAC-1, sowohl unter statischen als auch unter dynamischen Bedingungen ermöglicht; 3. *In vitro* beeinflusst JAM-C nicht die thrombozytenvermittelte Differenzierung von humanen CD34⁺ Zellen in endotheliale Progenitorzellen oder Makrophagen/Schaumzellen.

5.2 Die Rolle der Thrombozyten in der vaskulären Homöostase und Inflammation

5.2.1 Thrombozyten adhärieren an verletztem Endothel

Unter physiologischen Bedingungen interagieren zirkulierende Thrombozyten nicht mit der Gefäßwand (109). Im Falle eines Gefäß- (z.B. Plaqueruptur, -erosion) oder Gewebeschadens (Ischämie) sind Thrombozyten die ersten zirkulierenden Zellen im peripheren Blut, die mit der verletzten Gefäßwand innerhalb von wenigen Minuten interagieren. Als ersten Schritt der Homöostase nach einer Verletzung bezeichnet man die Adhäsion der Thrombozyten an der beschädigten Gefäßwand (95, 113, 323).

Eine Schädigung der Gefäßwandintegrität führt zur Freilegung der subendothelialen extrazellulären Matrix. Dies löst dann die Plättchenadhäsion und -aggregation durch das Plättchen-GPIIb und den Kollagenrezeptor (GPVI), zwei Hauptadhäsionsrezeptoren, die für die Regulierung der initialen Plättchenadhäsion verantwortlich sind, aus (111, 115, 320). GPIIb/IIIa-Komplex bindet auf der subendothelialen Oberfläche an den von-Willebrand-Faktor und ermöglicht so das Haften der Thrombozyten an der Gefäßoberfläche (109). Darüber hinaus können Thrombozyten entlang des SDF-1-Gradienten migrieren. Diese Fähigkeit spielt eine wichtige Rolle bei der Thrombozytenwanderung zu Orten einer Gefäßverletzung.

Die Adhäsion von Thrombozyten an dem entzündeten Endothel wird hauptsächlich durch zwei Arten von Rezeptoren vermittelt, den Selektinen und Integrinen. Hauptsächlich P-Selektin und teilweise auch E-Selektin, beide auf Endothelzellen exprimiert, vermitteln den initialen Kontakt zwischen Thrombozyten und Endothelzellen. Integrine und speziell β_3 -Integrine, wie $\alpha_{IIb}\beta_3$ oder GPIIB/IIIa und $\alpha_v\beta_3$, besitzen eine Schlüsselfunktion bei der festen Adhäsion der Thrombozyten auf dem Endothel (323). Nicht nur *In-vitro*-, sondern auch *In-vivo*-Experimente haben gezeigt, dass sowohl $\alpha_{IIb}\beta_3$ als auch $\alpha_v\beta_3$ die feste Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel vermitteln, auch unter hohen Schergeschwindigkeiten (324).

Junction-Adhäsionsmoleküle (JAMs), die auf Thrombozyten-, Leukozyten- und Endothelzellen-Membran lokalisiert sind, sind für die tight junctions, die sie bilden, bekannt. JAM-A, auch bekannt als F11-R, spielt ebenfalls eine Rolle bei der stabilen Adhärenz der Thrombozyten auf inflammatorischem Endothel und trägt zur Entwicklung von Atherosklerose bei (325). *In vivo* wurde gezeigt, dass JAM-A-Knock-out-Mäuse eine signifikant reduzierte Neointimahyperplasie darstellten (326).

In unserer Studie konnten wir bestätigen, dass humane Thrombozyten neben JAM-A auch JAM-C auf ihrer Oberfläche exprimieren. Santoso et al. zeigten, dass die endgültige Adhärenz von Leukozyten unter anderem durch den Thrombozyten-exprimierten JAM-C-Rezeptor vermittelt wird (262). Es wurde gezeigt, dass die Bindung von β_2 -Integrin MAC-1 ($\alpha_M\beta_2$) zu JAM-C die Interaktionen zwischen Thrombozyten mit Leukozyten und Endothelzellen verstärkt (262, 283, 308).

5.2.2 Thrombozyten interagieren mit der Gefäßwand

Zirkulierende Thrombozyten rollen und adhären nach endothelialer Denudation an Stellen vaskulärer Läsionen durch die Bindung von Plättchen-GPVI, Integrin VLA-6 und Plättchenmembran GPIIb/IIIa an Kollagen, Laminin und Fibronectin (126, 313). Plättchen können außerdem über ein intaktes und aktiviertes Endothel rollen. Dieser Prozess wird durch GPIba, P-Selektin und β 3-Integrin (327) ermöglicht. Thrombozyten interagieren mit Endothelzellen, verändern ihre Eigenschaften und regulieren somit die Chemotaxis, die Adhäsion und die Migration von zirkulierenden Blutzellen sowie die Proteolyse in der lokalen Peripherie (95). Nach ihrer Adhäsion sezernieren Thrombozyten proinflammatorische Moleküle wie P-Selektin, Gewebefaktor, CD40L, Matrixmetalloproteinase 1 und Matrixmetalloproteinase 2 (MMP-1 und MMP-2), IL-1 β und die Chemokine CXCL4, Plättchenfaktor 4 (PF4) und CCL5 (RANTES) (82), die die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion, die Endothelzell-Aktivierung und anschließend die Leukozytenrekrutierung und die Inflammation regulieren (80). Adhärenente Thrombozyten dienen als Mediatoren zwischen zirkulierenden inflammatorischen Blutzellen und Endothelzellen. Zum Beispiel: Thrombozyten rekrutieren Neutrophile Granulozyten (145), Monozyten (92) und Lymphozyten (328, 329) an die Gefäßwand. Darüber hinaus rekrutieren adhärenente Plättchen Leukozyten über PSGL-1-P-Selektin-Wechselwirkungen (330) sowie dendritische Zellen (297) durch die Bindung von Makrophagen-1-Antigen (MAC-1) (CD11b/CD18, $\alpha_M\beta_2$) an GPIb α , JAM-C und intrazellulärem Adhäsionsmolekül-2 (ICAM-2) oder über verbrückende Proteine wie Fibrinogen (das an GPIIb/IIIa bindet) oder hochmolekularem Kininogen (das an GPIb α bindet) (95). Darüber hinaus binden Plättchenmikropartikel auf Leukozytenoberflächen, die Leukozyten-Leukozyten- und Leukozyten-Endothelzell-Wechselwirkungen unterstützen (331).

5.2.3 Differenzielle Plättchensekretion reguliert Wundheilung und Angiogenese

Plättchen speichern und sezernieren verschiedene Wachstumsfaktoren, die die Wundheilung und Angiogenese regulieren. VEGF, bFGF, EGF, PDGF und Angiopoetin-1 besitzen eine proangiogene Aktivität und unterstützen das Gefäßwachstum (Tabelle 7) (130). Andererseits können Thrombozyten, durch Freisetzung von Endostatin, PF-4, Thrombospondin-1 und Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (PAI-1), die Angiogenese inhibieren (332). Ma et al. zeigte, dass die Proteinase-aktivierten Rezeptoren PAR1 und PAR4, die auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimiert sind, die Sekretion von Endostatin und VEGF aus den Thrombozyten unterschiedlich regulieren (333). Endostatin wird nach Aktivierung von PAR4 aus menschlichen Blutplättchen freigesetzt und durch Aktivierung von PAR1 unterdrückt (333). PAR-1 Blockade führt zu einer Thrombin-stimulierten Endostatin-Freisetzung (ein PAR4-ähnlicher Effekt) (333). Nach einer PAR4-Blockade stimulierte Thrombin die VEGF-Freisetzung (ein PAR1-ähnlicher Effekt) (333). So wirken PAR1 und PAR4 in gegenregulatorischer Weise, um die Freisetzung von zwei Substanzen aus den Thrombozyten zu regulieren, die die Angiogenese stark beeinflussen (130). In Übereinstimmung mit diesen Erkenntnissen haben Italiano und Kollegen gezeigt, dass pro- und antiangiogene Moleküle in separaten alpha-Granula von Thrombozyten gespeichert sind und durch unterschiedliche Stimuli freigesetzt werden (334). Die Fortbewegung von endogenen Wachstumsfaktoren vom Zytoplasma in die Peripherie mithilfe langer Fortsätze (Filopodie, Lamellipodien) von aktivierten Thrombozyten stellt einen intakten plättchenmodulierten Mechanismus dar, der für die Regulation der Angiogenese verantwortlich sein kann (334).

Darüber hinaus definierten Chatterjee und Kollegen weitere Stimuli, die für die differentielle Plättchensekretion von pro- und antiangiogenetischen Molekülen verantwortlich sind und konnten zudem verschiedene intrazelluläre Signalwege zeigen. Pro-angiogene Moleküle wie SDF-1a/CXCL12 und VEGF werden nach Stimulierung mit PAR1-aktiviertem Peptid, ADP, GPVI-Kollagen freigesetzt, während antiangiogene Faktoren wie PF4 und Endostatin nach Stimulierung mit PAR4 aktiviertem Peptid und Thromboxan A2 freigesetzt werden (335).

In unserer Studie konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass die PAR-1 Aktivierung, *in vitro*, die Expression von JAM-C auf der Oberfläche von humanen Thrombozyten erhöht (322). Bei Patienten mit einer bekannten koronaren Herzkrankheit beobachteten wir eine vermehrte JAM-C-Expression auf Thrombozyten, die mit der P-Selektin-Expression korrelierte (322).

Der Einfluss, von aus Thrombozyten freigesetzten Proteinen bei der Angiogenese, hängt nicht nur von der Umgebung ab in der sie freigesetzt werden, sondern auch von dem erreichten Grad ihrer Sekretion. Mehrere Proteine können synergistisch wirken, aber auch untereinander konkurrieren. Dennoch bleiben die genauen Mechanismen, durch die Thrombozyten die Angiogenese regulieren, noch weitgehend unklar.

5.2.4 Thrombozyten interagieren mit den Progenitorzellen

Zunehmende Beweise unterstützen die Wichtigkeit der zirkulierenden Stamm- und Progenitorzellen bei der Gefäß- und Geweberegeneration. Dabei handelt es sich um mehrstufige Prozesse, die die Mobilisierung der Progenitorzellen aus dem Knochenmark oder den peripheren Nischen in die Peripherie, die Chemotaxis auf das Zielgewebe, die Adhäsion an die Gefäßwand, das Überleben und das Engraftment in das lokale Gewebe, die Differenzierung in reife funktionelle Zelltypen sowie die Proliferation umfassen (306, 336). In letzter Zeit wurde hervorgehoben, dass Thrombozyten eine entscheidende Rolle, bei der Mobilisierung, der Adhäsion, der Proliferation, dem Überleben, der Aktivierung und der Differenzierung von Progenitorzellen, spielen. Dies ermöglicht den Progenitorzellen nicht nur das Zielgewebe zu erreichen und als Brücke zwischen Kreislauf und Gefäßwand zu wirken, sondern auch sich in reife Zelltypen zu differenzieren (Tabelle 8). Darüber hinaus haben Thrombozyten eine chemotaktische Wirkung auf mesenchymale Stammzellen und fördern ihre Migration. Dieser Prozess wird durch den basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) vermittelt (337).

Tabelle 7: Plättchen-Zytokine/Wachstumsfaktoren, die an den Interaktionen zwischen Thrombozyten und Progenitorzellen beteiligt sind.

Progenitorzellen	Thrombozyten	Funktion	Literatur
CXCR4 CXCR7	SDF-1;CXCL12	Chemotaxis Mobilisierung Adhäsion und Migration von Progenitorzellen Differenzierung der Progenitorzellen Angiogenese	(124)
Tie-2	Angiopoietin-1	Stabilisierung Vaskulogenese Angiogenese	(338, 339)
PDGFRbeta	PDGF	Proliferation Differenzierung Chemotaxis	(340)
EGFR	EGF	Proliferation	(341, 342)

5.2.4.1 SDF-1: etwas mehr als nur ein Plättchen-Chemokin

SDF-1, auch bekannt als CXCL12, reguliert die chemotaktische Rekrutierung, die Migration vom Knochenmark in die Peripherie, die Retention und die Entwicklung von CD34⁺Progenitorzellen (122, 209). SDF-1, das primär durch die Stromazellen des Knochenmarks gebildet wird, scheint eine entscheidende Rolle bei der Hämatopoese zu spielen. SDF-1 vermittelt das Homing von hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) und Progenitorzellen von der fetalen Leber bis zum Knochenmark (343). Darüber hinaus führt eine Veränderung des SDF-1-Plasmaspiegels im peripheren Kreislauf, zur Mobilisierung von Progenitorzellen in die periphere Zirkulation (343, 344). Megakaryozyten und ihre nachkommenden Thrombozyten enthalten erhebliche Mengen an SDF-1. Experimente mit thrombozytopenen Mäusen zeigten, dass Thrombozyten die Hauptquelle für das lösliche SDF-1 im Blut sind (345). Nach Thrombozytenaktivierung wird die SDF-1-Expression auf der

Thrombozytenoberfläche und anschließend die SDF-1 Sekretion in den Kreislauf erhöht (122). Der lösliche Kit-Ligand (Stammzellofaktor) und Thrombopoetin induzieren die Freisetzung von SDF-1 aus Thrombozyten, wodurch die Neovaskularisation durch Mobilisierung von CXCR4⁺VEGFR1⁺ Hämangiozyten verstärkt wird (345). In ähnlicher Weise vermittelt die Expression von SDF-1 das Rolling und die feste Adhäsion von humanen CD34⁺ Progenitorzellen an immobilisierten Plättchen *in vitro* unter Flussbedingungen und *in vivo* an Stellen der vaskulären Verletzung (124). Die Größe der SDF-1 Plasma-Erhöhung korreliert mit der Anzahl der mobilisierten CXCR4⁺VEGFR1⁺ Zellen und der Geschwindigkeit der Revaskularisation nach einer Hindlimb-Ischämie (345). Interessanterweise ist thrombozytäres SDF-1 auch an der Mobilisierung und Domizilierung von vaskulären glatten Muskelprogenitorzellen beteiligt. Dies könnte eine Rolle bei der Pathogenese der Neointimabildung nach vaskulärer Verletzung spielen (346). Die Hemmung der Thrombozytenaggregation durch den ADP-Rezeptorblocker Ticlopidin supprimierte deutlich die thrombozyten-vermittelte SDF-1 α -Produktion, was zu einer Abnahme der zirkulierenden glatten Muskelvorläuferzellen und zu einer Attenuierung der Neointimabildung führte (346).

5.2.5 Thrombozyten rekrutieren Progenitorzellen an der Gefäßwand

Nach der Thrombozytenadhäsion an der Gefäßwand, rollen zirkulierende Progenitorzellen über immobilisierte Thrombozyten. Dies erfolgt durch die Bindung vom thrombozytärem P-Selektin mit dem P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) der Progenitorzellen (311). Die feste Adhäsion der Progenitorzellen auf den Thrombozyten wird über SDF-1/CXCR4, beta (1) Integrin, beta (2) -Integrin und Thrombozyten GPIIb/IIIa (Abb.24, Tabelle 8 (122, 124, 126, 345) vermittelt. Nach vaskulärer Verletzung haften, vom Knochenmark abgeleitete murine Progenitorzellen, in einem Prozess, der thrombozytäres-P-Selektin und GPIIb-Integrin beinhaltet, direkt an Thrombozyten (122). Sobald sie aktiviert sind, sezernieren Thrombozyten das Chemokin SDF-1 α , welches *in vivo* die primäre Adhäsion von Progenitorzellen auf der Oberfläche arterieller Thromben unterstützt (122). Vom Knochenmark abgeleitete murine Progenitorzellen, die zu Thrombozytenaggregaten rekrutiert wurden, führten zur Bildung neointimaler Zellen. Dies weist darauf hin, dass die

Akkumulation der Knochenmark-Progenitorzellen in arteriellen Thromben zu vaskulärer Reparatur oder pathologischem Remodeling beitragen kann (122).

Im humanen System haften CD34⁺ Zellen an immobilisierten Thrombozyten, nicht aber an immobilisiertem Kollagen Typ I, das die wichtigste extrazelluläre Matrixkomponente der verletzten Arterienwand darstellt (124). Nach SDF-1/CXCR4 Blockade wurde die Adhäsion von CD34⁺ Zellen an immobilisierten Thrombozyten signifikant abgeschwächt. Dies deutet drauf hin, dass thrombozytäres-SDF-1 entscheidend für die Progenitorzellen-Thrombozyten-Interaktionen ist (122).

Thrombozyten exprimieren zudem noch JAM-A, welches die Adhäsion von humanen Progenitorzellen auf Thrombozyten, durch heterophile oder homophile Wechselwirkungen mit LFA-1 (Tabelle 8) oder mit dem JAM-A der Progenitorzellen, unterstützt (319, 347). JAM-A vermittelt die Adhäsion von humanen CD34⁺ Zellen über immobilisierten Thrombozyten oder inflammatorischem Endothel, *in vitro*, unter hoher Scherspannung und *in vivo*, nach Carotisligation oder Ischämie/ Reperfusionsverletzung (319, 347).

In unserer Studie zeigten wir, dass humane Thrombozyten neben JAM-A, auch JAM-C auf ihrer Oberfläche exprimieren. Da JAM-C essenziell bei der Zelladhäsion ist, untersuchten wir, ob thrombozytäres JAM-C *in vitro* eine Rolle bei der Rekrutierung von zirkulierenden CD34⁺ Progenitorzellen spielt. Wir konnten beweisen, dass die Adhäsion von humanen CD34⁺ Progenitorzellen über immobilisierten Thrombozyten, durch JAMC/MAC-1-Interaktionen, unter statischen- und dynamischen Bedingungen, vermittelt wird (322). Im Gegensatz zu thrombozytärem JAM-C, zeigte das endotheliale JAM-C keinen Einfluss auf die Adhäsion von humanen CD34⁺ Zellen auf aktivierten Endothelzellen (322).

5.2.6 Thrombozyten unterstützen die Differenzierung von Progenitorzellen zu Endothelzellen

Nach Adhäsion an der Gefäßwand induzieren Thrombozyten die Differenzierung sowohl der menschlichen als auch der murinen Progenitorzellen in reife funktionelle Endothelzellen (122, 124, 126, 345). Die Migration von murinen embryonalen Progenitorzellen über Plättchen ist mit einer verstärkten Expression des von-Willebrand-Faktors assoziiert. Dies bedeutet, dass murine Progenitorzellen in Anwesenheit von Thrombozyten ihren Phänotyp zum einem reifen Endothelzell-Phänotyp verändern (348). Daub et al. zeigten bereits, dass sich die initial runden CD34⁺ Zellen, zu adhärenenten spindelförmigen Zellen veränderten, die, nach 5-tägiger Kultivierung von isolierten CD34⁺ Zellen mit immobilisierten Thrombozyten, für vWF positiv waren (124). CD34⁺ Zellen bilden auf immobilisierten Plättchen und ebenfalls in ähnlicher Weise auf immobilisiertem Fibronektin Kolonien, was auf eine Differenzierung zu Endothelzellen hindeutet (124). Das endotheliale Überleben, die Proliferation und die Migration, die für die Reparatur des verletzten Endothels notwendig sind, werden durch CD34⁺ Progenitorzellen verstärkt, die den VEGF-R2/Kinase-Insert-Domänenrezeptor (KDR) exprimieren (349). Humane CD34⁺/KDR⁺ Zellen entstehen nach ihrer Immobilisierung auf aktivierten Thrombozyten aus zirkulierenden CD34⁺ Zellen (350).

Sowohl SDF-1 als auch JAM-A fördern die Differenzierung von humanen CD34⁺ Zellen zu endothelialen Zellen (Abb.24, Tabelle 8). Dies fördert, *in vitro* sowie *in vivo*, nach vaskulärer Verletzung, die CD34⁺ Zell-vermittelte Re-Endothelialisierung (124, 347). In unserer Studie untersuchten wir, ob JAM-C bei der thrombozytenvermittelten Differenzierung von Progenitorzellen zu Endothelzellen eine Rolle spielen könnte (Abb. 24, Tabelle 8). Wir konnten zum ersten mal zeigen, dass JAM-C *in vitro* keinen Einfluss auf die thrombozytenvermittelte CD34⁺ Zelldifferenzierung zu Endothelzellen hat (322). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis spielte JAM-C keine Rolle bei der Thrombozyten-Phagozytose und Schaumzellbildung (322).

