

**Untersuchungen zur Rolle des Notch-Signalweges  
in endothelialen Progenitorzellen  
in der vaskulären Regeneration**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades einer

**Doktorin der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.**

genehmigte Dissertation  
von

Dipl.-Biol. Diana Elligsen-Merkel

geboren am 02.07.1980 in Hannover

Referent: Prof. Dr. W. Müller  
Korreferent: Prof. Dr. B. Otto  
Tag der Promotion: 04.12.2009

### **Zusammenfassung**

Die normale Funktion von Gewebe ist stark abhängig von der adäquaten Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen durch Blutgefäße (Cines, 1998, Carmeliet, 2000). Die These, dass die postnatale Neovaskularisierung ausschließlich durch die Migration und Proliferation von Endothelzellen (*endothelial cells*, ECs), in einem als Angiogenese benannten Prozess, vermittelt wird, wurde in den letzten Jahren durch verschiedene Arbeitsgruppen widerlegt. Sie zeigten, dass vom Knochenmark abstammende, zirkulierende Vorläuferzellen ebenfalls an der postnatalen Neubildung von Blutgefäßen beteiligt sind (Asahara, 1997, Asahara, 1999, Kalka, 2000, Takahashi, 1999). Die Vorläuferzellen werden als endotheliale Progenitorzellen (*endothelial progenitor cells*, EPCs) bezeichnet und vermitteln eine Gefäßneubildung, die als Vaskulogenese bezeichnet wird (Carmeliet, 2000). Der Einsatz von *ex vivo* expandierten EPCs in tierexperimentellen Modellen wie Myokardinfarkt oder Hinterlaufischämie führte zur einer signifikanten Verbesserung des Blutflusses, der Herzfunktion und einer reduzierten Narbenbildung des linken Ventrikels bzw. einer verbesserten Neovaskularisierung (Kawamoto, 2001, Kocher, 2001, Urbich, 2003, Kalka, 2000, Murohara, 2000).

Der Signalweg Notch wurde zuerst in der Entwicklung des Nervensystems beschrieben und nimmt dort die Rolle eines Entscheiders in der Entwicklung von Vorläuferzellen in Nervenzellen oder Gliazellen ein. Kürzlich wurde für Notch eine ähnliche Rolle in der Entwicklung des vaskulären Systems beschrieben (Adams, 2003). Die These, ob eine Modifikation des Notch-Signalweges zu einer verbesserten Funktionalität der EPCs in der Regeneration des Endothels und somit auch in der von ischämischem oder infarziertem Gewebe führen könnte, war Grundlage dieser Arbeit. Um diese Frage zu beantworten, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Rolle der Notch-Signaltransduktion in humanen endothelialen Progenitorzellen untersucht. Zuerst wurde die Kultivierung von EPCs aus humanen Vollblut etabliert und die isolierten EPCs charakterisiert. Die Expression des Notch1-Rezeptors wurde auf Transkriptions- und Translationsebene in den kultivierten EPCs nachgewiesen, sowie die des Notch-Liganden Delta1. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine Regulation der EPC-Zahl und -funktion durch die Notch-Signaltransduktion. Das Mausmodell der Carotidenverletzung zeigte eine verminderte Endothelregeneration und -funktion nach Notch-Inhibition der injizierten EPCs. Diese Arbeit zeigt, dass Notch1 eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Funktionalität von EPCs spielt. Bei Inhibition des Notch-Signalweges werden alle wichtigen Funktionen, welche EPCs in der physiologischen und pathologischen Reendothelialisierung und Neovaskularisierung von Gefäßsystemen haben, vermindert. Der genaue Mechanismus wie Notch die Entwicklung und Funktionalität in EPCs steuert, muss in weiteren Arbeiten untersucht werden.

**Schlagwörter:** Notch, EPC, vaskuläre Regeneration

## Abstract

The regular function of tissues is strongly dependent on the appropriate supply with oxygen and nutrients by blood vessels (Cines, 1998, Carmeliet, 2000). The theory, that postnatal neovascularization is exclusively mediated by migration and proliferation of endothelial cells (ECs), during a process called angiogenesis, has been contradicted in the last years by several groups. They showed, that circulating bone marrow derived progenitor cells also take part in the postnatal regeneration of blood vessels (Asahara, 1997, Asahara, 1999, Kalka, 2000, Takahashi, 1999). The progenitor cells are named endothelial progenitor cells (EPCs) and mediate a blood vessel regeneration, which is called vasculogenesis (Carmeliet, 2000). The application of *ex vivo* expanded EPCs in experimental murine or rat models like myocardial infarction or hind limb ischemia showed a significant improvement of blood flow, heart function and reduced scarring respectively an improved neovascularization (Kawamoto, 2001, Kocher, 2001, Urbich, 2003, Kalka, 2000, Murohara, 2000).

The signaling pathway Notch was first described in the development of the nervous system and is there a decider for cell fates in the development of precursor cells in nervous cells or glia cells. Recently a similar role for Notch has been described in the development of the vascular system (Adams, 2003). The basis of this work is, if a modification of the Notch signaling will show an improved functionality of EPCs in the regeneration of an endothelium and as well of ischemic and infarcted tissues. To answer this question, the role of Notch signaling in human endothelial progenitor cells was analyzed within this work. First the cultivation of EPCs from human whole blood was established and the isolated EPCs were characterized. The expression of the Notch1 receptor was shown on transcriptional and translational level in the cultured EPCs, as well the Notch ligand Delta1. The results of this work show a regulation of the EPC number and function by the Notch signaling. The murine model of carotis injury showed a decreased endothelial regeneration and function after injection of notch inhibited EPCs. This work shows that Notch1 plays an important role in the development and functionality of EPCs. If the Notch signaling is inhibited in EPCs all important functions are decreased, which EPCs have in the physiological and pathological reendothelialisation and neovascularization of blood vessels. The exact mechanism, by which Notch is regulating the development and functionality in EPCs, has to be analyzed in further works.

**Keywords:** Notch, EPC, vascular Regeneration

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	V
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	VI
<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>1.1. Endotheliale Progenitorzellen</b> .....	1
<b>1.1.1. Endotheliale Progenitorzellen</b> .....	1
HSCs, myeloide Zellen, EPCs und ECs.....	3
<b>1.1.2. EPCs in der Neovaskularisierung und Reendothelialisierung</b> .....	4
EPCs als mögliche Therapie zur verbesserten Neovaskularisierung und Reendothelialisierung.....	4
Mechanismen der Funktionalität von EPCs.....	5
CXCR4 und SDF-1 in der Vaskulogenese.....	7
<b>1.1.3. Risikofaktoren, vaskuläre Erkrankungen und EPCs</b> .....	7
Kardiovaskuläre Erkrankungen und EPCs als Therapiemöglichkeit.....	7
EPCs und Risikofaktoren.....	8
<b>1.2. Notch-Signaltransduktion</b> .....	9
<b>1.2.1. Notch – Eine kurze Einführung</b> .....	9
<b>1.2.2. Der Notch-Rezeptor und die Deltaliganden</b> .....	9
<b>1.2.3. Der Notch-Signalweg in der embryonalen und der vaskulären Entwicklung</b> ... 11	
Der Notch-Signalweg und seine Wirkmechanismen.....	11
Der Notch-Signalweg in der Embryogenese.....	13
Der Notch-Signalweg in der Vaskulogenese, Angiogenese und Hämatopoese.....	13
Der Notch-Signalweg in der Entwicklung und Reifung von EPCs.....	15
<b>1.3. Ziele der Arbeit</b> .....	16
<b>2. Material</b> .....	17
<b>2.1. Chemikalien</b> .....	17
<b>2.1.1. Allgemeine Chemikalien</b> .....	17
<b>2.1.2. Enzyme, biologische Substanzen und Puffer</b> .....	18
<b>2.1.3. Kits</b> .....	22
<b>2.2. Materialien und Geräte</b> .....	23
<b>2.2.1. Filme und Membranen</b> .....	23
<b>2.2.2. Geräte</b> .....	23
<b>2.2.3. Kleinmaterialien</b> .....	24
<b>2.3. Standardlösungen, -medien und -puffer</b> .....	25
<b>2.3.1. Lösungen</b> .....	31
<b>2.4. Probenmaterial</b> .....	32
<b>2.5. Bakterienstämme</b> .....	32

2.6.	Mausstämme.....	32
2.7.	Zelllinien.....	32
2.8.	Plasmide.....	33
2.9.	Adenoviren.....	33
2.10.	Computerprogramme.....	33
2.11.	Genbank-Accession-Nummern.....	34
3.	<b>Methoden</b> .....	35
3.1.	Zellkultur.....	35
3.1.1.	Medien und Lösungen.....	35
3.1.2.	Zellzahlbestimmung.....	36
3.1.3.	Kultivierung von HUVEC.....	36
3.1.4.	Zellpräparationen.....	37
3.1.5.	Kultivierung von AD-293-Zellen.....	38
3.1.6.	Transfektion von humanen Zellen.....	38
3.1.7.	Markierung von EPC für <i>in vivo</i> Experimente.....	39
3.2.	Nukleinsäureanalytik.....	39
3.2.1.	Nukleinsäureextraktion.....	39
3.2.2.	Nukleinsäureaufreinigung.....	42
3.2.3.	Analyse von Nukleinsäuren.....	43
3.2.4.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	46
3.2.5.	Amplifikation von Plasmiden.....	50
3.3.	Herstellung adenoviraler Konstrukte.....	53
3.4.	Proteinanalytik.....	58
3.5.	Immunhistochemie und Immuncytochemie.....	63
3.5.1.	Doppelfärbung von EPC.....	64
3.5.2.	TUNEL-Färbung von apoptotischen Zellkernen.....	64
3.5.3.	Herstellung von Gewebeschnitten.....	66
3.5.4.	Färbung von Gewebeschnitten.....	66
3.6.	Fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse (FACS).....	68
3.6.1.	FACS-Analyse der Expression von Rezeptoren.....	68
3.6.2.	Zellzyklusanalyse.....	70
3.6.3.	Apoptose Nekrose Bestimmung.....	71
3.6.4.	FACS-Analyse.....	72
3.7.	Murines Carotis-Verletzungsmodell.....	72
3.7.1.	Maushaltung.....	74
3.7.2.	Operationstechnik.....	74
3.7.3.	<i>in situ</i> -Färbung und Entnahme der Carotis.....	75

3.7.4.	Entnahme der Carotis zur Fluoreszenzfärbung.....	76
3.8.	<i>in vitro</i> Experimente.....	77
3.8.1.	Adhäsionsassay.....	77
3.8.2.	Migrationsassay.....	77
3.8.3.	Tube Formationsassay.....	78
3.9.	Analyse der Zellproliferation und Zytotoxizität.....	79
3.9.1.	Analyse der Zellproliferation.....	79
3.9.2.	Analyse der Zytotoxizität bzw. Zytolyse.....	79
3.10.	Inhibition des Notch-Signalweges.....	81
4.	Ergebnisse.....	82
4.1.	Nachweis und Analyse der EPC.....	82
4.1.1.	Nachweis der EPC-Kultur durch Doppelfärbung.....	82
4.1.2.	Nachweis spezifischer EPC-Marker in der FACS-Analyse.....	84
4.1.3.	Expression von Notch und seines Liganden auf EPC.....	86
4.2.	Inhibition des Notch-Signalweges in EPCs <i>in vitro</i> .....	87
4.2.1.	Nachweis der Inhibition der Notch-Prozessierung in EPCs.....	87
4.2.2.	Reduktion der EPC-Zellzahl und Kolonien in der EPC-Kultur.....	88
	Analyse der Zellzahl in der EPC-Kultur nach Inkubation mit DAPT.....	88
	Analyse der Koloniezahl in der EPC-Kultur nach Inkubation mit DAPT.....	89
4.2.3.	Die Analyse vitaler Eigenschaften der EPCs nach DAPT-Inkubation zeigt keine signifikanten Veränderungen.....	90
	Analyse der Nekrose in der EPC-Kultur nach Inkubation mit DAPT.....	90
	Analyse der Apoptose in der EPC-Kultur nach DAPT-Behandlung.....	91
	Analyse der Proliferation in der EPC-Kultur nach Inkubation mit DAPT.....	94
4.2.4.	Die Analyse funktionaler Eigenschaften der EPCs nach DAPT-Behandlung zeigt deutliche Reduktion der Migration, Adhäsion und Tubusformation.....	98
	Analyse der Migration der EPCs nach Inkubation mit DAPT.....	98
	Analyse der Adhäsion der EPCs nach DAPT-Behandlung.....	99
	Analyse der Tubusformation in EPC-HUVEC-Kokultur nach DAPT-Inkubation.....	100
4.2.5.	Der $\gamma$ -Secretase-Inhibitor XX und das Jagged-IgG zeigen Reduktion der Zellzahl.....	102
	$\gamma$ -Secretase-Inhibitor XX (DBZ) zeigt eine ähnliche Dosis-Wirkungskurve wie DAPT.....	102
	Das den Notch-Rezeptor blockierende Immunglobulin Jagged-IgG reduziert die EPC- Zahl.....	103
4.2.6.	Transfektion der EPCs mit dominant negativen RBP-J-Adenovirus führt zur Reduktion der EPC-Zahl.....	104

Transfektion der EPCs mit Adenoviren resultierte in Reduktion der EPC-Zahl.....	104
<b>4.2.7.</b> FACS-Analyse nach Inhibition des Notch-Signalweges in EPCs.....	107
Veränderung der exprimierten Oberflächenrezeptoren auf EPCs nach Inkubation mit den $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT.....	107
<b>4.3.</b> Analyse der Inhibition des Notch-Signalweges in EPCs <i>in vivo</i> .....	109
<b>4.3.1.</b> DAPT behandelte EPCs führen zu deutlich reduzierter Reendothelialisierung im murinen Carotidenverletzungsmodell.....	109
<b>4.3.2.</b> DAPT behandelte EPCs homen nicht zur Verletzung <i>in vivo</i> im Carotis- Verletzungsmodell.....	110
<b>5. Diskussion</b> .....	113
<b>5.1.</b> Charakterisierung der EPC-Kultur.....	113
<b>5.2.</b> Notch1 und seine Liganden sind in myeloischen EPCs exprimiert.....	114
<b>5.3.</b> Der Phänotyp und die Funktionalität von EPCs wird durch den Notch-Signalweg reguliert.....	114
<b>5.4.</b> Endothelregeneration und –funktion nach Behandlung mit Notch-inhibierten EPCs vermindert.....	115
<b>5.5.</b> Das Fazit.....	116
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	117
<b>7. Anhang</b> .....	131
<b>Lebenslauf</b> .....	140
<b>Liste wissenschaftlicher Veröffentlichungen</b> .....	141
<b>Eidesstattliche Versicherung</b> .....	142

