

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

Zentrum der Inneren Medizin
Medizinische Klinik III, Molekulare Kardiologie

**Sphingosin-1-Phosphat und FTY720 stimulieren die funktionelle Kapazität
von Progenitorzellen durch die Aktivierung des CXCR4-abhängigen Signalweges
über den S1P3-Rezeptor**

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

vorgelegt von Ulrich Rochwalsky,
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2008

Dekan:	Prof. Dr. J. Pfeilschifter
Referentin:	Priv. Doz. Dr. J. Haendeler
Koreferentin:	Prof. Dr. I. Fleming
Tag der mündlichen Prüfung:	16.01.2009

Inhaltsangabe

1.	Einleitung	7
1.1.	Stammzellen	7
1.1.1.	Was ist eine Stammzelle?	7
1.1.2.	Charakterisierung von Stammzellen	7
1.1.2.1.	Embryonale Stammzellen (ES)	7
1.1.2.2.	Adulte Stammzellen	8
1.2.	Endotheliale Progenitor (EPC)	10
1.2.1.	Definition	10
1.2.2.	Aufgaben: Neovaskularisation, Reparatur und andere Funktionen	10
1.3.	Stammzelltherapie	13
1.3.1.	Nutzen, Möglichkeiten und Gefahren der kardiologischen Stammzelltherapie	13
1.3.2.	Stammzelltherapiestudien in Europa	14
1.4.	EPC und KHK	16
1.5.	Rolle von S1P-Rezeptoren und den Liganden S1P und FTY720	17
1.5.1.	S1P und die S1P-Rezeptorenfamilie	17
1.5.2.	Was ist FTY720 und wofür ist es entwickelt worden?	18
1.6.	Rolle von CXCR4 und seinem Liganden SDF-1	18
1.6.1.	Aufgaben: Migration, Homing, Mobilisierung, Ischämie und Neovaskularisation	18
1.6.2.	Signalkaskade JAK/STAT	19
1.6.3.	CXCR4-Rezeptor und KHK	19
1.7.	Ziele der Arbeit	20
2.	Methoden	22
2.1.	Studienpopulation und Patientencharakteristik	22
2.2.	Zellkultur	22
2.2.1.	Menschliche EPC-Gewinnung und Kultivierung	22
2.2.2.	Embryonale Mausfibroblasten-Kultivierung	23
2.2.3.	Gewinnung der Knochenmarkszellen aus Mäusen	23
2.2.4.	Behandlung der Kulturen mit verschiedenen pharmakologischen Substanzen	24
2.3.	Biochemische und Immunologische Methoden	24
2.3.1.	Zellmigrationsassay	24
2.3.2.	Invasionsassay	25
2.3.3.	Western-Blots	26

2.3.3.1.	Ablösung der Zellen, Lysierung und Bestimmung der Proteinkonzentration	26
2.3.3.2.	Polyacrylamid – Gelelektrophorese	26
2.3.3.3.	Western-Blot	27
2.3.4.	Immunpräzipitation	28
2.3.5.	Histologische Bilder	28
2.3.6.	Colony Forming Units	29
2.4.	Analysemethoden	29
2.4.1.	FACS Analyse	29
2.5.	Tiermodelle	30
2.5.1.	Mausstämme	30
2.5.2.	Hinterlaufischemiemodell	30
2.5.3.	Hinterlaufperfusion	30
2.6.	Statistische Analyse	31
3.	Resultate	32
3.1.	Verbesserung der EPC Funktion durch S1P und FTY720	32
3.1.1.	S1P und FTY720 erhöhen die in-vivo-Neovaskularisation im Hinterlaufischämiemodell in der athymischen Nacktmaus	32
3.2.	Verschlechterte Angiogenese in S1P3 -/- Mäusen	33
3.2.1.	S1P Expression auf kultivierten EPCs von Patienten mit KHK und gesunden Probanden	33
3.2.2.	Eingeschränkte Migrationskapazität und Kolonie-Formation der EPCs von S1P3 -/- Mäusen	34
3.2.3.	Eingeschränkte Angiogenese und kapillare Dichte in S1P3 -/- Mäusen nach induzierter Hinterlaufischämie	35
3.3.	Aktivierung des CXCR4-Rezeptors und der nachfolgenden Signalwege durch S1P	38
3.3.1.	S1P und FTY720 induzieren eine Aktivierung des CXCR4-Rezeptors in menschlichen EPCs	38
3.3.2.	S1P und FTY720 induzieren eine Aktivierung von JAK2 in menschlichen EPCs	39
3.3.3.	Knochenmarkszellen von CXCR4 +/- Mäusen sind funktionell eingeschränkt	40
3.3.4.	Knochenmarkszellen von CXCR4 +/- Mäusen zeigen eine eingeschränkte JAK2-Phosphorylierung	42
3.4.	Die Src-Kinase ist an der Transaktivierung des CXCR4-Rezeptors beteiligt	43
3.4.1.	Src-Kinase-Familien-Inhibitor PP2 unterbindet die Phosphorylierung von JAK2 durch S1P	43
3.4.2.	Src-Kinase-Familien-Inhibitor PP2 reduziert die Invasionskapazität von FTY720/S1P-stimulierten Knochenmarkszellen	46
3.5.	S1P-induzierte Aktivierung der Src-Kinase ist S1P3 abhängig	46

3.5.1.	S1P aktiviert zeitabhängig die Src-Kinase	46
3.5.2.	Src-Phosphorylierung in EPCs von S1P3 -/- Mäusen ist reduziert	47
3.6.	Die Aktivierung des CXCR4-Rezeptors und der nachfolgenden Signalwege ist S1P3-Rezeptor abhängig	48
3.6.1.	Keine Phosphorylierung von JAK2/STAT3 durch S1P/FTY720 in MEF-Zellen mit src/fyn/yes -/- Zellen und auch keine Phosphorylierung in Wildtypzellen	48
3.6.2.	Phosphorylierung von JAK2 durch IL3 in MEF-Zellen	49
3.6.3.	Keine Expression von S1P3-Rezeptoren auf MEF-Zellen	50
4.	Diskussion	51
4.1.	S1P hat bedeutenden Einfluss auf das kardiovaskuläre System, wobei die Rezeptoren S1P1 und S1P3 eine entscheidende Rolle spielen	51
4.2.	In EPCs sind S1P-Rezeptoren an der Aktivierung des CXCR4-Rezeptors beteiligt	52
4.3.	Die Src-Kinase-Familie ist an der Transaktivierung des CXCR4-Rezeptors beteiligt	53
4.4.	S1P und sein Analogon FTY720 könnten therapeutisch die EPC-Funktion verbessern	54
4.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse	55
5.	Zusammenfassung	57
6.	Abstract	58
7.	Liste der Akürzungen	59
8.	Literatur	61
9.	Teilpublikationen	66
9.1.	Veröffentlichungen in Zeitschriften	66
9.2.	Zusammenfassungen	66
10.	Danksagung	68
11.	Ehrenwörtliche Erklärung	69

12. Curriculum vitae

70

1. Einleitung

1.1. Stammzellen

1.1.1. Was ist eine Stammzelle?

Stammzellen sind noch nicht ausdifferenzierte Körperzellen, die durch ihre Fähigkeit charakterisiert sind, sich ohne Differenzierung selbst erneuern zu können. Das bedeutet, dass durch mitotische Teilung wieder zwei undifferenzierte, totipotente Stammzellen hervorgehen, aus denen ein kompletter neuer Organismus entstehen kann. Totipotenz der Stammzellen besteht, nach heutigem Kenntnisstand, in Säugetieren längstens bis zum 8-Zell-Stadium des frühen Embryos. Danach gelten die Stammzellen als pluripotent und sind zur Differenzierung in unterschiedliche Zelllinien befähigt. Dies ist eine weitere Charaktereigenschaft der Stammzellen. Bei dieser asymmetrischen Teilung entstehen dann Progenitorzellen, die bereits Linien-determiniert sind.

1.1.2. Charakterisierung von Stammzellen

1.1.2.1. Embryonale Stammzellen (ES)

Embryonale Stammzellen werden aus der Zellschicht des frühembryonalen Trophoblasten gewonnen und können kultiviert werden. Charakteristisch für murine, wie auch humane ES ist, dass sie sich in alle drei Keimblätter differenzieren können. Außerdem behalten sie, solange sie in der Zellkultur mit sogenannten „Feeder“-Zellen kultiviert werden, den Status der Immortalität. Das bedeutet, dass sie weiterhin im undifferenzierten Zustand wachsen¹⁻³. Als „Feeder“ können bei humanen ES-Zellen inaktivierte murine, embryonale Fibroblasten (MEFs)^{2, 3}, humane fötale Fibroblasten, adulte Epithelzellen⁴, sowie Zellen der Vorhaut dienen⁵. Alternativ können sie auf Matrigel und Laminin in einem Medium gezüchtet werden, das vorher mit MEFs konditioniert wurde⁶.

Durch einen Wechsel der Kulturbedingungen („hanging drop culture“) können humane embryonale Stammzellen spontan zu frühembryonalen Gewebeverbänden mit

Anteilen aller drei Keimblätter differenzieren, die sogenannten „embryoid bodies“⁷. Eine andere Möglichkeit zur Differenzierung humaner ES ist eine gerichtete Differenzierung, die über Disaggregation zu bestimmten Zeitpunkten und/oder Kulturbedingungen erfolgt, unter Zugabe von spezifischen Zytokinen⁸.

Charakterisiert werden diese humanen Stammzellen durch typische Oberflächenmarker, wie SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 und eine hohe Aktivität von alkalischer Phosphatase und Telomerase.^{9,S.18}

1.1.2.2. Adulte Stammzellen

Während embryonale Stammzellen nur im frühen Embryo vorkommen, sind adulte Stammzellen im Organismus nach der Geburt vorhanden, haben aber im Allgemeinen ein geringeres Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotential.

Man teilt sie in hämatopoetische, mesenchymale, gewebsständige Stammzellen und sogenannte „side-population“-Zellen ein.

Hämatopoetische Stammzellen werden durch das Vorhandensein des CD34-Oberflächenmarkers charakterisiert. Da dies jedoch kein selektiver Stammzellmarker ist, sondern auch von anderen Zelltypen, wie endothelialen Zellen, exprimiert wird, gilt der Pan-Leukozytenmarker CD45 als weiteres Charakteristikum. Weitere herangezogene fakultative Marker sind CD38, CD133, CD90 und CD117. Frühe, unreife Stammzellen zeigen keine Expression von Linienmarkern (Lin-). Bis vor kurzem ging man davon aus, dass Stammzellen sich nur in den Zellen der hämatopoetischen Linie differenzieren können. Jedoch scheint die Differenzierungsmöglichkeit weitaus größer zu sein und umfasst Kardiomyozyten, Endothelzellen, Muskelzellen, Hepatozyten und Neurone¹⁰.

Mesenchymale Stammzellen (MSC) lassen sich aus der adhärennten Fraktion des Knochenmarks kultivieren und sind sehr proliferationsfähig. Sie sind positiv für folgende Marker: CD73 (Stromazellmarker), CD105 (Endothelzell-, Monozyten-, Makrophagen und Stromazellmarker), CD90 (hämatopoetischer Stammzell- und Stromazellmarker), CD106, CD29 und CD44 positiv, jedoch CD45 und CD34 negativ. Die MSC proliferieren zu adipogenen, chondrogenen, osteogenen und muskulären Zellen und unter bestimmten Umständen auch zu Kardiomyozyten¹¹.

Side-Population-Stammzellen weisen eine hohe Anreicherung an Langzeit-Stammzellen auf. Sie werden charakterisiert durch das effektive Ausschleusen des

Farbstoffes Hoechst 33342 oder Rhodamin ¹². In der Durchflusszytometrie (FACS Analyse) bilden sie eine separate Population an der Seite der Hauptpopulation. Die Side-Population-Stammzellen benötigen einen Transporter der ATP-bindenden Kasette (ABC), der die Farbstoffe aus der Zelle transportiert, beispielsweise das „breast cancer resistance protein“ (Bcrp)1/ABC- Transporter G2 (ABCG2) ¹³. Diese Zellen kommen in allen Geweben vor, weshalb diskutiert wird, ob es sich um gewebständige Stammzellen handelt. Funktionell sind sie in der Lage sich in Kardiomyozten oder Endothelzellen zu differenzieren ¹⁴.

Gewebständige Stammzellen sind als organständige Stammzellen die ersten, die nekrotische Gewebe ersetzen können. Zu ihnen gehören beispielsweise kardiale, hepatische und pankreatische Stammzellen ¹⁵.

Entgegen der klassischen Sichtweise, dass Stammzellen nach Erreichen eines bestimmten Reifungsprozesses keine Differenzierungsmöglichkeit mehr besitzen, mehren sich die Hinweise, dass eine Plastizität bei Stamm- und Progenitorzellen besteht ¹⁶.

Im Juli 2007 konnte durch Arbeitsgruppen in den USA und Japan erstmals gezeigt werden, dass es möglich ist, Fibroblasten der Haut, gewonnen aus einer Maus, umzuprogrammieren und so zurück zu einem pluripotenten Status zu wandeln. Diese wurden von den Wissenschaftlern als induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) bezeichnet. Die iPS werden in Morphologie, Proliferationsfähigkeit und Teratomer-Formation als gleichwertig den embryonalen Stammzellen beschrieben. In anderen Eigenschaften, wie beispielsweise den DNA-Methylierungsmustern und der Genexpression, gibt es jedoch Unterschiede ^{17, 18}.

Im November 2007 konnten ähnliche Ergebnisse auch für Hautfibroblasten des Menschen gezeigt werden. Durch Transduktion mit Hilfe eines Retrovirus von nur 4 Faktoren (Oct3/4, Sox2, Klf4 und c-Myc) kam es zu einer Umprogrammierung von differenzierten humanen Zellen zu Zellen mit einem pluripotenten Status ¹⁹.

Die Reichweite dieser neuen Entdeckungen kann zum jetzigen Zeitpunkt nur schwer eingeschätzt werden. Weitere Forschungen und Diskussionen, auch auf ethischer Ebene, werden uns in den nächsten Jahren begleiten.

1.2. Endotheliale Progenitor (EPC)

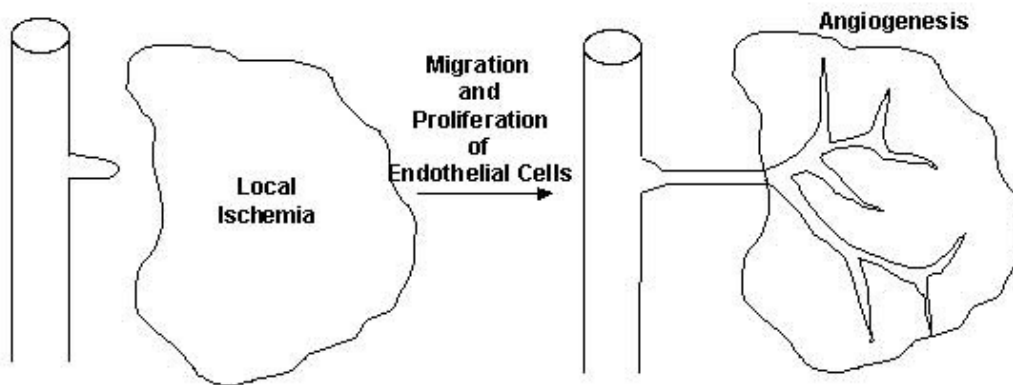
1.2.1. Definition

Endotheliale Progenitorzellen stammen von hämatopoetischen Stammzellen ab, werden aus dem Knochenmark freigesetzt und tragen wesentlich zur Neovaskularisierung und Regeneration von ischämischen Geweben bei. Kultivierte EPCs exprimieren verschiedene endotheliale Marker, wie von Willebrandfaktor, VEGF-Rezeptor 2 (KDR, flk-1), VE-Cadherine, CD146, CD31 und eNOS. Sie können aus aufgereinigten CD34+ oder CD133+ hämatopoetischen Zellen, CD14+ Monozyten oder unselektionierten, mononukleären Zellen des Peripherblutes kultiviert werden^{20, 21}. Die genaue Charakterisierung der EPCs ist allerdings immer noch Gegenstand zahlreicher Diskussionen.^{9,S.69}

1.2.2. Aufgaben: Neovaskularisation, Reparatur und andere Funktionen

Auch im adulten Körper besteht die Möglichkeit der Neovaskularisation. Man unterscheidet dabei drei Prozesse: Die Angiogenese, die Arteriogenese und die Vaskulogenese. Angiogenese bezeichnet man als Prozess, bei der neue Kapillaren aus bestehenden Blutgefäßen bereits existierender Endothelzellen entstehen. Bei der Arteriogenese entstehen Kollateralarterien durch strukturelles Remodelling von bereits bestehenden Arteriolen²². Die Arbeitsgruppe um Jeffrey Isner und Takayuki Asahara konnte erstmals zeigen, dass isolierte, kultivierte endotheliale Progenitorzellen in der Lage sind, kapillarähnliche Strukturen zu bilden²⁰. Diesen Prozess nennt man in Anlehnung an die embryonale Entwicklung des Gefäßsystems aus Angioblasten Vaskulogenese.

Conventional Concept „Angiogenesis“



Contribution of Progenitor Cells to Adult Vasculogenesis

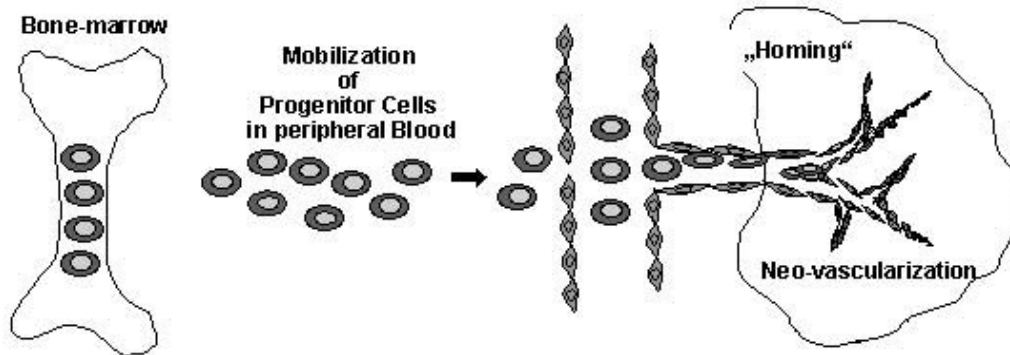


Abbildung 1: Gegenwärtiges Konzept zur Neovaskularisierung von ischämischem Gewebe im Erwachsenen: Angiogenese und Vasculogenese. Unter Angiogenese versteht man die Neubildung von Kapillaren durch Aussprossen von präexistenten Gefäßen. Dieser Prozess beinhaltet Migration und Proliferation von Endothelzellen. Bei der Vasculogenese kommt es nach einer Ischämie zu einer Mobilisierung von EPCs, die in das ischämische Areal einwandern und dort zu einer Neovaskularisation führen. Aus ²³

Vasculogenese findet postnatal vor allem nach peripherer oder myokardialer Ischämie statt. Dabei werden die EPCs aus dem Knochenmark durch Zunahme chemotaktischer Faktoren im ischämischen Areal mobilisiert. Im ischämischen Areal findet eine Hochregulierung von Wachstumsfaktoren, wie VEGF („vascular endothelial growth factor“) und SDF-1 („stromal-cell derived factor 1“) statt. Diese scheinen chemoattraktive Substanzen für die EPCs zu sein ²⁴. Die EPCs adhären, migrieren transendothelial und dringen in das ischämische Areal ²⁵. Dort können sie proliferieren und sich zu ausgereiften Endothelzellen differenzieren.

Durch die Entdeckung von Isner und Asahara ergaben sich völlig neue Ansatzpunkte der Verbesserung der Neovaskularisation. Eine Reihe von Tiermodellen wurden etabliert, um die jeweiligen Mechanismen zu untersuchen. So wurden menschliche EPCs ex vivo kultiviert, mit rot fluoreszierendem, acetylierten LDL

(DiLDL) markiert und in Tiere transplantiert, in denen zuvor eine experimentelle, unilaterale Ischämie induziert wurde, beispielsweise durch Induktion einer Hinterlaufischämie im athymischen Nacktmausmodell. Durch histologische Analysen konnte so gezeigt werden, dass die kultivierten EPCs sich in dem ischämischen Areal niederlassen und dort neue Blutgefäße bilden ²⁶.

Neben der Bedeutung für die Bildung neuer Blutgefäße, leisten EPCs auch ihren Beitrag zur Regeneration der Endothelzellschicht, der sogenannten Reendothelialisierung bereits existierender Blutgefäße. Erste Hinweise dafür wurden durch den Einsatz von Kreislaufunterstützungspumpen (LVAD) gefunden. Auf der dem Lumen zugewandte Seite der Pumpen kam es zu einer Ansiedlung von pluripotenten, hämatopoetischen Zellen. Die Zellen wurden als zirkulierende, aus dem Knochenmark stammende, endotheliale Progenitorzellen charakterisiert. Auch beim Einsatz der Ballondilatation bei koronaren Interventionen kam es an den denudierten Arealen des Gefäßes zu Endothelrekonstruktionen.

Diese und andere Beobachtungen deuten darauf hin, dass aus dem Knochenmark in die periphere Zirkulation freigesetzte Stamm- und Progenitorzellen befähigt sind, einen endothelialen Phänotyp anzunehmen, sich in geschädigte Endothelschichten zu inkorporieren oder in flächenhaft denudierten Arealen, erzeugt durch beispielsweise eine Ballondilatation, anzusiedeln und schließlich die Rolle von Endothelzellen einzunehmen.