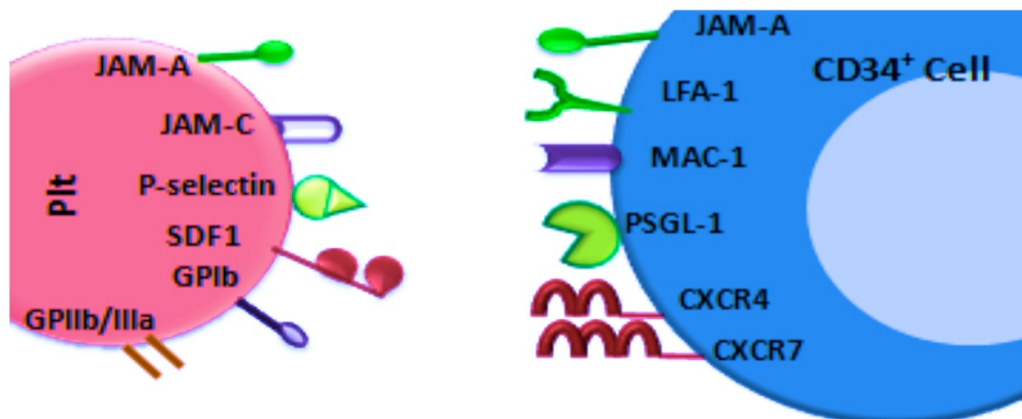


Abbildung 24 Rezeptor-Ligand-Paare bei den Thrombozyten-Progenitorzellen-Interaktionen. Die Wechselwirkung von Progenitorzellen (CD34⁺ Zellen) mit Thrombozyten induziert Chemotaxis, Rolling, Adhäsion, Proliferation der Progenitorzellen, sowie ihre Differenzierung zu endothelialen Progenitorzellen. *Adaptiert von Sopova K et al., CurrVascPharmacol.2012 (351).*

Tabelle 8: Adhäsionsrezeptoren, die an den Interaktionen zwischen Thrombozyten und Progenitorzellen involviert sind, und ihre Funktion.

Progenitorzellen	Thrombozyten	Funktion	Literatur
PSGL-1;CD162P	P-Selektin;CD62P	Adhäsion, Rolling	(352)
Integrin MAC-1	Mikropartikeln (CD41, CD61, CD62, CXCR4, PAR-1)	Proliferation Adhäsion auf ECs Migration, Differenzierung	(353, 354)
LFA-1	JAM-A	Differenzierung Adhäsion	(319)
MAC-1	Glykoprotein Iba	Adhäsion	(355)
MAC-1	Glykoprotein IIb/IIIa	Adhäsion	(95)
Integrin MAC-1	JAM-C	Adhäsion	(322)

5.2.7 Defekte in der Interaktion zwischen Thrombozyten und Progenitorzellen bei Patienten mit vaskulären Erkrankungen

Die endotheliale Dysfunktion, die durch veränderte Endothelzellfunktion, abgeschwächte Stickoxidproduktion und zunehmende Thrombose gekennzeichnet ist, stellt eine frühe Komplikation von Patienten mit vaskulären Erkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus, dar (356, 357). Thrombozyten von Diabetikern weisen Hyperreaktivität, eine erhöhte Adhäsivität sowie eine erhöhte Aggregation und Thromboseneigung auf (358).

Progenitorzellen sind bei Patienten mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen und vor allem mit Diabetes mellitus, nicht nur in ihrer Anzahl, sondern auch in ihrer Funktion beeinträchtigt (68, 359). Da diese Wechselwirkung zwischen Thrombozyten und Progenitorzellen erst vor kurzem beschrieben wurde, gibt es nur wenige Studien, die diese Wechselwirkung bei Patienten mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen beschreiben. Dernbach et al. berichtete zuerst, dass die Ko-Inkubation von Thrombozyten und peripheren mononukleären Blutzellen von gesunder Probanden, dosisabhängig, die Anzahl der frühen OECs (outgrowth endothelial cells) erhöht (360). Im Gegensatz dazu: Bei Inkubation von Thrombozyten von Patienten mit Diabetes mellitus zusammen mit peripheren mononukleären Blutzellen von gesunden Menschen, steigt die Anzahl früher OECs nicht (360). Allerdings hat die Ko-Inkubation von Thrombozyten gesunder Spender mit mononukleären Zellen von Patienten mit Diabetes mellitus, die Anzahl der OECs signifikant erhöht. Dies weist daraufhin, dass Thrombozyten von gesunden Probanden in der Lage sind, die Beeinträchtigung, der von den Patienten abgeleiteten pro-angiogenen Zellbildung, teilweise zu kompensieren (360).

5.3 Myokardinfarkt: Prognose und Therapie

Laut dem „Herzbericht 2015“ verstarben im Jahr 2013 in Deutschland 64,4 von 100.000 Einwohnern an einem akuten Myokardinfarkt. Diese Zahl ist gegenüber dem Jahr 1990 um 40 Prozent gesunken: 42,2 Prozent bei Männern und 37,2 Prozent bei Frauen. Diese Verringerung der Sterbeziffer beim akuten Herzinfarkt ist sowohl durch den Rückgang der Anzahl von Rauchern als auch durch die Verbesserungen der strukturellen und therapeutischen Maßnahmen zu erklären.

Die ersten beiden Stunden nach dem Eintritt eines Myokardinfarktes sind für die Überlebenschance von entscheidender Bedeutung. Dabei gilt die goldene Regel: „Time is muscle“. Die Mehrzahl der Todesfälle ist innerhalb der ersten zwei Stunden dokumentiert, wobei das Kammerflimmern die häufigste Todesursache darstellt.

Eine Wiedereröffnung der verengten oder verschlossenen Blutgefäße sollte durch Reperfusionstherapie (perkutane koronare Intervention (PCI) bzw. medikamentöse Thrombolyse) rasch erfolgen, um einen irreversiblen Schaden des betroffenen Myokardareals zu vermeiden. Trotz der bei dem Großteil der Patienten heutzutage erfolgreichen Revaskularisierungsmaßnahmen, können Herzinfarktpatienten eine chronische Herzinsuffizienz als Folge des narbigen Umbaus des Herzmuskels entwickeln. Diese aus dem Remodelling resultierende Herzinsuffizienz wirkt sich auf die Morbidität und Mortalität der Patienten aus. Nach einem Myokardinfarkt beträgt das Risiko für ein erneutes kardiovaskuläres Ereignis in den kommenden 36 Monaten 20% (361).

Wesentliche Ziele der Behandlung eines Myokardinfarktes sind:

- Das verschlossene Herzkranzgefäß so schnell wie möglich wieder zu öffnen (Reperfusionstherapie).
- Die kardiovaskuläre Morbidität, insbesondere durch Vermeidung von Reinfarkten und Entwicklung einer Herzinsuffizienz, zu reduzieren.
- Die Belastungsfähigkeit und die Lebensqualität des Patienten zu erhalten
- Die Sterblichkeit zu reduzieren.

Neben interventionellen Maßnahmen (Revaskularisation) und medikamentöser Sekundärprophylaxe, bekommen Maßnahmen wie Verhaltensänderung und damit Modifikation der wichtigsten beeinflussbaren Risikofaktoren (Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Bewegungsmangel, Adipositas, psychosoziale Faktoren) eine zunehmende Bedeutung.

5.3.1 Traditionelle Antiplättchensubstanzen für kardiokoronare Prävention und Verhinderung vor Rethrombosen

Antiplättchensubstanzen werden zur Prävention von kardiovaskulären Ereignissen und zur Verhinderung von Reokklusionen nach erfolgreicher Wiedereröffnung eines verschlossenen Koronargefäßes durch perkutane Koronarintervention oder Lyse angewendet (Abb.25).

Aspirin war das erste Medikament, welches für diese Indikationen mit großem Erfolg eingesetzt wurde. Es inhibiert die Cyclooxygenase-1 und bleibt somit eine grundlegende präventive und therapeutische Option gegen Atherosklerose. In-vitro-Studien zeigten die direkte Wirkung von Aspirin auf die Thrombozytenaktivierung, indem es die Expression von Oberflächenrezeptoren wie GPIIb/IIIa und P-Selektin sowie die Freisetzung von Chemokinen beeinflusst (362).

Die P2Y₁₂ADP-Rezeptor-Antagonisten, die durch Hemmung der ADP-induzierten Aktivierung des P2Y₁₂-Rezeptors wirken, sind ebenfalls wichtige Antiplättchensubstanzen. Clopidogrel, Ticlodipin und Prasugrel gehören im klinischen Alltag zu den am häufigsten angewendeten Antiplättchensubstanzen. In-vitro-Daten zeigten, dass diese Medikamente die Thrombozytenaktivierung direkt sowie die Thrombozyten-Wechselwirkung mit Leukozyten beeinflussen konnten. Weiterhin führte die Behandlung mit P2Y₁₂ADP-Rezeptor-Antagonisten zu einer verminderten Expression von Chemokinen, wie sCD40L, RANTES, P-Selektin und anderen (363). Verschiedene klinische Studien bestätigten die klinische Wirksamkeit dieser Medikamente. Vor allem in Kombination mit Aspirin wurde, bei Patienten mit Atherosklerose-assoziierten Erkrankungen, das Risiko schwerer kardiovaskulärer Ereignisse verringert (364, 365).

Statine, die am häufigsten verwendeten Lipidsenkungsmedikamente, sind weithin für ihre pleiotropen Wirkungen, vor allem ihre entzündungshemmenden Eigenschaften und ihre Rolle bei der Plaque-Stabilisierung, bekannt. In-vitro-Daten zeigten, dass Statine die Thrombozytenaggregation hemmen konnten, während sie gleichzeitig die Freisetzung von proinflammatorischen Chemokinen wie CD40L und die Oberflächenexpression von P-Selektin und anderen Aktivierungsmarkern vermindern (366). In-vivo-Daten zeigten, dass eine Statin-Behandlung, durch Verminderung des zirkulierenden Spiegels von CXCL4 und CXCL7, einen direkten Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung hat und somit im Tiermodell vor einer zerebralen Ischämie schützt (367). Es wird vermutet, dass Statine neben ihrer direkten Wirkung auf die Thrombozytenfunktion, auch indirekt, die Thrombozytenaktivierung und -funktion, durch ihre cholesterinsenkende Wirkung, die direkt auf den oxLDL-Spiegel wirkt, beeinflussen (368). Neuste Daten zeigten, dass Rosuvastatin die gestörte Hyperaktivität und das Membrancholesterin in Thrombozyten von Patienten mit Hypercholesterinämie vermindern könnte (369).

Dabigatran, ein direkter Thrombin-IIa-Inhibitor, Apixaban und Rivaroxaban, direkte Faktor Xa-Inhibitoren, sind neue orale Antikoagulantien, die in der klinischen Routine hauptsächlich bei Vorhofflimmern und zur Verhinderung von venösen Thromboembolien verwendet werden. Es wurde gezeigt, dass Thrombininhibitoren die Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten reduzieren, die Thrombozytenaggregation durch Hemmung der Gewebefaktor-Aktivierung reduzieren und somit *in vivo* eine direkte Wirkung auf die vaskuläre Inflammation und Atherosklerose aufweisen (370). Direkte Faktor Xa-Inhibitoren besitzen ähnliche Effekte auf Thrombozyten. Sie verringern signifikant die Thrombozytenaktivierung und -aggregation und reduzieren somit die Thrombusbildung (371). Allerdings sind die vorhandenen Daten, die die klinische Bedeutung der Wirkung dieser Antikoagulanzen auf die Thrombozytenaktivierung und -funktion erhellen, begrenzt.

Kürzlich wurden Anstrengungen unternommen, Agenzien zu entwickeln, die direkt Plättchen-Chemokin-Rezeptoren beeinflussen. Plerixafor (oder AMD3100) ist ein CXCR4-Antagonist und ein CXCR7-Agonist (372). Im Tiermodell hatte die Behandlung mit Plerixafor eine positive Wirkung auf die

Neointima-Bildung an der Stelle der Gefäßverletzung (373). Klinische Daten zeigten ebenfalls, dass Plerixafor das kardiale Remodeling und die kardiale Funktion, nach Myokardinfarkt und Ischämie/Reperfusionverletzung, positiv beeinflussen könnte (374).

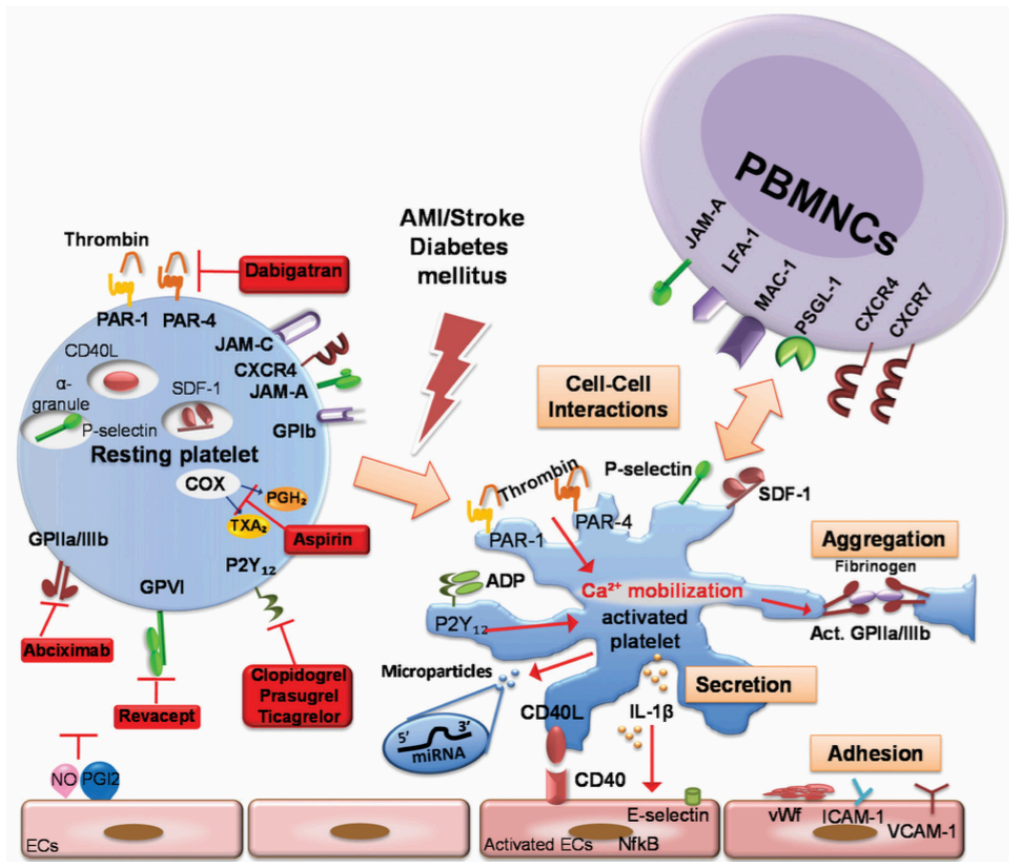


Abbildung 25 Wirksame (Anti-) Thrombozyten Therapien basieren auf der Rolle der Plättchen in der vaskulären Homöostase und Inflammation. Nach der Thrombozytenaktivierung haften Thrombozyten an der Gefäßwand und interagieren mit Endothel- und peripheren mononukleären Blutzellen (PBMNCs), einschließlich Leukozyten und Progenitorzellen. Die aktuellen Antithrombozyten-Medikamente hemmen die Thrombozytenaktivierung bei akutem Myokardinfarkt nicht vollständig. Neueste Befunde unterstützen die Rolle von thrombozytären Biomarkern bei der Diagnose und Prognose von Gefäßerkrankungen, wie dem akuten Koronarsyndrom, dem Schlaganfall und der Demenz. *Adaptiert von Stellos K. Curr Vasc Pharmacol. 2012 (375).*

5.3.2 Thrombozytäres P-Selektin als prognostischer Marker für Patienten mit koronarer Herzerkrankung

Zunehmende Evidenz deutet darauf hin, dass die Thrombozytenaktivierung eine wichtige Rolle bei der Pathogenese und der klinischen Darstellung akuter Koronarsyndrome (ACS) spielt, indem sie die thrombotische Okklusion großer epikardialer Koronararterien vermittelt und das Ausmaß der Myokardverletzung beeinflusst (376). Thrombozytäres P-Selektin scheint in allen diesen Prozessen eine sehr kritische Rolle zu spielen (377).

Die P-Selektin-Expression wurde als Biomarker für die Identifizierung thorakaler Beschwerden von kardialen Ursprung und für die Risikostratifizierung von Patienten mit ACS untersucht (109). P-Selektin-Knock-out-Mäuse zeigen eine signifikant kleinere Infarktgröße im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nach transienter koronarer Okklusion (378). Die Verabreichung von hemmenden Antikörpern gegen P-Selektin reduziert die Infarktgröße bei Tieren (379). Stellos et al zeigten, dass die P-Selektin-Expression auf der Oberfläche von Thrombozyten bei Patienten mit ACS, insbesondere bei Patienten mit STEMI, wesentlich erhöht ist und mit myokardialen Nekrose-Markern (Troponin und CK-MB) korreliert (311).

Diese Befunde unterstützen den potentiellen prädiktiven Wert von P-Selektin auf die nachfolgende Myokardinfarktgröße und Prognose. Dadurch könnten die Patienten identifiziert werden, die möglicherweise aggressiver behandelt werden sollten.

5.3.3 Junctional Adhäsionsmoleküle als neue Zielstrukturen

Die inflammatorische Rekrutierung von mononukleären Zellen erscheint als die treibende Kraft, die zur Entwicklung von atherosklerotischen Veränderungen führt. Dieser Schritt ist durch proinflammatorischen Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle kontrolliert (380, 381). Die Hochregulation der Expression von Junctional Adhäsionsmolekülen auf atherosklerotischem Endothel deutet die Rolle von JAMs bei der Atherogenese und der Bildung von vaskulären Läsionen an (295, 382).

Das auf atherosklerotischem Endothel exprimierte JAM-C ist als humanes Thrombozyten- Adhäsionsmolekül in der Lage, mit den leukozytären Integrinen

$\alpha_M\beta_2$ und $\alpha_X\beta_2$ zu interagieren (262). Dies deutete darauf hin, dass JAM-C in einem verschachtelten Netz von Wechselwirkungen zwischen hämatopoetischen Zellen und Endothelzellen verwickelt ist und somit zu der Leukozyten-Endothel Adhäsionskaskade beiträgt (383).

JAMs regulieren nicht nur die Atherosklerose sondern auch die Angiogenese. Die Bedeutung von JAMs in der Angiogenese wurde zum ersten Mal durch die Beteiligung von JAM-A bei der bFGF-induzierten Angiogenese untersucht (249). Ein JAM-C spezifisch blockierender Antikörper verminderte die Angiogenese in Modellen von hypoxieinduzierter retinaler Neovaskularisation und in Tumervaskularisation (384).

Die bedeutsame Rolle von JAMs in einerseits Inflammation und andererseits Vaskulogenese unterstreicht die zunehmende Bedeutung der Verbindung zwischen inflammatorischer Zellrekrutierung und Angiogenese. Diese funktionelle Dualität ergibt eine neue sehr interessante molekulare Dimension.

5.3.4 Thrombozyten und Regeneration

Die Strategien gegen Atherosklerose entwickeln sich ständig weiter und haben sehr früh die Thrombozyten als therapeutisches Hauptziel identifiziert. Thrombozyten sind von enormer Bedeutung bei der Regulation der vaskulären Homöostase. Sowohl bei Thrombose und Homöostase als auch bei der Aufrechterhaltung der Gefäßintegrität, durch ihre Interaktionen mit dem Endothel, spielen Thrombozyten eine wichtige Rolle.

Zunehmende Hinweise deuten darauf hin, dass Thrombozyten essenziell für die Angiogenese und Wundheilung/Geweberegeneration sind. Die Angiogenese (griechisch ἄγγος [*'aŋ os*] „Gefäß“ und γένεσις [*'genezis*] „Entstehung“) ist ein mehrstufiger Prozess, der auf Migration, Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen basiert. Angiogenese ist durch multiple Wachstumsfaktoren sowie VEGF und bFGF (basic fibroblast growth factor) reguliert. Die von Endothelzellen exprimierten Integrine, $\alpha_V\beta_3$ und $\alpha_V\beta_5$, beteiligen sich bei der Angiogenese durch Interaktion („crosstalk“) mit Rezeptoren für angiogene Faktoren. Blutplättchen sezernieren eine Reihe von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die die Angiogenese unterschiedlich fördern oder hemmen (130, 332). Darüber hinaus interagieren sie mit dem Endothel, verändern seine

Eigenschaften, stimulieren das Wachstum neuer Blutgefäße und verhindern dabei eine übermäßige Hämorrhagie.