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1. Schema der Abstammung und Differenzierung von EPCs  
Abb. 1.2. Mechanismen des *Homings* und der Differenzierung von EPCs  
Abb. 1.3. Notch-Signalweg: Der Notch-Rezeptor und seine Prozessierung  
Abb. 1.4. Arten des Notch-Signalweges  
Abb. 3.1. Raster der Neubauer-Zählkammer  
Abb. 3.2. Produktion von rekombinanten Adenoviren unter Einsatz des *Adeasy XL Adenoviral Vector System*  
Abb. 3.3. Zellzyklus und DNA-Gehalt  
Abb. 3.4. Vereinfachtes Modell der Carotidenverletzung  
Abb. 3.5. Verlauf der Blutgefäße im Hals der Maus  
Abb. 3.6. Aufbau der modifizierten Boydenchamber  
Abb. 4.1. Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen vom 7 d der EPC-Kultur  
Abb. 4.2. EPC-Kolonie und EPC-Kultur am 7 d der Kultivierung  
Abb. 4.3. FACS-Analyse der Oberflächenrezeptoren auf EPCs  
Abb. 4.4. Expression von Notch1 und seines Liganden Deltalike1 auf EPCs mittels RT-PCR  
Abb. 4.5. Inhibition der Notch-Prozessierung in EPCs nach Inkubation mit dem GSI-Inhibitor DAPT  
Abb. 4.6. DAPT-Dosis-Wirkungskurve in EPCs  
Abb. 4.7. Reduktion der Koloniezahl in der EPC-Kultur nach Inkubation mit DAPT  
Abb. 4.8. Freisetzung von LDH nach Inkubation mit dem GSI-Inhibitor DAPT  
Abb. 4.9. TUNEL-Färbung apoptotischer Zellkerne nach DAPT-Behandlung  
Abb. 4.10. Annexin-V-PI-Färbung apoptotischer EPCs nach Inkubation mit DAPT  
Abb. 4.11. Zellproliferation der EPCs nach Inkubation mit dem GSI-Inhibitor DAPT  
Abb. 4.12. Zellzyklus-Analyse der EPCs nach DAPT-Behandlung  
Abb. 4.13. Migration der EPCs nach Behandlung mit DAPT signifikant reduziert  
Abb. 4.14. Adhäsion der EPCs nach DAPT-Behandlung vermindert  
Abb. 4.15. Tubusartige Formationen in EPC-HUVEC-Kokultur sind nach DAPT-Behandlung der EPCs vermindert  
Abb. 4.16. DBZ-Dosis-Wirkungskurve in EPC-Kultur  
Abb. 4.17. Reduzierte EPC-Zahl nach Notch-Inhibition durch Jagged-IgG  
Abb. 4.18. Die Transfektion mit einem dominant negativen, rekombinanten RBP-J-Adenovirus führt zur Reduktion der EPC-Zahl  
Abb. 4.19. FACS-Analyse der Oberflächenrezeptoren auf EPCs nach DAPT-Inkubation  
Abb. 4.20. DAPT behandelte EPCs führen zu reduzierter Reendothelialisierung im Vergleich zu DMSO behandelten EPCs  
Abb. 4.21. DAPT behandelte EPCs homen schlechter in das verletzte Gewebe der Carotiden  
Abb. 7.1. pCMX-N/RBP-J Plasmidkarte  
Abb. 7.2. pCMX-N/RBP-J (R218H) Plasmidkarte  
Abb. 7.3. cytoN1pcDNA3 Plasmidkarte  
Abb. 7.4. hN1pcDNA3 Plasmidkarte  
Abb. 7.5. pAdEasy-1 Plasmidkarte  
Abb. 7.6. pShuttle-IRES-hrGFP-1 Plasmidkarte
- Tab. 1.1. Markerprofile von humanen HSCs, myeloiden Zellen, EPCs und ECs  
Tab. 1.2. Komponenten des Notch-Signalweges  
Tab. 2.1. Verwendete Inhibitoren und ihre Wirkung

- Tab. 2.2. Verwendete Antikörper/Substrate und ihre Spezifität  
Tab. 2.3. Verwendete Bakterienstämme und ihr Genotyp  
Tab. 2.4. Verwendete Mausstämme mit Genotyp und Phänotyp  
Tab. 2.5. Verwendete Zelllinien  
Tab. 2.6. Verwendete Plasmide: Genotyp und Bezugsquelle  
Tab. 2.7. Verwendete Computerprogramme  
Tab. 2.8. Genbank-Accession-Nummern der untersuchten Gene  
Tab. 3.1. Konzentration der verwendeten Wachstumsfaktoren  
Tab. 3.2. Kits zur Isolierung abhängig von Größe, Menge und Quelle des Plasmids  
Tab. 3.3. Antibiotika zur selektiven Vermehrung von Plasmiden  
Tab. 3.4. Charakteristika der verwendeten Restriktionsenzyme  
Tab. 3.5. Restriktionsansatz mit *EcoR V* und *BamH I*  
Tab. 3.6. Auftrennung von Nukleinsäuren abhängig von der Agarose-Konzentration  
Tab. 3.7. Allgemeines PCR-Programm  
Tab. 3.8. Standard-PCR-Probenzusammensetzung  
Tab. 3.9. Durchführung der Reversen Transkription  
Tab. 3.10. RT-PCR-Programm  
Tab. 3.11. Herculase *enhanced DNA-Polymerase*-PCR-Ansatz  
Tab. 3.12. Herculase *enhanced DNA-Polymerase*-PCR-Programm  
Tab. 3.13. Auftrennungskapazität der Trenngele  
Tab. 3.14. Herstellung des SDS-PAGE-Trenngels (10 ml)  
Tab. 3.15. Herstellung des SDS-PAGE-Sammelgels (5 ml)  
Tab. 3.16. Anwendung der primären und sekundären Antikörper beim Immunoblot  
Tab. 3.17. Immunhisto- und immunocytochemische Fluoreszenzfarbstoffe: Anregungs- und Emissionswellenlänge  
Tab. 3.18. Verwendete direkt konjugierte Antikörper der FACS-Analyse  
Tab. 3.19. Anwendung primärer und sekundärer Antikörper bei der FACS-Analyse  
Tab. 3.20. Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose nach Annexin-V/PI-Färbung  
Tab. 3.21. FACS-Fluoreszenzfarbstoffe: Anregungs- und Emissionswellenlänge  
Tab. 3.22. Verwendete Inhibitoren und ihre Wirkung  
Tab. 4.1. Konzentration der Adenoviren zur Transfektion der EPCs  
Tab. 7.1. Rezeptoren und Oberflächenmarker  
Tab. 7.2. Primersequenzen zur Amplifikation von cDNA  
Tab. 7.3. Primersequenzen zur Sequenzierung der Plasmide  
Tab. 7.4. Primersequenzen zur Klonierung von AdRBP-J  
Tab. 7.5. Verwendung von NEB-Puffern bei Einsatz von zwei Restriktionsenzymen

## Abkürzungsverzeichnis

A	Purinbase Adenin
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Pyrimidinbase Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAD	Erkrankung der Koronararterien ( <i>coronary artery disease</i> ), auch CHD
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CHD	Koronare Herzkrankheit (KHK, <i>coronary heart disease</i> ), auch CAD
CMV	Cytomegalievirus
CVD	kardiovaskuläre Erkrankungen ( <i>cardiovascular diseases</i> )
d	Tag, Tage, Tagen
Da, kDa	Dalton, KiloDalton
DAPI	Diamidinophenylindoldihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d. h.	dass heißt
DIL	Diocadecyltetramethylindocarbocyaninperchlorat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA ( <i>double-stranded DNA</i> )
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E	Extinktion
EBM	Endotheliales Basalmedium ( <i>endothelial basal medium</i> )
EBM-2	Endotheliales Basalmedium-2 ( <i>endothelial basal medium-2</i> )
EC	Endothelzellen ( <i>endothelial cells</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EGM	Endotheliales Wachstumsmedium ( <i>endothelial growth medium</i> )
EGM-2	Endotheliales Wachstumsmedium-2 ( <i>endothelial growth medium-2</i> )
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
EPC	Endotheliale Progenitorzellen ( <i>endothelial progenitor cells</i> )
etc.	<i>et cetera</i> , und so weiter
µF	Mikrofarad, Einheit für die elektrische Kapazität
Fa.	Firma
FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Purinbase Guanin
GFP	grünes fluoreszierendes Protein ( <i>green fluorescent protein</i> )
GSI	Gamma-Secretase-Inhibitor IX, DAPT
GSI II	Gamma-Secretase-Inhibitor XX, DBZ
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HUVEC	humane umbilikale venöse Endothelzellen ( <i>human umbilical venous endothelial cells</i> )
i. d. R.	in der Regel
IPTG	Isopropyl-β-G-thiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	KiloDalton
KHK	Koronare Herzkrankheit ( <i>coronary heart disease</i> , CAD, auch CHD)
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	Luria Bertani
m	Milli-
M	Molar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule, Einheit für Druck
mAmp	Milli-Ampere
MG	Molekulargewicht
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
min	Minute, Minuten
mind.	mindestens
mM	Millimolar
MMLV-RTase	Reverse Transkriptase des Moloney-Maus-Leukämie-Virus

MNC	mononukleäre Zellen ( <i>mononuclear cells</i> )
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
μ	Mikro-
n	Nano-
NaCl	Natriumchlorid
Ω	Ohm, Einheit für den elektrischen Widerstand
<i>ori</i>	Replikationsstart ( <i>origin of replication</i> )
p	Pico-
PBS	Phosphat gepufferte Saline ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pH	negativ dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionenkonzentration
PS	Phosphatidylserine, Bestandteil der Plasmamembran
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease
rpm	Runden pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkription
RT-PCR	PCR nach reverser Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
sek	Sekunde
SMC	glatte Gefäßmuskelzellen ( <i>smooth muscle cells</i> )
ssDNA	einzelsträngige DNA ( <i>single-stranded DNA</i> )
T	Pyrimidinbase Thymin
Tab.	Tabelle
TACE	Tumor Nekrose Factor- $\alpha$ -konvertierendes Enzyme ( <i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math>-converting enzyme</i> )
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAMRA	5- und 6-Carboxytetramethyl-Rhodamin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TdT	Terminale Deoxynucleotidyltransferase
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxyethylamin
TUNEL	Methode zur Darstellung apoptotischer Zellkerne ( <i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i> )
U	Einheit mit der die Aktivität eines Enzymes ausgedrückt wird ( <i>unit</i> )
U	Pyrimidinbase Uracil

---

u. a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
UV-Licht	Ultraviolettes Licht (254nm-366nm)
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit ( <i>volume per volume</i> )
W	Watt
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit ( <i>weight per volume</i> )
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

# 1. Einleitung

## 1.1. Endotheliale Progenitorzellen

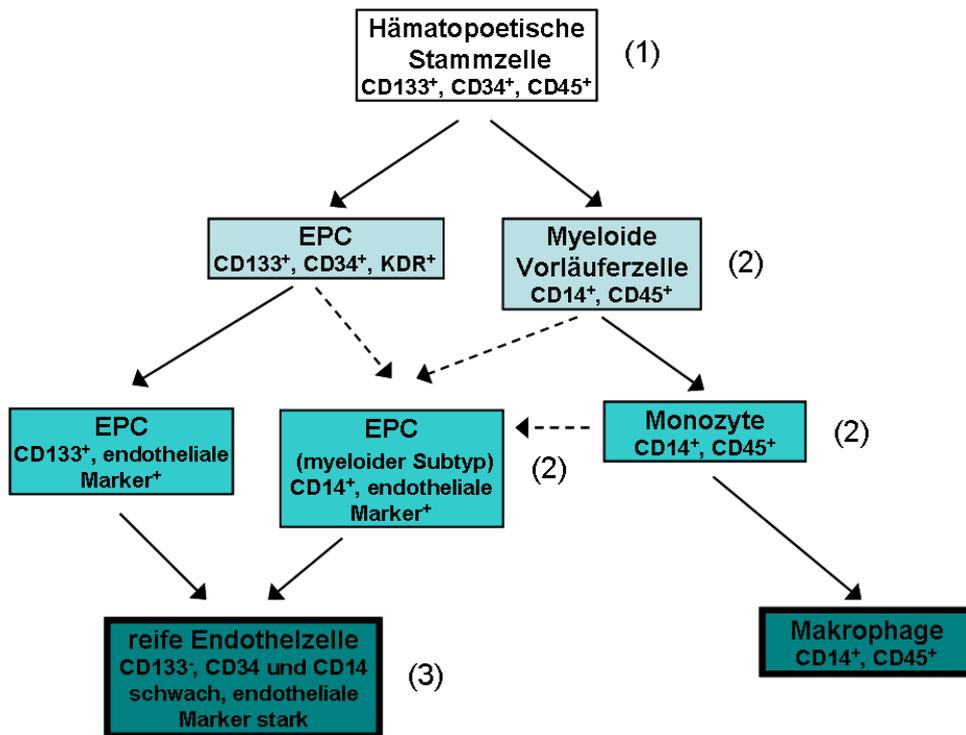
### 1.1.1. Endotheliale Progenitorzellen

Die meisten Zellen in adulten Organen sind ausdifferenziert und exprimieren eine Reihe von gewebespezifischen Genen, adaptiert an die physiologische Umgebung des Organs. Die undifferenzierten, ruhenden Stamm- und Progenitorzellen zirkulieren im Blutsystem oder sind im Gewebe lokalisiert. Stamm- und Progenitorzellen werden durch Cytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren aktiviert die physiologische und pathologische Geweberegeneration zu vermitteln (Asahara und Kawamoto, 2004). Die Zellen des Stammzellreservoirs ruhen und sind Cytokin-resistent, während Progenitorzellen sehr reaktiv gegenüber Cytokinen sind und eine hohe proliferative Aktivität haben (Stier, 2002).

Das postnatale Knochenmark ist ein ausgiebiges Reservoir für gewebespezifische Progenitorzellen. Unter diesen Zellen existiert die sehr seltene und einzigartige Population der endothelialen Progenitorzellen (EPCs). EPCs entwickeln sich aus den hämatopoetischen Stammzellen (HSCs), welche ein ähnliches Markerprofil wie EPCs haben (Iwami, 2004, vgl. Abb. 1.1.). EPCs können aus dem Knochenmark in den peripheren Blutkreislauf mobilisiert werden, in reife Endothelzellen (ECs) differenzieren und an neoangiogenetischen Prozessen mitwirken (Hristov, 2003). Bisher wurden für aus dem Knochenmark stammende Zellen die funktionelle Mitwirkung an der Neoangiogenese während der Wundheilung und Ischämie (Asahara, 1997, Asahara, 1999a, Iwaguro, 2002, Kalka, 2000, Takahashi, 1999), nach Herzinfarkt (Orlic, 2001a, Orlic, 2001b, Kocher, 2001, Schuster, 2004), bei Atherosklerose (Sata, 2002), retinaler Neovaskularisierung (Grant, 2002), Tumorwachstum (Asahara, 1999b, Reyes, 2002) und an der Reendothelialisierung von verletztem oder abgestorbenem arteriellen Endothel beschrieben (Shi, 1998, Peichev, 2000, Walter, 2002). Diese Zellen haben daher eine sehr große physiologische und pathologische Bedeutung, sie bieten Möglichkeiten zur Therapie von verschiedenen Erkrankungen.