So könnten die EPCs eine besondere Rolle bei der Entstehung von Arteriosklerose spielen. Der endotheliale Turnover, also der physiologische Ersatz von untergegangenen Endothelzellen in den Gefäßen durch zirkulierende Progenitorzellen, also eine Art Reparaturfunktion, könnte bei Patienten mit erhöhtem Arterioskleroserisiko gestört sein. Durch die Arteriosklerose kommt es zu einem erhöhten pathologischen Turnover, der einem relativen Mangel an endothelialen Vorläuferzellen gegenübersteht. Dies könnte zu einer initialen Verletzung des Endothels führen, was als Initialstadium der Atherogenese angesehen wird ²⁷.

1.3. Stammzelltherapie

1.3.1. Nutzen, Möglichkeiten und Gefahren der kardiologischen Stammzelltherapie

Erkrankungen des Herz- Kreislaufsystems sind, trotz verbesserter chirurgischer, medikamentöser, elektrophysiologischer und interventioneller Behandlungsstrategien, immer noch die Haupttodesursache in den westlichen Industrienationen. Ermutigt durch die positiven Resultate der tierexperimentellen Untersuchungen wurden erste klinische Stammzelltherapiestudien durchgeführt, um neue Methoden in der Behandlung der kardiovaskulärer Erkrankungen zu entwickeln. Besonders vielversprechend erschien dabei die Therapie bei Patienten nach Myokardinfarkt, da nach einem akuten Infarkt lokal und systemisch Zytokine, wie SDF-1, freigesetzt werden, welche endogene Stammzellen aus dem Knochenmark mobilisieren und anlocken. Vor allem die Herzinsuffizienz, die nach einem Myokardinfarkt durch myokardiale Remodellingprozesse entsteht, scheint durch den Einsatz von Progenitorzellen günstig behandelbar zu sein.

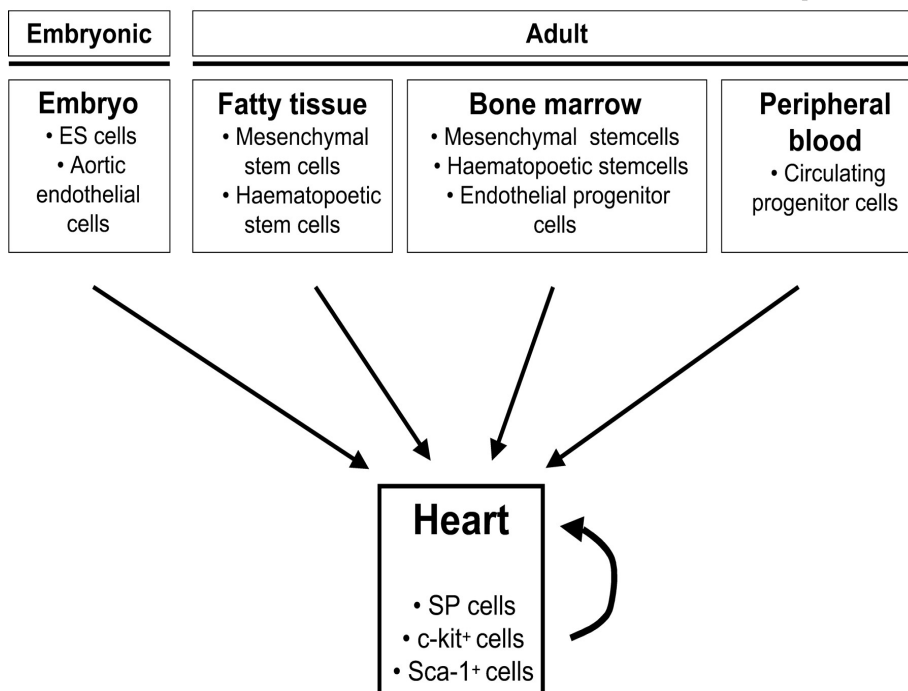


Abbildung 2: Übersicht über die möglichen Gewinnungsorte der verschiedenen Zelllinien für Herzregeneration. Aus ²⁸

In den verschiedenen Studien wurden die Zellen aus dem Knochenmark durch eine Beckenkammpunktion, aus dem peripheren Blut oder aus dem Fettgewebe gewonnen. Auf den Einsatz von embryonalen Stammzellen, die ein höheres Differenzierungspotential aufweisen, wurde zumindest in deutschen Kliniken bis zu diesem Zeitpunkt verzichtet, da neben den ethischen und rechtlichen Problemen auch eine hohe Entartungs- und Abstoßungsgefahr besteht.

Unterschiedliche Applikationsformen der Zellen wurden verwendet. So unterscheidet man grundsätzlich eine Herzkatheter-basierte intrakoronare Infusion, eine Herzkatheter-basierte intramyokardiale Injektion und eine chirurgische intramyokardiale Injektion der Zellen während einer Bypass-OP.

Stamm- oder Progenitorzellen können jedoch auch noch auf anderen Wegen, als nur über die Neovaskularisation, wie oben beschrieben, zur kardialen Regeneration führen. Die intrakoronare Injektion von aus dem Knochenmark gewonnenen Stammzellen führt auch zu einer Akkumulierung der Zellen in der Randzone des ischämischen Infarktgebietes, wie Tierstudien zeigen konnten^{14, 28}. Diese zeigten teilweise kardiale und/oder endotheliale Marker. Es wird noch diskutiert, ob dies ein Resultat einer Differenzierung der Progenitorzellen in kardiale Linien ist oder ob eine Zell-Zell-Fusion vorliegt²⁹. Ein anderer Mechanismus, der sich positiv auf die kardiale Regeneration auszuwirken scheint, ist ein parakriner Effekt der applizierten Stamm- oder Progenitorzellen auf das ischämische Gewebe des Infarktareals. Knochenmarkszellen sezernieren beispielsweise angiogenetische Wachstumsfaktoren, wie „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), „basic fibroblast growth factor“ (bFGF) und Angiopoetin. Dies führt zu einer erhöhten angiogenetischen Antwort des umliegenden Gewebes³⁰. Auch isolierte EPCs sezernieren verschiedene Wachstumsfaktoren, die die Neovaskularisation unterstützen²⁸.

1.3.2. Stammzelltherapiestudien in Europa

An dieser Stelle sollen nun fünf Studien vorgestellt werden, bei denen Herzkatheter-gestützt Knochenmarkszellen und EPCs intrakoronar infundiert wurden.

In einer ersten klinischen Studie haben Strauer et al. bei zehn Patienten die Sicherheit und Machbarkeit einer intrakoronaren Infusion von Knochenmarkstammzellen 10 Tage nach einem akuten Myokardinfarkt nachgewiesen

und dabei auch über eine Verbesserung der lokalen linksventrikulären Funktion berichtet.³¹

Die Topcare AMI (Transplantation of Progenitor Cells And Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction) Studie sollte ebenfalls die Sicherheit, die Durchführbarkeit und das Potential von endothelialen Progenitor- (EPC) und Knochenmarkszellen (KMZ) zeigen. Patienten wurden randomisiert, um KMZs (n=29) oder EPCs (n=30) zu erhalten. Die KMZs wurden durch eine Beckenkammfunktion gewonnen, mit Hilfe des Ficoll-Gradienten isoliert und sofort nach der Präparation mit Hilfe des Herzkatheters intrakoronar infundiert. EPCs wurden aus peripherem Blut gewonnen, 3 Tage ex vivo kultiviert und danach ebenfalls intrakoronar infundiert. Die Patienten erhielten die Behandlung durchschnittlich 5 Tage nach einem Myokardinfarkt. Die quantitative linksventrikuläre Angiographie nach 4 Monaten zeigte, dass die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) signifikant gegenüber einem nicht-randomisierten Patientenkollektiv gesteigert ($50 \pm 10\%$ zu $58 \pm 10\%$; $p < 0,001$) und das endsystolische Volumen signifikant gesenkt werden konnte (54 ± 19 ml zu 44 ± 20 ml; $p < 0,001$). Eine kontrastverstärkte Magnetresonanztomographie (MRT) zeigte nach einem Jahr, dass eine erhöhte Ejektionsfraktion vorlag, sowie eine reduzierte Infarktgröße und das Fehlen einer reaktiven Hypertrophie, was auf eine funktionelle Regeneration des betroffenen Ventrikels hindeutete. Der Effekt der beiden Zelltypen war vergleichbar. Es kam nur zu wenigen klinischen Ereignissen im Patientenkollektiv, was auf eine hohe Sicherheit der Behandlung schließen lässt.³²

In der BOOST-Studie (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) wurden 60 Patienten nach einer erfolgreichen PTCA-Intervention auf Grund eines akuten Myokardinfarktes randomisiert und auf zwei Gruppen mit je 30 Patienten verteilt. Die eine Gruppe bekam eine optimale Postinfarkt-Medikation und die andere Gruppe eine optimale Postinfarkt-Medikation plus eine intrakoronare Transfusion von autologen Knochenmarkszellen 4,8 Tage nach der PTCA-Intervention. Die Zellen wurden mit Hilfe von Gelatine-Polysuccinat-Dichtegradienten isoliert und noch am selben Tag zurück infundiert. Nach 6 Monaten kam es zu einem Anstieg der globalen, linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) von 6,7% in der Gruppe, die KMZs erhielt, gegenüber einer Verbesserung der LVEF von 0,7% in der Kontrollgruppe. Nach 18 Monaten wurde ein durchschnittlicher LVEF-Anstieg von 5,9% in der KMZ Gruppe gemessen und ein 3,1% Anstieg in der Kontrollgruppe. Der Unterschied in den beiden Gruppen zeigte nach 6 Monaten eine signifikante

Verbesserung in der Gruppe die Zellen bekam, jedoch keinen signifikanten Anstieg im 18-Monatevergleich. Der Zelltransfer führte zu keinem Risikoanstieg für klinische Ereignisse, wie eine Restenose des Stents oder proarrhythmischer Effekte.³³

Eine folgende belgische Studie von Janssens et al. randomisierte 67 Patienten nach einem erfolgreich reperfundierten, akuten Myokardinfarkt in eine Gruppe, welche eine intrakoronare Infusion von Knochenmarkzellen erhalten hatte und in eine Vergleichsgruppe. Diese Studie war doppelblind und plazebokontrolliert, das heißt, auch in der Vergleichsgruppe wurde Herzkatheter-gestützt ein Serum-Kochsalzlösung-Gemisch infundiert. Die Injektion erfolgte 24 Stunden nach dem akuten Myokardinfarkt. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der Infarktgröße (28%), gemessen mit dem MRT. Die Zunahme der linksventrikulären Ejektionsfraktion war jedoch statistisch nicht relevant (1%, $p=0,36$).^{34, 35}

Die REPAIR AMI-Studie ist eine kontrollierte, randomisierte und doppelverblindete-Multicenterstudie, mit über 200 Patienten, die KMZs oder aber zellfreies Plasma intrakoronar infundiert bekamen. In beiden Gruppen wurde Knochenmark aus den Beckenknochen entnommen, jedoch bekam ein Patientenkollektiv lediglich Placebo-Serum infundiert. Nach 4 Monaten verbesserte sich die linksventrikuläre Ejektionsfraktion in beiden Gruppen, jedoch signifikant höher in der Gruppe, die KMZs bekommen hatte (von 48% auf 54% in der KMZ-Gruppe, gegenüber 47% auf 50%; $p=0,021$)³⁶. Vor allem fiel auf, dass die Patienten mit der initial am stärksten reduzierten Ejektionsfraktion am meisten von der Therapie profitierten.³⁵

1.4. EPC und KHK

Die funktionelle Kapazität von EPCs korreliert mit der Anzahl der Risikofaktoren der Patienten. Vor allem EPCs, gewonnen aus Patienten mit koronarer Herzkrankheit, haben eine schlechtere migratorische Kapazität und eine geringere Neovaskularisationsfähigkeit als Zellen von gesunden Probanden. Dies geht auch mit einer eingeschränkten Kapazität der Stimulation des Blutflusses im Tiermodell der peripheren Ischämie nach Transplantation der EPCs einher. Auch die Anzahl der zirkulierenden EPCs ist bei Vorhandensein einer KHK erniedrigt²⁷.

Sowohl die basale wie auch die SDF-1 und VEGF-induzierte Migration von EPCs aus Patienten mit KHK ist im Vergleich zu Zellen von gesunden Probanden verringert³⁷.

Auch andere Erkrankungen, beispielsweise Diabetes mellitus Typ 2 gehen einher mit einer erniedrigten funktionellen Kapazität. Bei Diabetikern ist insbesondere die Adhäsion und Kapazität zur in vivo-Inkorporation eingeschränkt ³⁸.

1.5. Rolle von S1P-Rezeptoren und den Liganden S1P und FTY720

1.5.1. S1P und die S1P-Rezeptorenfamilie

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein bioaktives Lipid, abgeleitet von Sphingosin, dem Hauptbestandteil der meisten Sphingolipide. S1P ist der physiologische Ligand der S1P-, oder synonymen EDG-Rezeptorenfamilie. Die S1P-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Sieben-Transmembran-Rezeptoren, die unterschiedliche G-Proteine aktivieren und so eine Vielzahl an Signalwegen in der Zelle steuern.

Auf Endothelzellen beeinflusst S1P die Proliferation, Differenzierung, Migration und das Überleben der Zellen. Aber auch auf anderen Zelltypen, wie zum Beispiel Lymphozyten, glatte Muskel- und Knochenmarkszellen hat S1P eine Bedeutung ³⁹.

So haben S1P und die S1P-Rezeptoren diverse Effekte auf verschiedene physiologische Systeme des Körpers. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Angiogenese, der embryonalen Gefäßentwicklung- und Reifung, sowie der Immunität ⁴⁰. Ebenfalls nimmt S1P Einfluss auf die Herzrate, den Durchmesser der Koronararterien, den Blutdruck und reguliert die Rezirkulation von Lymphozyten ⁴¹. Abhängig ist dies von der Expression der S1P-Rezeptoren und den G-Proteinen auf den verschiedenen Zelltypen ³⁹.

Eine essentielle Rolle spielt bei der Gefäßentwicklung und -reifung der S1P1-Rezeptor, was mit Hilfe der Ausschaltung von Genen in Mäusen gezeigt werden konnte. So verstirbt die S1P1 -/- Knockout-Maus bereits in utero zwischen dem 12,5. bis 14,5. embryonalen Tag aufgrund von vaskulären Abnormalitäten, hervorgerufen durch die fehlende Migration von glatten Muskelzellen und Perzyten ⁴².

Auch der S1P3-Rezeptor hat eine bedeutende Rolle für die Gefäßentwicklung und proangiogenetische Reaktionen inne ^{43, 44}. HDL, welches unter anderem S1P enthält, hat einen vasoaktiven und vasoprotektiven Einfluss auf Endothelzellen und Blutgefäße, vermittelt über den S1P3-Rezeptor. Es kommt zu einer Aktivierung von

eNOS via Akt und so zu einer Freisetzung von NO, welches den Gefäßtonus reguliert⁴⁵.

Der S1P2-Rezeptor hingegen ist vor allem für inhibitorische Signale in anderen Zelltypen zuständig⁴⁶. Der S1P4-Rezeptor wird hauptsächlich auf Lymphgewebe expressiert, während S1P5 auf Zellen des ZNS und der Milz gefunden wird.

1.5.2. Was ist FTY720 und wofür ist es entwickelt worden?

FTY720 ist ein synthetisches S1P-Analogon, entwickelt von der Firma Novartis. Es befindet sich als neues Immunsuppressivum in Phase 3 der klinischen Zulassung und soll vor allem nach Nierentransplantationen zur Verhinderung von Organabstoßungen verwendet werden. FTY720 bindet an 4 der 5 relevanten S1P-Rezeptoren, einzig am S1P2-Rezeptor spielt es keine Rolle⁴⁷. Es induziert ein Homing der Lymphozyten in den sekundären lymphatischen Organen und verhindert so ein Zirkulieren von zytotoxischen T-Lymphozyten im Blutkreislauf⁴⁸.

Auf CD34+ Zellen verbessert FTY720 die SDF-1 induzierte Migration und das Knochenmarkshoming⁴⁹. So könnte FTY720 als potentieller Kandidat zur Verbesserung migratorischer Funktionen auch auf EPCs eine Anwendung finden.

1.6. Rolle von CXCR4 und seinem Liganden SDF-1

1.6.1. Aufgaben: Migration, Homing, Mobilisierung, Ischämie und Neovaskularisation

Der CXCR4-Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter Sieben-Transmembran-Rezeptor. Sein einziger bekannter Ligand ist das Chemokin SDF-1, ein 89 Aminosäure-Polypeptid, das von verschiedenen Zelltypen exprimiert wird. CXCR4/SDF-1 spielt physiologisch eine bedeutende Rolle in der embryonalen Hämatopoese, der vaskulären und zerebralen Entwicklung und der Kardiogenese.

Auf CD34+ Zellen spielt der CXCR4-Rezeptor eine wichtige Rolle bei der *in vitro*-Migration, und SDF-1 ist ein Hauptregulator der hematopoetischen Stammzellbewegung zwischen dem Knochenmark und dem peripheren Blut²⁵.

Der CXCR4-Rezeptor ist außerdem Co-Rezeptor für HIV Typ 1-Infektionen und ermöglicht dem Virus den Eintritt in CD4+ Zellen⁵⁰. Auch ist der CXCR4-Rezeptor auf

einer Vielzahl von Tumorzellen exprimiert. Diese CXCR4 positiven Tumorzellen können in Organe metastasieren, die SDF-1 sezernieren, wie beispielsweise Knochen, Lymphknoten, Lunge und Leber. SDF-1 steuert dabei Prozesse, die essentiell für den Tumor sind, wie die Fortbewegungsfähigkeit der malignen Zellen, ihre Chemotaxis, die Adhäsion und die Bildung von Tumovaskularisierung. Die Blockierung des CXCR4-Rezeptors scheint in diesem Falle eine interessante Möglichkeit zur Behandlung von CXCR4 positiven Tumoren ⁵¹.

Auf EPCs steuert der CXCR4-Rezeptor Prozesse, wie die Mobilisation der Zellen aus dem Knochenmark, Transmigration und das Homing in unterschiedliche Gewebe. Bei einer Ischämie, beispielsweise nach einer Sauerstoffunterversorgung des Herzens, sezerniert das umliegende Gewebe neben einer Reihe anderer Substanzen SDF-1. Hierdurch werden EPCs rekrutiert. Vermittelt durch den CXCR4-Rezeptor kommt es zu einem Homingprozess der EPCs in das ischämische Gebiet und zur Neovaskularisation. Dies konnte gezeigt werden unter Verwendung von heterozygoten CXCR4 +/- Mäusen, deren EPCs und KMZs eine signifikant schlechtere Migration und Invasion gegen SDF-1 hatten. Auch die Transplantation der Zellen in hinterlaufischämische Nacktmäuse bewies, dass es zu einer verminderten Neovaskularisation kam ⁵².

1.6.2. Signalkaskade JAK/STAT

Durch eine Phosphorylierung des CXCR4-Rezeptors kommt es zu einer Aktivierung des nachgeschalteten Enzyms JAK2. Dies aktiviert wiederum das Enzym STAT3, welches in den Zellkern vordringt und dort als Transkriptionsfaktor wirkt und so die Genexpression beeinflusst ⁵³. Auch andere Rezeptoren bewirken eine Aktivierung des JAK2/STAT3-Signaltransduktionsweges, beispielsweise der IL3-Rezeptor.

1.6.3. CXCR4-Rezeptor und KHK

Einer der Gründe für die erniedrigte funktionelle Kapazität der EPCs bei Patienten mit KHK könnten fehlerhafte Signalkaskaden innerhalb der Zelle sein mit dem Vorliegen einer Dysbalance an intrazellulären Enzymen.

Da der CXCR4-Rezeptor eine wichtige Rolle für die angiogenetische Aktivität der EPCs zu spielen scheint, könnte er auch bei Patienten mit KHK für die reduzierte Funktionalität mitverantwortlich sein.

Die Phosphorylierung von JAK2 ist in Zellen von Patienten mit einer bestehenden KHK nach Inkubation von SDF-1 signifikant niedriger als in EPCs von gesunden Probanden, wobei die CXCR4-Rezeptordichte bei beiden Gruppen keinen Unterschied zeigt. Eine Inkubation mit Interleukin IL3, das bekanntermaßen JAK2 aktiviert, zeigte, dass Patienten-EPCs keinen generellen Mangel von JAK2 haben, sondern dass das Problem auf der Ebene des CXCR4-Rezeptors oder eines übergeordneten Signalprozesses zu liegen scheint⁵². Eine therapeutische Intervention könnte auf dieser Ebene möglich sein.

1.7. Ziele der Arbeit

Wie erste klinische Studien belegen, könnte die klinische Anwendung von adulten Stammzellen eine neue und interessante Alternative bei der Behandlung von weitverbreiteten Krankheiten sein. Vor allem in der Kardiologie scheint der Einsatz von endothelialen Progenitorzellen vielversprechend, wie die TOPCARE-AMI, BOOST und andere Studien zeigen konnten. Jedoch ist der theoretische Wissensstand über die EPCs zurzeit noch begrenzt.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den funktionellen Einschränkungen der EPCs von Patienten mit koronarer Herzerkrankung und untersucht diese. Das Ziel ist, die Zellen in ihrer funktionellen Eigenschaft durch pharmakologische Intervention zu verbessern. So könnte in Zukunft der Einsatz von körpereigenen EPCs im klinischen Alltag durch Inkubation mit potenzierenden Substanzen noch weiter verbessert werden.