Studien zeigten, dass die Neovaskularisation bei thrombozytopenen Mäusen schwerst beeinträchtigt ist. Im Jahr 1969 zeigten Gimbrone et al. (385), dass Schilddrüsen, die mit plättchenreichem, anstatt mit plättchenarmem Plasma perfundiert und für eine spätere Transplantation aufbewahrt wurden, ihre vaskuläre Integrität erhalten konnten. Kitchens und Weiss beobachteten, dass Kaninchen, die durch Injektion von Anti-Thrombozyten-Serum thrombozytopen wurden, histologisch, eine endotheliale Ausdünnung nachwiesen (386). Beobachtungen aus einer Reihe von experimentellen Modellen bei Hämophilie B unterstützten weiterhin die Funktion der Thrombozyten bei der Wundheilung. Mäuse mit Hämophilie B (Fehlen von Faktor IX) haben eine verzögerte und histologisch abnorme Wundheilung (387). Eine Korrektur der Thrombinbildung zum Zeitpunkt der Verletzung, durch Verabreichung von humanem FIX oder FVIIa, konnte den normalen Heilungsprozess in Mäusen mit Hämophilie B nicht wiederherstellen (388). Im Gegensatz dazu traten während der Heilung, insbesondere an Stellen der Angiogenese, vermehrt späte Blutungen auf.

Autologes plättchenreiches Plasma und Wachstumsfaktorkonzentrate werden heutzutage bereits in einer Reihe von klinischen Szenarien, wie zum Beispiel der Heilung von akuten Wunden der Haut, diabetischen Ulzera, der Regeneration von Sehnen, Bändern und Nervengewebe, angewendet (389). Das zunehmende Verständnis der Rolle von Thrombozyten bei Wundheilung und bei Geweberegeneration, kann zur weiteren Entwicklung neuer therapeutischen Strategien, auch für die Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen, führen.

5.3.5 Knochenmarkzellen, CD34⁺ Zellen und kardiale Regeneration

Da die Anzahl der Patienten mit ischämischen kardiovaskulären Erkrankungen zunimmt, wächst stetig der Bedarf an effektiveren Behandlungen, vor allem bei Patienten, die unempfindlich gegenüber der pharmakologischen Standardtherapie oder Revaskularisationsbehandlungen sind. Bis vor einigen Jahren überwog die Meinung, dass das Herz kein regeneratives Potenzial besitzt, da die adulten Herzmuskelzellen als enddifferenzierte Zellen keine regenerative Fähigkeit aufweisen (390). Neue Erkenntnisse, wie z.B. die Mechanismen der Mobilisation von Knochenmark abgeleiteten Stammzellen in das periphere Blut, der erhöhte Nachweis an Mobilisierungsfaktoren wie VEGF und HGF und letztendlich die Plastizität der adulten Stammzellen, widerlegen dieses Dogma und unterstützen eine Vision des nachwachsenden Herzens. Dies wurde allerdings sehr kontrovers diskutiert.

Neuerdings wurde erkannt, dass das Herz eine intrinsische Reparaturfähigkeit besitzt. Derzeit gibt es zwei komplementäre Theorien über den Prozess der intrinsischen Reparatur des Herzens nach einer ischämischen Verletzung: 1. Kardiomyozyten treten wieder in den Zellzyklus ein und starten Prozesse wie Proliferation, Regeneration und Reparatur des nekrotischen Gewebes, (391, 392) und 2. bestimmte endogene Herzstammzellen wachsen und differenzieren sich, entweder durch die Regulation von sezernierten entzündlichen Faktoren oder durch autokrine Regulation (393, 394). Beide Mechanismen können in den Prozess der Herzregeneration einbezogen werden (395).

Um das menschliche Herz zu reparieren ist es entscheidend den passenden Zelltyp und den optimalen Applikationsweg zu bestimmen. Die ausgewählten Zellen sollten in der Lage sein, sich in reife Kardiomyozyten zu differenzieren und eine elektrische Integration mit mechanischer Kopplung zu erreichen. Sie sollten auch die Fähigkeit besitzen, das Herz durch parakrine Effekte zu reparieren. Wichtig dabei ist, dass die Anwendung der Stammzelltherapie für Patienten nur unter sorgfältiger Berücksichtigung der Risiken und Nutzen erfolgen kann. Stammzellen können intravenös, intrakoronar oder intramyokardial verabreicht werden (396). Bei der Auswahl der geeigneten Zellen sollte man das individuelle Potenzial jeder Zelle kennen: Ihre

regenerative Aktivität (ESC, iPSC, endogene Herzstammzellen), ihre parakrinen Effekte (MSC) und ihre Angiogeneseaktivität (EPC) (397).

Ein Teil der menschlichen CD34⁺ Zellen sind frühe pluripotente Vorläuferzellen mit der Fähigkeit alle hämatopoetischen Zelllinien zu bilden (398). Obwohl die hämatopoetischen Stammzellen auf der Basis ihrer CD34-Antigen-Expression isoliert werden können, ist es wichtig erneut zu erwähnen, dass nicht alle CD34-exprimierenden Zellen Stammzellen sind. Zellen, die das CD34-Antigen beherbergen, werden im Allgemeinen als multipotent betrachtet. Wie zuvor diskutiert, exprimieren Endothelzellen auch CD34 und scheinen dabei kein inhärentes expansives Potential zu besitzen. Dieser Standpunkt könnte sich allerdings ändern, wenn mehr über die Plastizität von Zellen, die einmal als endständig differenziert angesehen wurden, bekannt wird.

Die Transplantation von humanen CD34⁺ Zellen ist heutzutage eine etablierte Routinetherapie nach Knochenmarksbestrahlung oder myeloablativer Anti-Tumor-Chemotherapie bei Patienten mit verschiedenen Formen von Krebs, einschließlich multiplem Myelom, Lymphom, akuter Leukämie und Brustkrebs (67, 399). Es gibt in den letzten Jahren zunehmende Beweise dafür, dass nach einem akuten ischämischen Ereignis eine Mobilisierung der CD34⁺ Zellen aus dem Knochenmark erfolgt, die unter anderem Prozesse, wie die Angiogenese, die Neurogenese nach einem ischämischen Schlaganfall, die myokardiale Regeneration nach einem Myokardinfarkt und die Gefäßregeneration nach einer Gefäßverletzung, unterstützen (400-402).

Sowohl in humanen als auch in Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die Anzahl und Funktion der endothelialen Progenitorzellen durch kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie Diabetes mellitus oder Hypercholesterinämie, negativ beeinflusst werden (403). Eine verringerte Anzahl zirkulierender endothelialer Progenitorzellen führt wiederum zu einer gestörten Angiogenese und zur Pathogenese der Atherosklerose (68). Patienten mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko weisen eine verminderte Zahl zirkulierender endothelialer Progenitorzellen mit eingeschränkter Funktion auf (359, 404). Eine verminderte Zahl zirkulierender endothelialer Progenitorzellen stellt sich als prädiktiver Marker für kardiovaskuläre Ereignisse dar (359).

Diese Beobachtungen führten zu Studien, die den klinischen Stellenwert der Anwendung von Stammzellen und endothelialen Progenitorzellen zum funktionellen Remodeling der Herzfunktion nach Infarkt bzw. bei myokardialer Ischämie untersuchten, um insbesondere die Entwicklung einer Herzinsuffizienz, auf dem Boden eines akuten Myokardinfarkts, oder einer chronisch ischämischen koronaren Herzerkrankung, zu verhindern. Eine Reihe von kontrollierten und randomisierten Studien sowie Metaanalysen zeigten einen positiven Einfluss der Stammzellapplikation auf Mortalität und Morbidität nach stattgehabtem Myokardinfarkt.

Dabei wurden unterschiedliche Applikationswege, wie die intrakoronare, transendokardiale und intramyokardiale Injektion und unterschiedliche Stammzelltypen, darunter embryonale und adulte Stammzellen, angewendet. Eine intrakoronare oder transkoronare Transplantation von Progenitorzellen nach akutem Myokardinfarkt war mit einer moderaten, aber signifikanten Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion assoziiert (405, 406). Auch sogenannte "major adverse cardiovascular events" nach akutem Myokardinfarkt traten signifikant seltener auf (405, 407).

Die Cochrane-Collaboration hat 2012 eine Metaanalyse der 33 aufschlussreichsten Studien (insgesamt 1765 Patienten) durchgeführt (408). Diese Metaanalyse bestätigte, dass Knochenmarkstammzellen eine moderate Verbesserung der Herzfunktion, die bis zu fünf Jahre lang anhält, bewirken. Allerdings zeigten die Ergebnisse, trotz großer Studien- und Patientenzahlen, bezüglich der Lebensverlängerung keine statistische Signifikanz.

In derzeitig mehreren Studien wird die langfristige Sicherheit der Stammzelltransplantation nach akutem Myokardinfarkt auf Arrythmieneigung, Herzrhythmusstörungen, Restenosen und Reinfarkte untersucht. Ein signifikanter Erfolg bleibt bis jetzt verwehrt.

Einer der Hauptnachteile bei der therapeutischen Verwendung von CD34⁺ Zellen besteht in ihrer relativ niedrigen basalen Dichte im Kreislauf. Eine Behandlung von Patienten mit dem Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF), der aktuell als Standard Mobilisierungsmittel betrachtet wird, erhöht die Zahl der CD34⁺ Zellen im peripheren Blut (409). Der Granulozyten-

Makrophagen-CSF wurde zur Mobilisierung von CD34⁺ Zellen in Patienten nach Myokardinfarkt untersucht (410). Desweiteren wurden andere Agenzien wie der CXCR4-Chemokin-Rezeptor-Antagonist Plerixafor (AMD3100) (411), Statine (214, 412, 413), Erythropoetin (212), VEGF, (210, 414-416) und Angiopoietin-I (211) getestet. Alle konnten die periphere Mobilisierung von CD34⁺ Zellen wirksam fördern. Die Entdeckung von Agenzien, die CD34⁺ Zellen aus ihrer Knochenmarknische in das periphere Blut (wo sie gesammelt und purifiziert werden können) mobilisieren, hat das therapeutische Feld erheblich verstärkt.

Die Verwendung von autologen Zellen vermeidet Komplikationen, die mit der Transplantation von Spenderzellen in Verbindung stehen. Die potentielle Toxizität von immunsuppressiven Medikamenten kann ebenfalls vermieden werden. Vieljährige Erfahrung im Bereich der autologen Zelltransplantation in diversen hämatologischen und immunologischen Erkrankungen führte uns zu einem definierten Sicherheitsprofil für die autologe CD34⁺ Zelltransplantation. Dies, zusammen mit ihrer nachgewiesenen Wirksamkeit in präklinischen ischämischen Modellen, weist auf einen Einsatz autologer Stammzellen als eine attraktive Option zur Gewebereparatur bei ischämischen Erkrankungen hin.

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Das regenerative Potential von Stamm- und Progenitorzellen ist ein mehrstufiger Prozess, der die Mobilisierung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark oder peripheren Nischen in das periphere Blut, die Chemotaxis in das gezielte Gewebe, die Adhäsion an der Gefäßwand, das Überleben sowie Engraftment in das lokale Gewebe, die Differenzierung in reife funktionelle Zelltypen und die Proliferation einschließt.

Sowohl das Engraftment und Homing nach der Transplantation von CD34⁺ Zellen im Knochenmark bei Patienten mit Krebs als auch die Domizilierung der mobilisierten CD34⁺ Zellen in das periphere Blut nach akuter Ischämie, sind pathophysiologische Phänomene mit einem gemeinsamen Schritt: Die Adhäsion von CD34⁺ Zellen an der Gefäßwand. Alle Schritte der Adhäsionskaskade werden durch Zelladhäsionsmoleküle, die sowohl auf den Progenitorzellen als auch auf Endothelzellen vorkommen, reguliert. Zelluläre Adhäsionsmoleküle erscheinen daher als vielversprechende Ziele für pharmakologische Interventionen nach einem Myokardinfarkt.

Thrombozyten sind in allen Phasen der Rekrutierung der Progenitorzellen in die Gefäßwand von großer Bedeutung (306, 336, 347, 398). Wir und andere haben bereits gezeigt, dass murine und humane Progenitorzellen *in vitro* an immobilisierten Thrombozyten haften und *in vivo*, in die Gefäßwand rekrutiert werden. Dabei sind die Bindung des Chemokin stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) an CXCR4 und den Adhäsionsrezeptoren P-Selektin/P-Selektin Glykoprotein-Ligand-1 sowie die Bindung von JAM-A an JAM-A oder LFA-1 beteiligt (67, 122, 124, 126, 319, 345).

Das dritte Mitglied der JAM Familie, JAM-C, auch JAM-3 genannt, wurde ursprünglich als ein neuer Counterrezeptor auf Thrombozyten für das Leukozyten- β 2-Integrin-MAC-1 ($\alpha_M\beta_2$, CD11b/CD18) beschrieben (262, 295). Neue Studienergebnisse heben die Rolle von JAM-C bei der Aufrechterhaltung von Integrität und Funktion der myelinisierten peripheren Nerven, bei der transendothelialen Migration von Monozyten und Neutrophilen Granulozyten, im Entzündungsgebiet und bei der Endothelpermeabilität, hervor (262, 308, 417).

Unsere bereits publizierte Studie konnte zum ersten Mal zeigen, dass das thrombozytäre JAM-C teilweise die thrombozyteninduzierte Adhäsion von humanen CD34⁺ Zellen vermittelt. Bezüglich der thrombozyteninduzierten Differenzierung in Endothelzellen oder Makrophagen/Schaumzellen wurde keine Wirkung beobachtet (322). Zusammengenommen implizieren die vorliegenden Ergebnisse, dass das thrombozytäre JAM-C die Rekrutierung von zirkulierenden CD34⁺ Zellen in Richtung immobilisierter Thrombozyten vermittelt. Dies könnte eine entscheidende Rolle bei dem Engraftment/der Domizilierung zirkulierender CD34⁺ Progenitorzellen an die Gefäßwand spielen. Weitere Studien werden benötigt, um die *in-vivo*-Relevanz unserer Ergebnisse zu erläutern.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: CD34⁺ Zellen besitzen eine essenzielle Rolle in der Hämatopoese und vaskulären Homöostase. Das Ziel unserer Studie war, erstens, *in vitro* die Rolle des thrombozytären JAM-C bei der Adhäsion und anschließenden Differenzierung von humanen CD34⁺ Zellen zu endothelialen Progenitorzellen zu analysieren sowie zweitens, seine Assoziation mit dem thrombozytären P-Selektin bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit zu untersuchen.

Methoden und Ergebnisse: Mittels Durchflusszytometrie beobachteten wir, dass *in vitro* die JAM-C-Expression auf der Oberfläche von Thrombozyten, nach Thrombozytenaktivierung, erhöht ist. Die JAM-C-Expression korrelierte mit der Expression des thrombozytären P-Selektin in Patienten mit koronarer Herzkrankheit ($r=0,301$, $P=0,01$). Die Rolle des JAM-C und seines Counter-Rezeptors MAC-1 bei der Adhäsion von humanen CD34⁺ Zellen über immobilisierten Thrombozyten, wurde jeweils, unter Verwendung eines neutralisierenden löslichen Proteins (sJAMC-Fc) und eines monoklonalen Antikörpers gegen JAM-C oder Integrin MAC-1 (CD11b/CD18), untersucht. Die Behandlung mit löslichem JAM-C-Fc, anti-JAM-C oder anti-MAC-1 ergab, im Gegensatz zu einer Vorbehandlung mit Control-Fc oder IgG1, eine signifikant verminderte Adhäsion von humanen CD34⁺ Zellen an immobilisierten Thrombozyten unter statischen Bedingungen ($P<0,05$). Um unsere Ergebnisse unter hoher Scherspannung, ähnlich der arteriellen Strömung, zu validieren, führten wir Perfusionsexperimente in einer Flusskammer durch. Auch unter hoher Scherspannung führte die Hemmung der JAM-C/MAC-1 Interaktion zu einer signifikant verringerten Adhäsion von CD34⁺ Zellen über immobilisierten Thrombozyten ($P<0,05$). Mittels endothelialer Kolonienbildungstests und Kokulturen konnten wir zeigen, dass die Thrombozyten-vermittelte Differenzierung von CD34⁺ Zellen zu Endothelzellen oder Makrophagen/Schaumzellen, durch die Hemmung der JAM-C/MAC-1-Achse, unbeeinflussbar bleibt.

Schlussfolgerungen: In Anbetracht dieser Ergebnisse kann man behaupten, dass thrombozytäres JAM-C die CD34⁺ Zelladhäsion unterstützt. Dieser Mechanismus kann möglicherweise am Homing sowie an der Domizilierung von humanen CD34⁺ Zellen beteiligt sein.

7. ABSTRACT

Background: CD34⁺ progenitor cells play an important role in haematopoiesis and vascular homeostasis. The aim of the present study was to investigate the role of platelet-derived junctional adhesion molecule-C (JAM-C) in adhesion and differentiation of human CD34⁺ cells *in vitro*, as well as its association with platelet-derived P-selectin in patients with coronary artery disease.

Methods and Results: Using flow cytometry we observed that JAM-C expression on the surface of platelets is increased after activation with thrombin receptor activating peptide-6 *in vitro* and correlated with platelet-derived P-selectin expression in patients with coronary artery disease ($r=0.301$, $P=0.01$). The role of JAM-C and its counter receptor MAC-1 in adhesion of human CD34⁺ cells over immobilized platelets was investigated by using a neutralizing soluble protein (sJAM-C-Fc) and a monoclonal antibody against JAM-C or integrin MAC-1 (CD11b/CD18). Treatment with soluble JAM-C-Fc or anti-JAM-C or anti-MAC-1, but not with control-Fc or IgG1, resulted in a significantly decreased adhesion of human CD34⁺ cells to platelets under static conditions ($P<0.05$). In order to validate our findings under high shear stress we performed flow chamber experiments. In a similar manner, inhibiting JAM-C interaction with MAC-1 resulted in a significantly decreased adhesion of CD34⁺ cells over immobilized platelets under high shear stress ($P<0.05$). Colony forming unit assays and coculture assays revealed that inhibition of JAM-C/MAC-1 axis did not influence the platelet-mediated differentiation of CD34⁺ cells to endothelial cells or to macrophages/foam cells.

Conclusions: Taken together a platelet-derived JAM-C supports CD34⁺ cell adhesion, a mechanism potentially involved in homing as well as domiciliation of human CD34⁺ cells.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(6801):233-41.
2. Gosswald A, Schienkiewitz A, Nowossadeck E, Busch MA. [Prevalence of myocardial infarction and coronary heart disease in adults aged 40-79 years in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2013;56(5-6):650-5.
3. Thygesen K, Alpert JS, White HD, Joint ESCAAHAWHFTFFtRoMI. Universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(22):2173-95.
4. Mehta LS, Beckie TM, DeVon HA, Grines CL, Krumholz HM, Johnson MN, et al. Acute Myocardial Infarction in Women: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2016;133(9):916-47.
5. Mayerl C, Lukasser M, Sedivy R, Niederegger H, Seiler R, Wick G. Atherosclerosis research from past to present--on the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow. *Virchows Arch*. 2006;449(1):96-103.
6. Collins T, Cybulsky MI. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest*. 2001;107(3):255-64.
7. Chen XL, Grey JY, Thomas S, Qiu FH, Medford RM, Wasserman MA, et al. Sphingosine kinase-1 mediates TNF-alpha-induced MCP-1 gene expression in endothelial cells: upregulation by oscillatory flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287(4):H1452-8.
8. Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol*. 2010;7(2):77-86.
9. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420(6917):868-74.
10. Manduteanu I, Simionescu M. Inflammation in atherosclerosis: a cause or a result of vascular disorders? *J Cell Mol Med*. 2012;16(9):1978-90.
11. Libby P, Aikawa M. Evolution and stabilization of vulnerable atherosclerotic plaques. *Jpn Circ J*. 2001;65(6):473-9.
12. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. 1999;138(5 Pt 2):S419-20.