Aus dem peripheren Blut und Knochenmark stammende mononukleäre Zellen (MNCs) können *in vitro* kultiviert, in einen EPC-ähnlichen Zelltyp differenziert und durch die Expression von Lektin und die Aufnahme von acetylierten LDL-Cholesterol charakterisiert werden (Asahara, 1997, Vasa, 2001). In der Literatur werden unterschiedliche Ursprünge für reife Endothelzellen, welche sich aus den mononukleären Zellen des peripheren Blutes entwickeln, beschrieben (Urbich, 2004, Rookmaaker, 2003): (1) sehr wenige hämatopoetische Stammzellen, (2) myeloide Zellen, welche durch den Selektionsdruck der Kultivierungsmethode zu ECs differenzieren oder transdifferenzieren (Schmeisser, 2000, Urbich, 2002, Zhao, 2003), und (3) zirkulierende reife ECs, welche sich von der Gefäßwand abgelöst haben und an Kulturgefäße adhären (Mutin, 1999, siehe auch Abb. 1.1.). Im Rahmen dieser Arbeit werden myeloische

EPCs analysiert, diese entwickeln sich aus den myeloiden Vorläuferzellen des Immunsystems und definieren sich über ihre funktionelle Wirkung in der Regeneration von Gefäßen.



**Abb. 1.1. Schema der Abstammung und Differenzierung von EPCs** (nach Urbich und Dimmeler, 2004) Die Grafik gibt ein vereinfachtes Schema einer hierarchischen Struktur zur Abstammung von EPCs und ihrer Differenzierung wieder. Die gestrichelten Pfeile weisen auf die unklaren Kenntnisse über den Ursprung einer Subpopulation der EPCs hin, die sich möglicherweise von myeloiden Vorläufern bzw. Monozyten ableitet und monozytäre Marker (wie CD14) exprimiert. Die Zahlen beziehen sich auf die Aufzählung im Text und deuten mögliche Quellen für EPCs bzw. reife ECs im peripheren Blut an.

Im Jahre 1997 wurden endotheliale Vorläuferzellen von Asahara *et al.* erstmals beschrieben. Die Isolierung der EPCs aus humanem peripheren Blut erfolgte durch die Separation von CD34<sup>+</sup>- oder Flk1<sup>+</sup>-Zellen. Diese Zellen differenzierten *in vitro* in ECs und im tierexperimentellen Modell der Ischämie inkorporierten sie in Stellen an denen aktive Angiogenese stattfand (Asahara, 1997). Bis zu diesem Zeitpunkt glaubte man, dass postnatale Angiogenese ausschließlich ein Prozess von Migration, Proliferation und *Remodeling* von ausdifferenzierten ECs war. Dieses Dogma wurde durch die Publikation von Asahara *et al.* widerlegt.

Die EPCs haben ein ähnliches Profil wie embryonale Angioblasten, welche als Reaktion auf angiogenetische Wachstumsfaktoren proliferieren, migrieren und *in situ* in reife ECs differenzieren können (Asahara und Kawamoto, 2004, Iwami, 2004). Die aktuellen Definitionen von EPCs sind divergent und verschiedene Zellpopulationen werden als EPCs bezeichnet (Urbich und Dimmeler, 2004, Werner, 2006). Als weit akzeptierter Konsens werden EPCs über die Expression der Rezeptoren CD34 und VEGFR2 (*vascular endothelial growth factor receptor-2*, auch KDR) definiert, unreife EPCs über die zusätzliche Expression von CD133 (Gill, 2001, Handgretinger R, Rafii, 2003). Viele Arbeitsgruppen zeigten, dass EPCs, welche

aus peripherem Blut und durch Kultivierung in spezifischem Endothelzellmedium isoliert wurden, eine Vielzahl weiterer Oberflächenmarker exprimieren, darunter auch monozytäre Marker, und verschiedene funktionale Aktivitäten aufweisen (Urbich, 2003, Rehman, 2003, Kalka, 2000, Gulati, 2003). Diese Heterogenität der EPCs reflektiert vermutlich ihre unterschiedlichen Entwicklungsstadien während der Reifung vom Knochenmark zur ausdifferenzierten vaskulären Gefäßwandzelle und deutet die verschiedenen Funktionalitäten während dieser Stadien an (Gulati, 2003, Werner, 2006). Die im Rahmen dieser Arbeit analysierten myeloischen EPCs, welche durch die von Asahara und Dimmeler etablierten Methoden isoliert wurden, zeichnen sich vor allen durch ihre funktionelle Wirkung in der strukturellen Verbesserung von Gefäßverletzungen und -erkrankungen aus.

### HSCs, myeloide Zellen, EPCs und ECs

Hämatopoetische Stammzellen (HSCs) sind im Knochenmark lokalisiert und werden über die Fähigkeiten der Selbsterneuerung durch Zellteilung und der Differenzierung in alle lymphohämatopoetischen Zelllinien charakterisiert (Weissman, 2000). Die Differenzierung der HSCs in gewebespezifische Vorläuferzellen findet kontinuierlich statt und basiert auf einer hierarchischen Struktur (vgl. Abb. 1.1.). Die EPCs entwickeln sich vermutlich aus HSCs und differenzieren an Orten der Neovaskularisierung und Reendothelialisierung in reife ECs. Die Entwicklung der EPCs aus HSCs könnte direkt über endotheliale Vorläuferzellen oder indirekt über myeloide Vorläuferzellen/Monozyten stattfinden (siehe Abb. 1.1., Urbich und Dimmeler, 2004). Die nachfolgende Tabelle versucht die derzeit beschriebenen Markerprofile von humanen HSCs, myeloiden Zellen, EPCs und ECs zusammenzufassen:

**Tab. 1.1. Markerprofile von humanen HSCs, myeloiden Zellen, EPCs und ECs**

Marker	HSCs	Myeloide Zellen	EPCs	ECs
CD133	+	-	+	-
CD34	+	-	+	+
c-Kit	+	-	+	-
VE-Cadherin	-	-	+	+
VEGFR1	+	+	+	+
VEGFR2	-	-	+	+
CD146	+	-	+	+
CXCR4	+	+	+	+
vWF	+	? (-)	+	+
CD31	+	+	+	+
DIL-Ac-LDL-Aufnahme	+	+	+	+
<i>Ulex europaeus</i> -Bindung	+	+	+	+

(nach Rafii, 2003)

Die in der Tab. 1.1. aufgelisteten Rezeptoren und Oberflächenmarker werden im Anhang 7.2. Rezeptoren und Oberflächenmarker kurz beschrieben.

### 1.1.2. EPCs in der Neovaskularisierung und Reendothelialisierung

#### **EPCs als mögliche Therapie zur verbesserten Neovaskularisierung und Reendothelialisierung**

In der vaskulären Biologie werden den EPCs zwei Hauptfunktionen zugeordnet, die Neovaskularisierung von ischämischem Gewebe und die Reendothelialisierung von verletztem Endothel (Urbich und Dimmeler, 2004). Die Verbesserung der Neovaskularisierung ist eine Therapiemöglichkeit zur Erhaltung von Gewebe bei einer kritischen Ischämie (Isner und Asahara, 1999). Die Erkenntnis, dass aus dem Knochenmark stammende Zellen in ischämische Regionen *homen* und endotheliale Marker exprimieren, hat die Nutzung von isolierten hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSCs) und EPCs für die therapeutische Vaskulogenese angeregt (Urbich und Dimmeler, 2004).

Einige tierexperimentelle und klinische Studien zeigten, dass die Infusion von vielen verschiedenen Zelltypen, entweder aus dem Knochenmark isoliert oder aus der *ex vivo* Kultivierung, zur Erhöhung der Kapillardichte und einer verbesserten Neovaskulogenese führen (Asahara, 1997, Kocher, 2001, Kalka, 2000, Kawamoto, 2001, Yamaguchi, 2003, Murohara, 2000, Urbich, 2003, Tateishi-Yuyama, 2002, Assmus, 2002). Im tierexperimentellen Modell des Myokardinfarkts führte die Injektion von *ex vivo* expandierten EPCs oder Stamm- und Progenitorzellen zur einer signifikanten Verbesserung des Blutflusses, der Herzfunktion und einer reduzierten Narbenbildung des linken Ventrikels (Kawamoto, 2001, Kocher, 2001). Die Infusion von aus dem peripheren Blut isolierten, *ex vivo* expandierten EPCs in athymische Nacktmäuse oder -ratten verbesserte nach Hinterlaufischämie die Neovaskularisierung (Urbich, 2003, Kalka, 2000, Kawamoto, 2001, Murohara, 2000). Walter *et al.* konnten zeigen, dass zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen zu Arterien mit verletzten und abgestorbenen Endothel *homen* und zu einer verbesserten Reendothelialisierung führen können (Walter, 2002). Initiale klinische Pilotstudien deuten an, dass aus dem Knochenmark stammende oder zirkulierende, aus dem Blut stammende Progenitorzellen für die therapeutische Verbesserung des Blutflusses von Nutzen sind (Tateishi-Yuyama, 2002, Assmus, 2002).

Die funktionelle Verbesserung scheint bei Verwendung von verschiedenen Zelltypen wie isolierten humanen CD34<sup>+</sup>-, CD133<sup>+</sup>-, EPCs oder murinen Sca-1<sup>+</sup>-Zellen vergleichbar zu sein (Urbich, 2003, Kalka, 2000, Reyes, 2002, Kawamoto, 2001, Murohara, 2000, Takahashi, 1999, Yamaguchi, 2003, Grant, 2002). Die Fähigkeit der Zellen die Neovaskularisierung zu verbessern, scheint unabhängig vom Typ der verwendeten (endothelialen) Progenitorzellen zu sein (Urbich und Dimmeler, 2004). Interessanterweise verbessern ausdifferenzierte reife ECs (z. B. HMVECs, humane mikrovaskuläre ECs) die Neovaskularisierung nicht (Kalka, 2000). Diese

Beobachtung deutet auf eine bisher nicht definierte Funktion der EPCs hin, wie z. B. die Sezernierung von Chemokinen oder das durch den Integrinrezeptor vermittelte *Homing*. Diese Vorgänge könnten für die EPC-induzierte Verbesserung des Blutflusses nach Ischämie essentiell sein (siehe Abb. 1.2., Urbich und Dimmeler, 2004).

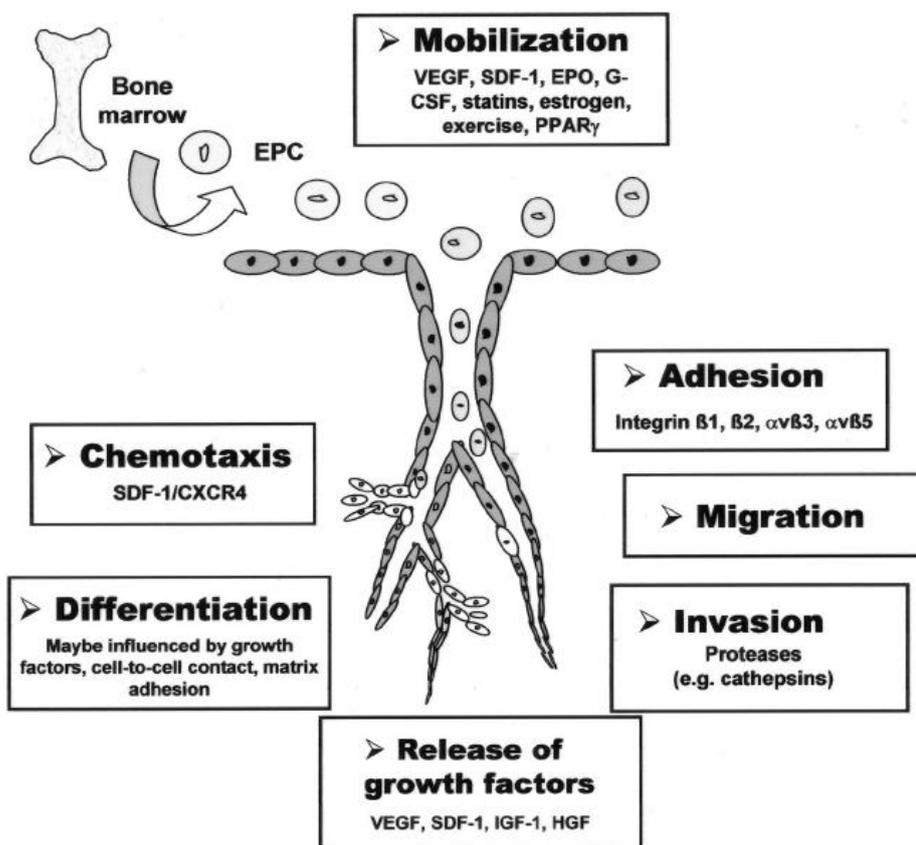
EPCs funktionieren vermutlich ähnlich wie Monozyten bzw. Makrophagen und verbessern die Arteriogenese über die Bereitstellung von Cytokinen und Wachstumsfaktoren (Urbich und Dimmeler, 2004). So verbesserten *ex vivo* kultivierte EPCs aus den Zellfraktionen der CD14<sup>+</sup>- oder CD14<sup>-</sup>-MNCs die Neovaskularisierung etwa im gleichen Ausmaß, während dieselbe Anzahl frisch isolierter MNCs keine Verbesserung zur Folge hatte (Urbich, 2003). Die Sezernierung von Wachstumsfaktoren könnte die Angiogenese, also die Proliferation, Migration und das Überleben von reifen ECs, stimulieren (Folkman, 1995). Die Fähigkeit der EPCs den Blutfluss zu verbessern, ist nicht ausschließlich auf den monozytären Phänotyp zurückzuführen. So scheinen die positiven Effekte der EPCs nicht allein über die Sekretion von Cytokinen und Wachstumsfaktoren erklärbar zu sein, da in Experimenten mit vermehrter Inkorporation der EPCs die Regeneration und Neovaskularisierung des Gewebes signifikant verbessert ist (Urbich, 2003).

### **Mechanismen der Funktionalität von EPCs**

Die Expansion und Migration der Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark wird durch die komplexe Interaktion von Cytokinen/Chemokinen, starken Proteasen und Adhäsionsmolekülen vermittelt und reguliert (Papayannopoulou, 2004). Als stärkstes physiologisches Signal zur Mobilisierung der EPCs aus dem Knochenmark wird die Ischämie vermutet, welche möglicherweise den angiogenetischen Wachstumsfaktor VEGF und das Chemokin SDF-1 hochreguliert (Lee, 2000, Pillarisetti, 2001). Die Sezernierung der angiogenetischen Faktoren in den Kreislauf kann die schnelle Expansion und Migration von Progenitorzellen induzieren (Takahashi, 1999, Gill, 2001). Die Mobilisierung von EPCs könnte eine wirksame Therapie zur Verbesserung der Reendothelialisierung und Neovaskularisierung sein, dies erfordert eine genaue Erforschung der Mechanismen und Moleküle der EPC-Mobilisierung (Urbich und Dimmeler, 2004). Klinische Studien unter der Verwendung der Gentherapie, bei der Plasmide zur Expression von VEGF verwendet wurden, zeigten eine Erhöhung der EPC-Zahl im Menschen (Kalka, 2000b). Die hier aufgeführten und weitere Substanzen, welche die Mobilisierung von EPCs aus dem Knochenmark vermitteln, sind in Abb. 1.2. unter *Mobilization* (dt.: Mobilisierung) aufgelistet.