Ein wichtiger Schlüssel scheint die Untersuchung der biochemischen Signalwege in der Zelle zu sein. Besonderes Interesse wurde in dieser Studie auf die S1P-Rezeptorfamilie und den CXCR4-Rezeptor gelegt, da sie eine herausragende Bedeutung für die funktionelle Kapazität besitzen. Der synthetische S1P-Rezeptor-Agonist FTY720 und der physiologische Agonist S1P wurden hier als mögliche Kandidaten für die pharmakologische Modulation der EPCs überprüft.

Zunächst sollte deshalb in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die S1P-Rezeptoragonisten S1P und FTY720 zu einer Verbesserung der Neovaskularisation durch EPCs in hinterlaufischämischen Nacktmäusen führen. Um die Bedeutung des

S1P3-Rezeptors für die funktionelle Kapazität und die Wiederherstellung des Blutflusses hervorzuheben, wurden mit Hilfe der S1P3 $-/-$ Maus in vivo und in vitro Versuche durchgeführt. Danach wurde die Aktivierung des CXCR4-Signalweges durch S1P-Agonisten überprüft. Dafür standen auch CXCR4 $+/-$ Mäuse zur Verfügung. Darüber hinaus wurde nach weiteren Proteinen gesucht, die an dem S1P/CXCR4 Signalweg beteiligt sein könnten. Dafür wurden der Src-Kinase-Familien-Inhibitor PP2 und MEF-Zellen mit src/fyn/yes $-/-$ verwendet. Abschließend wurde überprüft, ob der S1P3-Rezeptor ebenfalls Bedeutung an der Aktivierung vom CXCR4-Rezeptor hat.

2. Methoden

2.1. Studienpopulation und Patientencharakteristik

Die peripheren, mononukleären Zellen und die Knochenmarkszellen wurden isoliert aus dem peripheren Blut von gesunden Freiwilligen oder Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung, die angiographisch durch das Vorhandensein von koronaren Läsionen bewiesen wurde. Patienten mit einer akuten Myokardischämie, mit den typischen Symptomen Brustschmerz, EKG ST-Hebung, und Anstieg von Troponin T oder der Kreatininkinase wurden ausgeschlossen. Weitere Ausschlusskriterien waren das Vorhandensein einer chronischen Entzündung, chirurgischen Eingriffe, einem Schlaganfall oder eines Traumas in den letzten drei Monaten, sowie das Vorliegen einer malignen Erkrankung.

Die Ethikkommission der Johann Wolfgang Goethe – Universität in Frankfurt hat das Protokoll genehmigt und die Studie wurde gemäß der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Jeder Patient und Proband hat sein schriftliches Einverständnis gegeben.

2.2. Zellkultur

2.2.1. Menschliche EPC-Gewinnung und Kultivierung

Zur Gewinnung menschlicher EPCs diente Blut von gesunden Spendern oder aus „buffy coats“ des Blutspendedienstes Hessens.

Das Blut wurde 1:1 mit „phosphate buffered saline“ (PBS) (Clonetic, Vervies, Belgien) verdünnt. 15 ml Biocoll[®]-1077 (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) wurden in einem weiteren Röhrchen vorgelegt und 30 ml des Blut-PBS-Gemisches aufgeschichtet. Nach Zentrifugation bei 800g bei Raumtemperatur über 20 Minuten wurde die mononukleäre Zellfraktion an der Phasengrenze mit der Pipette abgenommen.

Die mononukleäre Zellfraktion wurde nun dreimal mit PBS gewaschen (800g, Raumtemperatur, 10 min) und mit Hilfe einer Neubauer- Zählkammer gezählt. Die Zellen wurden dann auf $8 \cdot 10^6$ /ml eingestellt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in

„Endothelial Basal Medium (EBM)“ (Clonetics, Köln, Deutschland) mit folgenden Zusatzfaktoren: fetal calf serum (FCS), 1‰ human endothelial growth factor (hEGF), 1‰ Hydrocortison, 1‰ glutamat und 4‰ bovine brain extract (BBE) (Clonetics, Verviers, Belgien). Als Kulturschalen dienten 6-Lochplatten, die vorher eine halbe Stunde mit 10 µg/ml Fibronectin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) beschichtet wurden. Diese wurden dann für 3 Tage bei 37° Grad Celsius und 5% CO₂ in einem Brutschrank kultiviert.

2.2.2. Embryonale Mausfibroblasten-Kultivierung

Es wurden embryonale Mausfibroblasten (MEF) verwendet, die die Proteine Src-Kinase, Fyn-Kinase und Yes-Kinase homozygot ausgeschaltet haben. Außerdem wurden Wildtyp-Varianten benutzt. Embryonale Mausfibroblasten wurden in DMEM mit Glutamax, 10 % hitzeinaktiviertem FCS (Fötalem Kälberserum) + Pen/Strep und Geneticin kultiviert. Die Kultivierung unter Geneticin diente zur Unterdrückung der Proteinexpression von Src, Fyn und Yes. Die Zellen wurden mittels Trypsinverdau abgelöst, in 6-cm-Platten ausgebracht und für 18 Stunden kultiviert, bevor sie stimuliert wurden.

Danach wurden die Zellen mit Zellschabern und der Zugabe von PBS + Natriumorthovanadat (Na₃VO₄) von den Schalen abgelöst, die Zellsuspension in 15 ml Röhrchen pipettiert und die Zellen bei 4° C mit 800 g 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand konnte abgesaugt werden und das Zellpellet mit 1ml PBS + Natriumorthovanadat (Na₃VO₄) in ein Eppendorfgefäß überführt werden. Nach einer weiteren Zentrifugation war das Zellpellet bereit, lysiert und für weitere Versuche verwendet zu werden (s.u.).

2.2.3. Gewinnung der Knochenmarkszellen aus Mäusen

Zur Gewinnung von Knochenmarkszellen (KMZ) aus dem Humerus- und Femurknochen wurden C57Bl6/J-Mäuse und ihre transgenen Varianten (CXCR4 +/- Heterozygot und S1P3 -/- Mäuse) verwendet. Unter sterilen Bedingungen wurden den mit einer Überdosis an Isofluran getöteten Mäusen die Knochen entnommen, der Knochenmarkskanal geöffnet, dieser mit Hilfe einer Spritze mit PBS durchspült und so die Knochenmarkszellen gewonnen. Die Knochenmarkszellen wurden auf 15 ml Biocoll

aufgeschichtet, bei 800g 20 Minuten lang zentrifugiert und die mononukleäre Zellfraktion mit der Pipette abgenommen. Es folgte ein dreimaliges Waschen der Zellen bei 800g und Raumtemperatur. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.4. Behandlung der Kulturen mit verschiedenen pharmakologischen Substanzen

In der Zellkultur wurden unterschiedliche Antikörper und pharmakologische Substanzen verwendet, um verschiedene Funktionen der Zellen zu untersuchen.

Eingesetzte Substanzen waren:

- Sphingosin-1-Phosphat (S1P)(Sigma, #S9666)
- FTY720 (Novartis Institute for Biomedical Research, Basel, Schweiz, zur Verfügung gestellt von V.Brinkmann, PKF 117-812-AA-1)
- Stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α)(R&D Systems, #350-NS)
- Anti-CXCR4-Antikörper (R&D Systems, #MAB170),
- IL3 (Interleukin 3)(R&D Systems, #203-IL)
- PP2 (Calbiochem, #529573)

2.3. Biochemische und Immunologische Methoden

2.3.1. Zellmigrationsassay

Es wurde eine modifizierte Boyden-Kammer von Costar benutzt (Transwell assay, 6.5mm, 5 μ m Porengröße, Corning, New York, USA), eingehängt in eine 24-Loch-Kulturschale.

Die Transwellkammern wurden in einer Konzentration von 5 μ g/ml mit Fibronectin (Roche, 1051, 4079) beschichtet und für 2 Stunden inkubiert.

Die behandelten EPCs von den Patienten oder Probanden wurden mit EBM gewaschen, für 2 Stunden inkubiert und mit Cell Tracker DiL (Molecular Probes C 7000) gefärbt. Zum Ablösen der Zellen diente EDTA. Die Zellen wurden danach

zweimal gewaschen, mit Hilfe einer Neubauer- Zählkammer gezählt und auf 5×10^5 Zellen pro 50 μ l RPMI plus 0,06% BSA eingestellt.

Das Fibrinogen wurde abgesaugt und die Transwellkammern in die mit 600 μ l RPMI und 0,06% BSA gefüllten 24-Lochplatten eingesetzt. In die Transwellkammern wurden die 5×10^5 Zellen eingesetzt und für 24 Stunden in den Inkubator gestellt.

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die migrierten Zellen mit 4%igem Formalaldehyd fixiert und die an der unteren Seite der Transwellkammer befindlichen Zellen gezählt.

Zum Zählen der migrierten Zellen wurde das Fluoreszenzmikroskop Axiovert 40 der Firma Carl Zeiss verwendet. Um das manuelle Zählen objektiv zu gestalten, wurde der Versuch durch unabhängige Untersucher vorher verblindet und von mindestens 2 Untersuchern unabhängig voneinander durchgeführt.

2.3.2. Invasionsassay

Es wurde eine modifizierte Boyden-Kammer gefüllt mit Matrigel, von BioCoat benutzt (BioCoat Invasion Assay, 8 μ m Porengröße, Becton Dickinson Labware, Massachusetts), die in eine 24-Loch-Zellkulturschale eingehängt wird.

Die Matrigelkammern wurden mit 200 μ l serumfreien X-Vivo 15 Medium befüllt und kamen für eine Stunde in den Inkubator.

Eingesetzt wurden 10^6 Knochenmarkszellen aus den C57Bl6/J Mäusen oder ihren transgenen Varianten, deren Gewinnung weiter oben beschrieben wurde, aufgenommen in ein 50 μ l X-Vivo 15 Medium.

Die Zellen kamen dann in die einsatzbereiten Matrigelkammern. In die untere Kammer der Zellkulturschalen wurden 500 μ l EBM Medium pipettiert. Die Zellkulturschale mit den Matrigelkammern kam dann für 24 Stunden in den Inkubator bei 37° Celsius und 5% CO₂.

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die durchgedrungenen Zellen, in der unteren Kammer von mindestens zwei Untersuchern unabhängig von einander gezählt.

2.3.3. Western-Blots

2.3.3.1. Ablösung der Zellen, Lysierung und Bestimmung der Proteinkonzentration

Verwendet wurden EPCs aus Menschen- und Mäusemilzen, Mäuseknochenmarkszellen und MEF-Zellen.

Die EPCs wurden, nach der Stimulation, mit Hilfe von Zellschabern und Zugabe von PBS + Natriumorthovanadat (Na_3VO_4) von den Schalen abgelöst, die Zellsuspension in 15-ml-Röhrchen pipettiert und die Zellen bei 4°C mit 800g 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand konnte abgesaugt werden und das Zellpellet mit 1ml PBS + Natriumorthovanadat (Na_3VO_4) in ein Eppendorfgefäß überführt werden. Der komplette Vorgang wurde gekühlt auf Eis durchgeführt.

Knochenmarkszellen wurden wie oben beschrieben gewonnen und standen nach der Aufreinigung zum Lysieren zur Verfügung. Die Ablösung von MEF-Zellen ist in Kapitel 2.2.2. beschrieben worden.

Zum Lysieren der Zellen wurde RIPA Puffer mit 1 mmol/l Natriumorthovanadat und 50 mmol/l Natriumfluorid und 20 mmol/l Natriumpyrogenphosphat verwendet. Je nach Größe des zu lysierenden Zellpellets, wurden 500 µl bis 1 ml RIPA plus Zusätze verwendet, auf die Zellen pipettiert und resuspendiert. Nach 30 Minuten wurden die Eppendorfgefäße bei 15000 rpm und 4° Celsius für 15 Minuten zentrifugiert. Im Überstand waren nun die Proteine der Zellen enthalten, die in ein neues Eppendorfgefäß überführt werden konnten.

Zur quantitativen Proteinbestimmung wurde ein Photometer der Firma Biorad verwendet. In Plastikküvetten wurde 800 µl H_2O vorgelegt und dann 1 µl des Protein-RIPA Gemisches hinzu pipettiert. Zur Färbung dienten 200 µl Bioradlösung.

2.3.3.2. Polyacrylamid – Gelelektrophorese

Zum Auftrennen der Proteine wurde eine SDS PAGE (Abkürzung für *engl.* sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) verwendet. Als Trenngel diente eine 12 % Acrylamidlösung, bestehend aus 5.1 ml H_2O , 1.88 ml Trenngelpuffer (1.5 mol/l TRIS pH 8.8 und 0.4% SDS), 6ml Acrylamid, 300 µl 10%iges APS und 12 µl Temed Lösung. Das Sammelgel bestand aus 5.5 ml H_2O , 2.5 ml Sammelgelpuffer (0,5 mol/l TRIS pH 6,8 und 0,4% SDS), 1.7 ml Acrylamid, 100 µl APS und 10µl Temed.

Die Proben enthielten alle denselben Proteingehalt und wurden mit Loading Dye auf das gleiche Volumen, zwischen 10 und 20 µl gebracht. Danach wurden sie fünf Minuten lang bei 100° Celsius auf einen Heizblock denaturiert, anschließend kurz bei 15000 rpm zentrifugiert und auf 1,5 mm dickem Gel bei einer Spannung von 120 Volt für 2 Stunden elektrophoretisch getrennt. Als Marker diente Rainbow RPN 756. Der Laufpuffer bestand aus 25 mmol/l TRIS, 192 mmol/l Glycin und 1% SDS.

2.3.3.3. Western-Blot

Der SDS PAGE folgte ein Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran. Als Puffer diente ein gekühlter Blotpuffer mit 5,8g /l Tris (= 48 mmol/l), 29g/l Glycin (= 386 mmol/l), 2,5 ml 20%iges SDS (= 0,05%) und 200 ml Methanol (= 20%). Die Nitrozellulose und 4 Blotpapiere wurden im Blotpuffer eingeweicht, 2 Blotpapiere wurden auf das Blotsystem von BioRad gelegt, dann die Nitrozellulosemembran, dann das Gel und darüber noch einmal 2 Blotpapiere. Für 90 Minuten wurde dann eine Spannung von 80 Volt auf die mit Eis gekühlte Transferbox (BioRad) gelegt, damit die Proteine transferieren konnten.

Nach Ablauf der Zeit wurde die Nitrozellulosemembran, die nun die getrennten Proteine enthielt, kurz in TBS-T (TBS-Tween) eingeweicht und mit Hilfe von TBS-T plus 5 % BSA für eine Stunde geblockt. TBS bestand aus 25 ml 2mol/l TRIS ph 8.0, 30 ml 5 mol/l NaCl und 2,5 ml 1 mol/l KCl, aufgefüllt auf einen Liter mit H₂O. 0,2 % Tween wurde hinzugegeben, um TBS-T zu erhalten. Über Nacht wurde ein polyklonaler 1. Antikörper gegen das zu detektierende Protein in TBS-T mit 5 % BSA inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der 1. Antikörper verworfen, die Membran dreimal mit TBS-T für 15 Minuten gewaschen und danach der entsprechende 2. Antikörper (ECL Anti Rabbit, ECL Anti Mouse von Amersham Biosciences) für 90 Minuten inkubiert (1:10000 in TBS-T mit 5% BSA). Darauf folgte ein weiterer Waschgang (3x 15 Minuten in TBS-T).

Zur Detektierung wurde ein Chemiluminiszenzverfahren verwendet. Dazu wurde 1 ml der Lösungen 1 und 2 (Amersham, USA) in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und für 1 Minute auf die Membran gebracht. Die Membran wurde danach zusammen mit einem Photopapier in eine Photobox gelegt, für unterschiedliche Zeiten belichtet und entwickelt. Die Banden wurden sichtbar.

2.3.4. Immunpräzipitation

Alle Schritte wurden gekühlt durchgeführt. Die EPCs wurden, wie oben beschrieben, mit RIPA Puffer lysiert und die Proteinmenge mit der Hilfe des Photometers bestimmt. Die Proteinmenge pro Probe wurde auf 1000 µg eingestellt und der CXCR4 Antikörper (Santa Cruz 1:1000) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente ein IgG-Antikörper. Das Zellgemisch wurde über Nacht, mindestens 12 Stunden, auf einem Überkopffrotator bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 µl Agarose Beads mit Na₃VO₄ hinzugegeben und weitere 2 Stunden auf dem Überkopffrotator inkubiert. Es folgten mehrere Waschschrte und danach Zugabe von Loading Dye. Nun wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, mit anschließenden Western-Blot, wie oben beschrieben. Dabei wurde die Tyrosin-Phosphorylierung des CXCR4-Rezeptors festgestellt (Upstate 1:1000).

2.3.5. Histologische Bilder

Die kapillare Dichte wurde aus 8 µm dicken, gefrorenen Schnitten der Adduktor- und Semimembranosusmuskeln von ischämischen und nicht-ischämischen Hinterläufen bestimmt. Die Schnitte wurde auf Objektträgern aufgenommen.

Für die Färbung wurden die gefrorenen Schnitte 30 Minuten lang aufgetaut und dann für zwei Minuten in eiskaltes Aceton gelegt. Danach wurden sie für fünf Minuten in PBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation über 60 Minuten in einem 5% Milchpulver-PBS-Natriumazid-Puffer, in dem Anti-Laminin (1:25) zugesetzt wurde, um die Myozyten zu färben. Danach wurden die Objektträger dreimal in PBS gewaschen. Darauf folgte eine weitere Inkubation mit dem gleichen Puffer, Anti-Rabbit-Ig-Alexa-Fluor 488 (1:200) und Anti-Mouse-CD 31 PE (1:100), um die Kapillaren zu färben. Die Objektträger wurden dann erneut dreimal mit PBS gewaschen.

Die Auszählung erfolgte am konfokalen Mikroskop. Die kapillare Dichte wurde als Ratio Kapillaren / Myozyten ausgedrückt, bei einer 40-fachen Vergrößerung. Mindestens 10 zufällig gewählte Abschnitte wurden von zwei unabhängigen Untersuchern betrachtet und ausgezählt.

2.3.6. Colony Forming Units

Es wurden Mäuse-EPCs aus Milzen verwendet. Die Zellen wurden wie oben beschrieben für drei Tage kultiviert. Nach drei Tagen wurden die adhärenenten Zellen abgelöst, gewaschen und in EBM-Medium in eine 24-Loch-Platte gesetzt, die vorher eine Stunde mit einer 1:100 Fibronectinlösung beschichtet wurde. Pro Loch wurden 4×10^6 Zellen eingesetzt. Nach sieben Tagen im Brutschrank wurde das EBM-Medium abgesaugt und die Kolonie mit Dil-Ac-LDL (2,4 µg/ml Medium) in EBM-Medium für eine Stunde bei 37° Celsius gefärbt. Danach wurde das Medium mit Dil-Ac-LDL erneut abgesaugt. Nun konnten die Kolonien mithilfe des Fluoreszenzmikroskops dargestellt und bei einer zehnfachen Vergrößerung gezählt werden. Die Zählungen wurden durch zwei unabhängige Untersucher durchgeführt.

2.4. Analysemethoden

2.4.1. FACS Analyse

Die Zellen (MEF oder EPC) wurden mittels Trypsinverdau von der Zellschale abgelöst und mit Wash Perm Buffer (Pharmingen BD) gewaschen. Zum Fixieren und Permeabilisieren diente Cytofix/Cytoperm (Pharmingen BD), das für 20 Minuten bei 4°C inkubiert wurde. Danach folgten zwei Waschgänge mit Wash Perm Buffer und die Inkubation des 1. Antikörpers (S1P1, 2, 3, 4 von Ex-alpha, Watertown, USA) für 30 Minuten bei 37° Celsius. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen zweimal gewaschen, der zweite, FITC gekoppelte Antikörper dazugegeben und wieder bei 37° Celsius inkubiert. Die nun immunfluoreszenz-markierten Zellen wurden mit PFA 2% fixiert und mit Hilfe der Durchflusszytometrie FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) (FACScalibur II mit Cellquest Software, BD Biosciences, San Jose, USA) analysiert. Als negative Kontrolle dienten isotyp-identische, direkt konjugierte Antikörper. Es wurde bis 10.000 Zellen pro Probe gezählt.

2.5. Tiermodelle

2.5.1. Mausstämme

Die athymischen NMRI Nacktmäuse, CXCR4 +/- Mäuse (B6.129X-Cxcr4^{tm1Qma}/J) und C57Bl6/J Hintergrund-/Wildtypmäuse wurden von der Firma Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA) erworben. S1P3 -/- Mäuse wurden freundlicherweise von J. Chun (La Jolla, Kalifornien, USA) zur Verfügung gestellt.

2.5.2. Hinterlaufischemiemodell

Um die Inkorporation und die Neovaskularisation der EPCs zu untersuchen, wurde ein Mausmodell mit 8-10 Wochen alten NMRI-Nacktmäusen verwendet. Sie wogen 18 bis 22 Gramm. Betäubt wurden die Mäuse mit Medetomidin (Domitor) 0,1 mg/kg und 4 % Chloralhydrat (400 mg/kg), intraperitoneal injiziert. Zur peri- und postoperativen Analgesie erhielten die Tiere Carprofen (5 mg/kg) s.c. verabreicht. Mit Hilfe einer feinen Schere wurde die Haut im rechten Hinterlauf der betäubten Maus geöffnet, die Arteria Femoralis superficialis frei präpariert und eine Ischämie der proximalen Arteria Femoralis superficialis mit ihren tiefen Abgängen durch Ligation mit 7.0 Silk Naht erreicht. Zur Obliteration der arteriellen Seitenäste diente ein Elektrokoagulator (Erbe, Tübingen, Germany). Die überlappende Haut wurde mit Hilfe von chirurgischen Klammern geschlossen.