13. Markus HS, Droste DW, Kaps M, Larrue V, Lees KR, Siebler M, et al. Dual antiplatelet therapy with clopidogrel and aspirin in symptomatic carotid stenosis evaluated using doppler embolic signal detection: the Clopidogrel and Aspirin for Reduction of Emboli in Symptomatic Carotid Stenosis (CARESS) trial. *Circulation*. 2005;111(17):2233-40.
14. Van de Werf F, Bax J, Betriu A, Blomstrom-Lundqvist C, Crea F, Falk V, et al. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2008;29(23):2909-45.
15. Goldstein LB, Samsa GP, Matchar DB, Oddone EZ. Multicenter review of preoperative risk factors for endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. *Stroke*. 1998;29(4):750-3.
16. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35(3):569-82.
17. Pfeffer MA, Hennekens CH. When a question has an answer: rationale for our early termination of the HEART Trial. *Am J Cardiol*. 1995;75(16):1173-5.
18. Josan K, Majumdar SR, McAlister FA. The efficacy and safety of intensive statin therapy: a meta-analysis of randomized trials. *CMAJ*. 2008;178(5):576-84.
19. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, et al. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med*. 1997;336(16):1131-41.
20. Krakauer H, Lin MJ, Bailey RC. Projected survival benefit as criterion for listing and organ allocation in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(6):680-9.
21. Sun R, Li X, Liu M, Zeng Y, Chen S, Zhang P. Advances in stem cell therapy for cardiovascular disease (Review). *Int J Mol Med*. 2016;38(1):23-9.
22. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*. 1997;88(3):287-98.
23. Beddington RS, Robertson EJ. An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development*. 1989;105(4):733-7.

24. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 2004;116(5):639-48.
25. Barrilleaux B, Phinney DG, Prockop DJ, O'Connor KC. Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells. *Tissue Eng*. 2006;12(11):3007-19.
26. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41-9.
27. Ratajczak MZ, Machalinski B, Wojakowski W, Ratajczak J, Kucia M. A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Leukemia*. 2007;21(5):860-7.
28. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*. 2001;107(11):1395-402.
29. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105(1):93-8.
30. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004;95(4):343-53.
31. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*. 2003;9(6):702-12.
32. Nakayama H, Enzan H, Miyazaki E, Kuroda N, Naruse K, Hiroi M. Differential expression of CD34 in normal colorectal tissue, peritumoral inflammatory tissue, and tumour stroma. *J Clin Pathol*. 2000;53(8):626-9.
33. Delia D, Lampugnani MG, Resnati M, Dejana E, Aiello A, Fontanella E, et al. CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro. *Blood*. 1993;81(4):1001-8.
34. Fennie C, Cheng J, Dowbenko D, Young P, Lasky LA. CD34+ endothelial cell lines derived from murine yolk sac induce the proliferation and differentiation of yolk sac CD34+ hematopoietic progenitors. *Blood*. 1995;86(12):4454-67.
35. Lin G, Finger E, Gutierrez-Ramos JC. Expression of CD34 in endothelial cells, hematopoietic progenitors and nervous cells in fetal and adult mouse tissues. *Eur J Immunol*. 1995;25(6):1508-16.

36. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol.* 1984;133(1):157-65.
37. Tindle RW, Nichols RA, Chan L, Campana D, Catovsky D, Birnie GD. A novel monoclonal antibody BI-3C5 recognises myeloblasts and non-B non-T lymphoblasts in acute leukaemias and CGL blast crises, and reacts with immature cells in normal bone marrow. *Leuk Res.* 1985;9(1):1-9.
38. Cheng J, Baumhueter S, Cacalano G, Carver-Moore K, Thibodeaux H, Thomas R, et al. Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34. *Blood.* 1996;87(2):479-90.
39. Baumhuter S, Singer MS, Henzel W, Hemmerich S, Renz M, Rosen SD, et al. Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science.* 1993;262(5132):436-8.
40. Hu MC, Chien SL. The cytoplasmic domain of stem cell antigen CD34 is essential for cytoadhesion signaling but not sufficient for proliferation signaling. *Blood.* 1998;91(4):1152-62.
41. Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(26):12240-4.
42. Majdic O, Stockl J, Pickl WF, Bohuslav J, Strobl H, Scheinecker C, et al. Signaling and induction of enhanced cytoadhesiveness via the hematopoietic progenitor cell surface molecule CD34. *Blood.* 1994;83(5):1226-34.
43. Furness SG, McNagny K. Beyond mere markers: functions for CD34 family of sialomucins in hematopoiesis. *Immunol Res.* 2006;34(1):13-32.
44. Doyonnas R, Nielsen JS, Chelliah S, Drew E, Hara T, Miyajima A, et al. Podocalyxin is a CD34-related marker of murine hematopoietic stem cells and embryonic erythroid cells. *Blood.* 2005;105(11):4170-8.
45. Suzuki A, Andrew DP, Gonzalo JA, Fukumoto M, Spellberg J, Hashiyama M, et al. CD34-deficient mice have reduced eosinophil accumulation after allergen exposure and show a novel crossreactive 90-kD protein. *Blood.* 1996;87(9):3550-62.
46. Wagemaker G, van Gils FC, Burger H, Dorssers LC, van Leen RW, Persoon NL, et al. Highly increased production of bone marrow-derived blood

cells by administration of homologous interleukin-3 to rhesus monkeys. *Blood*. 1990;76(11):2235-41.

47. Berenson RJ, Bensinger WI, Hill RS, Andrews RG, Garcia-Lopez J, Kalamasz DF, et al. Engraftment after infusion of CD34+ marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma. *Blood*. 1991;77(8):1717-22.

48. Peters C, Cornish JM, Parikh SH, Kurtzberg J. Stem cell source and outcome after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children and adolescents with acute leukemia. *Pediatr Clin North Am*. 2010;57(1):27-46.

49. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001;103(23):2776-9.

50. Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, et al. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood*. 2005;105(1):199-206.

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

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

53. Taguchi A, Matsuyama T, Moriwaki H, Hayashi T, Hayashida K, Nagatsuka K, et al. Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation*. 2004;109(24):2972-5.

54. Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, Malagutti P, et al. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation*. 2004;110(10):1209-12.

55. Heiss C, Keymel S, Niesler U, Ziemann J, Kelm M, Kalka C. Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(9):1441-8.

56. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, et al. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(8):1442-7.

57. Pai M, Zacharoulis D, Milicevic MN, Helmy S, Jiao LR, Levicar N, et al. Autologous infusion of expanded mobilized adult bone marrow-derived CD34+ cells into patients with alcoholic liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol.* 2008;103(8):1952-8.
58. Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ Res.* 2012;110(4):624-37.
59. Shantsila E, Wrigley BJ, Shantsila A, Tapp LD, Gill PS, Lip GY. Monocyte-derived and CD34+/KDR+ endothelial progenitor cells in heart failure. *J Thromb Haemost.* 2012;10(7):1252-61.
60. Chantzichristos VG, Agouridis AP, Moutzouri E, Stellos K, Elisaf MS, Tselepis AD. Effect of rosuvastatin or its combination with omega-3 fatty acids on circulating CD34(+) progenitor cells and on endothelial colony formation in patients with mixed dyslipidaemia. *Atherosclerosis.* 2016;251:240-7.
61. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation.* 2004;109(2):220-6.
62. Bonsignore MR, Morici G, Santoro A, Pagano M, Cascio L, Bonanno A, et al. Circulating hematopoietic progenitor cells in runners. *J Appl Physiol (1985).* 2002;93(5):1691-7.
63. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275(5302):964-7.
64. Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID. Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties. *J Exp Med.* 1989;169(5):1721-31.
65. Baumhueter S, Dybdal N, Kyle C, Lasky LA. Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood.* 1994;84(8):2554-65.
66. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood.* 1990;75(12):2417-26.

67. de Boer HC, Hovens MM, van Oeveren-Rietdijk AM, Snoep JD, de Koning EJ, Tamsma JT, et al. Human CD34+/KDR+ cells are generated from circulating CD34+ cells after immobilization on activated platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(2):408-15.
68. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med.* 2005;353(10):999-1007.
69. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;938:221-9; discussion 9-30.
70. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature.* 2004;428(6983):668-73.
71. Yeh ET, Zhang S, Wu HD, Korbling M, Willerson JT, Estrov Z. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation.* 2003;108(17):2070-3.
72. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature.* 2004;428(6983):664-8.
73. Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M, Oyamada A, Nakamori S, Nishimura H, et al. Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction. *Circulation.* 2006;113(10):1311-25.
74. Zhang S, Wang D, Estrov Z, Raj S, Willerson JT, Yeh ET. Both cell fusion and transdifferentiation account for the transformation of human peripheral blood CD34-positive cells into cardiomyocytes in vivo. *Circulation.* 2004;110(25):3803-7.
75. Zhang S, Shpall E, Willerson JT, Yeh ET. Fusion of human hematopoietic progenitor cells and murine cardiomyocytes is mediated by alpha 4 beta 1 integrin/vascular cell adhesion molecule-1 interaction. *Circ Res.* 2007;100(5):693-702.

76. Kawamoto A, Iwasaki H, Kusano K, Murayama T, Oyamada A, Silver M, et al. CD34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells. *Circulation*. 2006;114(20):2163-9.
77. Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Deliliers GL. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol*. 2001;115(1):186-94.
78. Passier R, Mummery C. Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovasc Res*. 2003;58(2):324-35.
79. Tongers J, Losordo DW, Landmesser U. Stem and progenitor cell-based therapy in ischaemic heart disease: promise, uncertainties, and challenges. *Eur Heart J*. 2011;32(10):1197-206.
80. Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, et al. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol*. 2001;154(3):485-90.
81. Willoughby S, Holmes A, Loscalzo J. Platelets and cardiovascular disease. *Eur J Cardiovasc Nurs*. 2002;1(4):273-88.
82. Pitsilos S, Hunt J, Mohler ER, Prabhakar AM, Poncz M, Dawicki J, et al. Platelet factor 4 localization in carotid atherosclerotic plaques: correlation with clinical parameters. *Thromb Haemost*. 2003;90(6):1112-20.
83. Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, Kislinger T, Belton O, McRedmond JP, et al. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood*. 2004;103(6):2096-104.
84. Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med*. 2002;196(7):887-96.
85. Panigrahi S, Ma Y, Hong L, Gao D, West XZ, Salomon RG, et al. Engagement of platelet toll-like receptor 9 by novel endogenous ligands promotes platelet hyperreactivity and thrombosis. *Circ Res*. 2013;112(1):103-12.
86. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human

coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001;104(13):1533-7.

87. Rossaint J, Herter JM, Van Aken H, Napirei M, Doring Y, Weber C, et al. Synchronized integrin engagement and chemokine activation is crucial in neutrophil extracellular trap-mediated sterile inflammation. *Blood*. 2014;123(16):2573-84.

88. Koenen RR, von Hundelshausen P, Nesmelova IV, Zerneck A, Liehn EA, Sarabi A, et al. Disrupting functional interactions between platelet chemokines inhibits atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *Nat Med*. 2009;15(1):97-103.

89. Strussmann T, Tillmann S, Wirtz T, Bucala R, von Hundelshausen P, Bernhagen J. Platelets are a previously unrecognised source of MIF. *Thromb Haemost*. 2013;110(5):1004-13.

90. Daub K, Seizer P, Stellos K, Kramer BF, Bigalke B, Schaller M, et al. Oxidized LDL-activated platelets induce vascular inflammation. *Semin Thromb Hemost*. 2010;36(2):146-56.

91. Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res*. 2010;107(9):1047-57.

92. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, et al. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis*. 2000;148(1):75-85.

93. Burger PC, Wagner DD. Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood*. 2003;101(7):2661-6.

94. Lievens D, Zerneck A, Seijkens T, Soehnlein O, Beckers L, Munnix IC, et al. Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis. *Blood*. 2010;116(20):4317-27.

95. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*. 2005;115(12):3378-84.

96. Nording HM, Seizer P, Langer HF. Platelets in inflammation and atherogenesis. *Front Immunol*. 2015;6:98.

97. Acosta J, Qin X, Halperin J. Complement and complement regulatory proteins as potential molecular targets for vascular diseases. *Curr Pharm Des.* 2004;10(2):203-11.
98. Giannakopoulos B, Passam F, Rahgozar S, Krillis SA. Current concepts on the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Blood.* 2007;109(2):422-30.
99. Peerschke EI, Yin W, Ghebrehiwet B. Complement activation on platelets: implications for vascular inflammation and thrombosis. *Mol Immunol.* 2010;47(13):2170-5.
100. Back J, Lang MH, Elgue G, Kalbitz M, Sanchez J, Ekdahl KN, et al. Distinctive regulation of contact activation by antithrombin and C1-inhibitor on activated platelets and material surfaces. *Biomaterials.* 2009;30(34):6573-80.
101. Hamad OA, Nilsson PH, Wouters D, Lambris JD, Ekdahl KN, Nilsson B. Complement component C3 binds to activated normal platelets without preceding proteolytic activation and promotes binding to complement receptor 1. *J Immunol.* 2010;184(5):2686-92.
102. Patzelt J, Mueller KA, Breuning S, Karathanos A, Schleicher R, Seizer P, et al. Expression of anaphylatoxin receptors on platelets in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 2015;238(2):289-95.
103. Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R. Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. *Heart Lung Circ.* 2013;22(6):399-411.
104. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, et al. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med.* 2003;349(24):2316-25.
105. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(10):2054-61.
106. Cabeza N, Li Z, Schulz C, Kremmer E, Massberg S, Bultmann A, et al. Surface expression of collagen receptor Fc receptor-gamma/glycoprotein VI is enhanced on platelets in type 2 diabetes and mediates release of CD40 ligand and activation of endothelial cells. *Diabetes.* 2004;53(8):2117-21.

107. Jandrot-Perrus M, Busfield S, Lagrue AH, Xiong X, Debili N, Chickering T, et al. Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood*. 2000;96(5):1798-807.
108. Massberg S, Konrad I, Bultmann A, Schulz C, Munch G, Peluso M, et al. Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo. *FASEB J*. 2004;18(2):397-9.
109. Gawaz M, Neumann FJ, Schomig A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease : consequences for diagnosis and therapy. *Circulation*. 1999;99(1):E1-E11.
110. Schwartz RS, Topol EJ, Serruys PW, Sangiorgi G, Holmes DR, Jr. Artery size, neointima, and remodeling: time for some standards. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32(7):2087-94.
111. Massberg S, Gawaz M, Gruner S, Schulte V, Konrad I, Zohlnhofer D, et al. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med*. 2003;197(1):41-9.
112. Gawaz MP, Loftus JC, Bajt ML, Frojmovic MM, Plow EF, Ginsberg MH. Ligand bridging mediates integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIB-IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions. *J Clin Invest*. 1991;88(4):1128-34.
113. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, et al. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation*. 1998;98(12):1164-71.
114. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*. 2003;102(2):449-61.
115. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*. 2002;8(11):1227-34.
116. Plow EF, Byzova T. The biology of glycoprotein IIb-IIIa. *Coron Artery Dis*. 1999;10(8):547-51.
117. Nurden AT. Platelets and tissue remodeling: extending the role of the blood clotting system. *Endocrinology*. 2007;148(7):3053-5.
118. Gospodarowicz D, Brown KD, Birdwell CR, Zetter BR. Control of proliferation of human vascular endothelial cells. Characterization of the

response of human umbilical vein endothelial cells to fibroblast growth factor, epidermal growth factor, and thrombin. *J Cell Biol.* 1978;77(3):774-88.

119. Maruyama N, Hirano F, Yoshikawa N, Migita K, Eguchi K, Tanaka H. Thrombin stimulates cell proliferation in human fibroblast-like synoviocytes in nuclear factor-kappaB activation and protein kinase C mediated pathway. *J Rheumatol.* 2000;27(12):2777-85.

120. Bar-Shavit R, Kahn AJ, Mann KG, Wilner GD. Identification of a thrombin sequence with growth factor activity on macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(4):976-80.

121. Tsopanoglou NE, Pipili-Synetos E, Maragoudakis ME. Thrombin promotes angiogenesis by a mechanism independent of fibrin formation. *Am J Physiol.* 1993;264(5 Pt 1):C1302-7.

122. Massberg S, Konrad I, Schurzinger K, Lorenz M, Schneider S, Zohlnhoefer D, et al. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med.* 2006;203(5):1221-33.

123. Xu X, Zhu F, Zhang M, Zeng D, Luo D, Liu G, et al. Stromal cell-derived factor-1 enhances wound healing through recruiting bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the wound area and promoting neovascularization. *Cells Tissues Organs.* 2013;197(2):103-13.

124. Stellos K, Langer H, Daub K, Schoenberger T, Gauss A, Geisler T, et al. Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells. *Circulation.* 2008;117(2):206-15.

125. Bermudez DM, Xu J, Herdrich BJ, Radu A, Mitchell ME, Liechty KW. Inhibition of stromal cell-derived factor-1alpha further impairs diabetic wound healing. *J Vasc Surg.* 2011;53(3):774-84.

126. Daub K, Langer H, Seizer P, Stellos K, May AE, Goyal P, et al. Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells. *FASEB J.* 2006;20(14):2559-61.

127. Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol.* 2007;28(7):299-307.

128. De Falco E, Porcelli D, Torella AR, Straino S, Iachininoto MG, Orlandi A, et al. SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. *Blood*. 2004;104(12):3472-82.
129. Salvucci O, Yao L, Villalba S, Sajewicz A, Pittaluga S, Tosato G. Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1. *Blood*. 2002;99(8):2703-11.
130. Battinelli EM, Markens BA, Italiano JE, Jr. Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis. *Blood*. 2011;118(5):1359-69.
131. Gawaz M, Vogel S. Platelets in tissue repair: control of apoptosis and interactions with regenerative cells. *Blood*. 2013;122(15):2550-4.
132. Li L, Blumenthal DK, Terry CM, He Y, Carlson ML, Cheung AK. PDGF-induced proliferation in human arterial and venous smooth muscle cells: molecular basis for differential effects of PDGF isoforms. *J Cell Biochem*. 2011;112(1):289-98.
133. Liu MW, Roubin GS, King SB, 3rd. Restenosis after coronary angioplasty. Potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. *Circulation*. 1989;79(6):1374-87.
134. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*. 2008;22(10):1276-312.
135. Ho-Tin-Noe B, Goerge T, Cifuni SM, Duerschmied D, Wagner DD. Platelet granule secretion continuously prevents intratumor hemorrhage. *Cancer Res*. 2008;68(16):6851-8.
136. Goerge T, Ho-Tin-Noe B, Carbo C, Benarafa C, Remold-O'Donnell E, Zhao BQ, et al. Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. *Blood*. 2008;111(10):4958-64.
137. Weyrich AS, Schwertz H, Kraiss LW, Zimmerman GA. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *J Thromb Haemost*. 2009;7(2):241-6.
138. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(9):678-89.
139. Wagner DD, Frenette PS. The vessel wall and its interactions. *Blood*. 2008;111(11):5271-81.

140. Hammer DA, Apte SM. Simulation of cell rolling and adhesion on surfaces in shear flow: general results and analysis of selectin-mediated neutrophil adhesion. *Biophys J*. 1992;63(1):35-57.
141. Cummings RD, McEver RP. C-type Lectins. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY)2009.
142. McEver RP. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr Opin Cell Biol*. 2002;14(5):581-6.
143. Zarbock A, Muller H, Kuwano Y, Ley K. PSGL-1-dependent myeloid leukocyte activation. *J Leukoc Biol*. 2009;86(5):1119-24.
144. Miner JJ, Xia L, Yago T, Kappelmayer J, Liu Z, Klopocki AG, et al. Separable requirements for cytoplasmic domain of PSGL-1 in leukocyte rolling and signaling under flow. *Blood*. 2008;112(5):2035-45.
145. Lam FW, Burns AR, Smith CW, Rumbaut RE. Platelets enhance neutrophil transendothelial migration via P-selectin glycoprotein ligand-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300(2):H468-75.
146. Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science*. 1998;279(5349):381-4.
147. Grabovsky V, Feigelson S, Chen C, Bleijs DA, Peled A, Cinnamon G, et al. Subsecond induction of alpha4 integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions. *J Exp Med*. 2000;192(4):495-506.
148. Clemetson KJ, Clemetson JM, Proudfoot AE, Power CA, Baggiolini M, Wells TN. Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4, and CXCR4 chemokine receptors on human platelets. *Blood*. 2000;96(13):4046-54.
149. Galt SW, Lindemann S, Medd D, Allen LL, Kraiss LW, Harris ES, et al. Differential regulation of matrix metalloproteinase-9 by monocytes adherent to collagen and platelets. *Circ Res*. 2001;89(6):509-16.
150. Lindemann SW, Weyrich AS, Zimmerman GA. Signaling to translational control pathways: diversity in gene regulation in inflammatory and vascular cells. *Trends Cardiovasc Med*. 2005;15(1):9-17.