Die Rekrutierung zu und Inkorporation in Gewebe von EPCs wird durch eine Abfolge von Signalen und Bindungsereignissen koordiniert und beinhaltet die Chemoattraktion, Adhäsion, Transmigration und Differenzierung in ECs (Urbich und Dimmeler, 2004). Die einzelnen Ereignisse dieses Prozesses sind in Abb. 1.2. aufgeführt, nach der Mobilisierung durch Cytokine aus dem Knochenmark, *homen* die Progenitorzellen in ischämische Gewebe (Vajkoczy, 2003).

Die Adhäsion findet vermutlich u.a. durch Integrine statt, diese sind bekannt die Bindung von HSCs und Leukozyten an extrazelluläre Matrixproteine und ECs zu vermitteln (Springer, 1994, Carlos und Harlan, 1994, Muller, 2002). Diese Rezeptoren lassen sich in verschiedene Gruppen unterteilen, die  $\beta_1$ -Integrine werden auf verschiedenen Zelltypen wie ECs und hämatopoetischen Zellen gefunden, und die  $\beta_2$ -Integrine vorwiegend auf hämatopoetischen Zellen exprimiert (Soligo, 1990). Übereinstimmend mit der Beobachtung, dass  $\beta_2$ -Integrine auf HSCs/HPCs stark exprimiert werden und ihre Adhäsion und Migration durch diese Rezeptoren vermittelt wird (Kollet, 2001, Peled, 1999), werden auf EPCs des peripheren Blutes  $\beta_2$ -Integrine (CD18/CD11) exprimiert und für die Adhäsion der EPCs an ECs und deren transendotheliale Migration *in vitro* benötigt (Chavakis, 2005). Die Reendothelialisierung wird vermutlich weniger über Zell-Zellkontakte und Transmigration vermittelt, sondern vermehrt durch die Adhäsion der EPCs an die extrazelluläre Matrix über Vitronectinrezeptoren ( $\alpha_v\beta_3$ - und  $\alpha_v\beta_5$ -Integrine) und  $\beta_1$ -Integrine (Walter, 2002, Fujiyama, 2003).



**Abb. 1.2. Mechanismen des Homings und der Differenzierung von EPCs** (aus Urbich und Dimmeler, 2004) Die Mobilisierung (engl.: *Mobilization*) von EPCs aus dem Knochenmark wird durch die Chemoattraktion vermittelt, dabei werden Chemokine von den Zellen am Ort der Neovaskularisierung sezerniert und ermöglichen das *Homing* der EPCs über chemotaktische Moleküle (z.B. SDF-1). Die EPCs *homen* vermutlich über die Vorgänge der Adhäsion (engl.: *Adhesion*), Migration und Invasion an den Ort der Neovaskularisierung. Dort findet wahrscheinlich die Differenzierung (engl.: *Differentiation*) der EPCs in ECs statt, welche durch Wachstumsfaktoren, Zell-Zellkontakte und Adhäsion an die extrazelluläre Matrix geleitet werden kann. EPCs und ECs können über die Sezernierung von Wachstumsfaktoren (engl.: *Release of growth factors*) eine Verbesserung der Neovaskularisierung bewirken.

Die Chemotaxis (d.h. die Lenkung von Zellen an einen bestimmten Ort) der EPCs in ischämische Regionen, wird u.a. durch SDF-1 vermittelt (Lapidot, 2001, Wright, 2002). Progenitorzellen werden durch SDF-1 in ischämische Gewebe rekrutiert und die experimentelle Überexpression von SDF-1 verbesserte das *Homing* der Stammzellen und ihre Inkorporation in ischämische Gewebe (Yamaguchi, 2003). Eine weitere chemoattraktive Substanz zur Anlockung von EPCs ist VEGF, es konnte gezeigt werden, dass VEGF in Tiermodellen und im Menschen die postnatale Neovaskularisierung über die Mobilisierung von EPCs verbessern kann (Asahara, 1999). Auch sind während einer Ischämie die VEGF-Werte erhöht (Lee, 2000, Kalka, 2000b). VEGF und seine Rezeptoren spielen eine essentielle Rolle in der endothelialen Differenzierung während der Embryogenese (Ferrara, 1996, Shalaby, 1995) und *in vitro* konnte VEGF die Differenzierung von verschiedenen adulten Progenitorzellen (z.B. EPCs) in ECs induzieren (Asahara, 1997, Kalka, 2000a, Dimmeler, 2001). Nach *in vivo* Gabe von VEGF konnte eine Erhöhung der zirkulierenden EPCs im Mausmodell beobachtet werden und die VEGF-induzierte Mobilisierung der aus dem Knochenmark stammenden EPCs verbesserte die Neovaskularisierung der Kornea (Hornhaut) *in vivo* (Asahara, 1999a).

### **CXCR4 und SDF-1 in der Vaskulogenese**

Das CXC-Chemokin SDF-1 (*stromal derived factor 1* oder CXCL12) und sein Rezeptor CXCR4 (auch als CD184 bekannt) sind essentiell für eine normale kardiovaskuläre Entwicklung und spielen eine kritische Rolle in der postnatalen Vaskulogenese (Nagasawa, 2001). Der CXCR4-Rezeptor ist stark auf endothelialen und hämatopoetischen Progenitorzellen exprimiert und ist essentiell für deren Mobilisierung und *Homing* (Wright, 2002, Lapidot, 2002). CXCR4 vermittelt die Migration von ruhenden Leukozyten und hämatopoetischen Progenitorzellen als Reaktion auf seinen Liganden SDF-1 (Zou, 1998). Die lokale Applikation von SDF-1 verbessert die Vaskulogenese und trägt zur ischämischen Neovaskularisierung *in vivo* durch eine verbesserte EPC-Rekrutierung bei (Yamaguchi, 2003). Der CXCR4-Rezeptor moduliert die angiogenetische Aktivität und die *Homing*-Fähigkeit von kultivierten humanen EPCs im beachtlichen Ausmaß, so zeigten Walter *et al.*, dass ein eingeschränktes CXCR4-*Signaling* eine verminderte Fähigkeit der EPCs zur Neovaskularisierung in CAD (*coronary artery disease*)-Patienten zur Folge hat (Walter, 2005). Eine Mobilisierung von hämatopoetischen Progenitorzellen konnte durch Applikation von AMD3100, einem Antagonisten von CXCR4, in gesunden Probanden erreicht werden (Liles, 2003).

### **1.1.3. Risikofaktoren, vaskuläre Erkrankungen und EPCs**

#### **Kardiovaskuläre Erkrankungen und EPCs als Therapiemöglichkeit**

Die kardiovaskulären Erkrankungen (*cardiovascular diseases*, CVDs oder CADs) sind die häufigste Todesursache in der westlichen Welt (Europa, USA, Japan). Im Jahr 2005 verstarben

weltweit ungefähr 17,5 Millionen Menschen an CVDs, das entspricht 30% aller globalen Todesfälle (WHO, 2006).

Therapiestrategien für kardiovaskuläre Erkrankungen basieren auf einer frühen Vermeidung des endothelialen Zelltodes und der endothelialen Dysfunktion, der Verhinderung der Entwicklung von atherosklerotischen Plaques und der effektiven Therapie von Myokardinfarkt und Herzdekompensation. Viele Therapieansätze basieren auf pharmakologischen Wirkstoffen, welche die vaskuläre Funktion positiv beeinflussen, modulieren und ECs regenerieren (Werner, 2006). Im Tierversuch wurden EPC-Infusionen zur Verbesserung der Neovaskularisierung, zur Regeneration der Endothelfunktion und zur Verbesserung der Angiogenese nach Gewebeischämie erfolgreich eingesetzt (Asahara, 1997, Roberts, 2005, Rumpold, 2004). Weiterhin ist eine genetische Veränderung der EPCs vor der Infusion durch Transfektion möglich, welche zu einer vermehrten Sekretion von regenerationsfördernden Cytokinen und/oder Wachstumsfaktoren führen würde. So konnte eine Studie EPCs erfolgreich mit einem Adenovirus transduzieren, der zur Expression des Wachstumsfaktors VEGF führte, und nach Injektion im Tiermodell der Hinterlaufischämie eine um 63,7% reduzierte Nekrose/Autoamputation und eine verbesserte Neovaskularisierung zur Folge hatte (Iwaguro, 2001).

### **EPCs und Risikofaktoren**

Die Anzahl der zirkulierenden EPCs korreliert invers mit den Risikofaktoren für Atherosklerose (Vasa, 2001, Hill 2003). Aus dem peripheren Blut von Patienten mit atherosklerotischer Erkrankung isolierte EPCs zeigten funktionale Defekte bei der Migration (Vasa, 2001). Experimentelle und klinische Studien konnten die negative Wirkung von Diabetes auf die EPC-Zahl und Funktion zeigen (Loomans, 2004, Tepper, 2002). Hypercholesterinämie ist assoziiert mit reduzierter EPC-Zahl, verringerter Teilungsaktivität, Migrationsfähigkeit und *in vitro* Vaskulogenese (Chen, 2004). Rauchen ist ein wichtiger Risikofaktor der Atherosklerose und ist assoziiert mit einer reduzierten EPC-Zahl (Vasa, 2001). Das C-reaktive Protein (CRP) ist ein wichtiger Marker der Entzündungsreaktion und assoziiert mit der endothelialen Dysfunktion und Atherosklerose (Verma, 2004). CRP ist ein guter prognostischer Marker für CVDs und korreliert mit reduzierter EPC-Zahl und -Funktion (Ridker, 2001, Verma, 2004). Östrogendefizienz nach Ovariectomie ist assoziiert mit reduzierter EPC-Zahl und verminderter EC-Erneuerung (Strehlow, 2003). Die starken Korrelationen von EPCs und Risikofaktoren deuten auf die wichtige Rolle der EPCs in CVDs hin, so sind EPCs als Prädiktor für CVDs beschrieben worden (Hill, 2003). In Patienten mit diagnostizierter Atherosklerose ist die Anzahl zirkulierender EPCs signifikant reduziert (Asahara, 1997, Vasa, 2001). Möglicherweise wird die Atherosklerose signifikant durch die Anzahl und die Aktivität von zirkulierenden EPCs beeinflusst.

## 1.2. Notch-Signaltransduktion

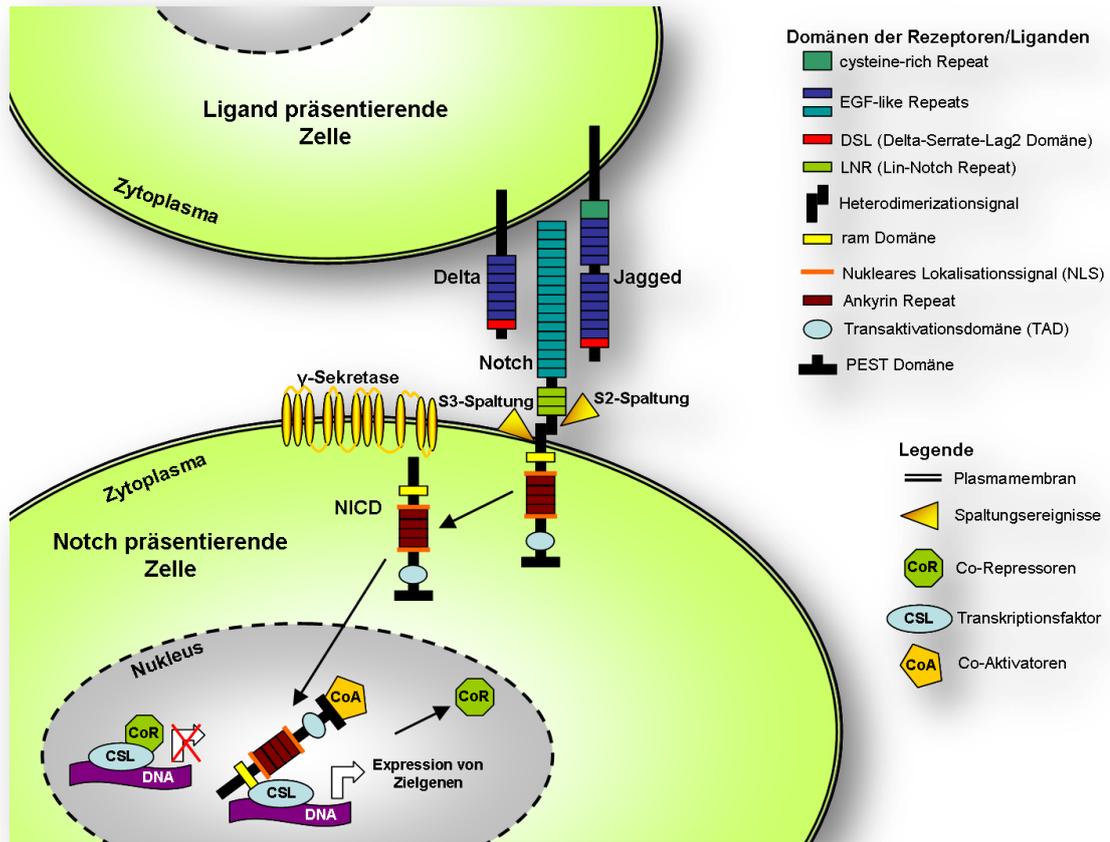
### 1.2.1. Notch – Eine kurze Einführung

Die Notch-Signaltransduktion ist einer der am weitesten verbreiteten Signalwege der tierischen Zell-Zellkommunikation und spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Differenzierung von vielen verschiedenen Zelltypen (Chiba, 2006). Bei Säugetieren reguliert der Notch-Signalweg Entscheidungen in der Zelldestination bei Zelldifferenzierung, Zellüberleben, Apoptose und Zellzyklus in physiologischen und pathologischen Prozessen, insbesondere bei der Differenzierung von Stammzellen. So reguliert Notch z.B. die embryonale Segmentierung und binäre Zelldestinationsentscheidungen, und spielt eine kritische Rolle in der Embryogenese und vaskulären Entwicklung bei Säugetieren (Artavanis-Tsakonas, 1999). Notch ist ein einzigartiger Rezeptor in der Signaltransduktion, da er erst als Rezeptor an der Zelloberfläche und dann als direkter Regulator der Gentranskription im Nukleus fungiert (Artavanis-Tsakonas, 1995)

Notch codiert für ein transmembranes Protein, welches die Membran einmal durchläuft, und als Rezeptor mit Liganden benachbarter Zellen reagiert (Wharton, 1985, Fehon, 1990, vgl. Abb. 1.3.). Das Gen Notch wurde zuerst bei *Drosophila*-Mutanten beschrieben, deren Flügel Einkerbungen (engl.: *notch*) hatten (Mohr, 1919). Um 1930 wurde erstmals vermutet, dass Notch für Entscheidungen der Zelldestination (*cell fate*) während der *Drosophila*-Embryogenese verantwortlich ist. Experimente mit homozygoten Mutationen des Notch-Gens führten in *Drosophila* zur exzessiven Differenzierung in neuronales Gewebe (Poulson, 1940). In den 1980ern konnte gezeigt werden, dass die Notch-Ligand-Rezeptorbindung ein Signal auslöst, welches die Destination der Signal-empfangenen Zelle durch Inhibition der neuronalen Differenzierung zur nicht-neuronalen Zelle umlenkt (Sternberg, 1988). Dieser Prozess wird als laterale Inhibition bezeichnet und ist essentiell für die embryonale Entwicklung (Greenwald, 1992, Artavanis-Tsakonas, 1995). Die Notch-Gene sind, vom Nematoden bis zum Menschen, sehr stark konserviert (s. Tab. 1.2.). Zuerst wurde der Notch-Signalweg in niederen Tieren wie *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* beschrieben, später bei *Xenopus* und im Menschen (Coffman, 1990, Ellisen, 1991). Notch wurde beim Menschen auf dem Chromosom 9 an der Translokation t(7;9)(q34;q34) in einer Subpopulation von akuten T-lymphoblastischen Leukämien entdeckt und darauf folgend TAN-1 genannt (*translocation-associated Notch homolog 1*, Ellisen, 1991). TAN-1 wird im Allgemeinen als Notch1 bezeichnet.