Einen Tag später wurde den Mäusen eine intravenöse Gabe von 5×10^5 EPC injiziert.

2.5.3. Hinterlaufperfusion

Nach 2 Wochen wurde die Durchblutung der operierten Nacktmäuse mit Hilfe eines Laserdoppler-Blutflussmessers (Laser Doppler Perfusion Imager System, moorLDITM-Mark 2, Moor Instruments, Wilmington, Delaware, USA) festgestellt. Die Mäuse standen während der Messung unter Betäubung mit 4% Chloralhydrat intraperitoneal.

2.6. Statistische Analyse

Alle Daten sind angegeben als arithmetisches Mittel +/- der Standardabweichung, es sei denn, es ist anders beschrieben. Kontinuierliche Variable wurden mit dem Student's-T-Test oder dem Mann-Whitney-U-Test verglichen. Multiple Vergleiche wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test oder ANOVA mit Bonferroni Korrektur mit Hilfe von SPSS 11.0. durchgeführt. Ein P-Wert von $<0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

3. Resultate

3.1. Verbesserung der EPC Funktion durch S1P und FTY720

3.1.1. S1P und FTY720 erhöhen die in-vivo-Neovaskularisation im Hinterlaufischämiemodell in der athymischen Nacktmaus

Zur Untersuchung der Neovaskularisationskapazität in vivo wurde eine Hinterlaufischämie am rechten Bein der athymischen Nacktmaus induziert. Es wurden EPCs von gesunden Probanden verwendet und EPCs von Patienten, die mit S1P (200 nM) und FTY720 (10 nM) für 2 Stunden inkubiert wurden.

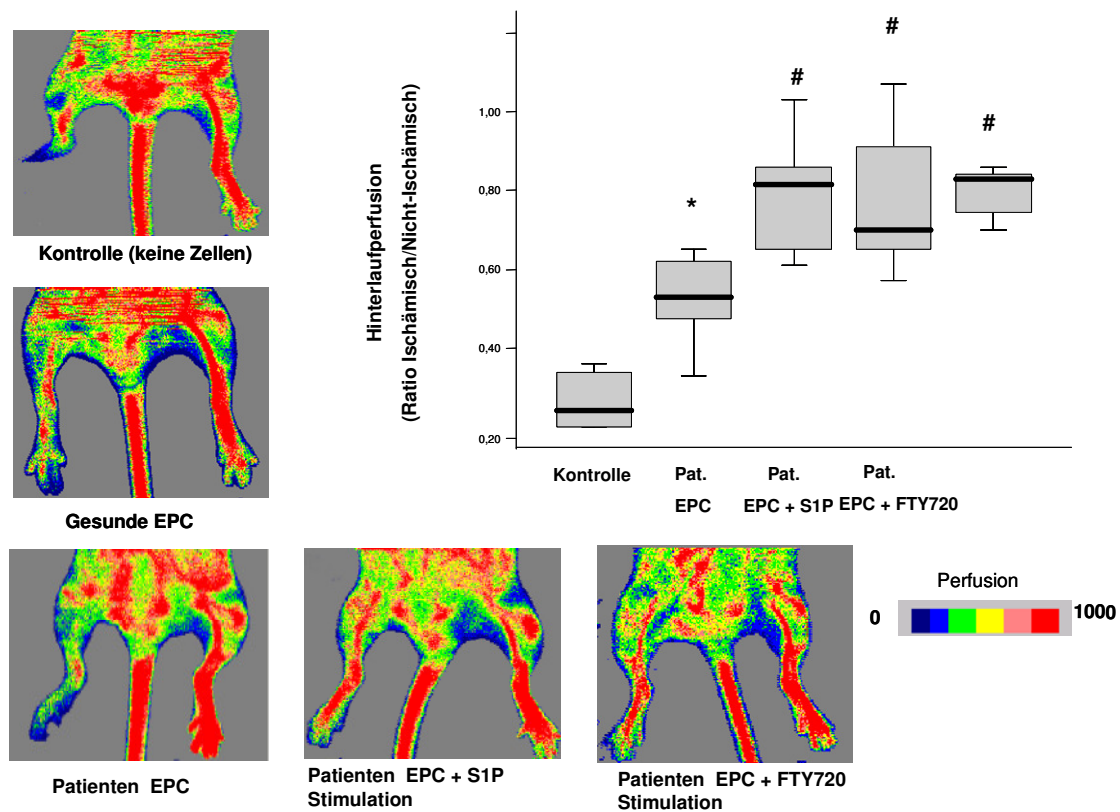


Abbildung 3: S1P und FTY720 unterstützen die in vivo Neovaskularisation nach EPC Transplantation. Links und unten im Bild: Representative Photographien der Laserdoppler-Perfusions-Bildgebung, am Tag 14. Ischämische (rechts) und nicht-ischämische Beine (links), nach Ligation der A. Femoralis, mit und ohne EPC Transplantation, mit und ohne Stimulation. Oben rechts im Bild: Quantifizierung des mit dem Laser Doppler ermittelten Blutflusses. N= 6 bis 7 pro Gruppe. * P < 0,01 gegen Kontrolltiere ohne Behandlung. # P < 0,01 gegen unbehandelte Patienten EPCs

Ein Tag nach der Operation bekamen die Mäuse diese Zellen i.v. transplantiert. Außerdem gab es noch eine Kontrollgruppe, in der die Mäuse keine Zellen, sondern PBS gespritzt bekamen.

Wie schon vorher gezeigt werden konnte, führt eine Transplantation von EPCs in hinterlaufischämische Mäuse zu einer erhöhten Neovaskularisation nach 2 Wochen⁵². Es zeigte sich, dass die EPCs von Patienten mit KHK signifikant schlechtere Werte hatten, als die EPCs von gesunden Probanden. Jedoch können, durch die Vorinkubation mit den S1P-Rezeptoragonisten für 2 Stunden, die EPCs der KHK Patienten verbessert werden und so ein erhöhter Blutfluss in den operierten Beinen erzielt werden. Es wird annähernd eine Neovaskularisierung erreicht, die dem Level der EPCs von gesunden Probanden entspricht. Die Mäuse, die nur PBS injiziert bekamen, erzielten die schlechtesten Werte. Oftmals kam es bei diesen zu einem Verlust des rechten Hinterlaufs.

3.2. Verschlechterte Angiogenese in S1P3 -/- Mäusen

3.2.1. S1P Expression auf kultivierten EPCs von Patienten mit KHK und gesunden Probanden

Um die Expression von S1P-Rezeptoren auf EPCs von Patienten mit KHK und von gesunden Probanden nach einer 3-Tage-Kultivierung zu zeigen, wurde eine FACS-Analyse (Durchflusszytometrie) durchgeführt. Es zeigte sich, dass S1P1, S1P3, S1P2 und S1P4 exprimiert werden, wobei S1P1 die höchste Expression zeigte. Es erwies sich auch, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Expression von S1P-Rezeptoren auf EPCs von Patienten mit einer bestehenden KHK und gesunden Probanden gibt.

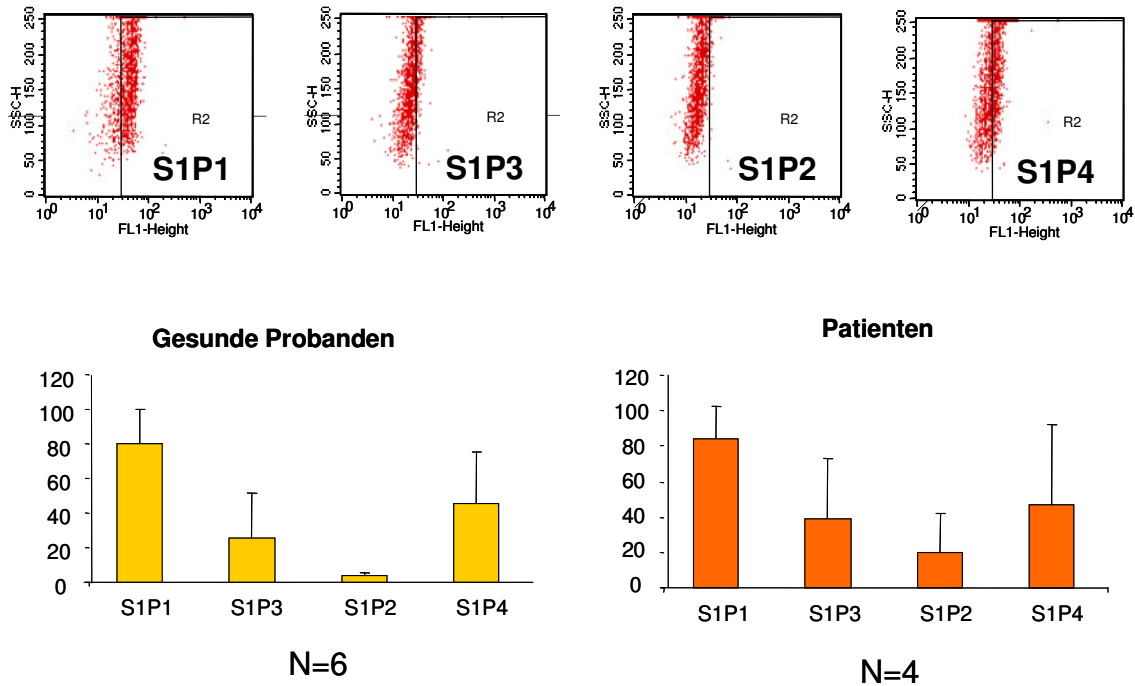


Abbildung 4: Expression der S1P-Rezeptoren auf EPCs von gesunden Probanden und von KHK Patienten, gemessen mit dem FACS Gerät.

3.2.2. Eingeschränkte Migrationskapazität und Kolonie-Formation der EPCs von S1P3 $-/-$ Mäusen

Es wurden S1P3 $-/-$ Mäuse verwendet, um die Bedeutung der S1P-Rezeptoren zu untersuchen. S1P1, der andere wichtige Rezeptor, ist bei einer homozygoten Ausschaltung in Mäusen embryonal letal und steht deshalb nicht zur Verfügung.

Zunächst wurden die EPCs, gewonnen aus den Milzen der S1P3 $-/-$ Mäusen und deren Wildtyp-Varianten, auf ihre funktionelle Kapazität mit der Hilfe des Migrations Assays untersucht. Die Zellen wurden für 3 Tage kultiviert, mit S1P (200 nM) für 2 Stunden inkubiert, mit acLDL-Dil gefärbt und in den Migration Assay eingesetzt. Die Zählung der migrierten Zellen nach 24 Stunden ergab, dass die Zellen aus den S1P3 $-/-$ Mäusen nicht durch S1P zu stimulieren sind. Bei den Zellen aus den Wildtypmäusen konnte jedoch ein signifikanter Anstieg der durchgewanderten Zellen gemessen werden.

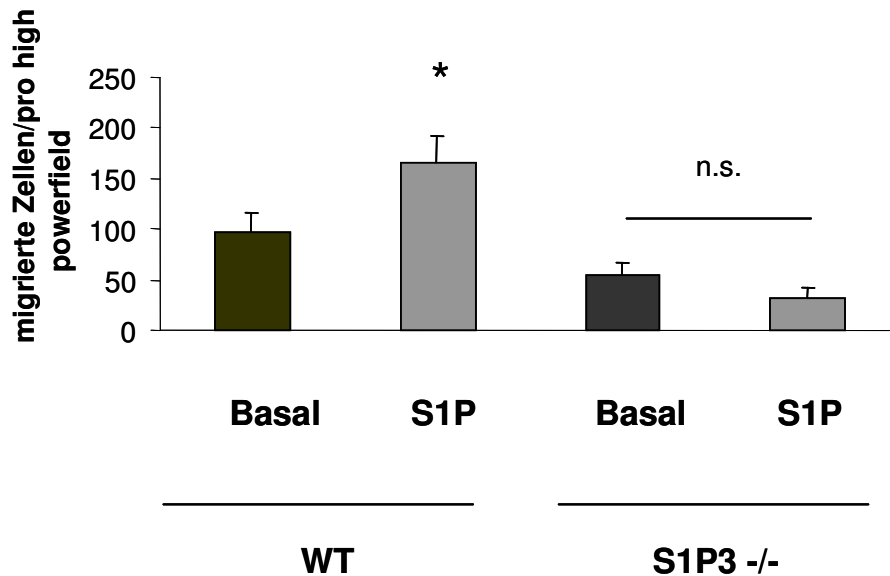


Abbildung 5: Migrations Kapazität der EPCs aus Wildtyp und S1P3 -/- Mäusen gewonnen aus der Milz gegen SDF-1. Jeweils mit und ohne S1P Stimulation. * P < 0,01 S1P gegen Basal. ; n.s.= S1P gegen Basal nicht signifikant. N = 3 bis 4

Auch die koloniebildenden Einheiten waren in EPC-Kulturen gewonnen aus S1P3 -/- Mäusen, signifikant reduziert, im Vergleich zu den Zellen aus Wildtypmäusen, wie vorläufige Daten zeigten.

3.2.3. Eingeschränkte Angiogenese und kapillare Dichte in S1P3 -/- Mäusen nach induzierter Hinterlaufischämie

Zur Untersuchung der Neovaskularisation in den Mäusen mit ausgeschaltetem S1P3-Rezeptor wurde in diesen Tieren und in den Wildtypmäusen eine Hinterlaufischämie operativ induziert. In diesen endogenen Hinterlaufischämien sollte die Funktion der körpereigenen EPCs der Tiere untersucht werden.

Nach 14 Tagen ergab die Laserdopplermessung, dass in den S1P3 -/- Mäusen die Wiederherstellung des Blutflusses deutlich schlechter war als in den Wildtypmäusen. Dies unterstreicht den wichtigen Einfluss des S1P3-Rezeptors auf die Neovaskularisation.

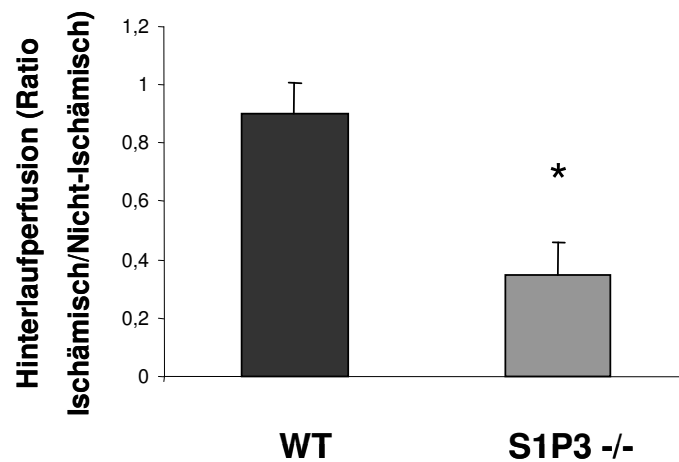


Abbildung 6: Die Laserdopplermessung der Perfusion am Tag 14 nach Induktion einer Hinterlaufischämie zeigt eine deutlich verminderte Wiederherstellung des Blutflusses in den S1P3 -/- Mäusen. * $P < 0,001$; N = 6 - 7

Auch wurden Knochenmarkszellen aus den S1P3 -/- Mäusen und den Wildtyp-Varianten gewonnen und diese in hinterlaufischämische Nacktmäuse transplantiert. Es zeigte sich, dass die Nacktmäuse mit transplantierten Zellen aus Wildtypmäusen nach zwei Wochen eine wesentlich verbesserte Durchflussrate aufwiesen als die Mäuse mit Zellen der S1P3 -/- Tiere. Dabei fiel auf, dass die Wildtypzellen, im Gegensatz zu den S1P3 -/- Zellen, sich mit S1P stimulieren ließen und es so zu einer weiteren Verbesserung der Durchblutung kam.

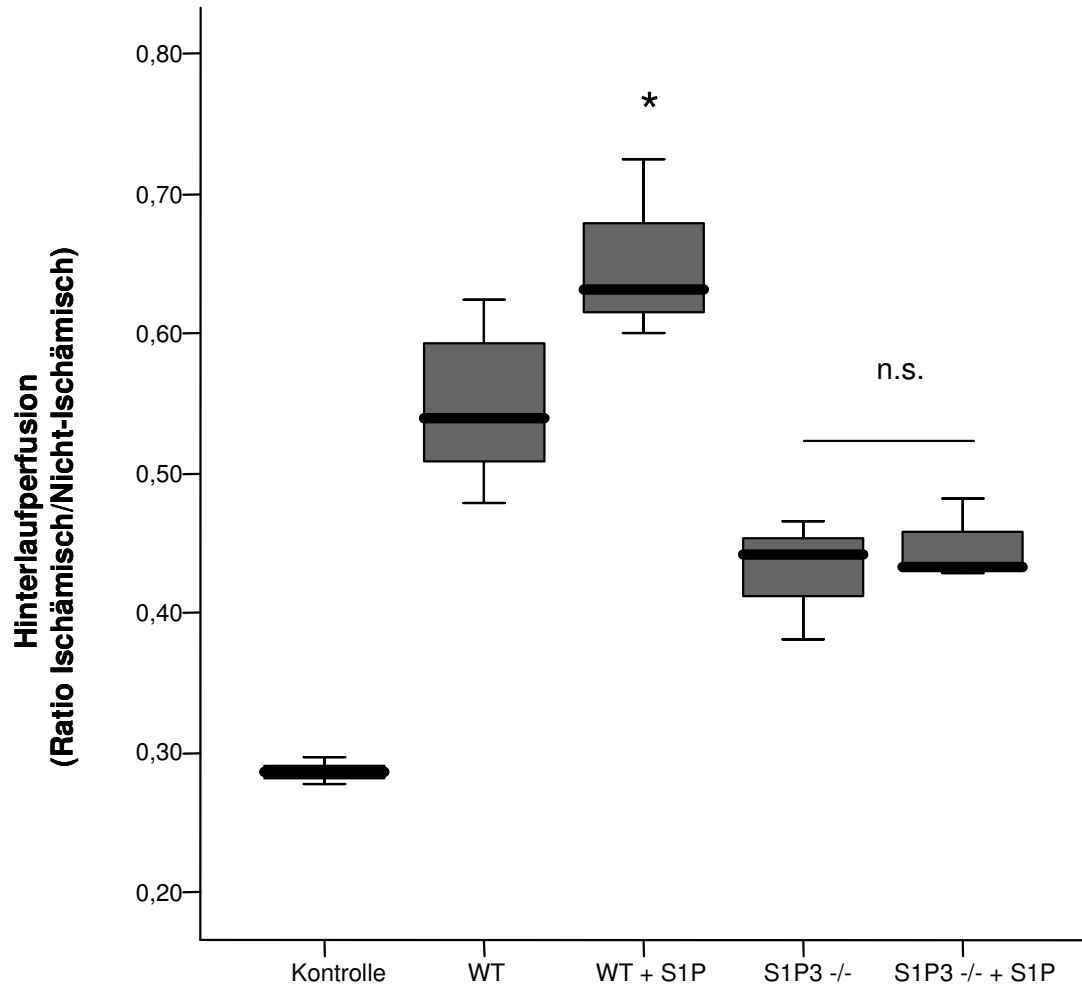


Abbildung 7: Laserdopplermessung am Tag 14 bei Infusion von KMZs aus Wildtyp oder S1P3 -/- Mäusen in hinterlaufischämische Nacktmäuse mit oder ohne Vorinkubation von S1P. * P < 0,001 WT + S1P gegen Kontrolle, WT, S1P3 -/- und S1P3 -/- + S1P, n.s. = keine Signifikanz. N = 3 - 4.

Auch die kapillare Dichte in den ischämischen Hinterlaufsmuskeln, nach Transplantation von KMZs, gewonnen aus Wildtypmäusen, war bei den mit S1P inkubierten Zellen erhöht. Nicht jedoch bei den transplantierten Zellen aus S1P3 -/- Mäusen. Dort führte eine Stimulation zu keinem signifikanten Anstieg der Dichte. Auch war deren basaler Wert niedriger als bei den transplantierten Zellen der Wildtyp-Varianten.