151. Weyrich AS, McIntyre TM, McEver RP, Prescott SM, Zimmerman GA. Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor-alpha secretion. Signal integration and NF-kappa B translocation. *J Clin Invest.* 1995;95(5):2297-303.
152. Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL, Morrissey JH, et al. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest.* 1996;97(6):1525-34.
153. Evangelista V, Pamuklar Z, Piccoli A, Manarini S, Dell'elba G, Pecce R, et al. Src family kinases mediate neutrophil adhesion to adherent platelets. *Blood.* 2007;109(6):2461-9.
154. Hidalgo A, Peired AJ, Wild MK, Vestweber D, Frenette PS. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity.* 2007;26(4):477-89.
155. Hidalgo A, Chang J, Jang JE, Peired AJ, Chiang EY, Frenette PS. Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury. *Nat Med.* 2009;15(4):384-91.
156. Vieira-de-Abreu A, Campbell RA, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Semin Immunopathol.* 2012;34(1):5-30.
157. Passacquale G, Vamadevan P, Pereira L, Hamid C, Corrigall V, Ferro A. Monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes. *PLoS One.* 2011;6(10):e25595.
158. Kuckleburg CJ, Yates CM, Kalia N, Zhao Y, Nash GB, Watson SP, et al. Endothelial cell-borne platelet bridges selectively recruit monocytes in human and mouse models of vascular inflammation. *Cardiovasc Res.* 2011;91(1):134-41.
159. Smyth SS, McEver RP, Weyrich AS, Morrell CN, Hoffman MR, Arepally GM, et al. Platelet functions beyond hemostasis. *J Thromb Haemost.* 2009;7(11):1759-66.
160. Barnard MR, Linden MD, Frelinger AL, 3rd, Li Y, Fox ML, Furman MI, et al. Effects of platelet binding on whole blood flow cytometry assays of monocyte and neutrophil procoagulant activity. *J Thromb Haemost.* 2005;3(11):2563-70.
161. Brambilla M, Camera M, Colnago D, Marenzi G, De Metrio M, Giesen PL, et al. Tissue factor in patients with acute coronary syndromes: expression in

platelets, leukocytes, and platelet-leukocyte aggregates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(5):947-53.

162. Polanowska-Grabowska R, Wallace K, Field JJ, Chen L, Marshall MA, Figler R, et al. P-selectin-mediated platelet-neutrophil aggregate formation activates neutrophils in mouse and human sickle cell disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(12):2392-9.

163. Rinder HM, Tracey JL, Rinder CS, Leitenberg D, Smith BR. Neutrophil but not monocyte activation inhibits P-selectin-mediated platelet adhesion. *Thromb Haemost.* 1994;72(5):750-6.

164. Lorant DE, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL, Prescott SM, Zimmerman GA. Activation of polymorphonuclear leukocytes reduces their adhesion to P-selectin and causes redistribution of ligands for P-selectin on their surfaces. *J Clin Invest.* 1995;96(1):171-82.

165. Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol.* 2004;25(9):489-95.

166. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med.* 2007;357(24):2482-94.

167. Garraud O, Cognasse F. Platelet Toll-like receptor expression: the link between "danger" ligands and inflammation. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2010;9(5):322-33.

168. Elzey BD, Ratliff TL, Sowa JM, Crist SA. Platelet CD40L at the interface of adaptive immunity. *Thromb Res.* 2011;127(3):180-3.

169. Freedman JE, Loscalzo J. Platelet-monocyte aggregates: bridging thrombosis and inflammation. *Circulation.* 2002;105(18):2130-2.

170. van Gils JM, Zwaginga JJ, Hordijk PL. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol.* 2009;85(2):195-204.

171. Panes J, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology.* 1998;114(5):1066-90.

172. Weber C, Fraemohs L, Dejana E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(6):467-77.

173. Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev.* 1999;79(1):181-213.

174. Ley K. Functions of selectins. *Results Probl Cell Differ.* 2001;33:177-200.
175. Yang J, Hirata T, Croce K, Merrill-Skoloff G, Tchernychev B, Williams E, et al. Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration. *J Exp Med.* 1999;190(12):1769-82.
176. Zarbock A, Lowell CA, Ley K. Spleen tyrosine kinase Syk is necessary for E-selectin-induced alpha(L)beta(2) integrin-mediated rolling on intercellular adhesion molecule-1. *Immunity.* 2007;26(6):773-83.
177. Alon R, Feigelson S. From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. *Semin Immunol.* 2002;14(2):93-104.
178. Broermann A, Winderlich M, Block H, Frye M, Rossaint J, Zarbock A, et al. Dissociation of VE-PTP from VE-cadherin is required for leukocyte extravasation and for VEGF-induced vascular permeability in vivo. *J Exp Med.* 2011;208(12):2393-401.
179. Rowe RG, Weiss SJ. Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends Cell Biol.* 2008;18(11):560-74.
180. Heit B, Robbins SM, Downey CM, Guan Z, Colarusso P, Miller BJ, et al. PTEN functions to 'prioritize' chemotactic cues and prevent 'distraction' in migrating neutrophils. *Nat Immunol.* 2008;9(7):743-52.
181. Sarris M, Masson JB, Maurin D, Van der Aa LM, Boudinot P, Lortat-Jacob H, et al. Inflammatory chemokines direct and restrict leukocyte migration within live tissues as glycan-bound gradients. *Curr Biol.* 2012;22(24):2375-82.
182. Voisin MB, Nourshargh S. Neutrophil transmigration: emergence of an adhesive cascade within venular walls. *J Innate Immun.* 2013;5(4):336-47.
183. Crockett-Torabi E. Selectins and mechanisms of signal transduction. *J Leukoc Biol.* 1998;63(1):1-14.
184. Etzioni A, Frydman M, Pollack S, Avidor I, Phillips ML, Paulson JC, et al. Brief report: recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency. *N Engl J Med.* 1992;327(25):1789-92.
185. Etzioni A, Tonetti M. Leukocyte adhesion deficiency II-from A to almost Z. *Immunol Rev.* 2000;178:138-47.
186. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood.* 1996;88(9):3259-87.

187. Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(24):9238-42.
188. Hsu-Lin S, Berman CL, Furie BC, August D, Furie B. A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. Studies using a monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets. *J Biol Chem*. 1984;259(14):9121-6.
189. Hattori R, Hamilton KK, McEver RP, Sims PJ. Complement proteins C5b-9 induce secretion of high molecular weight multimers of endothelial von Willebrand factor and translocation of granule membrane protein GMP-140 to the cell surface. *J Biol Chem*. 1989;264(15):9053-60.
190. Setiadi H, Disdier M, Green SA, Canfield WM, McEver RP. Residues throughout the cytoplasmic domain affect the internalization efficiency of P-selectin. *J Biol Chem*. 1995;270(45):26818-26.
191. Zimmerman GA. Two by two: the pairings of P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(18):10023-4.
192. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000;12(2):121-7.
193. Nagasawa T, Nakajima T, Tachibana K, Iizasa H, Bleul CC, Yoshie O, et al. Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(25):14726-9.
194. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:217-42.
195. Blanchet X, Langer M, Weber C, Koenen RR, von Hundelshausen P. Touch of chemokines. *Front Immunol*. 2012;3:175.
196. Mantovani A. Chemokines. Introduction and overview. *Chem Immunol*. 1999;72:1-6.
197. Ward SG, Bacon K, Westwick J. Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction. *Immunity*. 1998;9(1):1-11.
198. Frangogiannis NG, Entman ML. Chemokines in myocardial ischemia. *Trends Cardiovasc Med*. 2005;15(5):163-9.

199. Takahashi M. Role of the SDF-1/CXCR4 system in myocardial infarction. *Circ J*. 2010;74(3):418-23.
200. Chavakis E, Carmona G, Urbich C, Gottig S, Henschler R, Penninger JM, et al. Phosphatidylinositol-3-kinase-gamma is integral to homing functions of progenitor cells. *Circ Res*. 2008;102(8):942-9.
201. Debnath B, Xu S, Grande F, Garofalo A, Neamati N. Small molecule inhibitors of CXCR4. *Theranostics*. 2013;3(1):47-75.
202. Domanska UM, Kruizinga RC, Nagengast WB, Timmer-Bosscha H, Huls G, de Vries EG, et al. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. *Eur J Cancer*. 2013;49(1):219-30.
203. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*. 2004;10(8):858-64.
204. Schober A, Karshovska E, Zerneck A, Weber C. SDF-1alpha-mediated tissue repair by stem cells: a promising tool in cardiovascular medicine? *Trends Cardiovasc Med*. 2006;16(4):103-8.
205. Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension*. 2005;45(3):321-5.
206. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000;95(3):952-8.
207. Powell TM, Paul JD, Hill JM, Thompson M, Benjamin M, Rodrigo M, et al. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(2):296-301.
208. Moore MA, Hattori K, Heissig B, Shieh JH, Dias S, Crystal RG, et al. Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;938:36-45; discussion -7.
209. Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*. 2003;107(9):1322-8.

210. Kalka C, Tehrani H, Laudenberg B, Vale PR, Isner JM, Asahara T, et al. VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *Ann Thorac Surg.* 2000;70(3):829-34.
211. Hattori K, Dias S, Heissig B, Hackett NR, Lyden D, Tateno M, et al. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 2001;193(9):1005-14.
212. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood.* 2003;102(4):1340-6.
213. Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, et al. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation.* 2003;107(24):3059-65.
214. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest.* 2001;108(3):391-7.
215. Mazo IB, Massberg S, von Andrian UH. Hematopoietic stem and progenitor cell trafficking. *Trends Immunol.* 2011;32(10):493-503.
216. Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, Petit I, Franitza S, Grabovsky V, et al. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood.* 2000;95(11):3289-96.
217. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(1):11-21.
218. Semerad CL, Christopher MJ, Liu F, Short B, Simmons PJ, Winkler I, et al. G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood.* 2005;106(9):3020-7.
219. Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Simmons PJ, Bendall LJ. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest.* 2003;111(2):187-96.
220. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol.* 2002;3(7):687-94.

221. Christopherson KW, 2nd, Cooper S, Broxmeyer HE. Cell surface peptidase CD26/DPPIV mediates G-CSF mobilization of mouse progenitor cells. *Blood*. 2003;101(12):4680-6.
222. Campbell TB, Broxmeyer HE. CD26 inhibition and hematopoiesis: a novel approach to enhance transplantation. *Front Biosci*. 2008;13:1795-805.
223. Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Williams B, Winkler IG, Simmons PJ. Mobilization by either cyclophosphamide or granulocyte colony-stimulating factor transforms the bone marrow into a highly proteolytic environment. *Exp Hematol*. 2002;30(5):440-9.
224. Levesque JP, Liu F, Simmons PJ, Betsuyaku T, Senior RM, Pham C, et al. Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice. *Blood*. 2004;104(1):65-72.
225. Takagi J, Springer TA. Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol Rev*. 2002;186:141-63.
226. Hood JD, Cheresch DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(2):91-100.
227. Dustin ML, Springer TA. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol*. 1988;107(1):321-31.
228. Staunton DE, Dustin ML, Springer TA. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature*. 1989;339(6219):61-4.
229. Campanero MR, del Pozo MA, Arroyo AG, Sanchez-Mateos P, Hernandez-Caselles T, Craig A, et al. ICAM-3 interacts with LFA-1 and regulates the LFA-1/ICAM-1 cell adhesion pathway. *J Cell Biol*. 1993;123(4):1007-16.
230. Languino LR, Plescia J, Duperray A, Brian AA, Plow EF, Geltosky JE, et al. Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. *Cell*. 1993;73(7):1423-34.
231. Hoefler IE, van Royen N, Rectenwald JE, Deindl E, Hua J, Jost M, et al. Arteriogenesis proceeds via ICAM-1/Mac-1-mediated mechanisms. *Circ Res*. 2004;94(9):1179-85.

232. Wuthrich RP, Jevnikar AM, Takei F, Glimcher LH, Kelley VE. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression is upregulated in autoimmune murine lupus nephritis. *Am J Pathol.* 1990;136(2):441-50.
233. Shimizu Y, Van Seventer GA, Horgan KJ, Shaw S. Regulated expression and binding of three VLA (beta 1) integrin receptors on T cells. *Nature.* 1990;345(6272):250-3.
234. van Dinther-Janssen AC, Horst E, Koopman G, Newmann W, Scheper RJ, Meijer CJ, et al. The VLA-4/VCAM-1 pathway is involved in lymphocyte adhesion to endothelium in rheumatoid synovium. *J Immunol.* 1991;147(12):4207-10.
235. Williams AF, Barclay AN. The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol.* 1988;6:381-405.
236. Malergue F, Galland F, Martin F, Mansuelle P, Aurrand-Lions M, Naquet P. A novel immunoglobulin superfamily junctional molecule expressed by antigen presenting cells, endothelial cells and platelets. *Mol Immunol.* 1998;35(17):1111-9.
237. Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, et al. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol.* 1998;142(1):117-27.
238. Cunningham SA, Arrate MP, Rodriguez JM, Bjercke RJ, Vanderslice P, Morris AP, et al. A novel protein with homology to the junctional adhesion molecule. Characterization of leukocyte interactions. *J Biol Chem.* 2000;275(44):34750-6.
239. Palmeri D, van Zante A, Huang CC, Hemmerich S, Rosen SD. Vascular endothelial junction-associated molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is localized to intercellular boundaries of endothelial cells. *J Biol Chem.* 2000;275(25):19139-45.
240. Arrate MP, Rodriguez JM, Tran TM, Brock TA, Cunningham SA. Cloning of human junctional adhesion molecule 3 (JAM3) and its identification as the JAM2 counter-receptor. *J Biol Chem.* 2001;276(49):45826-32.
241. Aurrand-Lions M, Duncan L, Ballestrem C, Imhof BA. JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells. *J Biol Chem.* 2001;276(4):2733-41.

242. Hirabayashi S, Tajima M, Yao I, Nishimura W, Mori H, Hata Y. JAM4, a junctional cell adhesion molecule interacting with a tight junction protein, MAGI-1. *Mol Cell Biol*. 2003;23(12):4267-82.
243. Moog-Lutz C, Cave-Riant F, Guibal FC, Breau MA, Di Gioia Y, Couraud PO, et al. JAML, a novel protein with characteristics of a junctional adhesion molecule, is induced during differentiation of myeloid leukemia cells. *Blood*. 2003;102(9):3371-8.
244. Tomko RP, Xu R, Philipson L. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(7):3352-6.
245. Raschperger E, Engstrom U, Pettersson RF, Fuxe J. CLMP, a novel member of the CTX family and a new component of epithelial tight junctions. *J Biol Chem*. 2004;279(1):796-804.
246. Hirata K, Ishida T, Penta K, Rezaee M, Yang E, Wohlgemuth J, et al. Cloning of an immunoglobulin family adhesion molecule selectively expressed by endothelial cells. *J Biol Chem*. 2001;276(19):16223-31.
247. Ebnet K, Suzuki A, Ohno S, Vestweber D. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 1):19-29.
248. Arcangeli ML, Frontera V, Aurrand-Lions M. Function of junctional adhesion molecules (JAMs) in leukocyte migration and homeostasis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2013;61(1):15-23.
249. Naik MU, Mousa SA, Parkos CA, Naik UP. Signaling through JAM-1 and alphavbeta3 is required for the angiogenic action of bFGF: dissociation of the JAM-1 and alphavbeta3 complex. *Blood*. 2003;102(6):2108-14.
250. Kostrewa D, Brockhaus M, D'Arcy A, Dale GE, Nelboeck P, Schmid G, et al. X-ray structure of junctional adhesion molecule: structural basis for homophilic adhesion via a novel dimerization motif. *EMBO J*. 2001;20(16):4391-8.
251. Ostermann G, Weber KS, Zernecke A, Schroder A, Weber C. JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat Immunol*. 2002;3(2):151-8.
252. Woodfin A, Voisin MB, Imhof BA, Dejana E, Engelhardt B, Nourshargh S. Endothelial cell activation leads to neutrophil transmigration as supported by the

- sequential roles of ICAM-2, JAM-A, and PECAM-1. *Blood*. 2009;113(24):6246-57.
253. Mamdouh Z, Mikhailov A, Muller WA. Transcellular migration of leukocytes is mediated by the endothelial lateral border recycling compartment. *J Exp Med*. 2009;206(12):2795-808.
254. Corada M, Chimenti S, Cera MR, Vinci M, Salio M, Fiordaliso F, et al. Junctional adhesion molecule-A-deficient polymorphonuclear cells show reduced diapedesis in peritonitis and heart ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(30):10634-9.
255. Ebnet K, Suzuki A, Horikoshi Y, Hirose T, Meyer Zu Brickwedde MK, Ohno S, et al. The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *EMBO J*. 2001;20(14):3738-48.
256. Cera MR, Del Prete A, Vecchi A, Corada M, Martin-Padura I, Motoike T, et al. Increased DC trafficking to lymph nodes and contact hypersensitivity in junctional adhesion molecule-A-deficient mice. *J Clin Invest*. 2004;114(5):729-38.
257. Cunningham SA, Rodriguez JM, Arrate MP, Tran TM, Brock TA. JAM2 interacts with alpha4beta1. Facilitation by JAM3. *J Biol Chem*. 2002;277(31):27589-92.
258. Ludwig RJ, Hardt K, Hatting M, Bistrrian R, Diehl S, Radeke HH, et al. Junctional adhesion molecule (JAM)-B supports lymphocyte rolling and adhesion through interaction with alpha4beta1 integrin. *Immunology*. 2009;128(2):196-205.
259. Arcangeli ML, Frontera V, Bardin F, Obrados E, Adams S, Chabannon C, et al. JAM-B regulates maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow. *Blood*. 2011;118(17):4609-19.
260. Stelzer S, Worlitzer MM, Bahnassawy L, Hemmer K, Rugani K, Werthschulte I, et al. JAM-C is an apical surface marker for neural stem cells. *Stem Cells Dev*. 2012;21(5):757-66.
261. Lamagna C, Meda P, Mandicourt G, Brown J, Gilbert RJ, Jones EY, et al. Dual interaction of JAM-C with JAM-B and alpha(M)beta2 integrin: function in junctional complexes and leukocyte adhesion. *Mol Biol Cell*. 2005;16(10):4992-5003.

262. Santoso S, Sachs UJ, Kroll H, Linder M, Ruf A, Preissner KT, et al. The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J Exp Med*. 2002;196(5):679-91.
263. Li X, Stankovic M, Lee BP, Aurrand-Lions M, Hahn CN, Lu Y, et al. JAM-C induces endothelial cell permeability through its association and regulation of β 3 integrins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(8):1200-6.
264. Mirza M, Hreinsson J, Strand ML, Hovatta O, Soder O, Philipson L, et al. Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) is expressed in male germ cells and forms a complex with the differentiation factor JAM-C in mouse testis. *Exp Cell Res*. 2006;312(6):817-30.
265. Johnson-Leger CA, Aurrand-Lions M, Beltraminelli N, Fasel N, Imhof BA. Junctional adhesion molecule-2 (JAM-2) promotes lymphocyte transendothelial migration. *Blood*. 2002;100(7):2479-86.
266. Glikli G, Ebnet K, Aurrand-Lions M, Imhof BA, Adams RH. Spermatid differentiation requires the assembly of a cell polarity complex downstream of junctional adhesion molecule-C. *Nature*. 2004;431(7006):320-4.
267. Wyss L, Schafer J, Liebner S, Mittelbronn M, Deutsch U, Enzmann G, et al. Junctional adhesion molecule (JAM)-C deficient C57BL/6 mice develop a severe hydrocephalus. *PLoS One*. 2012;7(9):e45619.
268. Mandicourt G, Iden S, Ebnet K, Aurrand-Lions M, Imhof BA. JAM-C regulates tight junctions and integrin-mediated cell adhesion and migration. *J Biol Chem*. 2007;282(3):1830-7.
269. Nagamatsu G, Ohmura M, Mizukami T, Hamaguchi I, Hirabayashi S, Yoshida S, et al. A CTX family cell adhesion molecule, JAM4, is expressed in stem cell and progenitor cell populations of both male germ cell and hematopoietic cell lineages. *Mol Cell Biol*. 2006;26(22):8498-506.
270. Zen K, Liu Y, McCall IC, Wu T, Lee W, Babbitt BA, et al. Neutrophil migration across tight junctions is mediated by adhesive interactions between epithelial coxsackie and adenovirus receptor and a junctional adhesion molecule-like protein on neutrophils. *Mol Biol Cell*. 2005;16(6):2694-703.
271. Luissint AC, Lutz PG, Calderwood DA, Couraud PO, Bourdoulous S. JAM-L-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells is regulated in cis by α 4 β 1 integrin activation. *J Cell Biol*. 2008;183(6):1159-73.