### 1.2.2. Der Notch-Rezeptor und die Delta-Liganden

In Säugetieren wurden vier Notch-Rezeptoren (Notch1-Notch4) und fünf strukturell ähnliche Liganden (Delta-like1 bzw. Delta1, Delta-like3, Delta-like4, Jagged1, Jagged2) beschrieben. Sowohl die Notch-Rezeptoren als auch ihre Liganden sind transmembrane Proteine, welche die Membran durchlaufen (s. Abb. 1.3.).



**Abb. 1.3. Notch-Signalweg: Der Notch-Rezeptor und seine Prozessierung** Die Bindung von Notch an seinen Liganden (Delta oder Jagged) führt zur sukzessiven Spaltung des Notch-Rezeptors durch verschiedene Proteasen (TACE,  $\gamma$ -Sekretase) und schließlich zur Abspaltung der intrazellulären Domäne von Notch (NICD, *Notch intracellular domain*). NICD translokalisiert in den Nucleus und verdrängt dort Co-Repressoren vom Transkriptionsfaktor CSL bzw. RBP-J (CBF1, *Suppressor of hairless*, *Lag-1*). Durch die Bindung weiterer Co-Aktivatoren wird die Expression von Zielgenen induziert (z.B. HES, *Hairy/Enhancer of split*).

Der Notch-Rezeptor wird intramolekular als Vorläuferprotein gespalten (S1-Spaltung) und bildet ein Heterodimer mit einer extrazellulären und einer transmembranen Untereinheit (s. Abb. 1.3., Blaumueller, 1997, Logeat, 1998, Brou, 2000, Fortini, 2002). Unter physiologischen Bedingungen binden die Notch-Rezeptoren ihre Liganden, welche von benachbarten Zellen exprimiert werden. Diese Bindung löst die Spaltung der extrazellulären Einheit aus (S2-Spaltung durch die Protease TACE, s. Abb. 1.3.), wodurch die nächste Spaltung in der transmembranen Domäne ermöglicht wird (S3-Spaltung, s. Abb. 1.3., Brou, 2000, Schroeter, 1998, Das, 2004). Die S3-Spaltung durch die  $\gamma$ -Sekretase, einem Komplex von mehreren Proteinen (Presenillin, Nicastrin, APH-1, PEN-2), führt zur Freisetzung der intrazellulären Domäne von Notch (NICD, *Notch intracellular domain*), die in den Nucleus transloziert (Okochi, 2002). Dort verdrängt NICD Co-Repressoren vom Transkriptionsrepressor CSL (CBF1, *Suppressor of Hairless*, *Lag-1*, auch RBP-J genannt, *Recombining binding protein-J*) und bindet mit der Ram-Domäne an CSL, dieser Komplex agiert daraufhin als

Transkriptionsfaktor (Lai, 2002). Durch die Bindung weiterer Co-Aktivatoren, wie MAML1, wird die Expression der Zielgene induziert (Wu, 2000, Kitagawa, 2001). Die bekanntesten Zielgene des Notch-Signalweges sind die HES(*Hairy/Enhancer of split*)-Genfamilie und die homologe Hey/HERP(*Hes-related repressor protein*)-Genfamilie (Kageyama, 2005, Iso, 2002, Iso, 2003b), dabei handelt es sich um bHLH(*basic Helix-Loop-Helix*)-Transkriptionsfaktoren. Die HES-Gene bewirken eine negative Regulation der Transkription von Genen, u.a. von der *Achaete Scute*-Genfamilie, welche die neuronale Differenzierung vermittelt (Oellers, 1994, Ishibashi, 2004).

In Tabelle 1.2. sind die Funktionen der Komponenten des Notch-Signalweges und die verschiedenen Bezeichnungen in unterschiedlichen Organismen zusammengefasst.

**Tab. 1.2. Komponenten des Notch-Signalweges** (nach Milner und Bigas, 1999)

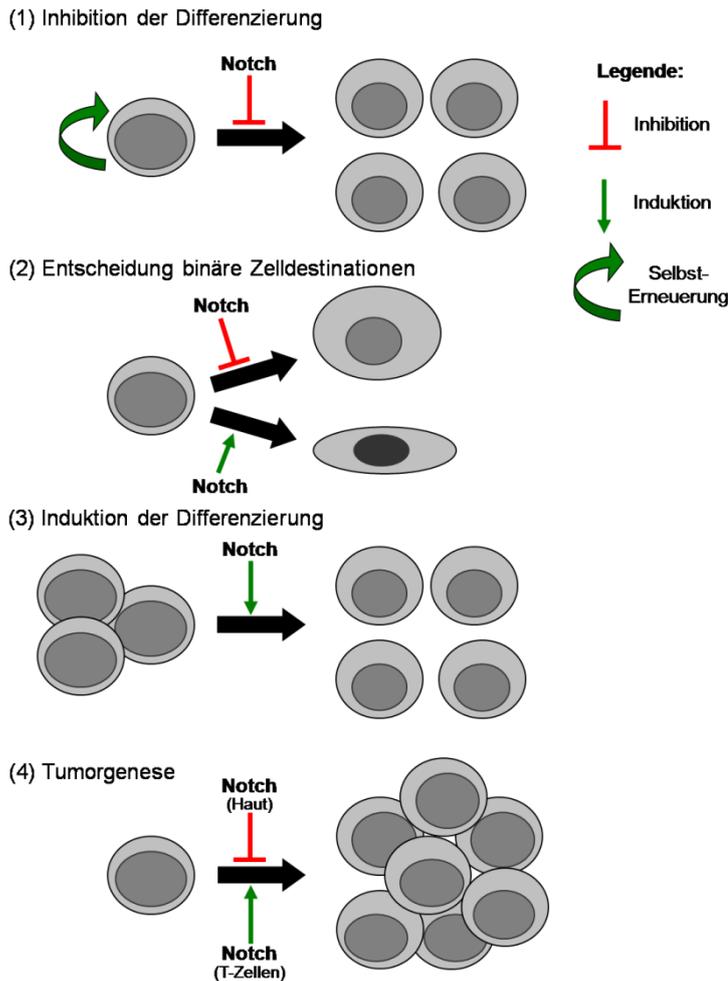
	<b>Säugetiere</b>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<b>Notch Rezeptoren</b>	Notch1 Notch2 Notch3 Notch4	Notch	Lin-12 Glp-1
<b>Liganden</b>	Delta-1 Delta-like 1 (Dll1) Delta-like 3 (Dll3) Delta-like 4 (Dll4) Jagged1 (Serrate1) Jagged2 (Serrate2)	Delta  Serrate	Lag-2 Apx-1
<b>Intrazelluläre Effektoren</b>	CBF-1/RBP-Jk Deltex NFκB	<i>Supressor of Hairless</i> [Su(H)] Deltex	Lag-1
<b>Co-Aktivatoren</b>	MAML1	Mastermind	
<b>Zielgene</b>	HES ( <i>Hairy/Enhancer of split</i> ) bHLH ( <i>basic Helix-Loop-Helix</i> ) TLE Sonic hedgehog (Shh)	Enhancer of split [E(spl)], bHLH Groucho	
<b>Prozessierende Moleküle</b>	Kuzbanian	Kuzbanian	SUP-17
<b>Modifizierende Moleküle</b>	Lunatic Fringe Maniac Fringe Radical Fringe Numb Numb-like Dishevelled 1, 2, 3	Fringe  Numb  Dishevelled	

### 1.2.3. Der Notch-Signalweg in der embryonalen und der vaskulären Entwicklung

#### Der Notch-Signalweg und seine Wirkmechanismen

Der Notch-Signalweg kann auf verschiedene Arten in Abhängigkeit vom zellulären Kontext und dem Aktivitätszustand der Zellen deren Entwicklung beeinflussen, (1) durch die Inhibition der Differenzierung, (2) durch binäre Zeldestinationsentscheidungen, (3) durch die Induktion der

Differenzierung oder (4) in der Tumorgenese (s. Abb. 1.4., Artavanis-Tsakonas, 1999, Wilson und Radtke, 2006).



**Abb. 1.4. Arten des Notch-Signalweges** (nach Wilson und Radtke, 2006) Der Notch-Signalweg kann auf verschiedene Arten die Entwicklung der Zellen in der Selbsterneuerung von Organen und der Tumorgenese regulieren, (1) durch Inhibition der Differenzierung, (2) durch binäre Zelldestinationsentscheidungen, (3) durch die Induktion der Differenzierung und (4) in der Tumorgenese.

Die Inhibition der Differenzierung wurde für Notch bei Stammzellen z.B. im Darm und im Pankreas beschrieben, dabei verhinderte das Notch-Signaling die Differenzierung von Vorläuferzellen und induzierte deren Selbsterneuerung (Fre, 2005, Murtaugh, 2003). Die Inhibition der Differenzierung durch das Notch-Signaling konnte auch in neuronalen und hämatopoetischen Stammzellen gezeigt werden (Shen, 2004, Varnum-Finney, 2000). Die Regulation von binären Zelldestinationsentscheidungen, also der Entscheidung, ob sich eine (Vorläufer-)Zelle in Zelltyp A oder B entwickelt, wurde für Notch im lymphatischen System gezeigt, dort reguliert das Notch-Signaling die Entwicklung von bipotenten Vorläuferzellen in T-Zellen zu Lasten von B-Zellen (Radtke, 2004). Die Induktion der Differenzierung durch den Notch-Signalweg wurde in der Haut bei der terminalen Differenzierung von Vorläuferzellen (Keratinocyten) und während der Thymocyten-Entwicklung von Pro-T-Zellen in Pre-T-Zellen beobachtet (Lowell, 2000, Rangarajan, 2001, Maillard, 2005, Hoflinger, 2004).

Notch kann in der Tumorgenese sowohl als Onkogen als auch als Tumorsuppressor agieren, so führt die Überexpression von Notch in hämatopoetischen Knochenmarkzellen und T-Vorläuferzellen zu T-Zell-Leukämien (Ellisen, 1991, Pear, 1996). In der Haut agiert Notch als Tumorsuppressor, denn der Verlust des Notch-Signalweges führt im Mausmodell zur Entwicklung von Basalzellkarzinomen (Lefort, 2004, Nicolas, 2003)

### **Der Notch-Signalweg in der Embryogenese**

Durch die Einführung von Mutationen in jedes der vier Notch-Gene (Notch1-Notch4) und der vier Gene der Liganden (Delta-like1, Delta-like4, Jagged1, Jagged2) in Mäusen, konnte die Rolle der Notch-Signaltransduktion in der Embryogenese analysiert werden. Die homozygote Zerstörung des Notch1- oder Notch2-Gens führt zum Absterben der Embryonen am E11 (*embryonic day* 11, Swiatek, 1994, Conlon, 1995, Hamada, 1999). Notch3- oder Notch4-Null-Mäuse überleben ohne phänotypische Abnormalitäten (Krebs, 2000, Krebs, 2003), dennoch spielen Notch3 und Notch4 eine Rolle in der vaskulären embryonalen Entwicklung (Krebs, 2000, Domenga, 2004). Die homozygote Inaktivierung von Delta-like1, Delta-like4 oder Jagged1 hat embryonale Letalität (E9.5-E12.5) zur Folge (Hrabe de Angelis, 1997, Duarte, 2004, Gale, 2004, Xue, 1999), während Jagged2-Null-Mäuse perinatal versterben (Jiang, 1998). Diese Beobachtungen zeigen, dass die meisten Gene des Notch-Signalweges eine nicht-redundante Rolle in der Mausembryogenese haben, da in den Null-Mäusen eine abnormale Bildung der Blutgefäße, eine erhöhte Zellapoptose, eine exzessive neuronale Differenzierung beobachtet werden konnte.

### **Der Notch-Signalweg in der Vaskulogenese, Angiogenese und Hämatopoese**

Als Vaskulogenese bezeichnet man die Neubildung von Blutgefäßen durch endotheliale Vorläufer. Angiogenese ist die Sprossung von Gefäßen und Vernetzung von Gefäßsystemen, und die nachfolgende Stabilisierung durch Anlagerung von muralen Zellen, d. h. von Perizyten und glatten Gefäßmuskelzellen (Carmeliet, 2003). Die Hämatopoese beschreibt die Bildung von Blutzellen, dabei durchlaufen hämatopoetische Stammzellen und Progenitorzellen sequenzielle Zelldestinationsentscheidungen und Reifungsprozesse, und produzieren so alle Zelllinien des Blutes (Milner und Bigas, 1999). Die Mitglieder der Notch-Genfamilie spielen eine essentielle Rolle in der Entscheidung von Zelldestinationen und der Erhaltung von Progenitor- und Stammzellen (Artavanis-Tsakonas, 1995).

In genetisch veränderten Mäusen mit unterbrochenem Notch-Signalweg wurden verschiedene Abnormalitäten in der Bildung von Blutgefäßen beobachtet: bei der Proliferation und Migration von ECs, der Differenzierung von glatten Gefäßmuskelzellen, dem vaskulären *Remodeling* und der Entscheidung über die arteriell-venöse Identität. Diese Studien wiesen eine Beteiligung der Rezeptoren Notch1, Notch3 und Notch4 und seiner Liganden Delta-like4 und Jagged1 in der Blutgefäßbildung nach (Krebs, 2000, Domenga, 2004, Duarte, 2004, Gale, 2004, Krebs, 2004,

Xue, 1999, Iso, 2003a, You, 2005). So zeigten Krebs *et al.* z.B., dass das Notch-Signal essentiell für die vaskuläre Morphogenese in Mäusen ist, da Notch1- und Notch1/Notch4-defiziente Mäuse schwere Defekte im angiogenetischen, vaskulären *Remodeling* haben (Krebs, 2000). Durch eine Endothel-spezifische Deletion des Notch1-Genes in Mäusen konnte die essentielle Bedeutung des Notch1-Genes in der Angiogenese gezeigt werden, da die Embryonen am E10.5 durch schwerwiegende vaskuläre Defekte verstarben (Limbourg, 2005). Die Relevanz des Notch-Signalings in der arteriell-venösen Differenzierung konnte durch die Expression der Rezeptoren Notch1, Notch3 und Notch4 und seiner Liganden Delta-like4, Jagged1 und 2 in arteriellen ECs gezeigt werden (Villa, 2001, Shutter, 2000, Adams, 2003). Zielgene des Notch-Signalweges im vaskulären System (z.B. Hey1, Hey2 und HeyL) weisen auf dessen Bedeutung in der vaskulären Embryogenese hin, da Hey1-/Hey2-Null-Mäuse aufgrund von Abnormalitäten in der Bildung des Herzens und des Blutgefäßsystems embryonal versterben (Iso, 2003a, Fischer, 2004).