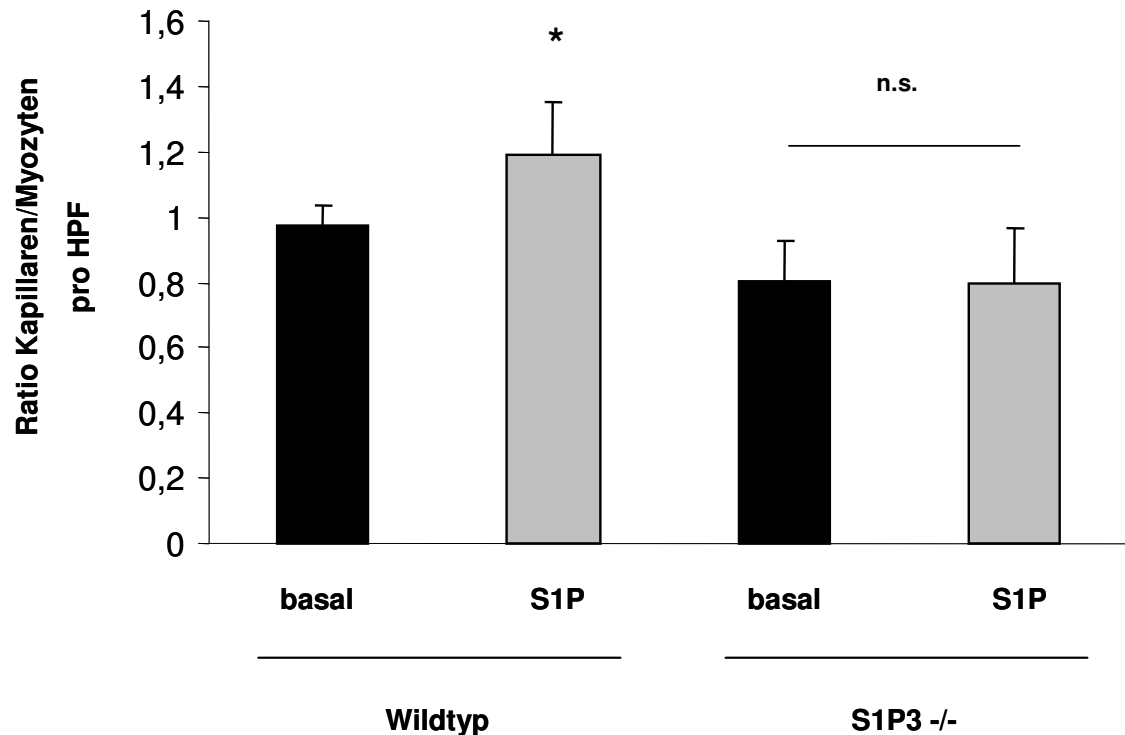


Abbildung 8: Kapillare Dichte in den ischämischen Muskeln aus den hinterlaufischämischen Nacktmäusen nach KMZ Transplantation, gewonnen aus Wildtyp und S1P3^{-/-} Mäusen am Tag 14. Bei den mit Wildtypzellen transplantierten Zellen ist eine Erhöhung der kapillaren Dichte durch Präinkubation mit S1P möglich. Bei Transplantation der Zellen aus S1P3^{-/-} Mäusen ist diese Erhöhung nicht möglich. *P=0,04 Wildtyp S1P vs Wildtyp basal. n.s. = keine Signifikanz zwischen S1P³^{-/-} Mäusen basal und S1P stimuliert. n = 4

3.3. Aktivierung des CXCR4-Rezeptors und der nachfolgenden Signalwege durch S1P

3.3.1. S1P und FTY720 induzieren eine Aktivierung des CXCR4-Rezeptors in menschlichen EPCs

Nachdem zunächst gezeigt wurde, dass die funktionelle Kapazität durch S1P-Rezeptoragonisten gesteigert werden kann, wurden nun die zu Grunde liegenden Mechanismen der EPCs und KMZs untersucht.

Da bekannt ist, dass S1P-Agonisten die SDF-1 induzierte Migration in CD34⁺ hematopoetischen Stamm- und Progenitorzellen verbessern⁴⁹, wurde untersucht, ob S1P und FTY720 den CXCR4-Rezeptor und nachfolgende Signalwege aktivieren. Deshalb wurde eine Immunpräzipitation des CXCR4-Rezeptors in EPCs durchgeführt.

Die EPCs wurden für 24 Stunden Serum depletiert und mit FTY720 (10 nM) über 30 Minuten behandelt. Es zeigte sich, dass die Inkubation zu einer zweifach

erhöhten Tyrosin-Phosphorylierung des CXCR4-Rezeptors führt, verglichen mit einer unstimulierten Probe.

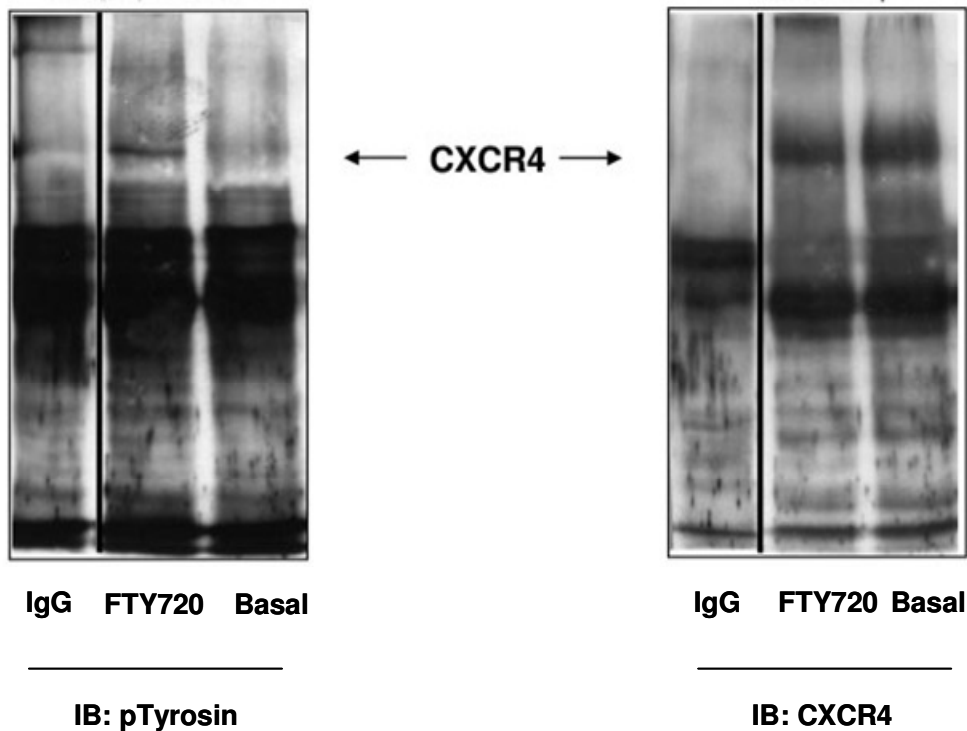


Abbildung 9: Immunpräzipitation des CXCR4-Rezeptors in humanen EPCs. Repräsentativer Immunoblot, welches die Tyrosin-Phosphorylierung nach Inkubation mit FTY720 für 30 Minuten zeigt. N = 5

3.3.2. S1P und FTY720 induzieren eine Aktivierung von JAK2 in menschlichen EPCs

Da bekannt ist, dass JAK2 ein hinter dem CXCR4-Rezeptor geschaltetes Enzym ist, wurde untersucht, ob die JAK2-Phosphorylierung bei Inkubation mit S1P oder FTY720 ansteigt.

Die EPCs wurden für 24 Stunden Serum depletiert und mit FTY720 (10 nM) und S1P (200 nM) über 30 Minuten behandelt und ein Western-Blot wie oben beschrieben durchgeführt. Es wurde ein P-JAK2-Antikörper (Upstate, Dundee, Groß Britanien, 1:500) verwendet. Um eine Gleichladung zu bestätigen, wurde ein JAK2-Antikörper (Upstate, Dundee, Groß Britanien, 1:500) verwendet. Es zeigte sich, dass es zu einer erhöhten Phosphorylierung von JAK2 kommt. Bei Inkubation eines

blockierenden CXCR4-Antikörpers in einer Konzentration von 20 µg/ml, 30 Minuten vor Einsetzen von S1P kam es zu keiner erhöhten Phosphorylierung von JAK2.

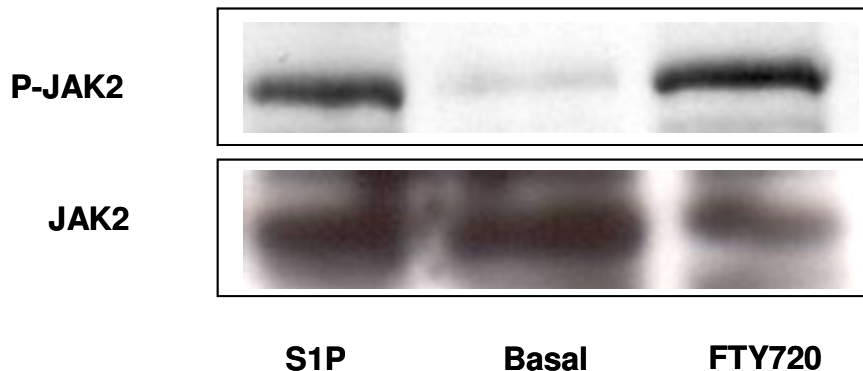


Abbildung 10: Repräsentativer Western-Blot von EPCs. Phosphoryliertes JAK2 (oben) und JAK2 (unten), jeweils mit und ohne Stimulation von S1P (200 nmol) und FTY720 (10 nmol). N = 4 bis 6

3.3.3. Knochenmarkszellen von CXCR4 +/- Mäusen sind funktionell eingeschränkt

Um zu zeigen, dass Zellen mit eingeschränkter Expression des CXCR4-Rezeptors auf S1P weniger effektiv wirken, wurden Mäuse mit einer erniedrigten CXCR4-Rezeptor-Anzahl verwendet. Es wurden CXCR4 +/- Mäuse phänotypisch charakterisiert, da Mäuse mit homozygot ausgeschalteten CXCR4-Rezeptoren embryonal letal sind. Wie schon vorher beschrieben, ist die Rezeptorexpression auf Knochenmarkszellen um 50% verringert, verglichen zu KMZs von Wildtyp C57Bl6/J Mäusen⁵².

Die Knochenmarkszellen der CXCR4 +/- Mäuse wurden mit Hilfe des Invasionsassay, bei dem die Zellen gegen SDF-1 migrieren, auf deren funktionelle Kapazität getestet. Es zeigte sich, dass diese Zellen, verglichen zu den Zellen aus Wildtypmäusen, signifikant schlechtere funktionelle Werte hatten. Eine Stimulation mit S1P führte in den Zellen aus Wildtypmäusen zu einem Anstieg der Invasion, während dies bei den Zellen aus den CXCR4 +/- Mäusen keinen eindeutigen Effekt hatte.

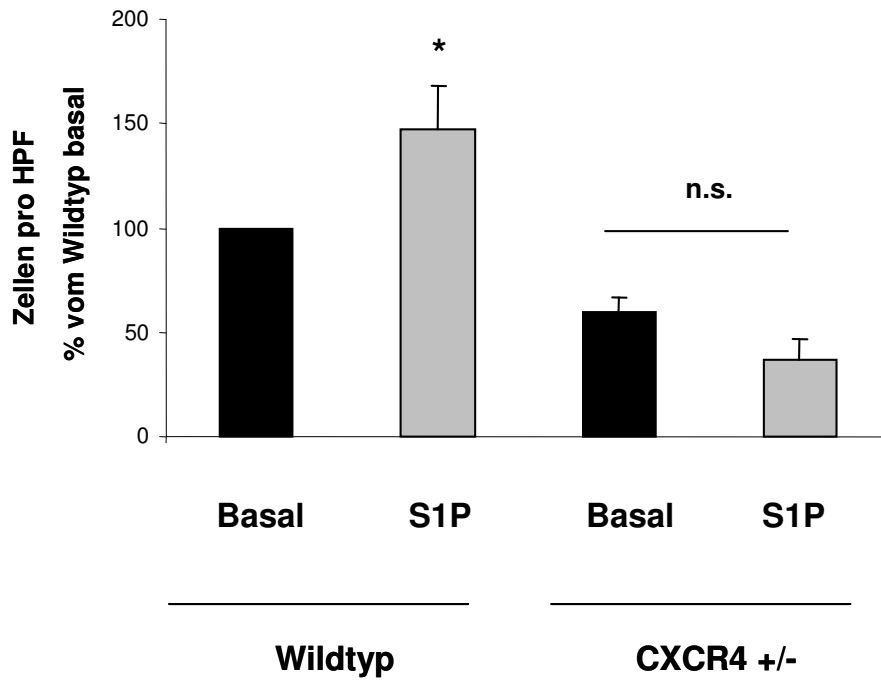


Abbildung 11: Quantifizierung des SDF-1 induzierten Invasionsassays von Knochenmarkszellen gewonnen aus Wildtypmäusen und CXCR4 +/- Mäusen, mit und ohne S1P Stimulation. Bei den KMZs aus CXCR4 +/- Mäusen ist keine Stimulation mit S1P möglich. * P < 0,05; N = 7

Auch bei Transplantation der Knochenmarkszellen in hinterlaufischämische Nacktmäuse am Tag 1 nach der Operation, erzielten die Zellen aus den CXCR4 +/- Mäusen signifikant schlechtere Werte gegenüber den Wildtypzellen bei der Wiederherstellung des Blutflusses nach 14 Tagen. Es fällt auf, dass keine Steigerung des Blutflusses durch Inkubation der Zellen mit S1P in den heterozygoten Zellen beobachtet werden kann (Blutfluß unbehandelte Zellen: $26 \pm 11\%$ gegenüber S1P behandelten Zellen: $32 \pm 19\%$, P=nicht signifikant, N=5).

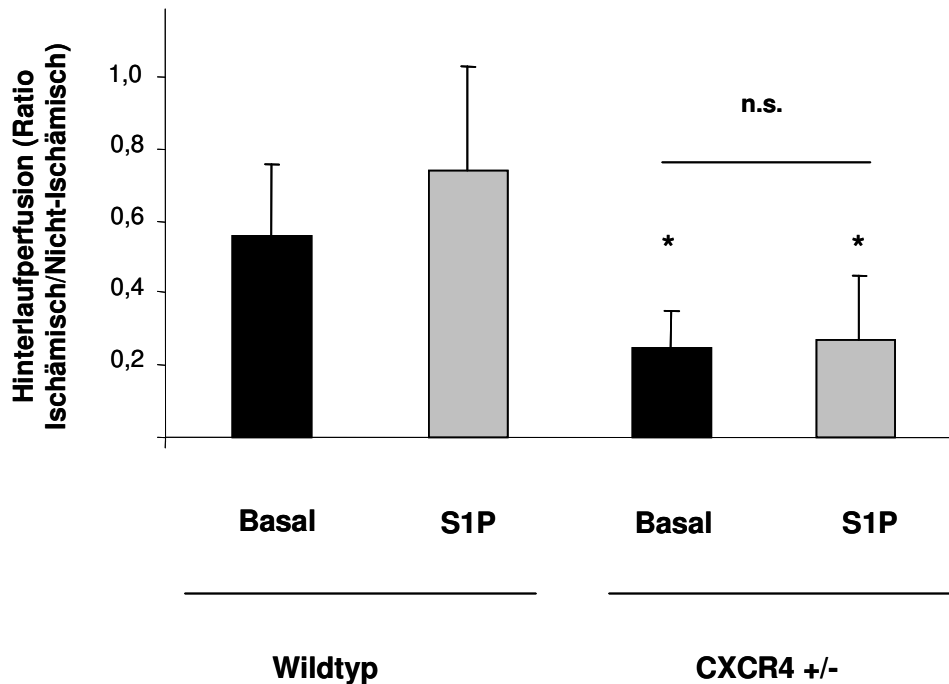


Abbildung 12: Hinterlaufperfusion bei Transplantation von Knochenmarkszellen in Nacktmäuse am Tag 14 nach induzierter Hinterlaufischämie, gemessen mit dem Laserdoppler. Keine Stimulation der Perfusion durch Transplantation mit CXCR4 +/- Zellen, inkubiert mit S1P, möglich. *P < 0,001 CXCR4 +/- Zellen gegen Wildtypzellen. n.s. = CXCR4 +/- Zellen basal gegen S1P nicht signifikant. N = 5.

3.3.4. Knochenmarkszellen von CXCR4 +/- Mäusen zeigen eine eingeschränkte JAK2-Phosphorylierung

Um zu untersuchen, ob bei Knochenmarkszellen aus CXCR4 +/- Mäusen auch eine verringerte Phosphorylierung von JAK2 vorliegt, wurde ein Western-Blot der Zellen durchgeführt. Dabei wurden KMZs aus Wildtypmäusen und von CXCR4 +/- Mäusen mit S1P für 30 Minuten stimuliert oder Zellen ohne Stimulation als Negativkontrolle verwendet. Als Antikörper dienten P-JAK und JAK, wie in Punkt 3.3.2 beschrieben. Es zeigte sich, dass in der Tat eine verringerte Phosphorylierung von JAK2, durch S1P, in KMZs aus CXCR4 +/- Mäusen vorliegt, verglichen zu der Phosphorylierung der Wildtypzellen.

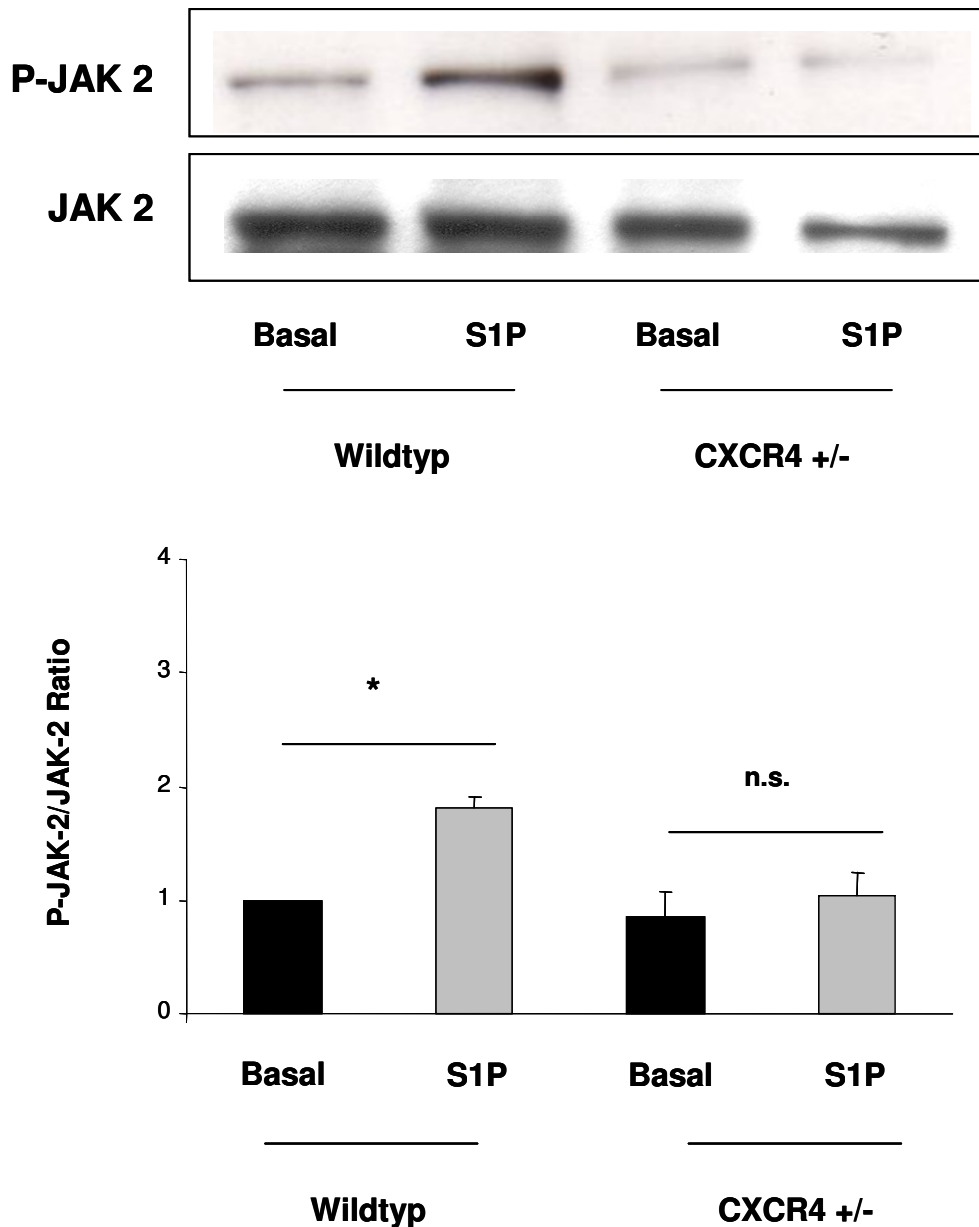


Abbildung 13: Western-Blot Knochenmarkszellen aus Wildtyp und CXCR4 +/- Zellen unter Verwendung von JAK2 und P-JAK2 Antikörpern jeweils mit und ohne S1P Stimulation. Oben, Repräsentativer Western-Blot. Unten, Quantitative P-JAK2 / JAK2 Ratio. *P < 0,01 Wildtyp basal gegen Wildtyp S1P, n.s. = keine Signifikanz CXCR4 +/- basal gegen CXCR4 +/- S1P. N = 4.

3.4. Die Src-Kinase ist an der Transaktivierung des CXCR4-Rezeptors beteiligt

3.4.1. Src-Kinase-Familien-Inhibitor PP2 unterbindet die Phosphorylierung von JAK2 durch S1P

Wie mehrere Gruppen zeigen konnten, spielt die Src-Kinase-Familie eine wichtige Rolle in Aktivierungsprozessen zwischen zwei 7-membranständigen-

gekoppelten Rezeptoren⁵⁴⁻⁵⁶. Deshalb wurde untersucht, ob die Src-Kinase-Familie auch eine Rolle in der Aktivierung des CXCR4-Rezeptors durch die S1P-Rezeptoren spielt. Um dies zu testen wurde der Src-Kinasen-Familien-Inhibitor PP2 in einer Konzentration von 1 mmol/l 30 Minuten lang vorinkubiert. Danach wurden S1P und FTY720 für 30 Minuten eingesetzt.