272. Witherden DA, Verdino P, Rieder SE, Garijo O, Mills RE, Teyton L, et al. The junctional adhesion molecule JAML is a costimulatory receptor for epithelial gammadelta T cell activation. *Science*. 2010;329(5996):1205-10.
273. Verdino P, Witherden DA, Havran WL, Wilson IA. The molecular interaction of CAR and JAML recruits the central cell signal transducer PI3K. *Science*. 2010;329(5996):1210-4.
274. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, et al. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*. 1997;275(5304):1320-3.
275. Mapoles JE, Krah DL, Crowell RL. Purification of a HeLa cell receptor protein for group B coxsackieviruses. *J Virol*. 1985;55(3):560-6.
276. Guo YL, Bai R, Chen CX, Liu DQ, Liu Y, Zhang CY, et al. Role of junctional adhesion molecule-like protein in mediating monocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(1):75-83.
277. Nasdala I, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H, Kuhn A, Ebnet K, Brachtendorf G, et al. A transmembrane tight junction protein selectively expressed on endothelial cells and platelets. *J Biol Chem*. 2002;277(18):16294-303.
278. Wegmann F, Petri B, Khandoga AG, Moser C, Khandoga A, Volkery S, et al. ESAM supports neutrophil extravasation, activation of Rho, and VEGF-induced vascular permeability. *J Exp Med*. 2006;203(7):1671-7.
279. Ooi AG, Karsunky H, Majeti R, Butz S, Vestweber D, Ishida T, et al. The adhesion molecule esam1 is a novel hematopoietic stem cell marker. *Stem Cells*. 2009;27(3):653-61.
280. Liang TW, Chiu HH, Gurney A, Sidle A, Tumas DB, Schow P, et al. Vascular endothelial-junctional adhesion molecule (VE-JAM)/JAM 2 interacts with T, NK, and dendritic cells through JAM 3. *J Immunol*. 2002;168(4):1618-26.
281. Aurrand-Lions M, Lamagna C, Dangerfield JP, Wang S, Herrera P, Nourshargh S, et al. Junctional adhesion molecule-C regulates the early influx of leukocytes into tissues during inflammation. *J Immunol*. 2005;174(10):6406-15.
282. Zen K, Babbitt BA, Liu Y, Whelan JB, Nusrat A, Parkos CA. JAM-C is a component of desmosomes and a ligand for CD11b/CD18-mediated neutrophil transepithelial migration. *Mol Biol Cell*. 2004;15(8):3926-37.

283. Bradfield PF, Scheiermann C, Nourshargh S, Ody C, Luscinikas FW, Rainger GE, et al. JAM-C regulates unidirectional monocyte transendothelial migration in inflammation. *Blood*. 2007;110(7):2545-55.
284. Ludwig RJ, Zollner TM, Santoso S, Hardt K, Gille J, Baatz H, et al. Junctional adhesion molecules (JAM)-B and -C contribute to leukocyte extravasation to the skin and mediate cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol*. 2005;125(5):969-76.
285. Rabquer BJ, Pakozdi A, Michel JE, Gujar BS, Haines GK, 3rd, Imhof BA, et al. Junctional adhesion molecule C mediates leukocyte adhesion to rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum*. 2008;58(10):3020-9.
286. Christen S, Coppieters K, Rose K, Holdener M, Bayer M, Pfeilschifter JM, et al. Blockade but not overexpression of the junctional adhesion molecule C influences virus-induced type 1 diabetes in mice. *PLoS One*. 2013;8(1):e54675.
287. Scheiermann C, Colom B, Meda P, Patel NS, Voisin MB, Marrelli A, et al. Junctional adhesion molecule-C mediates leukocyte infiltration in response to ischemia reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(10):1509-15.
288. Chavakis T, Preissner KT, Santoso S. Leukocyte trans-endothelial migration: JAMs add new pieces to the puzzle. *Thromb Haemost*. 2003;89(1):13-7.
289. Chavakis T, Keiper T, Matz-Westphal R, Hersemeyer K, Sachs UJ, Nawroth PP, et al. The junctional adhesion molecule-C promotes neutrophil transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 2004;279(53):55602-8.
290. Sircar M, Bradfield PF, Aurrand-Lions M, Fish RJ, Alcaide P, Yang L, et al. Neutrophil transmigration under shear flow conditions in vitro is junctional adhesion molecule-C independent. *J Immunol*. 2007;178(9):5879-87.
291. Palmer G, Aurrand-Lions M, Contassot E, Talabot-Ayer D, Ducrest-Gay D, Vesin C, et al. Indirect effects of leptin receptor deficiency on lymphocyte populations and immune response in db/db mice. *J Immunol*. 2006;177(5):2899-907.
292. Vonlaufen A, Aurrand-Lions M, Pastor CM, Lamagna C, Hadengue A, Imhof BA, et al. The role of junctional adhesion molecule C (JAM-C) in acute pancreatitis. *J Pathol*. 2006;209(4):540-8.

293. Woodfin A, Voisin MB, Beyrau M, Colom B, Caille D, Diapouli FM, et al. The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nat Immunol.* 2011;12(8):761-9.
294. Weber C, Springer TA. Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to α IIb β 3 and stimulated by platelet-activating factor. *J Clin Invest.* 1997;100(8):2085-93.
295. Keiper T, Al-Fakhri N, Chavakis E, Athanasopoulos AN, Isermann B, Herzog S, et al. The role of junctional adhesion molecule-C (JAM-C) in oxidized LDL-mediated leukocyte recruitment. *FASEB J.* 2005;19(14):2078-80.
296. Shagdarsuren E, Djalali-Talab Y, Aurrand-Lions M, Bidzhekov K, Liehn EA, Imhof BA, et al. Importance of junctional adhesion molecule-C for neointimal hyperplasia and monocyte recruitment in atherosclerosis-prone mice-brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(8):1161-3.
297. Langer HF, Daub K, Braun G, Schonberger T, May AE, Schaller M, et al. Platelets recruit human dendritic cells via Mac-1/JAM-C interaction and modulate dendritic cell function in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(6):1463-70.
298. Dancey JT, Deubelbeiss KA, Harker LA, Finch CA. Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest.* 1976;58(3):705-15.
299. Imhof BA, Zimmerli C, Glick G, Ducrest-Gay D, Juillard P, Hammel P, et al. Pulmonary dysfunction and impaired granulocyte homeostasis result in poor survival of Jam-C-deficient mice. *J Pathol.* 2007;212(2):198-208.
300. Frontera V, Arcangeli ML, Zimmerli C, Bardin F, Obrados E, Audebert S, et al. Cutting edge: JAM-C controls homeostatic chemokine secretion in lymph node fibroblastic reticular cells expressing thrombomodulin. *J Immunol.* 2011;187(2):603-7.
301. Praetor A, McBride JM, Chiu H, Rangell L, Cabote L, Lee WP, et al. Genetic deletion of JAM-C reveals a role in myeloid progenitor generation. *Blood.* 2009;113(9):1919-28.
302. Mercier FE, Ragu C, Scadden DT. The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2011;12(1):49-60.

303. Nagasawa T, Omatsu Y, Sugiyama T. Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells. *Trends Immunol.* 2011;32(7):315-20.
304. Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest.* 2005;115(3):572-83.
305. Xu Q. The impact of progenitor cells in atherosclerosis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006;3(2):94-101.
306. Stellos K, Gawaz M. Platelet interaction with progenitor cells: potential implications for regenerative medicine. *Thromb Haemost.* 2007;98(5):922-9.
307. Gawaz M, Stellos K, Langer HF. Platelets modulate atherogenesis and progression of atherosclerotic plaques via interaction with progenitor and dendritic cells. *J Thromb Haemost.* 2008;6(2):235-42.
308. Erpenbeck L, Rubant S, Hardt K, Santoso S, Boehncke WH, Schon MP, et al. Constitutive and functionally relevant expression of JAM-C on platelets. *Thromb Haemost.* 2010;103(4):857-9.
309. Velders GA, Pruijt JF, Verzaal P, van Os R, van Kooyk Y, Figdor CG, et al. Enhancement of G-CSF-induced stem cell mobilization by antibodies against the beta 2 integrins LFA-1 and Mac-1. *Blood.* 2002;100(1):327-33.
310. Seizer P, Stellos K, Selhorst G, Kramer BF, Lang MR, Gawaz M, et al. CXCL16 is a novel scavenger receptor on platelets and is associated with acute coronary syndrome. *Thromb Haemost.* 2011;105(6):1112-4.
311. Stellos K, Bigalke B, Stakos D, Henkelmann N, Gawaz M. Platelet-bound P-selectin expression in patients with coronary artery disease: impact on clinical presentation and myocardial necrosis, and effect of diabetes mellitus and anti-platelet medication. *J Thromb Haemost.* 2010;8(1):205-7.
312. Bigalke B, Stellos K, Stakos D, Joos T, Potz O, Geisler T, et al. Influence of platelet count on the expression of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) in patients with acute coronary syndrome. *Thromb Haemost.* 2009;101(5):911-5.
313. Bigalke B, Geisler T, Stellos K, Langer H, Daub K, Kremmer E, et al. Platelet collagen receptor glycoprotein VI as a possible novel indicator for the acute coronary syndrome. *Am Heart J.* 2008;156(1):193-200.
314. Stellos K, Bigalke B, Langer H, Geisler T, Schad A, Kogel A, et al. Expression of stromal-cell-derived factor-1 on circulating platelets is increased

in patients with acute coronary syndrome and correlates with the number of CD34+ progenitor cells. *Eur Heart J.* 2009;30(5):584-93.

315. Lataillade JJ, Clay D, Bourin P, Herodin F, Dupuy C, Jasmin C, et al. Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G(0)/G(1) transition in CD34(+) cells: evidence for an autocrine/paracrine mechanism. *Blood.* 2002;99(4):1117-29.

316. Herzenberg LA, Sweet RG, Herzenberg LA. Fluorescence-activated cell sorting. *Sci Am.* 1976;234(3):108-17.

317. Fulwyler MJ. Electronic separation of biological cells by volume. *Science.* 1965;150(3698):910-1.

318. Chattopadhyay PK, Hogerkorp CM, Roederer M. A chromatic explosion: the development and future of multiparameter flow cytometry. *Immunology.* 2008;125(4):441-9.

319. Stellos K, Langer H, Gnerlich S, Panagiota V, Paul A, Schonberger T, et al. Junctional adhesion molecule A expressed on human CD34+ cells promotes adhesion on vascular wall and differentiation into endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(6):1127-36.

320. Celik S, Langer H, Stellos K, May AE, Shankar V, Kurz K, et al. Platelet-associated LIGHT (TNFSF14) mediates adhesion of platelets to human vascular endothelium. *Thromb Haemost.* 2007;98(4):798-805.

321. Grothusen C, Umbreen S, Konrad I, Stellos K, Schulz C, Schmidt B, et al. EXP3179 inhibits collagen-dependent platelet activation via glycoprotein receptor-VI independent of AT1-receptor antagonism: potential impact on atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(5):1184-90.

322. Stellos K, Panagiota V, Gnerlich S, Borst O, Bigalke B, Gawaz M. Expression of junctional adhesion molecule-C on the surface of platelets supports adhesion, but not differentiation, of human CD34 cells in vitro. *Cell Physiol Biochem.* 2012;29(1-2):153-62.

323. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Reiningger A, Adelsberger H, Gebhardt A, et al. Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation.* 1997;96(6):1809-18.

324. Massberg S, Enders G, Matos FC, Tomic LI, Leiderer R, Eisenmenger S, et al. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood*. 1999;94(11):3829-38.
325. Babinska A, Kedees MH, Athar H, Ahmed T, Batuman O, Ehrlich YH, et al. F11-receptor (F11R/JAM) mediates platelet adhesion to endothelial cells: role in inflammatory thrombosis. *Thromb Haemost*. 2002;88(5):843-50.
326. Zerneck A, Liehn EA, Fraemohs L, von Hundelshausen P, Koenen RR, Corada M, et al. Importance of junctional adhesion molecule-A for neointimal lesion formation and infiltration in atherosclerosis-prone mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(2):e10-3.
327. Kahn ML. Platelet-collagen responses: molecular basis and therapeutic promise. *Semin Thromb Hemost*. 2004;30(4):419-25.
328. Solpov A, Shenkman B, Vitkovsky Y, Brill G, Koltakov A, Farzam N, et al. Platelets enhance CD4+ lymphocyte adhesion to extracellular matrix under flow conditions: role of platelet aggregation, integrins, and non-integrin receptors. *Thromb Haemost*. 2006;95(5):815-21.
329. Morrell CN, Sun H, Swaim AM, Baldwin WM, 3rd. Platelets an inflammatory force in transplantation. *Am J Transplant*. 2007;7(11):2447-54.
330. McEver RP. Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb Haemost*. 2001;86(3):746-56.
331. Wagner DD, Burger PC. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(12):2131-7.
332. Gleissner CA, von Hundelshausen P, Ley K. Platelet chemokines in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(11):1920-7.
333. Ma L, Perini R, McKnight W, Dickey M, Klein A, Hollenberg MD, et al. Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF release from human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(1):216-20.
334. Italiano JE, Jr., Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, et al. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood*. 2008;111(3):1227-33.
335. Chatterjee M, Huang Z, Zhang W, Jiang L, Hultenby K, Zhu L, et al. Distinct platelet packaging, release, and surface expression of proangiogenic

and antiangiogenic factors on different platelet stimuli. *Blood*. 2011;117(14):3907-11.

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

337. Langer HF, Stellos K, Steingen C, Frohofer A, Schonberger T, Kramer B, et al. Platelet derived bFGF mediates vascular integrative mechanisms of mesenchymal stem cells in vitro. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;47(2):315-25.

338. Nadar SK, Blann AD, Lip GY. Plasma and platelet-derived vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 in hypertension: effects of antihypertensive therapy. *J Intern Med*. 2004;256(4):331-7.

339. Nadar SK, Blann A, Beevers DG, Lip GY. Abnormal angiopoietins 1&2, angiopoietin receptor Tie-2 and vascular endothelial growth factor levels in hypertension: relationship to target organ damage [a sub-study of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT)]. *J Intern Med*. 2005;258(4):336-43.

340. Dainiak N, Davies G, Kalmanti M, Lawler J, Kulkarni V. Platelet-derived growth factor promotes proliferation of erythropoietic progenitor cells in vitro. *J Clin Invest*. 1983;71(5):1206-14.

341. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, Delezay O, Pozzetto B, McNicol A, et al. Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets. *Br J Haematol*. 2008;141(1):84-91.

342. Ben-Ezra J, Sheibani K, Hwang DL, Lev-Ran A. Megakaryocyte synthesis is the source of epidermal growth factor in human platelets. *Am J Pathol*. 1990;137(4):755-9.

343. Hattori K, Heissig B, Tashiro K, Honjo T, Tateno M, Shieh JH, et al. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*. 2001;97(11):3354-60.

344. Stellos K, Ruf M, Sopova K, Kiliass A, Rahmann A, Stamatelopoulos K, et al. Plasma levels of stromal cell-derived factor-1 in patients with coronary artery disease: effect of clinical presentation and cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis*. 2011;219(2):913-6.

345. Jin DK, Shido K, Kopp HG, Petit I, Shmelkov SV, Young LM, et al. Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4+ hemangiocytes. *Nat Med.* 2006;12(5):557-67.
346. Yokoi H, Yamada H, Tsubakimoto Y, Takata H, Kawahito H, Kishida S, et al. Bone marrow AT1 augments neointima formation by promoting mobilization of smooth muscle progenitors via platelet-derived SDF-1{alpha}. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(1):60-7.
347. Stellos K, Seizer P, Bigalke B, Daub K, Geisler T, Gawaz M. Platelet aggregates-induced human CD34+ progenitor cell proliferation and differentiation to macrophages and foam cells is mediated by stromal cell derived factor 1 in vitro. *Semin Thromb Hemost.* 2010;36(2):139-45.
348. Langer H, May AE, Daub K, Heinzmann U, Lang P, Schumm M, et al. Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro. *Circ Res.* 2006;98(2):e2-10.
349. Langer HF, May AE, Vestweber D, De Boer HC, Hatzopoulos AK, Gawaz M. Platelet-induced differentiation of endothelial progenitor cells. *Semin Thromb Hemost.* 2007;33(2):136-43.
350. Spinetti G, Fortunato O, Kraenkel N, Madeddu P. Close encounters of the third kind: progenitor cells land on the platelet-enriched vascular surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(2):243-4.
351. Sopova K, Tatsidou P, Stellos K. Platelets and platelet interaction with progenitor cells in vascular homeostasis and inflammation. *Curr Vasc Pharmacol.* 2012;10(5):555-62.
352. de Boer HC, Verseyden C, Ulfman LH, Zwaginga JJ, Bot I, Biessen EA, et al. Fibrin and activated platelets cooperatively guide stem cells to a vascular injury and promote differentiation towards an endothelial cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(7):1653-9.
353. Janowska-Wieczorek A, Majka M, Kijowski J, Baj-Krzyworzeka M, Reca R, Turner AR, et al. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood.* 2001;98(10):3143-9.

354. Barry OP, Pratico D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest.* 1998;102(1):136-44.
355. Simon DI, Chen Z, Xu H, Li CQ, Dong J, McIntire LV, et al. Platelet glycoprotein Iba1 is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med.* 2000;192(2):193-204.
356. Tabit CE, Chung WB, Hamburg NM, Vita JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord.* 2010;11(1):61-74.
357. Wong WT, Wong SL, Tian XY, Huang Y. Endothelial dysfunction: the common consequence in diabetes and hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010;55(4):300-7.
358. Angiolillo DJ, Badimon JJ, Saucedo JF, Frelinger AL, Michelson AD, Jakubowski JA, et al. A pharmacodynamic comparison of prasugrel vs. high-dose clopidogrel in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease: results of the Optimizing anti-Platelet Therapy In diabetes Mellitus (OPTIMUS)-3 Trial. *Eur Heart J.* 2011;32(7):838-46.
359. Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation.* 2005;111(22):2981-7.
360. Dernbach E, Randriamboavonjy V, Fleming I, Zeiher AM, Dimmeler S, Urbich C. Impaired interaction of platelets with endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk factors. *Basic Res Cardiol.* 2008;103(6):572-81.
361. Jernberg T, Hasvold P, Henriksson M, Hjelm H, Thuresson M, Janzon M. Cardiovascular risk in post-myocardial infarction patients: nationwide real world data demonstrate the importance of a long-term perspective. *Eur Heart J.* 2015;36(19):1163-70.
362. McKenzie ME, Malinin AI, Bell CR, Dzhanashvili A, Horowitz ED, Oshrine BR, et al. Aspirin inhibits surface glycoprotein IIb/IIIa, P-selectin, CD63, and CD107a receptor expression on human platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2003;14(3):249-53.