Die Rolle des Notch-Signalweges in der Bildung von HSCs wurde anhand von Notch- und Delta-Null-Mäusen beschrieben. In Mäusen werden am E9.5 hämatogene ECs in der Paraaorta-Splanchnopleura des Embryos gebildet, welche sich am E10.5 in HSCs entwickeln (Dzierzak, 2003). In Notch1-Null-Mäusen können hämatogene ECs beobachtet werden, jedoch nicht die Entwicklung dieser Zellen in HSCs (Kumano, 2003). Weitere Studien deuten auf eine wesentliche Rolle des Notch-Signalweges in der Entwicklung von hämatogenen ECs in HSCs hin (Hadland, 2004, Robert-Moreno, 2005). Weiterhin hat das Notch-Signaling eine große Bedeutung während der Hämatopoese in der adulten HSC-Bildung (Stier, 2002, Kumano, 2003, Hadland, 2004). Notch1 wird von CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks (Milner, 1994) und von T- und B-Lymphozyten, Monozyten und Neutrophilen des peripheren Blutes exprimiert (Milner, 1999). Die Liganden des Notch-Rezeptors sind im Knochenmark auf Stromazellen, in der fötalen Leber und im Thymus exprimiert (Varnum-Finney B, 1998, Li, 1998, Hasserjian, 1996).

Notch scheint zwei verschiedene Rollen im hämatopoetischen System, ähnlich wie in anderen Geweben, zu haben, zum einen nimmt Notch an Zelldestinationsentscheidungen in Progenitorzellpopulationen teil (Pui, 1999, Washburn, 1997), zum anderen inhibiert Notch die Differenzierung von hämatopoetischen Progenitorzellen. So führt die Transduktion durch ein Retrovirus, welches eine konstitutiv aktive Form von Notch1 exprimiert, oder die Aktivierung von Notch1 durch spezifische Liganden, zur Inhibition der Differenzierung von Granulozyten und der Konservierung eines unreiferen Phänotyps in der murinen Zelllinie 32D, der humanen Zelllinie HL-60 und in primären murinen und humanen myeloiden Vorläuferzellen (Li, 1998, Varnum-Finney, 1998, Milner, 1996, Walker, 1999, Han, 2000). Weiterhin konnten Varnum-Finney *et al.* zeigen, dass aktiviertes Notch1 *in vitro* zur Bildung von multipotenten Zelllinien führt und die Fähigkeit hat, Stammzellen zu immortalisieren (Varnum-Finney, 2000). Auch die

Analyse von Effektoren des Notch-Signalweges, wie z.B. dem Transkriptionsfaktor RBP-J, zeigte dessen Relevanz in der HSC-Entwicklung. So konnte in RBP-J-mutierten Mäusen gezeigt werden, dass die Entwicklung von hämatopoetischen Vorläuferzellen nicht stattfindet, wenn der RBP-J/Notch-Signalweg unterbrochen ist (Robert-Moreno, 2004).

### **Der Notch-Signalweg in der Entwicklung und Reifung von EPCs**

Notch1 spielt eine wichtige Rolle in der Bildung, Erhaltung und Differenzierung von HSCs und könnte folglich auch relevant für die Entwicklung und Differenzierung von EPCs sein. So entwickeln sich EPCs wahrscheinlich aus HSCs (Urbich und Dimmeler, 2004) und die Expression von Notch1 und seinen Liganden auf ECs (Villa, 2001, Shutter, 2000) deutet auf eine mögliche Bedeutung des Notch-Signalweges in der EPC-Entwicklung und -Reifung hin. Die Expression der Mitglieder der Notch-Genfamilie konnte in mehreren hämatopoetischen Zelltypen verschiedenen Ursprungs gezeigt werden und weist stark auf eine Teilnahme an der Kontrolle der hämatopoetischen Differenzierung in vielen verschiedenen Zelllinien hin (Han, 2002, Radtke, 1999, Stier, 2002).

Die genaue Rolle des Notch-Signalings in der Entwicklung von EPCs wurde bisher nicht beschrieben und in der Literatur wird die mögliche Funktion von Notch kontrovers diskutiert, ob z.B. die Differenzierung von HSCs in andere Zelltypen durch das Notch-Signaling induziert oder inhibiert wird (Wilson und Radtke, 2006). So führte die Expression von einer konstitutiv aktiven Form von Notch1 zur Inhibition der Differenzierung von hämatopoetischen Zelllinien (Bigas, 1998, Milner, 1996, Kumano, 2001). Eine andere Studie zeigte, dass aktiviertes Notch1 *in vitro* zur Bildung von multipotenten Zelllinien und zur Immortalisierung der Stammzellen führte (Varnum-Finney, 2000). Obwohl der Notch-Signalweg in vielen *gain-of-function* Experimenten die Inhibition der Differenzierung, die Selbsterneuerung und HSC-Erhaltung zu vermitteln scheint, können die *loss-of-function* Experimente diese Hypothese nicht stützen (Han, 2002, Radtke, 1999, Wilson und Radtke, 2006). So zeigen Han *et al.*, dass die induzierte Inaktivierung des nuklearen Notcheffektors RBP-J im Knochenmark zur Blockade der T-Zellentwicklung führt. Die Differenzierung der myeloiden und B-Zelllinie scheint in RBP-J-defizienten Knochenmark normal zu verlaufen (Han, 2002). Eine Analyse der Rolle des Notch-Signalweges in der EPC-Entwicklung und -Differenzierung ist von besonderem Interesse durch die oben beschriebene Bedeutung als Marker und mögliches Therapeutikum für kardiovaskuläre Erkrankungen und könnte mögliche Aspekte einer Modulation von EPCs zur verbesserten Neovaskularisierung und Reendothelialisierung aufzeigen.

### 1.3. Ziele der Arbeit

Die Notch-Signaltransduktion spielt eine wichtige Rolle in der Bildung und Entwicklung von hämatopoetischen Zellen und Systemen, während die myeloischen EPCs eine noch weitgehend unbekannt, aber scheinbar wichtige Funktion in der physiologischen und pathologischen Reendothelialisierung und Neovaskularisierung von Gefäßsystemen haben. Der Notch-Signalweg könnte die Entwicklung von EPCs in ihrer Funktionalität und der Ausprägung ihres Phänotyps steuern. Das Ziel dieser Arbeit ist die Rolle der Notch-Signaltransduktion in der Entwicklung und Funktion von EPCs zu analysieren.

In humanen EPCs soll auf unterschiedliche Weise der Notch-Signalweg moduliert werden, in ersten Experimenten sollen  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren verwendet werden, welche die Notch-Signaltransduktion durch Inhibition der S3-Spaltung (s. Abb. 1.3.) und der Freisetzung von NICD verhindern. In späteren Experimenten soll ein hergestellter Adenovirus zur transienten Transfektion der EPCs u.a. mit dominant negativen RBP-J (inhibiert die durch NICD ausgelöste Transkription) verwendet werden, um die Modulation des Signalweges auf Proteinebene zu erreichen. Die behandelten Zellen werden mit unterschiedlichen Testverfahren auf mögliche Veränderungen im Funktions- und Markerprofil untersucht werden, z.B. mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) auf unterschiedliche Expressionslevel von Zielgenen des Notch-Signalweges bzw. EPC-spezifischer Marker. Das Fluoreszenz-aktivierte Zellsorting (FACS) soll der Analyse der Oberflächenmarker und der Zellvitalität/-letalität dienen. Die Funktionalität nach Modulation des Notch-Signalweges wird *in vivo* in einem adaptiven Modell zur Endothelregeneration dem Karotidenverletzungsmodell und *in vitro* in funktionellen Tests, wie dem Adhäsions- und dem Migrationsassay, analysiert werden.

Eine weitergehende Fragestellung, nach Ermittlung der Rolle von Notch in EPCs, könnte sein, ob durch eine Modulation des Notch-Signalweges die Entwicklung der EPCs und ihrer Vorläuferzellen in eine bestimmte Richtung gelenkt und ihre Funktion verbessert werden kann. Bei positiven Ergebnissen könnte langfristig die Modulation des Notch-Signalweges eine weitere Therapieoption zur Behandlung von Herz-Kreislaufkrankungen sein.

## 2. Material

### 2.1. Chemikalien

#### 2.1.1. Allgemeine Chemikalien

Agar-Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SeaKem LE Agarose	Biozym. Hess. Oldendorf, Deutschland
Ammoniumchlorid	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Ampicillin	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Amphotericin B	Biochrom AG seromed, Berlin, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Bacto-Hefe-Extract	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bacto-Trypton	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
BSA, Fraktion 5	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Cäsiumchlorid	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Chloramphenicol	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Chloroform	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
DAPI (Diamidinophenylindole dihydrochloride)	Fluka Biochemika, über Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
DTT (Dithiothreitol)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Evans Blue	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Formaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glucose	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HCl (Salzsäure)	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -G-thiogalaktosid)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Isopentan	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Isopropanol	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Kaliumbicarbonat	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland

Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Kanamycin	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
NZ Amin (Casein Hydrolysat)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Methanol	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Penicillin	Biochrom AG seromed, Berlin, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Piperazinbisethansulfonsäure (PIPES)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
SDS, ultrapure	Fluka Biochemika, über Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Streptomycinsulfat	Biochrom AG seromed, Berlin, Deutschland
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Tris (Trishydroxyethylamin) -Base	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	USB Corporation, Cleveland, USA
Tween-20	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
X-Gal	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland

Alle übrigen eingesetzten Chemikalien wurden von der Firma E. Merck, Darmstadt, erworben oder sind bei ihren Spezialanwendungen im Text angegeben.

### 2.1.2. Enzyme, biologische Substanzen und Puffer

#### Enzyme, biologische Substanzen und Puffer

Accutase	PAA laboratories, Pasching, Österreich
bFGF (basaler Fibroblasten-Wachstumsfaktor)	Tebu-bio/ PeproTech Inc., New Jersey, USA
<i>complete mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets</i>	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
DNase	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
dNTPs	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DIL-AcLDL	Harbor Bio-Products, über CellSystems, St.

	Katharinen, Deutschland
DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )	Biochrom AG seromed, Berlin, Deutschland
EGM ( <i>Endothelial Growth Medium</i> )	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
EGM-2	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
FACS Calbrite Beads	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS Rinse	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Fibronectin	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
<i>Fluorescent Mounting Medium</i>	Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS, <i>fetal calf serum</i> )	Biochrom AG seromed, Berlin, Deutschland
FuGENE 6 Transfection Reagent	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Gelatine	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>Glycergel Mounting Medium</i>	Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland
Glykogen	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Hanks' Salzlösung	Biochrom AG seromed, Berlin, Deutschland
Heparin	B. Braun, Melsungen, Deutschland
humanes Serum	Jackson ImmunoResearch, über dianova, Hamburg Deutschland
Jung Tissue Freezing Medium	Leica Instruments, Nussloch, Deutschland
Ketanest	Pharmacia, über Pfizer, Wien, Österreich
L-Glutamin	Biochrom AG seromed, Berlin, Deutschland
Lymphozytentrennmedium LSM 1077	PAA laboratories, Pasching, Österreich
Matrigel Matrix ( <i>growth factor reduced</i> )	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
PBS (Phosphat gepufferte Saline)	Biochrom AG seromed, Berlin, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Proteinase K	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
Ribonuclease A	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
rHu SDF-1 beta (rekombinanter humaner Stromalzellen abgeleiteter Faktor)	PromKine, über PromoCell, Heidelberg, Deutschland
RNase A	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Rompun 2%	Bayer, Leverkusen, Deutschland
TAMRA (5- und 6-Carboxytetramethyl-Rhodamin)	MoBiTec, Göttingen, Deutschland

Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypan Blau	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
Trypsin/ EDTA	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<i>Ulex europaeus</i> Lectin konjugiert mit FITC	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
VEGF <sub>165</sub> (Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)	Tebu-bio/ PeproTech Inc., New Jersey, USA
Ziegenerum	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland

## Inhibitoren

**Tab. 2.1. Verwendete Inhibitoren und ihre Wirkung**

Substanz	Wirkung	Firma
<i>γ-Secretase Inhibitor</i> XX, DBZ	Verhindert die spaltende Aktivität der $\gamma$ -Secretase	Calbiochem, über Merck Biosciences, Darmstadt, Deutschland
<i>γ-Secretase Inhibitor</i> IX, DAPT	Verhindert die spaltende Aktivität der $\gamma$ -Secretase	Calbiochem, über Merck Biosciences, Darmstadt, Deutschland
CXCR4-Inhibitor, AMD3100	Verhindert die Bindung von SDF-1 an seinen Rezeptor (CXCR4)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland

## DNA-Marker

1kb-DNA-Leiter	Gibco-BRL, Eggenstein
100bp-DNA-Leiter	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland

## Protein-Marker

<i>Precision Plus Protein Standards Dual Colour</i>	Biorad, Hercules, CA, USA
---	---------------------------

## Antikörper und Substrate

**Tab. 2.2. Verwendete Antikörper/Substrate und ihre Spezifität**

Name	Spezifität	Quelle	Firma
Anti-Actin	Aktin im Cytoskelett und in kontraktile Strukturen	Kaninchen	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Alexa Fluor 594 <i>goat anti-human</i> IgG (H+L)	human IgG (schwere und leichte Kette)	Ziege	Molecular Probes, über Mo Bi Tec, Göttingen, Deutschland
Alexa Fluor 594 <i>goat anti-mouse</i> IgG (H+L)	Maus-IgG (schwere und leichte Kette)	Ziege	Molecular Probes, über Mo Bi Tec, Göttingen, Deutschland
Alexa Fluor 488 <i>goat anti-rabbit</i> IgG (H+L)	Kaninchen-IgG (schwere und leichte Kette)	Ziege	Molecular Probes, über Mo Bi Tec, Göttingen, Deutschland