Der Western-Blot der menschlichen EPCs zeigt, dass PP2 die basale und die S1P induzierte Phosphorylierung von JAK2 in beträchtlicher Weise unterbindet (Antikörper wie in Punkt 3.3.2.). Die gleichen Ergebnisse wurden mit FTY720 erzielt. Eine Inkubation des CXCR4 Antikörpers und S1P zeigte, dass es auch hier zu einer Erniedrigung der Phosphorylierung kommt, jedoch nicht in dem Maße wie bei Inkubation mit PP2.

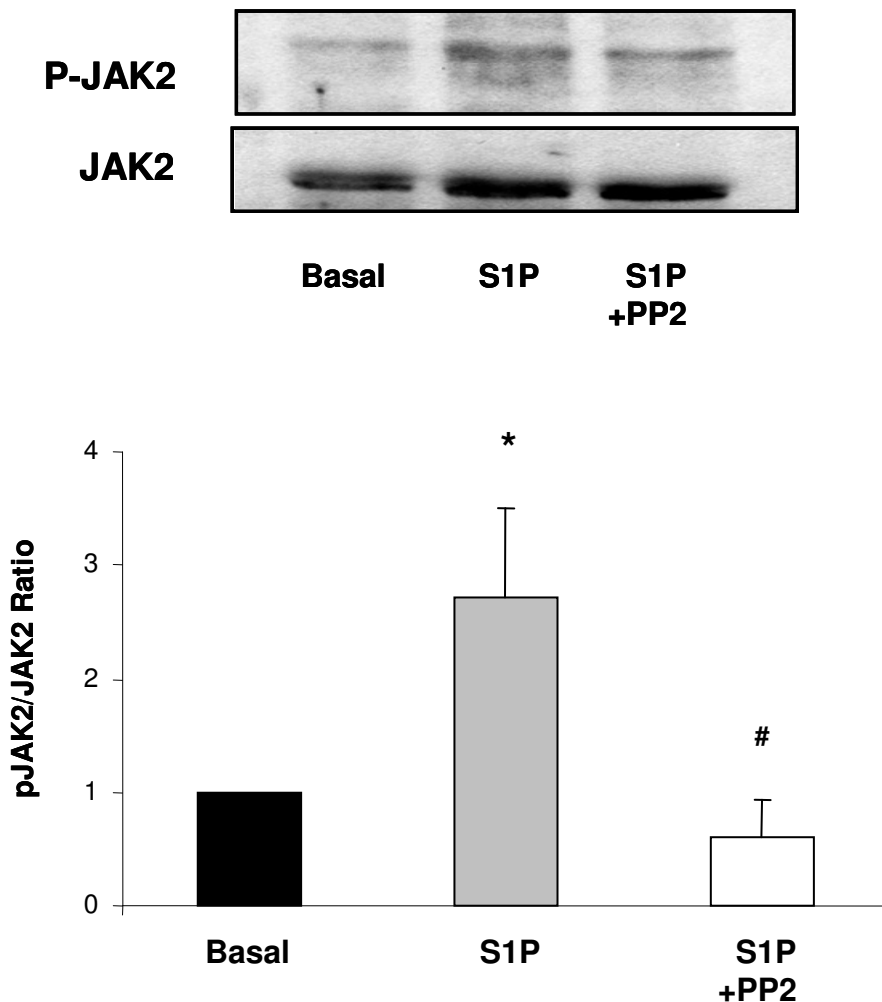


Abbildung 14: Western-Blots von humanen EPCs auf JAK2 und P-JAK2, jeweils mit Inkubation von S1P und S1P + PP2. PP2 ist ein Src-Kinase-Familien-Inhibitor. Es soll gezeigt werden, dass der S1P-abhängige Effekt auf die Aktivierung von JAK2 durch PP2 inhibiert werden kann. Oben wird ein repräsentativer Blot gezeigt. Unten die quantitative pJAK2/JAK2 Ratio, wodurch die Gleichladung bestätigt wird. *P < 0,001 S1P gegen Basal. #P < 0,01 S1P + PP2 gegen Basal. N = 4.

Auch bei der Verwendung von Knochenmarkszellen aus den Wildtypmäusen kam es zu einer stark verringerten JAK2-Phosphorylierung bei Vorinkubation mit PP2. Gleiche Versuche mit Knochenmarkszellen aus CXCR4 +/- Mäusen zeigten, dass der Grad der Phosphorylierung bei Verwendung von PP2 und S1P noch niedriger liegt, als bei Zellen ohne Inkubation.

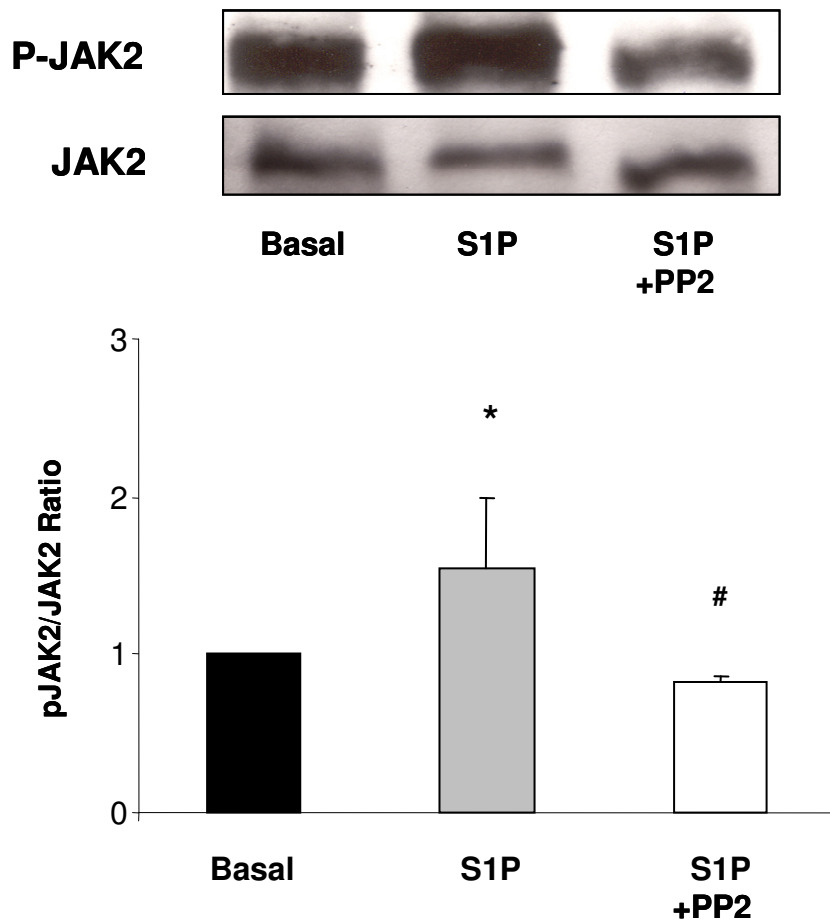


Abbildung 15: Western-Blots aus Knochenmarkszellen von der Wildtypmaus, auf JAK2 und P-JAK2, jeweils mit Inkubation von S1P und S1P + PP2. Oben wird ein repräsentativer Blot gezeigt. Unten die Quantitative pJAK2/JAK2 Ratio, wodurch die Gleichladung bestätigt wird. *P < 0,001 S1P gegen Basal. #P = Nicht signifikant S1P + PP2 gegen Basal. N = 4.

3.4.2. Src-Kinase-Familien-Inhibitor PP2 reduziert die Invasionskapazität von FTY720/S1P-stimulierten Knochenmarkszellen

Knochenmarkszellen aus Wildtypmäusen wurden mit 1 mM PP2 für 30 Minuten vorinkubiert und danach mit S1P (200 nM) und FTY720 (10 nM) für 2 Stunden behandelt. Es zeigte sich hier, dass PP2 einen signifikanten Effekt auf die SDF-1-induzierte Invasionskapazität der KMZs hat. Die Anzahl der durch das Matrigel gedrunenen Zellen bei Inkubation von PP2 und S1P ist um fast 60 Prozentpunkte niedriger als bei einer alleinigen Inkubation von S1P. Bei FTY720 liegt der Unterschied bei ca. 55 Prozentpunkten (FTY720 + PP2 gegenüber FTY720).

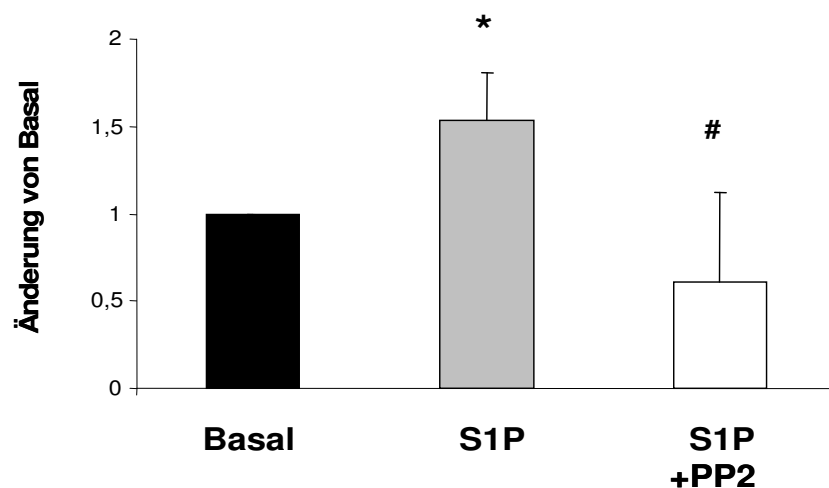


Abbildung 16: SDF-1-induzierte Invasion aus KMZs von der Wildtypmaus, mit und ohne S1P Stimulation bzw Src-Kinase-Familie Blockade mit PP2. Die Invasionskapazität der KMZs wird durch PP2 verringert. * $P < 0,05$ S1P gegen Basal. # $P < 0,05$ S1P + PP2 gegen S1P. N = 3 bis 4

3.5. S1P-induzierte Aktivierung der Src-Kinase ist S1P3 abhängig

3.5.1. S1P aktiviert zeitabhängig die Src-Kinase

Nun wurde auch im Western-Blot gezeigt, dass Src durch S1P-Agonisten aktiviert wird. Die menschlichen EPCs wurden für 24 Stunden Serum depletiert und mit S1P (200 nM) für 10, 30 und 60 Minuten behandelt und ein Western-Blot wie oben beschrieben durchgeführt. Es wurde ein Antikörper gegen aktives Src an Tyrosin 416

(Anti-Rabbit, Cell Signalling, Danvers, USA) und gegen inaktives Src an Tyrosin 527 (Cell Signalling, Danvers, USA) verwendet.

Es zeigte sich, dass es zu einem zeitabhängigen Anstieg der Phosphorylierung von aktiven Src an Tyrosin 416 und einer herabgesetzten Phosphorylierung an Tyrosin 527 kommt. Dies zeigt, dass die S1P-Rezeptoragonisten die Src-Kinase aktivieren.

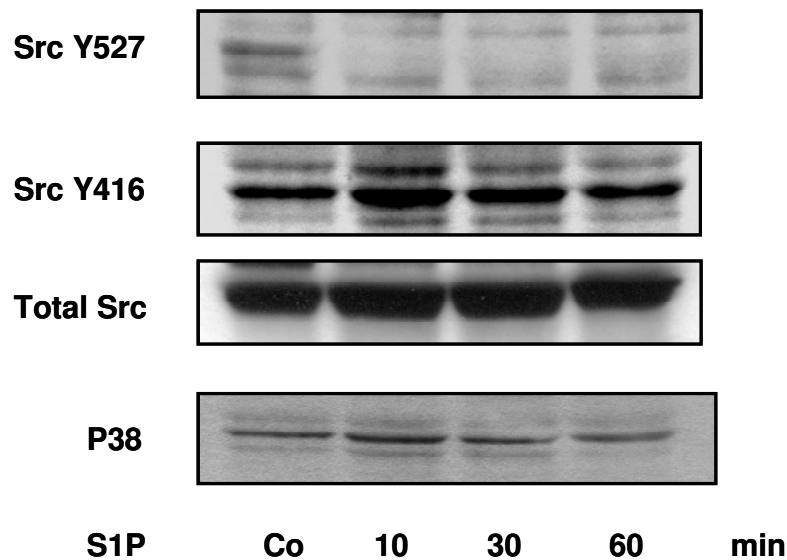


Abbildung 17: Repräsentative Western-Blots von humanen EPCs. Antikörper gegen aktives Src Y415 und gegen inaktives Src Y527. P38 zur Gleichladungskontrolle. Zeitabhängige Inkubation nach 10, 30 und 60 Minuten. Entsprechend der Vermehrung von Src Y416 wird Src Y527 bei Inkubation von S1P reduziert. Ab 10 Minuten kann eine Phosphorylierung erkannt werden. N = 3

3.5.2. Src-Phosphorylierung in EPCs von S1P3^{-/-} Mäusen ist reduziert

Um zu zeigen, dass die Src-Kinase ebenfalls durch S1P3 aktiviert wird, wurden EPCs aus den S1P3^{-/-} Mäusen und deren Wildtypvarianten verwendet. Dabei wurden EPCs aus der Milz gewonnen. 15 Mäusemilzen wurden jeweils für einen Ansatz gepoolt. Nach Kultivierung wurden diese mit S1P für 2 Stunden stimuliert und ein Western-Blot wurde durchgeführt.

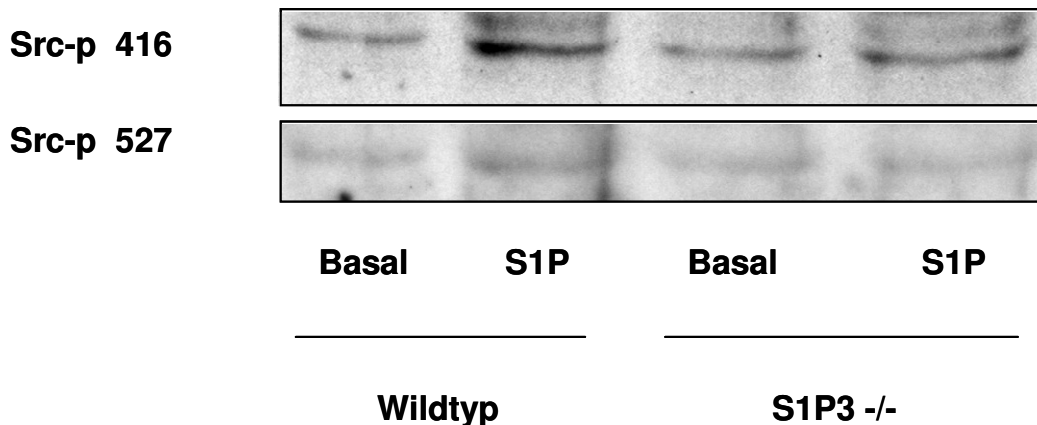


Abbildung 18: Repräsentative Western-Blots aus EPCs, gewonnen aus der Milz, von Wildtyp- und S1P3 ^{-/-} Mäusen. Inkubation mit und ohne S1P. Bei den Zellen aus den Wildtypmäusen ist eine Stimulation mit S1P möglich, während dies bei den Zellen aus den S1P3-Knockout-Mäusen nicht möglich ist. N = 3

Es zeigte sich, dass bei Verwendung des Antikörpers gegen aktives Src an Tyrosin 416 (Anti-Rabbit, Cell Signalling, Danvers, USA) bei den S1P 3 ^{-/-} Mäusen keine gesteigerte Phosphorylierung nachweisbar war gegenüber den unstimulierten Zellen. Hingegen war bei den EPCs aus Wildtypen durchaus eine Aktivierung von Src 416 zu erkennen.

3.6. Die Aktivierung des CXCR4-Rezeptors und der nachfolgenden Signalwege ist S1P3-Rezeptor abhängig

3.6.1. Keine Phosphorylierung von JAK2/STAT3 durch S1P/FTY720 in MEF-Zellen mit src/fyn/yes ^{-/-} Zellen und auch keine Phosphorylierung in Wildtypzellen

Um zu prüfen, welche Vertreter der Src-Familie in die Signalprozesse verwickelt sind, wurden embryonale Mausfibroblasten (MEF) verwendet, die die Proteine Src-Kinase, Fyn-Kinase und Yes-Kinase, drei Vertreter der Src-Kinase-Familie, homozygot ausgeschaltet haben. Zum Vergleich wurden auch die Wildtyp-Varianten verwendet.

Beide Zelllinien wurden für 24 Stunden Serum depletiert und mit FTY720 oder CXCR4-Antikörper für 2 Stunden inkubiert. Der Western-Blot zeigte, unter Verwendung eines P-JAK2- und JAK2-Antikörpers (siehe 3.3.2.) , dass die src/fyn/yes ^{-/-} MEFs, mit FTY720 nicht stimulierbar waren, da es zu keiner erhöhten

Phosphorylierung von JAK2 kommt. Der Blot der Wildtyp-MEF-Zellen zeigte jedoch ebenfalls keine erhöhte Phosphorylierung von JAK2.

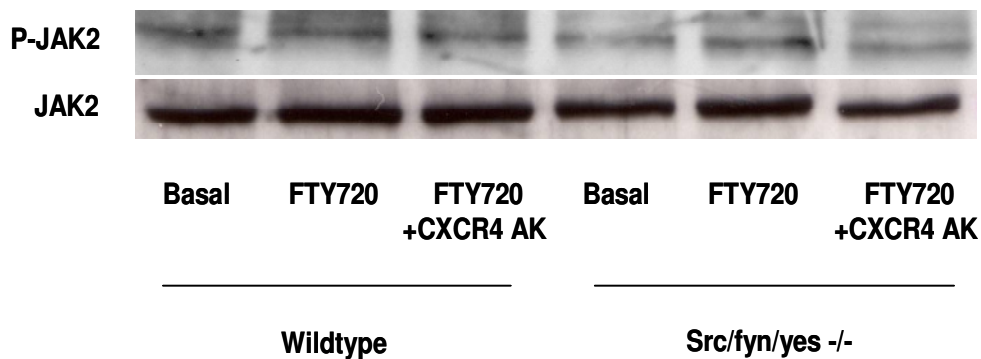


Abbildung 19: Repräsentativer Western-Blot aus embryonalen Mausfibroblasten (MEF). Jeweils Wildtypzellen und Zellen mit *Src/fyn/yes* ^{-/-} basal und stimuliert mit FTY720, FTY720 und einem blockierenden CXCR4-Antikörper. In beiden Zelltypen ist keine Phosphorylierung von JAK2 mit FTY720 zu erreichen. N = 3

Dieses Ergebnis war unerwartet, da davon ausgegangen wurde, dass es in den Wildtypzellen keine Einschränkung im Aktivierungsprozess von den S1P-Rezeptoren zum CXCR4-Rezeptor gab.

3.6.2. Phosphorylierung von JAK2 durch IL3 in MEF-Zellen

Um herauszufinden, ob es in den MEF-Zellen eine generelle Beeinträchtigung von JAK2 gibt, wurde IL3, ein bekannter JAK2-Aktivator, als Stimulator der Zellen verwendet⁵⁷. Die MEF-Zellen wurden 24 Stunden depletiert und mit IL3 in einer Konzentration von 1 ng/ml für 2 Stunden inkubiert. Der durchgeführte Western-Blot zeigte, dass IL3 zu einer Phosphorylierung von JAK2 führt. Das bedeutet, dass JAK2 in den MEF-Zellen normal vorhanden ist, und deshalb die gescheiterte Stimulierbarkeit mit S1P/FTY720 nicht darauf zurückzuführen ist.

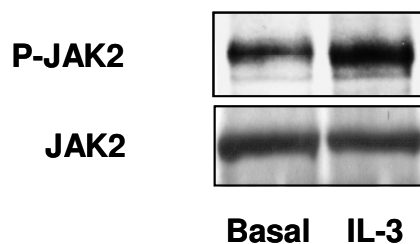


Abbildung 20: Repräsentativer Western-Blot aus embryonalen Mausfibroblasten (MEF), mit und ohne Inkubation von IL-3. Eine Phosphorylierung von JAK2 durch Stimulation mit IL-3 ist möglich. N = 3

3.6.3. Keine Expression von S1P3-Rezeptoren auf MEF-Zellen

Als Nächstes wurde überprüft, welche S1P-Rezeptoren auf den MEF-Zellen exprimiert waren. Die Zellen wurden, wie oben beschrieben, permeabilisiert, fixiert, mit den Antikörpern konjugiert (S1P1, S1P2, S1P3, S1P4 von Ex-alpha, Watertown, USA und CXCR4 von R&D Systems) und mit dem FACS Gerät gemessen.

Das Ergebnis zeigt, dass auf den MEF-Zellen S1P1, S1P2, S1P4 und CXCR4 exprimiert werden, nicht aber der S1P3-Rezeptor. Da es in den MEF-Zellen zu keiner Aktivierung des CXCR4-Rezeptor und seiner nachfolgenden Enzyme, durch S1P-Agonisten kam, deutet dieses Resultat nochmals darauf hin, dass der S1P3-Rezeptor eine herausragende Rolle im Aktivierungsprozess des CXCR4-Rezeptors spielt.

Auch andere Gruppen zeigten, dass der S1P3-Rezeptor eine herausragende Rolle in anderen Aktivierungsprozessen spielt^{45, 58}.