363. Heitzer T, Rudolph V, Schwedhelm E, Karstens M, Sydow K, Ortak M, et al. Clopidogrel improves systemic endothelial nitric oxide bioavailability in patients with coronary artery disease: evidence for antioxidant and antiinflammatory effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(7):1648-52.
364. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK, et al. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med.* 2001;345(7):494-502.
365. Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT, 3rd, Fry ET, DeLago A, Wilmer C, et al. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2002;288(19):2411-20.
366. Haramaki N, Ikeda H, Takenaka K, Katoh A, Sugano R, Yamagishi S, et al. Fluvastatin alters platelet aggregability in patients with hypercholesterolemia: possible improvement of intraplatelet redox imbalance via HMG-CoA reductase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(6):1471-7.
367. Laufs U, Gertz K, Huang P, Nickenig G, Bohm M, Dirnagl U, et al. Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke.* 2000;31(10):2442-9.
368. Cipollone F, Mezzetti A, Porreca E, Di Febbo C, Nutini M, Fazio M, et al. Association between enhanced soluble CD40L and prothrombotic state in hypercholesterolemia: effects of statin therapy. *Circulation.* 2002;106(4):399-402.
369. Panes O, Gonzalez C, Hidalgo P, Valderas JP, Acevedo M, Contreras S, et al. Platelet tissue factor activity and membrane cholesterol are increased in hypercholesterolemia and normalized by rosuvastatin, but not by atorvastatin. *Atherosclerosis.* 2017;257:164-71.
370. Christersson C, Johnell M, Siegbahn A. The influence of direct thrombin inhibitors on the formation of platelet-leukocyte aggregates and tissue factor expression. *Thromb Res.* 2010;126(4):e327-33.
371. Perzborn E, Heitmeier S, Laux V. Effects of Rivaroxaban on Platelet Activation and Platelet-Coagulation Pathway Interaction: In Vitro and In Vivo Studies. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2015;20(6):554-62.

372. Kalatskaya I, Berchiche YA, Gravel S, Limberg BJ, Rosenbaum JS, Heveker N. AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Mol Pharmacol*. 2009;75(5):1240-7.
373. Karshovska E, Zagorac D, Zerneck A, Weber C, Schober A. A small molecule CXCR4 antagonist inhibits neointima formation and smooth muscle progenitor cell mobilization after arterial injury. *J Thromb Haemost*. 2008;6(10):1812-5.
374. Dai S, Yuan F, Mu J, Li C, Chen N, Guo S, et al. Chronic AMD3100 antagonism of SDF-1alpha-CXCR4 exacerbates cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;49(4):587-97.
375. Stellos K. Platelets in vascular homeostasis and inflammation: current perspectives from bench to bedside. *Curr Vasc Pharmacol*. 2012;10(5):521-3.
376. Taylor A, Granger DN. Hypercholesterolemia promotes P-selectin-dependent platelet-endothelial cell adhesion in postcapillary venules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(4):675-80.
377. Eguchi H, Ikeda H, Murohara T, Yasukawa H, Haramaki N, Sakisaka S, et al. Endothelial injuries of coronary arteries distal to thrombotic sites: role of adhesive interaction between endothelial P-selectin and leukocyte sialyl LewisX. *Circ Res*. 1999;84(5):525-35.
378. Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med*. 2003;197(11):1585-98.
379. Fukushima S, Coppen SR, Varela-Carver A, Yamahara K, Sarathchandra P, Smolenski RT, et al. A novel strategy for myocardial protection by combined antibody therapy inhibiting both P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 via retrograde intracoronary route. *Circulation*. 2006;114(1 Suppl):I251-6.
380. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352(16):1685-95.
381. Weber C, Schober A, Zerneck A. Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(11):1997-2008.

382. Ostermann G, Fraemohs L, Baltus T, Schober A, Lietz M, Zerneck A, et al. Involvement of JAM-A in mononuclear cell recruitment on inflamed or atherosclerotic endothelium: inhibition by soluble JAM-A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(4):729-35.
383. Nourshargh S, Hordijk PL, Sixt M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(5):366-78.
384. Lamagna C, Hovalala-Dilke KM, Imhof BA, Aurrand-Lions M. Antibody against junctional adhesion molecule-C inhibits angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res.* 2005;65(13):5703-10.
385. Gimbrone MA, Jr., Aster RH, Cotran RS, Corkery J, Jandl JH, Folkman J. Preservation of vascular integrity in organs perfused in vitro with a platelet-rich medium. *Nature.* 1969;222(5188):33-6.
386. Kitchens CS, Weiss L. Ultrastructural changes of endothelium associated with thrombocytopenia. *Blood.* 1975;46(4):567-78.
387. Hoffman M, Harger A, Lenkowski A, Hedner U, Roberts HR, Monroe DM. Cutaneous wound healing is impaired in hemophilia B. *Blood.* 2006;108(9):3053-60.
388. McDonald A, Hoffman M, Hedner U, Roberts HR, Monroe DM. Restoring hemostatic thrombin generation at the time of cutaneous wounding does not normalize healing in hemophilia B. *J Thromb Haemost.* 2007;5(8):1577-83.
389. Nurden AT, Nurden P, Sanchez M, Andia I, Anitua E. Platelets and wound healing. *Front Biosci.* 2008;13:3532-48.
390. Murry CE, Field LJ, Menasche P. Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point. *Circulation.* 2005;112(20):3174-83.
391. Bersell K, Arab S, Haring B, Kuhn B. Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell.* 2009;138(2):257-70.
392. Kuhn B, del Monte F, Hajjar RJ, Chang YS, Lebeche D, Arab S, et al. Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. *Nat Med.* 2007;13(8):962-9.
393. Gneccchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem

cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J*. 2006;20(6):661-9.

394. Ventura C, Cantoni S, Bianchi F, Lionetti V, Cavallini C, Scarlata I, et al. Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic Acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. *J Biol Chem*. 2007;282(19):14243-52.

395. Ventura C. Cardiomyocyte proliferation: paving the way for cardiac regenerative medicine without stem cell transplantation. *Cardiovasc Res*. 2010;85(4):643-4.

396. Bartunek J, Dimmeler S, Drexler H, Fernandez-Aviles F, Galinanes M, Janssens S, et al. The consensus of the task force of the European Society of Cardiology concerning the clinical investigation of the use of autologous adult stem cells for repair of the heart. *Eur Heart J*. 2006;27(11):1338-40.

397. Lerman DA, Alotti N, Ume KL, Peault B. Cardiac Repair and Regeneration: The Value of Cell Therapies. *Eur Cardiol*. 2016;11(1):43-8.

398. Stellos K, Gawaz M. Platelets and stromal cell-derived factor-1 in progenitor cell recruitment. *Semin Thromb Hemost*. 2007;33(2):159-64.

399. Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part I: angiogenic cytokines. *Circulation*. 2004;109(21):2487-91.

400. Stellos K, Panagiota V, Sachsenmaier S, Trunk T, Straten G, Leyhe T, et al. Increased circulating progenitor cells in Alzheimer's disease patients with moderate to severe dementia: evidence for vascular repair and tissue regeneration? *J Alzheimers Dis*. 2010;19(2):591-600.

401. Geisler T, Fekecs L, Wurster T, Chiribiri A, Schuster A, Nagel E, et al. Association of platelet-SDF-1 with hemodynamic function and infarct size using cardiac MR in patients with AMI. *Eur J Radiol*. 2012;81(4):e486-90.

402. Siena S, Schiavo R, Pedrazzoli P, Carlo-Stella C. Therapeutic relevance of CD34 cell dose in blood cell transplantation for cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2000;18(6):1360-77.

403. Werner N, Nickenig G. Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells: limitations for therapy? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(2):257-66.

404. Urbich C, Dimmeler S. Risk factors for coronary artery disease, circulating endothelial progenitor cells, and the role of HMG-CoA reductase inhibitors. *Kidney Int.* 2005;67(5):1672-6.
405. Assmus B, Honold J, Schachinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, et al. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006;355(12):1222-32.
406. Kastrup J, Ripa RS, Wang Y, Jorgensen E. Myocardial regeneration induced by granulocyte-colony-stimulating factor mobilization of stem cells in patients with acute or chronic ischaemic heart disease: a non-invasive alternative for clinical stem cell therapy? *Eur Heart J.* 2006;27(23):2748-54.
407. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet.* 2004;364(9429):141-8.
408. Clifford DM, Fisher SA, Brunskill SJ, Doree C, Mathur A, Watt S, et al. Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012(2):CD006536.
409. To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood.* 1997;89(7):2233-58.
410. Zohlnhofer D, Ott I, Mehilli J, Schomig K, Michalk F, Ibrahim T, et al. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2006;295(9):1003-10.
411. Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E, Wood B, Hubel K, Cooper S, et al. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood.* 2003;102(8):2728-30.
412. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow--derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest.* 2001;108(3):399-405.
413. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation.* 2001;103(24):2885-90.

414. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.* 1999;18(14):3964-72.
415. Sun P, Yang XB. Two Properties of a Gene-for-Gene Coevolution System under Human Perturbations. *Phytopathology.* 1999;89(9):811-6.
416. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Gordon R, Tepper O, Gravereaux E, et al. Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res.* 2000;86(12):1198-202.
417. Orlova VV, Economopoulou M, Lupu F, Santoso S, Chavakis T. Junctional adhesion molecule-C regulates vascular endothelial permeability by modulating VE-cadherin-mediated cell-cell contacts. *J Exp Med.* 2006;203(12):2703-14.

9. ANHANG

9.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.:	Abbildung
Abb.	Abbildung
Abk.:	Abkürzung
ACD:	Acid-Citrate-Dextrose Puffer
ADP:	Adenosindiphosphat
AF6:	Afadin-6
AG:	Arbeitsgruppe; Arbeitsgemeinschaft
Ala:	Alanin
ApoE:	Apolipoprotein E
Arg:	Arginin
Asp:	Asparagin
ATP:	Adenosintriphosphat
bFGF:	Basic Fibroblast Growth Factor
BSA:	Bovines Serum Albumin
°C:	Grad Celsius
c:	Konzentration
Ca ²⁺ :	zweiwertiges Kalzium
CASK:	Calcium-Calmodulin-abhängige Serinproteinkinase
CAR:	Coxsackie und Adenovirus-Rezeptor
Cat:	Katalog (catalog)
CD:	Differenzierungsmarker (Cluster of differentiation)
cGMP:	zyklisches Guanosinmonophosphat
CLMP:	CAR-ähnliches Membranprotein
CPDA:	Citrate Phosphate Dextrose Adenine
CTLD:	C-type lectin-like domain
C-Terminus:	Carboxy-terminales Ende
DAG:	Diacyl-Glycerol
DCF:	5-(and-6-)-carboxyfluorescein diacetate
DLG:	Drosophila melanogaster
DNA:	Desoxyribonucleinacid
DPP-4:	Dipeptidylpeptidase-4

EGF:	Epidermal Growth Factor
ELAM-1:	Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule 1
EPC:	Endotheliale Progenitorzellen (Endothelial Progenitor Cells)
ERKs:	Extracellular-signal-Regulated Kinases
ESAM:	Endothelial cell-Selective Adhesion Molecule
ESC:	embryonale Stammzellen (Embryonic Stem Cell)
Fa:	Firma
FACS:	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FLK-1:	Fetal Liver Kinase 1
g:	relative Zentrifugalbeschleunigung
G-CSF:	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
Glu:	Glutamin
GmbH:	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GM-CSF:	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GMP-140:	Granule Membrane Protein 140
GP:	Glykoprotein
G-Protein:	Guaninnukleotidbindendes Protein
Gro:	Growth-regulated protein
HAEC:	humane arterielle endotheliale Zellen (Human Arterial Endothelial Cell)
HCPCs:	Human Cardia Progenitor Cells
HEV:	hochendotheliale Venole
HGF:	Hepatocyte Growth Factor
HIV:	Human Immundeficiency Virus
HSC:	hämatopoetische Stammzellen (Hematopoietic Stem Cell)
HSPC:	Hematopoietic Stem Progenitor Cell
HUVEC:	humane Endothelzellen aus der Umbilicalvene
i.v.:	intravenös
ICAM-1:	CD54; intercellular adhesion molecule-1
IFN:	Interferon
Ig:	Immunglobulin
IgSF:	Immunglobulin-Superfamilie
IL:	Interleukin
Ile:	Isoleucin

IMD-Medium:	Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium
iPSC:	induzierte pluripotente Stammzellen
IP ₃ :	Phosphatidylinositol 1,4,5-triphosphat
IP-9:	interferon-gamma-inducible protein 9
I-TAC:	interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant
IVM:	Intravitalmikroskopie
JAK/STAT:	Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transkription
JAM:	junctional adhesion molecule
Kap.:	Kapitel
kDa:	Kilodalton
KDR:	Kinase insert Domain Receptor
kg:	Kilogramm
KGW:	Körpergewicht
LAM-1:	Leucocyte Adhesion Molecule 1
LCMV:	Lymphozytären Choriomeningitis-Virus
LDL:	Low Density Lipoprotein
Ldlr:	Low density lipoprotein receptor
Leu:	Leucin
LFA-1:	Lymphocyte function-associated antigen 1
LPS:	Lipopolysaccharide
LTB4:	Leukotriene B4
M.:	Musculus
MAB:	monoclonal antibody
MAC-1:	Macrophage-1 antigen
MACS:	Magnetic Affinity Cell Sorting
MAPK:	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCP-1:	Monocyte Chemoattractant Protein 1
M-CSF :	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MFI:	mittlere Fluoreszenzintensität
mg:	Milligramm
min:	Minute
MIP:	Macrophage Inflammatory Protein
ml:	Milliliter

mm ² :	Quadratmillimeter
MMP:	Matrix-Matrixmetallopeptidase
mRNA:	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleinacid)
MSC:	mesenchymalen Stammzellen
MW:	Mittelwert
n:	Anzahl
NES:	neuronale Stammzellen
NF-κB:	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NK-Zellen:	“Natural Killer” Zellen
nm:	Nanometer
NO:	Stickstoffmonoxid
N-Terminus:	Amino-terminales Ende
OP:	Operation
oxLDL:	oxidized Low Density Lipoprotein
p:	Irrtumswahrscheinlichkeit
PADGEM:	Platelet Activation Dependent Granule-External Membrane
PAR1:	Partioning Defective” 1
PAR3:	Partioning Defective” 3
PARD3:	par-3 family cell polarity regulator -3
PBS:	phosphat buffered saline
PBSF:	pre-B cell growth-stimulating factor
PCI:	perkutane koronare Intervention
PDGF:	platelet derived growth factor
PECAM:	platelet-endothelial cell adhesion molecule
PF4:	platelet factor 4
PGI ₂ :	Prostazyklin
pH:	pH-Wert (lat. pondus/potentia Hydrogenii)
Phe:	Phenylalanin
PIP ₂ :	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphat
PKC:	Proteinkinase C
PL:	Phospholipase
Plts.:	Platelets
PMGCs:	primordial germ cells

PRP:	Plättchenreiches Plasma
PSD:	post synaptic density
PSGL-1:	P-selektin glycoprotein ligand-1
PTK:	Proteintyrosinkinase
RANTES:	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
RDC1:	Receptor dog cDNA
RIP:	Rat Insulin Promoter
RNA:	Ribonukleinsäure (ribonucleinacid)
ROS:	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RT:	Raumtemperatur
s:	Sekunde
Sca-1 ⁺ :	Stem cells antigen-1
SCR:	short consensus repeats
SD:	Standardabweichung (standard deviation)
SDF-1:	stromal cell-derived factor 1
SEM:	Standardabweichung der Mittelwerte (standard error of the mean)
SIV:	simmian immundeficiency virus
sLe ^x :	sialyl Lewis x
SMC:	glatte Muskelzellen (Smooth Muscle Cells)
TEM:	transendotheliale Migration
Th1:	T-Helferzelle Typ 1 (T helper Type 1)
Th2:	T-Helferzelle Typ 2 (T helper Type 2)
TNF- α :	Tumornekrosefaktor- α
TRAP:	Thrombinrezeptor aktivierendes Peptid 6
TREG:	regulatory T-cells
Tyr:	Tyrosin
U.:	Unit
USA:	United States of America
V.:	Vena (lat.)
Val:	Valin
VCAM-1:	CD106 ; vascular cellular adhesion molecule-1
VE-Cadherin:	vascular endothelial-cadherin

VEGF:	vascular endothelial growth factor
VEGF-R2:	vascular endothelial growth factor receptor 2
VIP:	Vasointestinales Peptid
VLA:	very late antigen
vWF:	von-Willebrand-Faktor
WHO:	World Health Organisation
µg:	Mikrogramm
µl:	Mikroliter
µm:	Mikrometer
ZO1:	Zonula occludentes-1

9.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1 Die Stadien der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen.....</i>	<i>4</i>
<i>Abbildung 2 Herkunft und Entwicklungsmöglichkeiten von Stammzellen für medizinische Anwendungen.....</i>	<i>8</i>
<i>Abbildung 3 Differenzierung multipotenter Stammzellen.....</i>	<i>9</i>
<i>Abbildung 4 Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt.</i>	<i>13</i>
<i>Abbildung 5 Adhäsion von Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand.....</i>	<i>16</i>
<i>Abbildung 6 Adhäsive Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten.....</i>	<i>20</i>
<i>Abbildung 7 Interaktionen zwischen Thrombozyten und Immunzellen.....</i>	<i>23</i>
<i>Abbildung 8 Leukozyten-Endothel Kontakt durch Interaktionen von JAMs mit Integrinen.....</i>	<i>24</i>
<i>Abbildung 9 Zell-Zell-Interaktionen vermittelt durch P-Selektin und PSGL-1.</i>	<i>27</i>
<i>Abbildung 10 Chemische Struktur der Junktional-Adhäsionsmoleküle (JAMs).</i>	<i>33</i>
<i>Abbildung 11 Aufbau eines Durchflusszytometers.</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 12 Die emittierte Photonenkonzentration ist proportional zur Zahl an gebundenen Antikörpern pro Zelle.</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 13 Streulicht 2D-Dot-Plot.....</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 14 Humane Thrombozyten exprimieren JAM-C.</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 15 Thrombozytäres JAM-C korreliert mit der P-Selektin-Expression bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit.</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 16 Die Thrombozyten-vermittelte Adhäsion von CD34⁺ Zellen wird durch JAM-C/MAC-1-Interaktionen unter statischen Bedingungen vermittelt. ...</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 17 Lösliches JAM-C-Fc reduziert die Adhäsion von CD34⁺ Zellen an immobilisiertem JAM-C.....</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 18 Thrombozytäres und nicht endotheliales JAM-C vermittelt die Adhäsion von CD34⁺ Zellen unter hoher Scherspannung.....</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 19 Endotheliales JAM-C hat keinen Einfluss auf die Adhäsion von menschlichen CD34⁺ Zellen auf aktivierten Endothelzellen.</i>	<i>71</i>
<i>Abbildung 20 Thrombozytäres JAM-C beeinflusst nicht die Differenzierung von CD34⁺ Zellen zu Endothelzellen oder Makrophagen/Schaumzellen.</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 21 Immobilisiertes JAM-C fördert die Bildung von endothelialen Kolonien aus CD34⁺ Zellen.....</i>	<i>74</i>

<i>Abbildung 22 Die aus CD34⁺ Zellen entstandenen endothelialen Progenitorzellen weisen typischen Oberflächenantigene von primären Endothelzellen auf.</i>	76
<i>Abbildung 23 JAM-C hat keinen Einfluss auf die Schaumzellbildung.</i>	77
<i>Abbildung 24 Rezeptor-Ligand-Paare bei den Thrombozyten-Progenitorzellen-Interaktionen.</i>	87
<i>Abbildung 25 Wirksame (Anti-) Thrombozyten Therapien basieren auf die Rolle der Plättchen in der vaskulären Homöostase und Inflammation.</i>	92

9.3 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: JAMs: Gewebeverteilung und Zellexpression.....	35
Tabelle 2: JAMs-Liganden Interaktionen und ihre Funktionen.....	37
Tabelle 3: JAMs in verschiedenen Modellen von Inflammation, Ischämie-Reperfusion und vaskulären Pathogenese.....	42
Tabelle 4: Die (Haupt-) Fluoreszenzfarbstoffe in der Durchflusszytometrie.....	51
Tabelle 5: Produktbezeichnung der Versuchsmaterialien und Geräte.....	59
Tabelle 6: Klinische Eigenschaften der untersuchten Patientenkohorte.....	63
Tabelle 7: Plättchen-Zytokine/Wachstumsfaktoren, die an den Interaktionen zwischen Thrombozyten und Progenitorzellen beteiligt sind.....	83
Tabelle 8: Adhäsionsrezeptoren, die an den Interaktionen zwischen Thrombozyten und Progenitorzellen involviert sind und ihre Funktion.....	87

10. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Konstantinos Stellos bedanken. Herr Stellos hat mir mit seinem Vertrauen die Gelegenheit gegeben an diesem und vielen anderen spannenden Projekten teilzunehmen und hat mir somit die Tür in einer faszinierenden Welt der Forschung geöffnet. Er begleitete leidenschaftlich, nicht nur meine ersten wissenschaftlichen Schritte, sondern auch schwierige Phasen meines Weges. Zu jeder Uhrzeit war er für mich da, hat mich aufgebaut und mir immer mit ehrlicher und offener Kritik geholfen. Für diese Ehrlichkeit und seine Kollegialität bin ich sehr dankbar. Herr Stellos war mir eine Quelle der Inspiration sowie ein großes Vorbild. Er hat mir stets geistige Anregungen gegeben, eine gute Wissenschaftlerin und ein guter Mensch zu sein.