Name	Spezifität	Quelle	Firma
Alexa Fluor 488 <i>goat anti-rat</i> IgG (H+L)	Ratten-IgG (schwere und leichte Kette)	Ziege	Molecular Probes, über Mo Bi Tec, Göttingen, Deutschland
Allophycocyanin- <i>mouse anti-human</i> CD34	human CD34, auf hämatopoetischen Vorläuferzellen	Maus	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
AvidinD:Fluorescein	Biotin		Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
bTAN 20	human Notch1, intrazelluläre Domäne Nucleotide 6658-7131	Ratte	Developmental Study Hybridoma Bank, Spyros Artavanis-Tsakonas
Cleaved Notch1 (Val1744)	Notch1, enzymatisch gespalten an der Aminosäure 1744 Valin	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-Cre Antikörper		Kaninchen	Novagen, über Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
anti-human CD14	humanes CD14, Monocyten	Maus	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-human CD18	humaner $\beta_2$ Integrinrezeptor	Maus	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-human CD31	humanes PECAM-1 (platelet endothelial adhesion molecule-1)	Maus	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-human CD31	humanes PECAM-1 (platelet endothelial adhesion molecule-1)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
anti-mouse CD31	mouse PECAM-1 (platelet endothelial adhesion molecule-1)	Ratte	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-human CD54	humanes ICAM-1 (intercellular adhesion molecue-1)	Maus	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-human CD141	humanes CD141, Thrombomodulin	Maus	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
eNOS/NOS III	Nitridoxidase in Neuronen und Endothelzellen	Maus	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FITC-F(ab') <sub>2</sub> Fragment	humanes Fc-Fragment	Ziege	Jackson ImmunoResearch, über dianova, Hamburg Deutschland
FITC-F(ab') <sub>2</sub> Fragment	Maus IgG	Ziege	Jackson ImmunoResearch, über dianova, Hamburg Deutschland
FITC-F(ab') <sub>2</sub> Fragment	Kaninchen IgG	Ziege	Jackson ImmunoResearch, über dianova, Hamburg Deutschland

Name	Spezifität	Quelle	Firma
Biotinyliertes <i>Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia</i> Lectin I, Isolectin B4	Gefäßstrukturen	Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia	Vector laboratories, über Linaris, Wertheim, Deutschland
Anti-RBP-J kappa <i>monoclonal antibody</i>	RBP-J in Mensch und Mouse	Ratte	Institute of Immunology Co. Ltd., Tokyo, Japan
Rekombinantes Mensch IgG <sub>1</sub> Fc		Maus	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Rekombinant Ratte Jagged 1/Fc Chimera	Notch-Liganden Bindung	Maus	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Rekombinant Maus EphB4/Fc Chimera	mouse EphrinB2	Maus	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Recombinant Maus Ephrin-B2/Fc Chimera	mouse EphB4	Maus	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
R-Phycoerytherin-F(ab') <sub>2</sub> Fragment	Maus IgG	Ziege	Jackson ImmunoResearch, über dianova, Hamburg Deutschland
R-Phycoerytherin- <i>anti-mouse</i> Notch1	intrazelluläre Domäne von Maus Notch1	Maus	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Oregon Green 488 <i>goat anti-mouse</i> IgG	Maus IgG	Ziege	Molecular Probes, über Mo Bi Tec, Göttingen, Deutschland
Anti- $\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin-Cy3-konjugiert	$\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin	Maus	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Anti-TIE2 <i>monoclonal antibody</i>	humaner und muriner Angiopoeitinrezeptor		BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Anti-VEGFR-2/KDR (clone 3)	humaner vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor 2	Maus	RELIA Tech GmbH, Braunschweig, Deutschland

### 2.1.3. Kits

Adeasy XL Adenoviral Vector System	Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande
ApopTag Plus Fluorescein <i>in Situ</i> Apoptosis Detection Kit	Chemicon, Hampshire, Groß Britannien
CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay	Promega, Madison, WI, USA
Cytotoxicity Detection Kit	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences, über GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
peqGOLD TriFast <sup>TM</sup> FL	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QiaPrep Miniprep	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Sylgard 184 Silicone Elastomere	Dow Corning, Michigan, USA

## 2.2. Materialien und Geräte

### 2.2.1. Filme und Membranen

Membran Protan BA85 (Cellulosenitrat)	Whatman Schleier&Schuell, Dassel, Deutschland
Röntgenfilme Kodak X-OMAT	Kodak, Rochester, New York, USA

### 2.2.2. Geräte

Autoklav	KSG Sterilisatoren GmbH, Olching, Deutschland
Brutschränke	Sanyo Biomedical, Az Etten Leur, Niederlande
Cleanbench	Jouan, über W.H.Mahl, Trendelburg, Deutschland
Kryostat Leica CM 1900	Leica Instruments, Nussloch, Deutschland
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen, Deutschland
Elektrophoresegeräte:	
Bio-Rad Power PAC 200	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
DNA-Gelelektrophoresekammern	Eigenbau, Medizinische Hochschule Hannover, Deutschland
AB Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Biosciences, über GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Elektroporator BTX Electro square porator T820	BTX, über VWR International, Darmstadt, Deutschland
Entwicklermaschine OPTIMAX X-Ray Film Processor	Protec Medizintechnik GmbH&Co.KG, Oberstenfeld, Deutschland
FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Microcoagulator	
Elektrotom 80B	Martin, Tüttlingen, Deutschland
Mikropinzette	Fischer, Freiburg, Deutschland
Minishaker MS1	Ika Werke GmbH&Co.KG, Staufen, Deutschland
Mikroskopie	
Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Lichtquelle HBO 100	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Lichtfilter	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland

Mikrotiterplattenleser	
Rainbow Reader	Laboratory Instruments SLT, Salzburg, Österreich
Geldokumentation	
Bio-Rad Gel Doc 2000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Heizbad GFL 1002	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Inkubationsschrank	Memmert, über Omnilab, Gehrden, Deutschland
Mikrowelle M1719N	Samsung Electronics GmbH, Schwalbach, Deutschland
PCR-Gerät T-Personal	Biometra, Göttingen, Deutschland
pH-Meter HI 931401	Hanna Instruments, über Omnilab, Gehrden, Deutschland
Photometer Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech, über GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Pipetten (einstellbar, Eppendorf Research)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe (pipetus)	Hirschman-Laborgeräte GmbH&Co.KG, Eberstadt, Deutschland
Schüttelinkubator GFL 3017	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
UV-Transilluminator (312nm)	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, Deutschland
Feinwaage Mettler AK160	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Zentrifugen	
Mikrozentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Tischzentrifuge Megafuge 2.0.R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland

### 2.2.3. Kleinmaterialien

Cryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Deckgläser	Menzel, Braunschweig, Deutschland
	Omnilab, Gehrden, Deutschland
	Hecht-Assistent, Sondheim
Einmalhandschuhe	Nitrilhandschuhe, Safeskin, Kimberly-Clark-Corporation, Roswell, USA
Einmalpipetten	Greiner, Nüringen, Deutschland
	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Einmalspritzen	Braun, Melsungen, Deutschland

Elektroküvetten	BTX, über VWR International, Darmstadt, Deutschland
Eppendorfspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Ambion, Cambridgeshire, UK Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Entsorgungsbeutel	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FACS-Röhrchen (5ml Rundbodenröhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Falcon-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Fixogum	Marabuwerke GmbH & Co.KG, Tamm, Deutschland
Kanülen	Braun, Melsungen, Deutschland
Kulturröhrchen	Greiner/ Sarstedt
Minutiennadeln	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Objektträger	Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland
Parafilm	American National Can, Greenwich, USA
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
Petrischalen	Becton Dickinson
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Polypropylenröhrchen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland Ambion, Cambridgeshire, UK
Saran <sup>®</sup> -Folie	Roth, Karlsruhe, Deutschland
S-Monovette Na-Citrat (1:10), 10ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Transwell (8µm Porengröße)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturplastik	Biochrom AG seromed, Berlin, Deutschland
Zellkulturschaber	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

### 2.3. Standardlösungen, -medien und -puffer

#### Nukleinsäureanalytik

<b>1 kb DNA Leiter (Stock-Lösung)</b>	1 mg/ml	1 kb DNA Leiter
<b>1 kb DNA Leiter (Arbeitslösung)</b>	83 µg/ml 16,7% (v/v) 1x	1 kb DNA Leiter Ladepuffer TE

<b>100 bp DNA Leiter (Arbeitslösung)</b>	2 µg/µl 16,7% (v/v) 1x	1 kb DNA Leiter Ladepuffer TE
<b>DEPC-Wasser</b> in destillierten Wasser	0,1% (v/v)	DEPC
<b>dNTP-Lösung (10mM)</b> in destillierten DEPC-Wasser	10 mM 10 mM 10 mM 10 mM	dCTP dATP dGTP dTTP
<b>Ethidiumbromid-Lösung</b> in Wasser	10mg/ml	Ethidiumbromid
<b>Ladepuffer (DNA)</b>	15% (w/v) 10 mM 10 mg/ml	Ficoll 400 EDTA Bromphenol
<b>Primer-Lösungen (10x)</b> in destillierten DEPC-Wasser	100 pmol/µl	Primer
<b>TAE-Puffer (50x)</b>	2 M 57,1 (v/v) 0,05 M	Tris-Base Essigsäure EDTA
<b>TE-Puffer (10x)</b> pH 8.0	100 mM 10 mM	Tris-Base EDTA

## Zellkultur

<b>bFGF-Lösung</b> pH 7,6, in destillierten Wasser	50 µg/ml 5 mM	bFGF Tris-Base
<b>CXCR4-Inhibitor, AMD3100</b> in sterilen Wasser	22mg/ml	AMD3100
<b>Einfriermedium für AD-293-Zellen</b> in sterilem Kulturmedium für AD-293-Zellen	10% 40%	DMSO FCS
<b>Einfriermedium für HUVEC</b> steril	10% 90%	DMSO FCS
<b>Erythrozytenlysepuffer (10x)</b> in destillierten Wasser	155 mM 10 mM 100 mM	Ammoniumchlorid Kaliumhydrogencarbonat EDTA
<b>Fibronectin-Stocklösung</b>	200 µg/ml	Fibronectin

in sterilem, destillierten Wasser		
<b>Fibronectin-Arbeitslösung</b> in sterilem PBS ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	25 µg/ml	Fibronectin
<b>Gelatine-Lösung</b> in destilliertem Wasser	1%	Gelatine
<b>Kulturmedium für AD-293-Zellen</b> in sterilem DMEM	4,5 g/L 110 mg/L 2 mM 10%	Glucose Natriumpyruvat L-Glutamin FCS
<b>PBS-Lösung</b> ( <i>phosphate-buffered saline</i> ) in sterilem Wasser, pH 7.4	137 mM 2,6 mM 10 mM 1,8 mM	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>SDF-1-Lösung</b> in destillierten Wasser	100 µg/ml	SDF-1
<b>TAMRA-Lösung</b> (5-Carboxytetramethyl-Rhodamin) in sterilen PBS-Puffer	5 mM	TAMRA
<b>TE-Lösung (Trypsin-EDTA)</b>	0,53 mM 0,05%	EDTA Trypsin
<b>Trypan Blau-Lösung</b> steril, in destillierten Wasser	0,4% (w/v) 0,81% (w/v) 0,06% (w/v)	Trypan Blau Natriumchlorid Kaliumphosphat
<b>γ-Secretase Inhibitor XX, DBZ</b> in DMSO	3 mM	DBZ
<b>γ-Secretase Inhibitor IX, DAPT</b> in DMSO	30 mM	DAPT
<b>VEGF-Lösung</b> in Endothelialelem Basalmedium	50 µg/ml	VEGF

### Proteinanalytik

<b>Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (30%)</b> in destillierten Wasser	29,2% (w/v) 0,8% (w/v)	Acrylamid Bis-Acrylamid
<b>APS-Lösung</b> in destillierten Wasser	10% (w/v)	Ammoniumpersulfat
<b>Blocking Puffer</b>	5% (w/v) 1x	Milchpulver TBS

	0,1% (v/v)	Tween-20
<b>complete mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets-Lösung (20x)</b> in destillierten Wasser	1 Tablette/500µl	Protease Inhibitor Cocktail Tablette
<b>PMSF-Lösung</b> in Isopropanol	100 mM	PMSF
<b>Ponceaurot-Lösung</b> in destillierten Wasser	2% (w/v) 3% (v/v)	Ponceaurot Trichloressigsäure
<b>Protein-Lysis-Puffer (10x)</b> pH 7,4	400 mM 1,5 M 10 mM 10 mM 10% (v/v) 10 mM	Tris-Base NaCl EDTA EGTA Triton X 100 Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
<b>Protein-Lysis-Puffer (1x)</b>	1x 10 µM 1x	Lysis-Puffer PMSF complete mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets-Lösung
<b>Tris Glycin SDS Elektrophoresepuffer (10x)</b> pH 8,3	250 mM 2,5 M 1% (v/v)	Tris-Base Glycin SDS
<b>TBS-Puffer (10x)</b> pH 7,6	0,2 M 1,36 M 1,0% (v/v)	Tris-Base NaCl Tween-20
<b>TBST-Puffer (1x)</b>	1x 0,1% (v/v)	TBS Tween-20
<b>Transfer-Puffer (1x)</b> pH 8,0	48 mM 39 mM 0,037% (v/v) 20% (v/v)	Tris-Base Glycin SDS Methanol
<b>Stripping-Puffer</b> pH 6,8	2% (v/v) 62.5 mM 100 mM	SDS Tris-Base β-Mercaptoethanol
<b>SDS-Lösung</b>	10% (w/v)	SDS

in Wasser		
<b>SDS-Proben-Puffer (Lämmli, 3x)</b> pH 6,8	187,5 mM 6% (v/v) 30% (v/v) 150 mM 0,03% (w/v)	Tris-Base SDS Glycerin DTT Bromphenolblau

### Bakterienkultur

<b>Ampicillin-Stock</b> in destillierten Wasser	50mg/ml	Ampicillin
<b>LB-Agar</b> pH 7.0, in destillierten Wasser	1 % (w/v) 0,5 % (w/v) 1 % (w/v) 1,5 % (w/v)	Bacto-Trypton Hefeextrakt NaCl Bacto-Agar
<b>LB-Medium</b> pH 7.0, in destillierten Wasser	1 % (w/v) 0,5 % (w/v) 1 % (w/v)	Bacto-Trypton Hefeextrakt NaCl
<b>NZY<sup>+</sup>-Medium</b>	1% (w/v) 0,5% (w/v) 0,5% (w/v) 0,4% (w/v) 12,5 mM 12,5 mM	NZ-Amin (Casein Hydrolysat) Hefeextrakt NaCl Glucose MgCl <sub>2</sub> MgSO <sub>4</sub>
<b>SOC-Medium</b>	2% (w/v) 0,5% (w/v) 8,6 mM 2,5 mM 20 mM 20 mM	Bacto-Trypton Hefeextrakt NaCl KCl MCl <sub>2</sub> Glucose

### Adenovirale Produktion

<b>Cäsiumchloridlösung (Dichte 1,2g/ml)</b> in 50ml destillierten Wasser	13,25g 0,5ml	Cäsiumchlorid Tris (1M, pH 7,5)
<b>Cäsiumchloridlösung (Dichte 1,4g/ml)</b> in 50ml destillierten Wasser	26,75g 0,5ml	Cäsiumchlorid Tris (1M, pH 7,5)