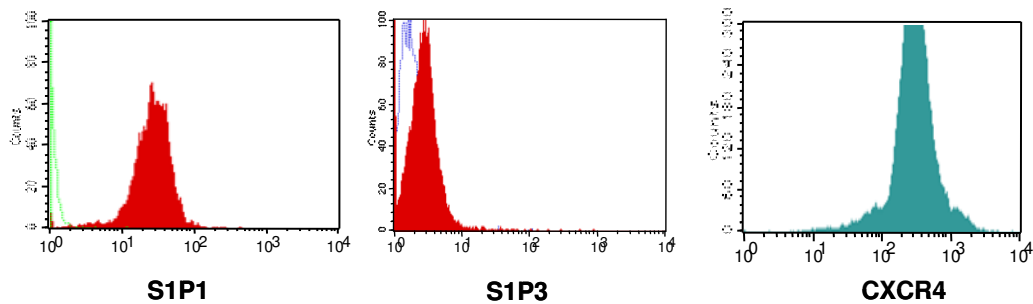


Abbildung 21: Expression des S1P1-, S1P3- und CXCR4-Rezeptors auf Wildtyp-MEF-Zellen. Der S1P3-Rezeptor hat auf MEF-Zellen keine Expression, wobei der S1P1- und der CXCR4-Rezeptor exprimiert werden. N = 3

4. Diskussion

4.1. S1P hat bedeutenden Einfluss auf das kardiovaskuläre System, wobei die Rezeptoren S1P1 und S1P3 eine entscheidende Rolle spielen

In vorhergehenden Studien konnte bereits der wichtige Einfluss von S1P auf das kardiovaskuläre System aufgezeigt werden. S1P spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des kardiovaskulären Systems, wie auch bei der Perfusion von Myokard. Auf Zellen beeinflusst S1P das Homing und Trafficking der Zellen. Erwähnt sei an dieser Stelle nochmals, dass S1P in HDL, dem „guten“ Cholesterin enthalten ist, welches ebenfalls einen positiven Effekt auf das kardiovaskuläre System hat.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass S1P auch einen Einfluss auf die funktionelle Aktivität von endothelialen Vorläuferzellen hat. Durch Inkubation von S1P oder seinem synthetischen Analogon FTY720 konnte in den vorliegenden Versuchen die Neovaskularisationskapazität *in vivo* verbessert werden. Die Zellen, die aus Patienten mit einer bestehenden KHK gewonnen wurden, konnten im Hinterlaufischämiemodell mit Hilfe von S1P oder FTY720 auf das Niveau der Zellen von gesunden Probanden gehoben werden.

S1P wirkt dabei über die S1P-Rezeptoren, eine G-Protein-gekoppelte Rezeptorfamilie. Die Rezeptoren S1P1 und S1P3 sind in den Zellen des kardiovaskulären Systems weit exprimiert und schon vorhergehende Studien konnten beweisen, dass sie in der Gefäßentwicklung während der Embryonalentwicklung stark beteiligt sind. S1P1-Knockout-Zellen sind embryonal letal, auf Grund von Gefäßabnormalitäten. In den hier durchgeführten Versuchen wurde auf S1P3 *-/-* Zellen zurückgegriffen. Mit diesen konnte gezeigt werden, dass der S1P3-Rezeptor auf Progenitor-Zellen die *in vitro*-Migration, die *in vivo*-Neovaskularisation und die Aktivierung von nachfolgenden Signalwegen S1P-abhängig vermittelte.

Interessant ist auch das Ergebnis der Studien mit den embryonalen Mausfibroblasten (MEF-Zellen). Hier sollte ursprünglich die Src-Kinase-Familie untersucht und die eventuelle Beteiligung von drei wichtigen Vertretern der Src-Familie überprüft werden. Jedoch kam es sowohl in den Wildtyp-Zellen wie auch in den *src/fyn/yes -/-* Zellen zu keiner Phosphorylierung von JAK2. Die Erklärung liefert eine Untersuchung der S1P-Rezeptoren auf den MEF-Zellen. Unerwarteterweise wird auf ihnen kein S1P3-Rezeptor exprimiert. Dies zeigt, dass S1P3 an der Aktivierung von

CXCR4 und JAK2 beteiligt ist, die eine wichtige Rolle für Migration und Neovaskularisation spielen.

Obwohl der S1P1- und der S1P3-Rezeptor zusammenarbeiten, kann man den beiden Rezeptor-Subtypen unterschiedliche Aufgaben zuordnen. So konnte vorher schon bewiesen werden, dass spezifische S1P1-Rezeptor-Agonisten die Lymphozyten-Rezirkulation steuern, wohingegen durch S1P3 die Herzfrequenz reguliert wird ⁴¹. Die spezifische Rolle für S1P3 im proangiogenetischen Signaling konnte aufgezeigt werden durch Verwendung von synthetischen Peptiden aus der zweiten intrazellulären Schleife vom S1P3-Rezeptor ⁴⁴. Diese Resultate gehen eng einher mit den Daten aus dieser Studie, wo S1P3 ^{-/-} Mäuse eine stark herabgesetzte Neovaskularisation nach induzierter Ischämie, im Vergleich zu den Wildtyp-Varianten, haben. In einer anderen Studie wird S1P1 wiederum als wichtige Komponente in der Tumorangionese beschrieben, unter Verwendung von Knockout-Strategien mit Hilfe von Gegenstrang-RNAs ⁵⁹.

Es scheint, dass S1P1 und S1P3 beide bedeutende Rollen für die funktionelle Kapazität von EPCs und die Neovaskularisation in Säugetieren spielen. Ein Ausschalten beider Rezeptoren auf EPCs könnte zu einer noch größeren Einschränkung dieser führen.

4.2. In EPCs sind S1P-Rezeptoren an der Aktivierung des CXCR4-Rezeptors beteiligt

In vielen angiogenetischen Prozessen konnte bereits das Phänomen der Transaktivierung von Wachstumsfaktor-Tyrosinkinase-Rezeptoren gezeigt werden, wie beispielsweise bei der Zellmigration, der Gefäßentwicklung und des Zellwachstums. So aktivieren die S1P-Rezeptoren den PDGF-Rezeptor ⁵⁶, den VEGF-Rezeptor-2 ⁵⁵ und den EGF-Rezeptor ⁶⁰ in Endothel- und glatten Muskelzellen.

Durch eine Inkubation der EPCs mit S1P-Rezeptor-Agonisten kommt es in den hier durchgeführten Versuchen ebenfalls zu einer Aktivierung eines G-Proteingekoppelten Sieben-Transmembran-Rezeptors, wie die Immunpräzipitation des CXCR4-Rezeptors zeigen konnte. FTY720 führt in diesen Zellen zu einer Phosphorylierung des präzipitierten Rezeptors gegenüber den unstimulierten Kontrollen. Es wurde auch geprüft, ob das bekanntermaßen dem CXCR4 folgende Signalelysm JAK2 aktiviert wird. Wie Western-Blot-Untersuchungen bewiesen, kam es zu einer Phosphorylierung von JAK2 durch S1P und FTY720. So konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von

S1P-Rezeptoragonisten zu einer Tyrosin-Phosphorylierung des CXCR4-Rezeptors führt und dass das nachfolgende Enzym JAK2 ebenfalls aktiviert wird.

Der CXCR4-Rezeptor ist ein entscheidender Rezeptor für die endotheliale Zellmigration und ist essentiell für das Homing und die Funktionalität der EPCs in ischämischem Gewebe. Schon in einer vorhergehenden Studie konnte gezeigt werden, dass EPCs aus CXCR4 +/- Mäusen nicht zu einer erhöhten Neovaskularisation führen⁵². Um diesen Sachverhalt zu prüfen, wurden für diese Arbeit funktionelle Studien mit Hilfe des Invasionsassays und in vitro-Versuche durchgeführt. Im Invasionsassay erbrachte eine Inkubation von S1P auf die Zellen aus den CXCR4 +/- Mäusen keine Steigerung gegenüber den unbehandelten Zellen. Bei KMZs aus Wildtypmäusen war eine Stimulation mit S1P in einem signifikanten Maße möglich. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam die Überprüfung dieses Sachverhaltes im Tiermodell. Auch hier erbrachte eine Inkubation von S1P auf KMZs aus den CXCR4 +/- Mäusen keine Steigerung der Neovaskularisationskapazität im Hinterlaufischämiemodell. So konnte dargestellt werden, dass auch durch Stimulation mit S1P, die KMZs aus den CXCR4 +/- Mäusen zu keiner erhöhten funktionellen Kapazität in der Lage sind.

Ebenfalls reduziert ist die Phosphorylierung von JAK2 im Western-Blot von Knochenmarkszellen aus der CXCR4 +/- Maus im Vergleich zu den Wildtyp-Varianten. Dieser Sachverhalt zeigt, dass die Aktivierung von JAK2 und die darauf folgende Aktivierung der Enzymkaskade abhängig sind vom Vorhandensein von aktivierten CXCR4.

4.3. Die Src-Kinase-Familie ist an der Transaktivierung des CXCR4-Rezeptors beteiligt

Die Src-Kinase-Familie spielt eine wichtige Rolle im Aktivierungsprozess verschiedener Wachstumsfaktor-Rezeptoren durch S1P, in Endothelzellen der menschlichen Nabelschnur (HUVECs) und Fibroblasten^{55, 56, 61} oder in der Aktivierung des EGF-Rezeptors durch PDGF⁶².

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass für die Aktivierung des CXCR4-Rezeptors die Src-Kinase-Familie benötigt wird. Die Inkubation des Src-Kinasen-Familien-Inhibitors PP2 blockierte auf Knochenmarkszellen die FTY720- oder S1P-induzierte Invasion gegen SDF-1. Auch die Phosphorylierung von JAK2 in

menschlichen EPCs und KMZs aus Wildtypmäusen wurde komplett unterbrochen, wie Western-Blots zeigen konnten.

Da die S1P- vermittelte Aktivierung des CXCR4-Rezeptors sensitiv zu PP2 ist, kann vermutet werden, dass die Src-Kinase-Familie den Signalweg zwischen dem S1P3-Rezeptor und CXCR4 vermittelt. Jedoch kann aus den vorliegenden Daten nicht unterschieden werden zwischen einer direkten Phosphorylierung von CXCR4 durch S1P3 mit einer anschließenden Aktivierung von Src, einer S1P induzierten Src Phosphorylierung mit einer nachfolgenden Aktivierung von CXCR4 und einer S1P induzierten Aktivierung von einem unbekanntem Protein mit der nachfolgenden Aktivierung von CXCR4 und der Src-Kinase. Eine direkte Phosphorylierung von CXCR4 durch S1P ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da nichts über eine intrinsische Kinase-Aktivität des S1P-Rezeptors bekannt ist. Demgegenüber liegen mehrere Studien vor, bei denen die S1P-abhängige Aktivierung von verschiedenen Wachstumsfaktorrezeptoren durch Src-Kinasen vermittelt wurden^{55, 56, 61, 62}. Für die Hypothese, dass S1P3 Src aktiviert und dieses dann CXCR4 phosphoryliert, sprechen auch die Versuche mit den Zellen aus den S1P3^{-/-} Mäusen. Eine Inkubation von S1P brachte in diesen Zellen keine Aktivierung von Src. Ebenfalls vermindert war die Neovaskularisationskapazität dieser Zellen. Jedoch kann nicht endgültig ausgeschlossen werden, dass noch ein anderes, unbekanntes Protein im Signalprozess S1P3 zu Src und CXCR4 beteiligt ist.

Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass Src noch über einen anderen Signalweg die funktionelle Kapazität von den EPCs verbessert. Beispielsweise aktiviert Src den VEGF-Rezeptor-2, welcher eine wichtige Rolle für die Endothelzellen-Mobilisierung, -Überleben und -Funktion spielt^{63, 64}. Außerdem aktiviert Src noch den PI3K/Akt/eNOS-Signalweg, der ebenfalls bedeutend für die Funktion der endothelialen Zellen ist⁶⁵.

4.4. S1P und sein Analogon FTY720 könnten therapeutisch die EPC-Funktion verbessern

Risikofaktoren für KHK und schwere Herzerkrankungen haben gezeigt, dass sie die Funktion von EPCs verschlechtern^{37, 66, 67}. Dies limitiert die Eigenschaft der isolierten Zellen, gewonnen aus Patienten mit KHK, bei der Wiederherstellung des Blutflusses in experimentellen Tiermodellen, wie vorhergehende Untersuchungen im

Labor zeigen konnten ⁵². Auch Knochenmarkszellen, isoliert von Patienten mit chronisch ischämischer Herzerkrankung, haben eine signifikante Einschränkung im Homing und in der Neovaskularisationskapazität gezeigt ⁶⁸. Auch wenn die Risikofaktoren verschiedene Signalwege betreffen können ^{69, 70}, sprechen Daten aus dem hiesigen Labor für eine erhebliche Einschränkung des CXCR4-Signalings und der Reaktion gegen SDF-1, bei Zellen von KHK Patienten gegenüber gesunden Probanden ⁵². Insofern scheint eine medikamentöse Behandlung der Zellen mit S1P eine mögliche Alternative zu sein. S1P und FTY720 können über den in dieser Arbeit vorgestellten Signalweg den CXCR4-Rezeptor aktivieren und so die durch die vorliegende Erkrankung bedingten Beeinträchtigungen kompensieren. Dies wurde im Migrationsmodell, in den Tierstudien, mit der Immunpräzipitation und im Western-Blot gezeigt.

FTY720 befindet sich zurzeit in der klinischen Erprobung bei nierentransplantierten Patienten als Immunsuppressivum, um Organabstoßungen zu verhindern. Der genaue Mechanismus ist bis jetzt noch nicht komplett klar. Nachdem FTY720 durch zelluläre Kinasen zu FTY720-P metabolisiert wurde, zeigt es strukturelle Ähnlichkeit mit S1P und verhält sich wie ein S1P-Analogon. Durchgehend stimuliert FTY720 die CD34+ Zellmigration ⁴⁹.

Ebenfalls bekannt ist, dass FTY720 auch als Antagonist von S1P-induzierten Reaktionen agieren kann. Bei Gabe von FTY720 systemisch, blockiert FTY720 die S1P-Angiogenese und die VEGF-induzierte Tumervaskularisation ⁷¹. Der Grund dafür könnte eine vorgehende Inkubation von den proangiogenetischen Faktoren S1P bzw. VEGF auf die Zellen oder Tiere sein. So ist es denkbar, dass sich der S1P-Rezeptor internalisiert und so eine S1P-Reaktion inhibiert. In der vorliegenden Studie wurde FTY720 jedoch nur im Rahmen einer Vorinkubation verwendet und nicht wie in der erwähnten Studie auf schon vorbehandelten Zellen.

4.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

S1P und FTY720 verbessern die angiogenetische Aktivität und Neovaskularisationskapazität der EPCs und KMZs, wie die funktionellen Versuche dieser Studie belegen konnten. Sowohl mit in vitro-Versuchen, wie auch in tierexperimentellen Studien konnte dies bewiesen werden. Im Weiteren konnte in dieser Arbeit ein Teil des intrazellulären Signalweges aufgezeigt werden, der zur

Transaktivierung des CXCR4-Rezeptors und seiner nachfolgenden Enzyme führt. Es konnte gezeigt werden, dass die S1P-Rezeptoragonisten den CXCR4-Rezeptor und die darauffolgende JAK-Kinase aktivieren. Die Verbesserung der funktionellen Aktivität kann auch auf diesen Aspekt zurückgeführt werden. Es konnte weiterhin dargestellt werden, dass durch die Inkubation von S1P oder FTY720 Src-Kinasen über den S1P3-Rezeptor aktiviert werden, die dann direkt oder über Umwege zu einer Phosphorylierung des CXCR4-Rezeptors führen.

S1P und FTY720 könnten so bei Zelltherapiestudien als pharmakologisches Mittel benutzt werden, um die in ihrer Funktion eingeschränkten EPCs oder KMZs von Patienten mit einer bestehenden KHK zu verbessern. Man könnte so in den Zellen die funktionelle Kapazität erhöhen und so ihre klinische Aktivität verbessern mit dem Ziel, den Nutzen der klinisch eingesetzten Zellen zu vergrößern.

5. Zusammenfassung

S1P ist ein bioaktives Lipid, welches die Migration und Proliferation von Endothelzellen durch die Aktivierung des S1P-Rezeptors (EDG-Rezeptor) mit beeinflusst. Auch bei der SDF-1 induzierten Migration und beim Knochenmarkshoming von CD34+ Zellen spielt S1P eine Rolle. FTY720 ist ein synthetisches Analogon von S1P.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass endotheliale Progenitor Zellen (EPCs), gewonnen aus Patienten mit einer vorbestehenden KHK, durch Inkubation von S1P oder FTY720, verbesserte Neovaskularisation in der hinterlaufischämischen, athymischen Nacktmaus zeigen. Demgegenüber war die endogene Neovaskularisationskapazität, bei induzierter Hinterlaufischämie, von Mäusen mit S1P3^{-/-} stark eingeschränkt im Vergleich zu den Wildtyp-Varianten. Auch vermindert war der Blutfluß von Knochenmarkszellen, gewonnen aus S1P3^{-/-} Mäusen, transplantiert in hinterlaufischämische, athymische Nacktmäuse. Die Behandlung der KMZs mit S1P-Rezeptor-Agonisten führte zu keiner gesteigerten Erholung des Blutflusses.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass S1P und FTY720 den CXCR4-Rezeptor und JAK2 phosphorylieren. Ebenfalls aktiviert wird die Src-Kinase. Bei Verwendung von Zellen, gewonnen aus CXCR4^{+/-} Mäusen, zeigt die Inkubation von S1P oder FTY720 keine Verbesserung in der Invasions- und Neovaskularisationskapazität. Durch Vorinkubation des Src-Kinase-Familien-Inhibitors PP2 konnte aufgezeigt werden, dass die Phosphorylierung von CXCR4 von der Src-Familie abhängig ist. Auch funktionell betrachtet, führt die Vorinkubation von PP2 zu einer ausgeprägten Erniedrigung der Invasionskapazität bei Inkubation mit S1P-Rezeptoragonisten. In Knochenmarkszellen, gewonnen aus S1P3^{-/-} Mäusen, kommt es zu keiner Src-Kinase-Phosphorylierung. Auch kommt es in den embryonalen Mausfibroblasten (MEF-Zellen) zu keiner JAK2-Kinase-Phosphorylierung, nach Inkubation von einem S1P-Rezeptoragonisten. Auf diesen Zellen wird kein S1P3-Rezeptor exprimiert, wie FACS-Analysen zeigten. Dies spricht für eine Aktivierung des CXCR4-Rezeptors über den S1P3-Rezeptor.

Diese Doktorarbeit zeigt, dass S1P und FTY720 den CXCR4-Signalweg beeinflussen. So könnten sie bei Zelltherapiestudien als pharmakologisches Mittel benutzt werden, um die in ihrer Funktion eingeschränkten EPCs oder KMZs von Patienten mit einer bestehenden KHK zu verbessern.

6. Abstract

Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a bioactive lipid, which influences migration and proliferation of endothelial cells through activation of S1P receptors (EDG Receptor). It also supports SDF-1 induced migration and bone marrow homing of CD34+ Progenitors. FTY720 is a synthetic analog of S1P

This thesis shows that incubation of Endothelial Progenitor Cells (EPCs) harvested from patients with a Coronary Artery Disease (CAD) improves neovascularization in ischemic hind limbs from athymical nude mice. Related, endogenous neovascularisation capacity was dramatically reduced in induction of hindlimb ischemia in mice with S1P3 $-/-$, compared to the wildtype mice. Also reduced was blood flow recovery from S1P3 $-/-$ bone marrow – derived cells (BMC), transplanted into ischemic hind limb nude mice. Of note, treatment of BMCs derived from S1P3 $-/-$ mice with S1P did not rescue blood flow recovery.

In this study it is shown that S1P and FTY720 induces phosphorylation of CXCR4 and JAK2. Src Kinase is also activated. The contribution of CXCR4 for S1P-mediated effects was further supported by the findings that S1P preincubation failed to stimulate invasion and neovascularisation capacity of BMCs from CXCR4 $+/-$ mice. Pre-treatment with Src Kinase Inhibitor PP2 showed, that phosphorylation of CXCR4 is dependent on the Src Kinase Family. The invasion capacity of the BMCs pre-treated with PP2 and incubated with S1P is also reduced. On embryonic mouse fibroblasts (MEF-Cells) were no activation of JAK2-Kinase by S1P, because there is no S1P3-Receptor expressed, which was shown by FACS Analysis. The activation of the CXCR4 signaling by S1P is mediated via the S1P3 receptor, since S1P-induced Src phosphorylation was abrogated in EPC from S1P3 $-/-$ mice.

This thesis shows that S1P agonists might serve as a sensitizer of CXCR4-mediated signaling. It could be applied in clinical progenitor cell therapy to improve EPC or BMC function in patients with CAD.