Das gilt natürlich auch für meine Familie, die mich immer unterstützt und motiviert hat. Ich danke ganz besonders meinen Eltern, die mir meinen beruflichen Werdegang mit Liebe und Selbstaufopferung ermöglichten. Meiner Schwester Katholiki danke ich besonders dafür, dass sie immer für mich da ist, mein Klagen jahrelang ertrug und mich weiterhin immer wieder aufrichtet.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. M. Gawaz für die Bereitstellung eines hervorragenden Forschungsumfeldes an seinem Institut an der Eberhard Karls Universität Tübingen bedanken. Dort konnte ich mit seiner Unterstützung und der unersetzlichen Hilfe seiner Labormitarbeiter den experimentellen Teil meiner Doktorarbeit vervollständigen.

Mein besonderer Dank gilt auch T.F., der mich während der Bearbeitung meiner Dissertation mit seiner unendlichen Geduld liebevoll unterstützt hat.

Allen meinen lieben Freunden danke ich für die Kraft, die sie mir zur Anfertigung und Vollendung meiner Dissertation geschenkt haben.

Für das Korrekturlesen danke ich Rawlings Achangwa und Marco Sachse (Stellos Lab, Goethe Universität Frankfurt).

11. PUBLIKATIONEN

1. Kröger N, **Panagiota V**, Badbaran A, Zabelina T, Triviai I, Araujo Cruz MM, Shahswar R, Ayuk F, Gehlhaar M, Wolschke C, Bollin R, Walter C, Dugas M, Wiehlmann L, Lehmann U, Koenecke C, Chaturvedi A, Alchalby A, Stadler M, Eder M, Christopeit M, Göhring G, Koenigsmann M, Schlegelberger B, Kreipe HH, Ganser A, Stocking C, Fehse B, Thol F, Heuser M. Impact of molecular genetics on outcome in myelofibrosis patients after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017 Apr 4. pii: S1083-8791(17)30385-3. doi: 10.1016/j.bbmt.2017.03.034.
2. **Panagiota V**, König T, Bauersachs J, Veltmann C, Napp LC. Intermittent accelerated idioventricular rhythm: a novel arrhythmia in lupus erythematosus. *Lupus*. 2016 Mar 16.
3. Heuser M, Meggendorfer M, Cruz MM, Fabisch J, Klesse S, Köhler L, Göhring G, Ganster C, Shirneshan K, Gutermuth A, Cerny-Reiterer S, Krönke J, **Panagiota V**, Haferlach C, Koenecke C, Platzbecker U, Thiede C, Schroeder T, Kobbe G, Ehrlich S, Stamer K, Döhner K, Valent P, Schlegelberger B, Kroeger N, Ganser A, Haase D, Haferlach T, Thol F. Frequency and prognostic impact of casein kinase 1A1 mutations in MDS patients with deletion of chromosome 5q. *Leukemia*. 2015 Sep;29(9):1942-5. doi: 10.1038/leu.2015.49. Epub 2015 Feb 24.
4. Heuser M, Schlarmann C, Dobbernack V, **Panagiota V**, Wiehlmann L, Walter C, Beier F, Ziegler P, Yun H, Kade S, Kirchner A, Huang L, Koenecke C, Eder M, Brümmendorf TH, Dugas M, Ganser A, Thol F. Genetic characterization of acquired aplastic anemia by targeted sequencing. *Haematologica*. 2014 Jun 6. pii: haematol.2013.101642.
5. Heuser M, **Panagiota V**, Koenecke C, Fehse B, Alchalby H, Badbaran A, Shahswar R, Stadler M, Eder M, Göhring G, Trummer A, Schroeder T, Kobbe G, Thiede C, Platzbecker U, Schlegelberger B, Kroeger N, Ganser A, Thol F. Low frequency of calreticulin mutations in MDS patients. *Leukemia*. 2014 Sep;28(9):1933-4. doi: 10.1038/leu.2014.165. Epub 2014 May 21.
6. **Panagiota V**, Thol F, Markus B, Fehse B, Alchalby H, Badbaran A, Lehmann U, Koenecke C, Shahswar R, Chaturvedi A, Stadler M, Eder M,

- Göhring G, Koenigsmann M, Kloos A, Trummer A, Schroeder T, Kobbe G, Thiede C, Platzbecker U, Schlegelberger B, Kreipe HH, Ganser A, Kröger N, Heuser M. Prognostic effect of calreticulin mutations in patients with myelofibrosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2014 Jul;28(7):1552-5. doi: 10.1038/leu.2014.66. Epub 2014 Feb 7.
7. Stellos K, Sauter R, Fahrleitner M, Grimm J, Stakos D, Emschermann F, **Panagiota V**, Gnerlich S, Perk A, Schönberger T, Bigalke B, Langer HF, Gawaz M. Binding of oxidized low-density lipoprotein on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndromes and induces platelet adhesion to vascular wall in vivo--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Aug;32(8):2017-20. Epub 2012 Jun 14.
 8. Stellos K, **Panagiota V**, Gnerlich S, Borst O, Bigalke B, Gawaz M. Expression of junctional adhesion molecule-C on the surface of platelets supports adhesion, but not differentiation, of human CD34⁺ cells *in vitro*. *Cell Physiol Biochem*. 2012;29(1-2):153-62. Epub 2012 Mar 1.
 9. Stellos K, **Panagiota V**, Kögel A, Leyhe T, Gawaz M, Laske C. Predictive value of platelet activation for the rate of cognitive decline in Alzheimer's disease patients. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010 Nov;30(11):1817-20. Epub 2010 Aug 18.
 10. Stellos K, Langer H, Gnerlich S, **Panagiota V**, Paul A, Schönberger T, Ninci E, Menzel D, Mueller I, Bigalke B, Geisler T, Bültmann A, Lindemann S, Gawaz M. Junctional adhesion molecule A expressed on human CD34+ cells promotes adhesion on vascular wall and differentiation into endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Jun;30(6):1127-36. Epub 2010 Apr 8.
 11. Stellos K, **Panagiota V**, Sachsenmaier S, Trunk T, Straten G, Leyhe T, Seizer P, Geisler T, Gawaz M, Laske C. Increased circulating progenitor cells in Alzheimer's disease patients with moderate to severe dementia: evidence for vascular repair and tissue regeneration? *J Alzheimers Dis*. 2010;19(2):591-600.

PRÄSENTATIONEN

1. **Panagiota V**, Heuser M, Cruz MM, Badbaran A, Shahswar R, Triviai I, Fehse B, Alchalby H, Lehmann U, Koenecke C, Chaturvedi A, Stadler M, Eder M, Göhring G, Koenigsmann M, Schlegelberger B, Kreipe HH, Ganser A, Thol F and Kröger N. Prognostic Impact of Splicing Factor Mutations in Patients with Myelofibrosis Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. ***Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2014***
2. **Panagiota V**, Thol F, Marcus B, Fehse B, Alchalby H, Badbaran A, Lehmann U, Koenecke C, Shahswar R, Chaturvedi A, Stadler M, Eder M, Göhring G, Koenigsmann M, Kloos A, Trummer A, Schlegelberger B, Kreipe HH, Ganser A, Kröger N. and Heuser M. Outcome of JAK2/MPL/CALR triple negative patients with myelofibrosis after allogeneic stem cell transplantation, ***19th Congress of the European Hematology Association, Milan, Italy, June 12–15, 2014***
3. **Panagiota V**, Sopova K, Perk A, Paul A, Gawaz M, Stellos K. Essential, but not differential role of CXCR7 and CXCR4 on stromal cell-derived factor-1-mediated adhesion of human CD34⁺ cells in vitro and after vascular injury in vivo. ***Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2011 Scientific Sessions, Chicago IL, USA***
4. **Panagiota V**, Sopova K, Perk A, Paul A, Gawaz M, Stellos K. The novel SDF-1 Receptor CXCR7 is Expressed on Platelets and Regulates their Adhesion after Vascular Injury in Vivo. ***Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2011 Scientific Sessions, Chicago IL, USA***

BUCHBEITRÄGE

1. Gnerlich S, Langer H, **Panagiota V**, Schneider M, Gotsis C, Ninci E, Mueller I, Bigalke B, Geisler T, Bültmann A, Lindemann S, Gawaz M, Stellos K. Junctional Adhesion Molecule-A wird auf humanen CD34+ Zellen exprimiert und fördert deren Adhäsion an immobilisierten Thrombozyten, sowie Differenzierung zu endothelialen Progenitorzellen. **23. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung 2009**
2. Stellos K, **Panagiota V**, Sachsenmaier S, Gnerlich S, Langer H, Bigalke B, Daub K, Schönberger T, Gawaz M. Die Rolle der Interaktion von Thrombozyten und Progenitorzellen in Bezug auf die vaskuläre Regeneration und die Geweberegeneration. **22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung, Tübingen 2008**
3. Stellos K, Schneider M, **Panagiota V**, Gnerlich S, Seizer P, Geisler T, Schönberger T, Ninci E, Gawaz M. Die Rolle der Interaktion von Thrombozyten und Progenitorzellen in Bezug auf das vaskuläre Remodeling und die Atherogenese. **22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung, Tübingen 2008**
4. Stellos K, Bigalke B, Schad A, Grimm J, Mozes V, Pfaff F, **Panagiota V**, Gnerlich S, Gawaz M. Thrombozytäres SDF-1 ist bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom erhöht und korreliert mit der Anzahl der zirkulierenden CD34⁺ Progenitorzellen. **22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung, Tübingen 2008**

ABSTRACTS

1. Kroeger N, **Panagiota V**, Zabelina T, Cruz MM, Shahswar R, Badbaran A, Triviai I, Ayuk F, Gehlhaar M, Wolschke C, Bollin R, Lehmann U, Koenecke C, Chaturvedi A, Alchalby H, Stadler M, Eder M, Christopheit M, Göhring G, Koenigsmann M, Schlegelberger B, Kreipe HH, Ganser A, Fehse B, Thol F and Heuser M. Impact of Molecular Genetics on Disease-Free Survival in Myelofibrosis Patients Following Allogeneic Stem Cell Transplantation. **57th ASH Annual Meeting & Exposition, Orlando, FL, 2015**, Abstract 352
2. Triviai I, Stuebig T, Badbaran A, Zeschke S, **Panagiota V**, Heuser M, Stocking C and Kroger N. EZH2 Mutations Are Drivers of Clonal

- Hematopoiesis and Leukemic Transformation in a Mouse Model of Primary Myelofibrosis. **56th ASH Annual Meeting & Exposition, San Francisco, CA, 2014**, Abstract 3211
3. Heuser M, Meggendorfer M, Cruz MM, Koehler L, Goehring G, Ganster C, Gutermuth A, **Panagiota V**, Fabisch J, Haferlach C, Koenecke C, Platzbecker U, Thiede C, Germing U, Schroeder T, Kobbe G, Ehrlich S, Stamer K, Schlegelberger B, Kröger N, Ganser A, Haase D, Haferlach T and Thol F. Casein Kinase 1A1 (CSNK1A1) Is Recurrently Mutated in MDS Patients with Deletion of Chromosome 5q. **56th ASH Annual Meeting & Exposition, San Francisco, CA, 2014**, Abstract 4643
 4. **Panagiota V**, Thol F, Markus B, Fehse B, Alchalby H, Badbaran A, Lehmann U, Koenecke C, Shahswar R, Chaturvedi A, Stadler M, Eder M, Göhring G, Koenigsmann M, Kloos A, Trummer A, Schroeder T, Kobbe G, Thiede C, Platzbecker U, Schlegelberger B, Kreipe HH, Ganser A, Kröger N, Heuser M. Outcome of JAK2/MPL/CALR triple negative patients with myelofibrosis after allogeneic stem cell transplantation. **19th Congress of the European Hematology Association, Milan 2014**, P404
 5. **Panagiota V**, Heuser M, Cruz MM, Badbaran A, Shahswar R, Trivai I, Fehse B, Alchalby H, Lehmann U, Koenecke C, Chaturvedi A, Stadler M, Eder M, Göhring G, Koenigsmann M, Schlegelberger B, Kreipe HH, Ganser A, Thol F and Kröger N. Prognostic Impact of Splicing Factor Mutations in Patients with Myelofibrosis Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Blood (ASH Annual Meeting 2014)** Abstract 3171
 6. Heuser M, Schlarmann C, Dobbernack V, Panagiota V, Wiehlmann L, Walter C, Beier F, Ziegler P, Yun H, Kade S, Kirchner A, Huang L, Koenecke C, Eder M, Brümmendorf TH, Dugas M, Ganser A and Thol F. Genetic Characterization Of Aplastic Anemia Patients By Targeted Sequencing. **ASH 2013 Annual Meeting** Abstract 2470
 7. Sopova K, Perk A, **Panagiota V**, Paul A, Gawaz M, Stellos K. CXCR7 is expressed on the surface of platelets and mediates their adhesion on vascular wall after ischemia/reperfusion injury *in vivo*. ESC Congress 2011, Paris, France, 27.08.2011 – 31.08.2011; **European Heart Journal 2011**, 32 (Abstract Supplement)

8. Stellos K, Langer H, Gnerlich S, **Panagiota V**, Schönberger T, Paul A, Gawaz M. Platelet-mediated recruitment and differentiation of progenitor cells after vascular injury is mediated by junctional adhesion molecule-A *in vitro* and *in vivo*. 24. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung e.V., Blaubeuren, Germany, March 18-20, 2010. ***Perfusion. 2010***;1:36
9. Stellos K, Stakos D, Sopova K, **Panagiota V**, Gotsis C, Alkhalil H, Bigalke B, Gawaz M. Alzheimer's disease-associated amyloid beta peptides 1-40 and 1-42 in patients with coronary artery disease. 76th Annual meeting of the German Cardiac Society, Mannheim, Germany, 8-10.04 2010. ***Clin Res Cardiol April 2010***;99: Suppl 1, V666
10. Stellos K, Paul A, Grimm J, Gnerlich S, **Panagiota V**, Perk A, B. Bigalke, T. Geisler, M. Gawaz. Binding of oxidized LDL on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndromes and augments platelet adhesion on vascular wall *in vitro*. 76th Annual meeting of the German Cardiac Society, Mannheim, Germany, 8-10.04 2010. ***Clin Res Cardiol. 2010***; 99: Suppl 1, V1561
11. Stellos K, Langer H, Gnerlich S, **Panagiota V**, Ninci E, Mueller I, Bigalke B, Bueltmann A, S. Lindemann S, Gawaz M: Junctional adhesion molecule-A is expressed on human CD34⁺ cells and promotes adhesion to immobilized platelets and differentiation to endothelial progenitor cells. ***European Heart Journal 2009*** 30 (Abstract Supplement), 504
12. Stellos K, Bigalke B, Langer H, Schad A, **Panagiota V**, Mozes V, Grimm J, Sachsenmaier S, Gnerlich S, Geisler T, Seizer P, Htun P, Lindemann S, Gawaz M. Expression of SDF-1 on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndromes and correlates with the number of CD34+ progenitor cells. ***Clin Res Cardiol 98: Suppl 1 (April 2009)***, P412
13. Stellos K, Grimm J, Sachsenmaier S, Gnerlich S, Daub K, **Panagiota V**, Schneider M, Gotsis C, Mozes V, Bigalke B, Seizer P, Geisler T, Lindemann S, Gawaz M. Binding of oxidized LDL on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndrome and facilitates platelets adhesion on vascular wall. ***Clin Res Cardiol 98: Suppl 1 (April 2009)***, P1329
14. Stellos K, **Panagiota V**, Sachsenmaier S, Pfaff F, Schneider M, Gnerlich S, Bigalke B, Gkotsis C, Grimm J, Mozes V, Borst O, Pölzelbauer C, Fekecs L,

- May AE, Gawaz M. Circulating platelet – progenitor cell co-aggregates are increased in patients with acute coronary syndrome and present with increased adhesion and differentiation capability. ***Clin Res Cardiol 98: Suppl 1 (April 2009)***, V839
15. Stellos K, Langer H, Gnerlich S, **Panagiota V**, Schneider M, Gkotsis C, Ninci E, Müller I, Pölzelbauer C, Bigalke B, Geisler T, Bültmann A, Lindemann S, Gawaz M. Junctional adhesion molecule-A is expressed on human CD34⁺ cells and promotes adhesion to immobilized platelets and differentiation to endothelial progenitor cells. ***Clin Res Cardiol 98: Suppl 1 (April 2009)***, V1550
16. Stellos K, Langer H, Gnerlich S, **Panagiota V**, Schneider M, Gotsis C, Ninci E, Müller I, Bigalke B, Geisler T, Bültmann A, Lindemann S, Gawaz M. Junctional adhesion molecule-A is expressed on human CD34⁺ cells and promotes adhesion to immobilized platelets and differentiation to endothelial progenitor cells. ***Perfusion 2009***; 22: P26
17. Stellos K, Langer H, Petrakis G, **Panagiota V**, Gnerlich S, Schönberger T, Gauss A, Jahntz C, Ninci E, Müller I, Gawaz M. Circulating Platelet - Stem Cell co-aggregates present with enhanced capability for peripheral domiciliation in comparison to pure CD34⁺ cells: implications in vascular regeneration. 74th Annual meeting of the German Cardiac Society, Mannheim, March 27-29 2008. ***Clin Res Cardiol 2008***; 97- Suppl 1

12. LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Panagiota Viktoria
Nationalität	Griechisch, Deutsch
Geburtsdatum	13.02.1987
Geburtsort	Rhodos, Griechenland

WERDEGANG

1992-1998	Grundschule Kremasti, Rhodos, Griechenland
1998-2004	Gymnasium und Abitur Kremasti, Rhodos, Griechenland
2005-2011	Studium der Humanmedizin, Eberhard-Karls Universität Tübingen, Deutschland
NOVEMBER 2011	Approbation
SEIT APRIL 2012	Assistenzärztin in der Abteilung für Hämatologie, Hämostaseologie, Onkologie und Stammzelltransplantation, Medizinische Hochschule Hannover

FORSCHUNG

2008-2017	Forschung in der Gruppe von Prof. Dr. med. Konstantinos Stellos mit Fokus Arteriosklerose und Thrombose 1. Abteilung Innere Medizin III-Kardiologie und Kreislaufserkrankungen Eberhard-Karls Universität Tübingen 2. Institut für kardiovaskuläre Regeneration, Goethe Universität Frankfurt
2013-2017	Leukämieforschung in der Gruppe von Prof. Dr. med M. Heuser, Klinik für Hämatologie, Hämostaseologie, Onkologie und

Stammzelltransplantation, Medizinische
Hochschule Hannover

SPRACHEN

Griechisch (Muttersprache)

Deutsch (Zeugnis Zentrale Mittelstufenprüfung,
Goethe-Institut, Deutschland, DSH Philipps-
Universität Marburg)

Englisch (Certificate of Proficiency of the
University of Michigan, USA)

Portugiesisch (Basics, Eberhard Karls-
Universität Tübingen)

EDV KENTNISSE

Statistisches Programm SPSS, R-Programm
MS-Office (Word, Excel, Outlook, Powerpoint)

MITGLIEDSCHAFT

American Society of Cardiology since 2011

American Society of Hematology since 2013

PREISE

Travel award European Hematology
Association 2014

Travel award American Heart Association 2014

13. SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Die Rolle von Junctional Adhesion Molecule-C bei der Interaktion zwischen Thrombozyten und CD34⁺ Zellen“

im Zentrum der Inneren Medizin Medizinische Klinik III (Kardiologie, Angiologie) unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Konstantinos Stellos mit Unterstützung durch PD Dr. Emmanouil Chavakis ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Stellos K, Panagiota V, Gnerlich S, Borst O, Bigalke B, Gawaz M. Expression of junctional adhesion molecule-C on the surface of platelets supports adhesion, but not differentiation, of human CD34⁺ cells in vitro. Cell Physiol Biochem. 2012;29 (1-2):153-62. Epub 2012 Mar 1

(Ort, Datum)

(Unterschrift)