7. Liste der Akürzungen

Akt	Proteinkinase B
AMI	Akuter Myokardinfarkt
ANOVA	Analysis of variance
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BBE	Bovine brain extract
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMC	Bone marrow cells
BOOST	BOne marrOW transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration study
BSA	Rinderserumalbumin = bovine serum albumin
CAD	Coronary artery disease
CD	Cluster of differentiation
CXCR4	CXC Chemokin Rezeptor-4
Dil	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBM	Endothelial Basal Medium
EDG-Rezeptor	endothelial differentiation gene receptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF Rezeptor	Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
EPC	Endotheliale Progenitor Zellen
ES	Embryonale Stammzellen
FACS	Fluorescence activated cell sorting = Durchflusszytometrie
FCS	Fetal calf serum
FTY720	2-Amino-2-(2-(4-octylphenyl) ethyl)propan-1,3-diol = Fingolimod
HDL	High Density Lipoprotein
hEGF	Human endothelial growth factor
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HUVECs	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
i.v.	intravenös
IB	Immunoblot
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
iPS	Induzierte pluripotente Stammzellen
JAK	Janus-Kinase
KDR	Humaner VEGF Rezeptor 2
KHK	Koronare Herzkrankheit
KMZ	Knochenmarkszellen
LDL	Low Density Lipoprotein
LVAD	Left Ventricle Assistent Devices = Linksherzunterstützungssysteme
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MEF	Murine-embryonale-Fibroblasten, embryonale Mausfibroblasten
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
MSC	Mesenchymale Stammzellen

n.s.	nicht signifikant
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF Rezeptor	Platelet-derived growth factor Receptor
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
P-JAK	Phosphorylierte Janus-Kinase
PP2	Src-Kinase-Familien-Inhibitor
PTCA	Perkutane transluminale koronare Angioplastie
REPAIR AMI	Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction study
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	RPMI-1640 = Zellkulturmedium
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SDF-1	Stromal-cell derived factor 1
SDS PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Src	Proto-onkogene Kinase-Familie
STAT	Signal transduction and activator of transcription
TBS-T	Tris buffered saline – Tween
Topcare AMI	Transplantation of Progenitor Cells And Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction study
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

8. Literatur

- 1 Evans M, Kaufman M. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-6
- 2 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7
- 3 Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 399-404
- 4 Richards M, Fong CY, Chan WK, Wong PC, Bongso A. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 933-6
- 5 Amit M, Margulets V, Segev H, Shariki K, Laevsky I, Coleman R, Itskovitz-Eldor J. Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol Reprod* 2003; 68: 2150-6
- 6 Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, Carpenter MK. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 971-4
- 7 Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreq H, Benvenisty N. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 2000; 6: 88-95
- 8 Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 11307-12
- 9 Dimmeler S, Zeiher AM. Stammzelltherapie in der Kardiologie - Stand und Perspektiven: 1. Edition. Bremen, Germany: UNI-MED Science Verlag AG, 2005
- 10 Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001; 105: 369-77
- 11 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-7
- 12 Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 1996; 183: 1797-806
- 13 Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 2001; 7: 1028-34
- 14 Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001; 107: 1395-402
- 15 Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114: 763-76

- 16 Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 2001; 105: 829-41
- 17 Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007; 448: 318-24
- 18 Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448: 313-7
- 19 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861-72
- 20 Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-7
- 21 Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000; 95: 3106-12
- 22 Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 1999; 103: 1231-6
- 23 Walter DH, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: regulation and contribution to adult neovascularization. *Herz* 2002; 27: 579-88
- 24 Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103: 2776-9
- 25 Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 2003; 107: 1322-8
- 26 Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3422-7
- 27 Dimmeler S. Stammzelltherapie in der Kardiologie - Stand und Perspektiven. Uni-Med Science: 1. Auflage Edition. Bremen, Germany: International Medical Publishers (London, Boston), 2005
- 28 Honold J, Assmus B, Lehman R, Zeiher AM, Dimmeler S. Stem cell therapy of cardiac disease: an update. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 1673-7
- 29 Medvinsky A, Smith A. Stem cells: Fusion brings down barriers. *Nature* 2003; 422: 823-5
- 30 Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, Masaki H, Mori Y, Iba O, Tateishi E, Kosaki A, Shintani S, Murohara T, Imaizumi T, Iwasaka T. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 2001; 104: 1046-52
- 31 Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106: 1913-8
- 32 Schachinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM.

- Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 1690-9
- 33 Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, Hecker H, Schaefer A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* 2006; 113: 1287-94
- 34 Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, Van de Werf F. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2006; 367: 113-21
- 35 Schachinger V, Dimmeler S, Zeiher AM. [Stem cells after myocardial infarction]. *Herz* 2006; 31: 127-36; quiz 142-3
- 36 Cleland JG, Freemantle N, Coletta AP, Clark AL. Clinical trials update from the American Heart Association: REPAIR-AMI, ASTAMI, JELIS, MEGA, REVIVE-II, SURVIVE, and PROACTIVE. *Eur J Heart Fail* 2006; 8: 105-10
- 37 Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001; 89: E1-7
- 38 Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 2002; 106: 2781-6
- 39 Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 397-407
- 40 Allende ML, Yamashita T, Proia RL. G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood* 2003; 102: 3665-7
- 41 Sanna MG, Liao J, Jo E, Alfonso C, Ahn MY, Peterson MS, Webb B, Lefebvre S, Chun J, Gray N, Rosen H. Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor subtypes S1P1 and S1P3, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate. *J Biol Chem* 2004; 279: 13839-48
- 42 Liu Y, Wada R, Yamashita T, Mi Y, Deng CX, Hobson JP, Rosenfeldt HM, Nava VE, Chae SS, Lee MJ, Liu CH, Hla T, Spiegel S, Proia RL. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest* 2000; 106: 951-61
- 43 Kimura T, Watanabe T, Sato K, Kon J, Tomura H, Tamama K, Kuwabara A, Kanda T, Kobayashi I, Ohta H, Ui M, Okajima F. Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. *Biochem J* 2000; 348 Pt 1: 71-6
- 44 Licht T, Tsurunikov L, Reuveni H, Yarnitzky T, Ben-Sasson SA. Induction of pro-angiogenic signaling by a synthetic peptide derived from the second intracellular loop of S1P3 (EDG3). *Blood* 2003; 102: 2099-107
- 45 Nofer JR, van der Giet M, Tolle M, Wolinska I, von Wnuck Lipinski K, Baba HA, Tietge UJ, Godecke A, Ishii I, Kleuser B, Schafers M, Fobker M, Zidek W, Assmann G, Chun J, Levkau B. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest* 2004; 113: 569-81

- 46 Okamoto H, Takuwa N, Yokomizo T, Sugimoto N, Sakurada S, Shigematsu H, Takuwa Y. Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 9247-61
- 47 Brinkmann V, Davis MD, Heise CE, Albert R, Cottens S, Hof R, Bruns C, Prieschl E, Baumruker T, Hiestand P, Foster CA, Zollinger M, Lynch KR. The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem* 2002; 277: 21453-7
- 48 Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, Quackenbush E, Xie J, Milligan J, Thornton R, Shei GJ, Card D, Keohane C, Rosenbach M, Hale J, Lynch CL, Rupprecht K, Parsons W, Rosen H. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* 2002; 296: 346-9
- 49 Kimura T, Boehmler AM, Seitz G, Kuci S, Wiesner T, Brinkmann V, Kanz L, Mohle R. The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 supports CXCR4-dependent migration and bone marrow homing of human CD34+ progenitor cells. *Blood* 2004; 103: 4478-86
- 50 Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996; 382: 829-33
- 51 Kucia M, Jankowski K, Reza R, Wysoczynski M, Bandura L, Allendorf DJ, Zhang J, Ratajczak J, Ratajczak MZ. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J Mol Histol* 2004; 35: 233-45
- 52 Walter DH, Haendeler J, Reinhold J, Rochwalsky U, Seeger F, Honold J, Hoffmann J, Urbich C, Lehmann R, Arenzana-Seisdesdos F, Aicher A, Heeschen C, Fichtlscherer S, Zeiher AM, Dimmeler S. Impaired CXCR4 signaling contributes to the reduced neovascularization capacity of endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Circ Res* 2005; 97: 1142-51
- 53 Vila-Coro AJ, Rodriguez-Frade JM, Martin De Ana A, Moreno-Ortiz MC, Martinez AC, Mellado M. The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *Faseb J* 1999; 13: 1699-710
- 54 Waters CM, Connell MC, Pyne S, Pyne NJ. c-Src is involved in regulating signal transmission from PDGFbeta receptor-GPCR(s) complexes in mammalian cells. *Cell Signal* 2005; 17: 263-77
- 55 Tanimoto T, Jin ZG, Berk BC. Transactivation of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR is involved in sphingosine 1-phosphate-stimulated phosphorylation of Akt and endothelial nitric-oxide synthase (eNOS). *J Biol Chem* 2002; 277: 42997-3001
- 56 Rosenfeldt HM, Hobson JP, Maceyka M, Olivera A, Nava VE, Milstien S, Spiegel S. EDG-1 links the PDGF receptor to Src and focal adhesion kinase activation leading to lamellipodia formation and cell migration. *Faseb J* 2001; 15: 2649-59
- 57 Nagata Y, Todokoro K. Interleukin 3 activates not only JAK2 and STAT5, but also Tyk2, STAT1, and STAT3. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 221: 785-9
- 58 Tolle M, Levkau B, Keul P, Brinkmann V, Giebing G, Schonfelder G, Schafers M, von Wnuck Lipinski K, Jankowski J, Jankowski V, Chun J, Zidek W, Van der Giet M. Immunomodulator FTY720 Induces eNOS-dependent arterial vasodilatation via the lysophospholipid receptor S1P3. *Circ Res* 2005; 96: 913-20

- 59 Chae SS, Paik JH, Furneaux H, Hla T. Requirement for sphingosine 1-phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference. *J Clin Invest* 2004; 114: 1082-9
- 60 Le Stunff H, Mikami A, Giussani P, Hobson JP, Jolly PS, Milstien S, Spiegel S. Role of sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 in epidermal growth factor-induced chemotaxis. *J Biol Chem* 2004; 279: 34290-7
- 61 Endo A, Nagashima K, Kurose H, Mochizuki S, Matsuda M, Mochizuki N. Sphingosine 1-phosphate induces membrane ruffling and increases motility of human umbilical vein endothelial cells via vascular endothelial growth factor receptor and CrkII. *J Biol Chem* 2002; 277: 23747-54
- 62 Saito Y, Haendeler J, Hojo Y, Yamamoto K, Berk BC. Receptor heterodimerization: essential mechanism for platelet-derived growth factor-induced epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 6387-94
- 63 Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1185-9
- 64 Rumpold H, Wolf D, Koeck R, Gunsilius E. Endothelial progenitor cells: a source for therapeutic vasculogenesis? *J Cell Mol Med* 2004; 8: 509-18
- 65 Haynes MP, Li L, Sinha D, Russell KS, Hisamoto K, Baron R, Collinge M, Sessa WC, Bender JR. Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen. *J Biol Chem* 2003; 278: 2118-23
- 66 Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; 348: 593-600
- 67 Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, Malagutti P, Bugli AM, Bragotti LZ, Francolini G, Mauro E, Castoldi G, Ferrari R. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 2004; 110: 1209-12
- 68 Heeschen C, Lehmann R, Honold J, Assmus B, Aicher A, Walter DH, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation* 2004; 109: 1615-22
- 69 Seeger FH, Haendeler J, Walter DH, Rochwalsky U, Reinhold J, Urbich C, Rossig L, Corbaz A, Chvatchko Y, Zeiher AM, Dimmeler S. p38 mitogen-activated protein kinase downregulates endothelial progenitor cells. *Circulation* 2005; 111: 1184-91
- 70 Rosso A, Balsamo A, Gambino R, Dentelli P, Falcioni R, Cassader M, Pegoraro L, Pagano G, Brizzi MF. p53 Mediates the accelerated onset of senescence of endothelial progenitor cells in diabetes. *J Biol Chem* 2006; 281: 4339-47
- 71 LaMontagne K, Littlewood-Evans A, Schnell C, O'Reilly T, Wyder L, Sanchez T, Probst B, Butler J, Wood A, Liao G, Billy E, Theuer A, Hla T, Wood J. Antagonism of sphingosine-1-phosphate receptors by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization. *Cancer Res* 2006; 66: 221-31

9. Teilpublikationen

9.1. Veröffentlichungen in Zeitschriften

Walter DH [#], **Rochwalsky U** [#], Reinhold J, Seeger F, Aicher A, Urbich C, Spyridopoulos I, Chun J, Brinkmann V, Keul P, Levkau B, Zeiher AM, Dimmeler S, Haendeler J.
Sphingosine-1-phosphate stimulates the functional capacity of progenitor cells by activation of the CXCR4-dependent signaling pathway via the S1P3 receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 275-82

Walter DH [#], Haendeler J [#], Reinhold J [#], **Rochwalsky U**, Seeger F, Honold J, Hoffmann J, Urbich C, Lehmann R, Arenzana-Seisdesos F, Aicher A, Heeschen C, Fichtlscherer S, Zeiher AM, Dimmeler S.
Impaired CXCR4 signaling contributes to the reduced neovascularization capacity of endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Circ Res* 2005; 97: 1142-51

Seeger FH, Haendeler J, Walter DH, **Rochwalsky U**, Reinhold J, Urbich C, Rossig L, Corbaz A, Chvatchko Y, Zeiher AM, Dimmeler S.
p38 mitogen-activated protein kinase downregulates endothelial progenitor cells. *Circulation* 2005; 111: 1184-91

[#] contributed equally to the work

9.2. Zusammenfassungen

D. Walter, **U. Rochwalsky**, J. Reinhold, F. Seeger, B. Levkau, A. M. Zeiher, J. Haendeler

Die Aktivierung des CXCR4 Signalwegs durch Sphingosin 1 phosphat (S1P) und FTY720 wird über den S1P3 Rezeptor vermittelt: Ein wichtiger Mechanismus zur Verbesserung der funktionellen Kapazität von EPC. *Z Kardiol*, 2006 Suppl 1; V216

D.Walter, J.Reinhold, **U.Rochwalsky**, F.Seeger, U.Fischer-Rasokat, J.Haendeler
Sphingosin 1-Phosphat und der S1P Agonist FTY720 verbessern die funktionelle Aktivität von endothelialen Progenitorzellen (EPC) bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung durch Transaktivierung des CXCR4 Rezeptors. *Z Kardiol*, 2005, 94: Suppl 1; P1249

D.H. Walter, J. Reinhold, F. Seeger, **U. Rochwalsky**, J. Hoffmann, J. Honold, S. Fichtlscherer, J. Haendeler

Impaired CXCR4-mediated JAK/STAT signaling contributes to the reduced neovascularization capacity of endothelial progenitor cells (EPC) derived from patients with coronary artery disease. *Circulation Supplement* 2004; P715

D.H. Walter, J. Reinhold, F. Seeger, **U. Rochwalsky**, U. Fischer-Rasokat, J. Honold, J. Haendeler, S. Dimmeler
Sphingosine 1 phosphate (S1P) transactivates the CXCR4 receptor and stimulates functional capacity of endothelial progenitor cells (EPC). *Circulation Supplement* 2004; P1679

10. Danksagung

Zum Abschluss dieser Arbeit möchte ich mich als erstes bei meiner Doktormutter Frau Dr. Jojo Haendeler bedanken. Sie unterstützte mich mit viel Geduld und Wohlwollen durch die gesamte Zeit meiner wissenschaftlichen Arbeit und ich konnte sehr von Ihrer Erfahrung auf der wissenschaftlichen und labortechnischen Ebene profitieren. Wir haben uns menschlich sehr gut verstanden haben und so besteht auch über die Laborzeit hinaus ein freundschaftlicher Kontakt.

Ein weiterer sehr herzlicher Dank geht an Frau Christine „Fee“ Goy, die mir viele Labortechniken beigebracht hat und bei zahlreichen Versuchen behilflich war. Dabei wurde ihr ebenfalls viel Geduld abverlangt wurde. Ich möchte mich nicht nur für die Hilfe im Labor bedanken, sondern auch für die vielen guten Ratschläge darüber hinaus.

Des Weiteren will ich Herrn Dr. Dirk Walter danken, durch den ich in das Labor der Molekularen Kardiologie gelangte, und der mich vor allem bei den Tiermodellen sehr gut unterstützt hat.

Auch Carmen Schön und Tina Rasper haben mir durch ihre freundliche und unkomplizierte Mithilfe an der Realisierung dieser Doktorarbeit sehr geholfen. Weitere Technische Unterstützung bekam ich durch Andrea Knau, Tino Röxe, Ariane Fischer und Marion Muhly-Reinholz. Danke für die Hilfe.

Vielen Dank für wissenschaftlichen Rat und das Durcharbeiten von Teilen dieses Manuskriptes an Frau Dr. Alexandra Aicher. Außerdem möchte ich Herrn Dr. Florian Seeger, Herrn Dr. Ioakim Spyridopoulos, Herrn Johannes Reinhold, Herrn Dr. Fischer-Rasokat, Herrn Prof. Dr. A. Zeiher und Frau Prof. Dr. Stephanie Dimmeler für ihre Unterstützung danken.

Letztlich ein großes „Danke Schön“ an die gesamte Abteilung der Molekularen Kardiologie für die gebotenen Möglichkeiten und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ein weiterer Dank an meine Familie für die großartige Unterstützung während des kompletten Studiums und besonders während der Verfassung dieser Arbeit.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt (WA 1461/2-1 und 2-2).

11. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die im Fachbereich Medizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Sphingosin-1-Phosphat und FTY720 stimulieren die funktionelle Kapazität von Progenitorzellen durch die Aktivierung des CXCR4 abhängigen Signalweges über den S1P3-Rezeptor“ an der Universitätsklinik der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Zentrum der Inneren Medizin, Medizinische Klinik III, in der Arbeitsgruppe molekulare Kardiologie unter der Leitung von PD Dr. J. Haendeler mit Unterstützung von PD Dr. D.W. Walter ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt habe und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Dissertation vorgelegt.

Verschiedene Auszüge dieser Dissertation wurden bereits in folgenden Fachzeitschriften publiziert:

Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology 2007; 27: 275-82:

Walter DH [#], Rochwalsky U [#], Reinhold J, Seeger F, Aicher A, Urbich C, Spyridopoulos I, Chun J, Brinkmann V, Keul P, Levkau B, Zeiher AM, Dimmeler S, Haendeler J. Sphingosine-1-phosphate stimulates the functional capacity of progenitor cells by activation of the CXCR4-dependent signaling pathway via the S1P3 receptor.

Circulation Research 2005; 97: 1142-51:

Walter DH [#], Haendeler J [#], Reinhold J [#], Rochwalsky U, Seeger F, Honold J, Hoffmann J, Urbich C, Lehmann R, Arenzana-Seisdesdos F, Aicher A, Heeschen C, Fichtlscherer S, Zeiher AM, Dimmeler S. Impaired CXCR4 signaling contributes to the reduced neovascularization capacity of endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease.

([#] Gleichberechtigte Autoren)



Hannover, den 10.07.08

12. Curriculum vitae

Persönliches:

Name: Ulrich Rochwalsky
Geboren: 10.03.1981 in Frankfurt am Main
Familienstand: ledig
Konfession: römisch-katholisch
Wohnhaft: Lärchenstr. 17
30161 Hannover
Email: ulrich.rochwalsky@gmx.de
Telefon: +49-1775551899

Schulische Ausbildung und Zivildienst:

1987-1991 Steinbergschule Hofheim/Ts (Grundschule)
1991-2000 Main-Taunus-Schule Hofheim/Ts (Gymnasium)
06/2000 Abitur
2000-2001 Zivildienst an den Kliniken des Main-Taunus-Kreises in
Hofheim/Ts in der Elektrokardiographischen Abteilung

Studium der Humanmedizin

Universität:

2001-2003 Vorklinischer Studienabschnitt an der Johann Wolfgang
Goethe - Universität in Frankfurt/Main
2003-2005 Klinischer Studienabschnitt an der Johann Wolfgang
Goethe - Universität in Frankfurt/Main
2005-2006 Klinischer Studienabschnitt an der Karlsuniversität in
Prag/Tschechische Republik im Rahmen des europäischen
Erasmus/Sokrates Programms
2006-2007 Praktisches Jahr

Abschlüsse:

09/2003 1.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung/Ärztliche Vorprüfung
11/2007 2.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen:

04/2004 Innere Medizin/Kardiologie am Klinikum der Johann
Wolfgang Goethe - Universität in Frankfurt
08/2004 Allgemein Chirurgie am Hasan Sadikin General Hospital
der University Padjadjaran, Bandung, Indonesien
04/2005 Pädiatrie beim niedergelassenen Pädiater Dr. Thomas
Meinhard in Köln
08/2005 Notfallmedizin in der Zentralen Notaufnahme im
Klinikum Offenbach

Praktisches Jahr:

08/2006 Innere Medizin an der Mount Sinai School of Medicine in
- 10/2006 New York City, USA
10/2006 Innere Medizin am Klinikum der Johann Wolfgang
- 12/2006 Goethe - Universität in Frankfurt
12/2006 Chirurgie am Pretoria Academic Hospital und am
- 03/2006 Kalafong Hospital der University of Pretoria, Pretoria,
Republik Süd Afrika
03/2007 Pädiatrie am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe –
- 07/2007 Universität in Frankfurt

Facharztausbildung

Seit 04/2008 Assistenzarzt an der Kinderklinik der Medizinischen
Hochschule Hannover im Fach Pädiatrie

Promotion:

Seit 02/2004

Promotion an der Johann Wolfgang Goethe - Universität,
Medizinischen Klinik 3, Abteilung für Kardiologie
(Direktor: Prof. Dr. A.M. Zeiher, Laborleiterin: Prof. Dr.
S. Dimmeler)
Doktormutter: PD Dr. Judith Haendeler

Stipendien:

„Alfried Krupp von Bohlen und Halbach Stiftung zur Unterstützung junger
Wissenschaftler“, bewilligt durch Prof. S. Dimmeler

Erasmus/Sokrates Austauschstipendium der Europäischen Union

A handwritten signature in black ink, reading "U. Rochwałski". The signature is written in a cursive style with a prominent flourish at the end.

Hannover, den 10.07.08