<b>Viren-Aufbewahrungspuffer</b> im 10ml sterilen Wasser	100µl	Tris (1M, pH 8,0)
	200µl	NaCl (5M)
	10µl	MgCl <sub>2</sub> (5M)
	5ml	Glycerol
	100µl	BSA (10%)

### Immuncytochemie und Immunhistochemie

<b>Block-Lösung (Block G)</b> in PBS mit Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	5% (v/v) 0,2% (v/v)	Ziegenerum Tween-20
<b>BSA-Lösung</b> in PBS-Lösung	3%	BSA
<b>DAPI-Stammlösung</b> in destillierten Wasser	1mg/ml	DAPI
<b>DAPI-Lösung</b> in destillierten Wasser oder PBS-Lösung	0,5µg/ml	DAPI
<b>DIL-Ac-LDL-Lösung</b> steril	200µg/ml 0,15M 0,05M 0,03mM	DIL-AcLDL NaCl Tris (ph 7.4) EDTA
<b>DN-Puffer (TUNEL-Färbung)</b>	30mM 4mM 0,1mM	Tris (pH 7,2) MgCl <sub>2</sub> DTT
<b>DNase-Lösung (TUNEL-Färbung)</b> in DN-Puffer	1U/µl	DNase
<b>Isolectin B4-Stammlösung</b> (mit Biotin konjugiert)	0,5mg/ml	Isolectin B4
<b>Lectin (<i>Ulex europaeus</i>)-Lösung</b>	1mg/ml 0,9% (w/v)	Lectin aus <i>Ulex europaeus</i> NaCl
<b>Paraformaldehyd-Lösung</b> in PBS mit Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	8% (w/v)	PFA

### Fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse

<b>FACS-Lösung</b> in PBS-Lösung	2% (v/v) 0,1% (v/v)	FCS Natriumazid
<b>FACS-Block-Lösung</b> in PBS-Lösung, Lagerung bei 4°C	20µg/ml	hIgG
<b>Fixierungslösung</b>	70%	Methanol

in PBS-Lösung		
<b>humane Immunglobulin-Lösung (hIgG)</b> in destillierten Wasser, Lagerung bei -20°C	60mg/ml	hIgG
<b>Propidiumiodid-Färbelösung</b> in PBS-Lösung	0,25µg/ml 0,1mg/ml	Propidiumiodid RNase A
<b>Propidiumiodid-Lösung</b>	1mg/ml	Propidiumiodid
<b>RNase A-Lösung</b>	10mg/ml	RNase A

### Carotis-Verletzungsmodell

<b>Evans Blue Lösung</b>	1% (w/v) 0,9% (w/v)	Evans Blue NaCl
<b>PFA-Lösung</b>	2% 0,1 M	PFA PIPES
<b>Sucrose-Lösung (15%)</b> in Wasser	15% (w/v)	Sucrose
<b>Sucrose-Lösung (30%)</b> in Wasser	30% (w/v)	Sucrose

### 2.3.1. Lösungen

<b>EDTA-Lösung</b> pH 8,0, in destillierten Wasser	1 M	EDTA
<b>EGTA-Lösung</b> pH 7,0, in destillierten Wasser	0,5 M	EGTA
<b>Natriumchlorid-Lösung</b> in destillierten Wasser	~6 M	NaCl
<b>Natriumhydroxid-Lösung</b> in destillierten Wasser	10 M	NaOH
<b>Natriumacetatlösung</b> pH 5,2, in destillierten Wasser	3 M	Natriumacetat
<b>Magnesiumchlorid-Lösung</b> in destillierten Wasser	1 M	Magnesiumchlorid

### Puffer

<b>Tris-HCl-Puffer</b>	
1,5 M	pH 8.8
1,0 M	pH 6.8
1,0 M	pH 8.0

## 2.4. Probenmaterial

Bei den verwendeten Blutproben zur Isolierung von humanen endothelialen Progenitorzellen handelte es sich um junge, gesunde, freiwillige Spender. Die Blutproben wurden in S-Monovetten (Na-Citrat, 1:10, 10ml) der Firma Sarstedt entnommen und sofort weiterverarbeitet.

## 2.5. Bakterienstämme

Tab. 2.3. Verwendete Bakterienstämme und ihr Genotyp

Stamm	Genotype	Firma
MAX Efficiency DH5 $\alpha$ <i>competent cells</i>	F <sup>-</sup> $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> ( <i>r<sub>k</sub><sup>-</sup></i> , <i>m<sub>k</sub><sup>+</sup></i> ) <i>phoA supE44 <math>\lambda</math><sup>-</sup> thi-1 gyrA96</i> <i>relA1</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
XL10-Gold <i>ultracompetent cells</i>	Tet <sup>R</sup> $\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183 $\Delta$ ( <i>mcrCB-hsdSMR-</i> <i>mrr</i> )173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1</i> <i>gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F <sup>'</sup> <i>proAB</i> <i>lacI<sup>q</sup>ZAM15 Tn10 (Tet<sup>R</sup>) Amy Cam<sup>R</sup></i> ] <sup>a</sup>	Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande
BJ5183-AD-1 <i>electrocompetent cells</i>	<i>endA1 sbcBC recBC galK met thi-1</i> <i>bioT hsdR (Str<sup>r</sup>)</i> [pAdEasy-1 ( <i>Amp<sup>R</sup></i> )]	Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande

## 2.6. Mausstämme

Tab. 2.4. Verwendete Mausstämme mit Genotyp und Phänotyp

Mausstamm	Phänotyp	Firma/ Bezugsquelle
Nacktmäuse (NRMI nude/nude)	abnormales Haarwachstum, kein Thymus Immunologie H2:q, Genotyp <i>A/a, Tyr<sup>c</sup></i>	Zentrales Tierlabor/Institut für Versuchstierkunde, Medizinische Hochschule Hannover

## 2.7. Zelllinien

Tab. 2.5. Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Quelle/ Eigenschaften	Firma/ Bezugsquelle
AD-293	human embryonale Nierenzellen, transformiert mit dem Adenovirus Typ 5	Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande
COS7	Nierenzellen der grünen Meerkatze ( <i>Cercopithecus aethiops</i> ), transformiert mit einer Origin-defekten Mutante des SV-40- Virus	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen & Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
HUVEC	humane umbikale venöse Endothelzellen	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien

## 2.8. Plasmide

**Tab. 2.6. Verwendete Plasmide: Genotyp und Bezugsquelle**

Plasmid	Gen	Größe/Quelle des Inserts	Name, Größe und Art des Vektors	Resistenz	Bezugsquelle	Entwickler
pCMX-N/RBP-J	RBP-J	1.652 bp, Maus cDNA	pCMX-N, 4.536 bp, Expressionsvektor	Ampicillin	Riken BioResource Center, Tokyo, Japan	Kazuki Kuroda, Ottawa Health Research Institute
pCMX-N/RBP-J (R218H)	RBP-J, dominant negative Mutante	1.652 bp, Maus cDNA	pCMX-N, 4.536 bp, Expressionsvektor	Ampicillin	Riken BioResource Center, Tokyo, Japan	Kazuki Kuroda, Ottawa Health Research Institute

## 2.9. Adenoviren

Adenovirus	Bezugsquelle
AdGFP	selbst hergestellt
AdCre	selbst hergestellt
AdNICD Forward	selbst hergestellt
AdNICD Reverse = AdenoNonSense	selbst hergestellt
AdRBP-J Dominant negative Mutante	selbst hergestellt

## 2.10. Computerprogramme

**Tab. 2.7. Verwendete Computerprogramme**

Programm	Anwendung	Autor/Firma
Axiovision Rel. 4.4.1.0	Bildverarbeitung mit dem Zeiss-Mikroskop	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
CellQuest Pro Version 5.1.1	FACS-Datenakquisition und Analyse	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACSComp Version 5.1.1	FACS-Kalibrierung	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
NEB.Cutter 2.0	Berechnung der Restriktionsschnittstellen	New England Biolabs ( <a href="http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php">http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php</a> )
Nero Burning ROM 6.6.0.3	Datenspeicherung auf CD-/DVD-Rohlingen	Ahead Software, Karlbad, Deutschland
Photoshop CS2 9.0	Bildbearbeitung	Adobe Systems GmbH, München, Deutschland
WinMDI Version 2.8	FACS-Analyse	Joseph Trotter, trotter@scripps.edu (2000)

## 2.11. Genbank-Accession-Nummern

Tab. 2.8. Genbank-Accession-Nummern der untersuchten Gene

Gen	Accession-Nummer		
		human	murin
<b>CXCR4</b>	<b>DNA</b>	NC_000002.10	
	<b>mRNA</b>	NM_003467.2 NM_001008540.1	
	<b>Protein</b>	NP_003458 isoform b NP_001008540.1 isoform a	
<b>Delta-like-1</b>	<b>DNA</b>	NC_000006.10	NC_000083.4
	<b>mRNA</b>	NM_005618.2	NM_007865.2
	<b>Protein</b>	NP_005609	NP_031891
<b>Delta-like-4</b>	<b>DNA</b>	NC_000015.8	NC_000068.5
	<b>mRNA</b>	NM_019074.2	NM_019454.1
	<b>Protein</b>	NP_061947	NP_062327
<b>Notch1</b>	<b>DNA</b>	NC_000009.10	NC_000068.5
	<b>mRNA</b>	NM_017617.2	NM_008714.2
	<b>Protein</b>	NP_060087	NP_032740
<b>Notch2</b>	<b>DNA</b>	NC_000001.9	NC_000069.4
	<b>mRNA</b>	NM_024408.2	NM_010928.1
	<b>Protein</b>	NP_077719	NP_035058
<b>Notch3</b>	<b>DNA</b>	NC_000019.8	NC_000083.4
	<b>mRNA</b>	NM_000435.1	NM_008716.1
	<b>Protein</b>	NP_000426	NP_032742
<b>Notch4</b>	<b>DNA</b>	NC_000006.10	NC_000083.4
	<b>mRNA</b>	NM_00455.3	NM_010929.1
	<b>Protein</b>	NP_004548	NP_035059
<b>RBP-J/CBF-1</b>	<b>DNA</b>	NC_000004.10	NC_000071.4
	<b>mRNA</b>	NM_005349.2 NM_203283.1 NM_203284.1 NM_015874.3	NM_009035.1
	<b>Protein</b>	NP_005340 isoform 1 NP_976028 isoform 3 NP_976029 isoform 4 NP_056958 isoform 2	NP_033061

## 3. Methoden

### 3.1. Zellkultur

#### 3.1.1. Medien und Lösungen

Die verwendeten Medien der Firma Cambrex bieten eine spezielle Zusammensetzung für die Kultur von Endothelzellen und endothelialen Progenitorzellen. Sie wurden spezifisch für die Kultivierung von Endothelzellen unter niedrigen Serumbedingungen entwickelt.

##### **Endotheliales Wachstumsmedium**

500ml Endotheliales Basis Medium (*endothelial basal medium*, EBM) wurden mit den mitgelieferten Zusätzen BBE (*bovine brain extract*), Heparin, Hydrocortison, hEGF (humaner endothelialer Wachstumsfaktor) und GA-1000 (Gentamicin, Amphotericin B) versetzt. Das Endotheliale Wachstumsmedium (*endothelial growth medium*, EGM) wurde mit 20 % fötalem Kälberserum (FCS) für die Kultivierung der endothelialen Progenitorzellen eingesetzt (Rössig *et al.*, 2005).

##### **Endotheliales Wachstumsmedium-2**

500ml Endotheliales Basis Medium-2 (*endothelial basal medium-2*, EBM-2) wurden mit den mitgelieferten Zusätzen Hydrocortison, hEGF (humaner endothelialer Wachstumsfaktor), GA-1000 (Gentamicin, Amphotericin B), VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor), hFGF-B (humaner Fibroblasten-Wachstumsfaktor B), R3-IGF-1 (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1), Ascorbinsäure und Heparin versetzt. Das Endotheliale Wachstumsmedium-2 (*endothelial growth medium-2*, EGM-2) wurde mit 10 % FCS für die Kultivierung der HUVEC (humane umbilikale venöse Endothelzellen) eingesetzt (Urbich *et al.*, 2002).

##### **Fibronectin-Lösung**

Fibronectin ermöglicht über die Adhäsion von endothelialen Progenitorzellen an Plastikzellkulturgefäße ihre selektive Kultivierung (Asahara *et al.*, 1997). Fibronectin wurde mit einer Konzentration von 200 µg/ml in sterilem Wasser bei 37 °C 1 h gelöst. Die Fibronectin-Stammlösung wurde in Teilmengen von 1 ml bei -20 °C aufbewahrt. Zur weiteren Verwendung wurde die Stammlösung mit PBS auf eine finale Konzentration von 25 µg/ml gebracht. Die Plastikzellkulturgefäße wurden mit der Fibronectin-Arbeitslösung bedeckt und mind. 1 h bei RT inkubiert. Die Fibronectin-Arbeitslösung wurde anschließend in sterilen 15ml-Plastikreaktionsgefäßen gesammelt und einmal wieder verwendet.

### Wachstumsfaktoren

Die Wachstumsfaktoren wurden, wie in Tabelle 3.1. beschrieben, aufgenommen und in Teilmengen von 20 µl bei - 20 °C gelagert. Die finale Konzentration wurde in den Ergebnissen bei den jeweiligen Experimenten angegeben.

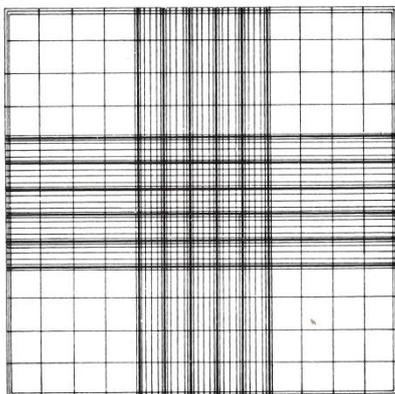
**Tab. 3.1. Konzentration der verwendeten Wachstumsfaktoren**

Wachstumsfaktor	Lösungsmittel	Konzentration
hrVEGF	EBM	50 µg/ml
hrbFGF	Tris 5 mM, pH 7.6	50 µg/ml
rHu SDF-1 beta	EBM, 0,1 % BSA	10 0µg/ml

### 3.1.2. Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen bei 300 x g und RT 5 min pelletiert und in einem kleinen Volumen aufgenommen (1-2 ml). 10 µl der Zellsuspension wurden mit PBS-Lösung 1:10 und diese Verdünnung 1:2 mit Trypan Blau-Lösung verdünnt. 10 µl der letzten Verdünnung wurden in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt. Der Farbstoff Trypan ist membrandurchlässig und dringt in alle Zellen ein, vitale Zellen sind in der Lage den blauen Farbstoff wieder auszustoßen, während tote Zellen blau bleiben. Die Zellzahl in der Kammer wurde mit 100facher Vergrößerung im Stereomikroskop durch Zählen der vitalen EPCs in den vier großen Eckquadrate, die je aus 16 kleinen Quadraten bestehen, ermittelt (s. Abb. 3.1.). Die Zellzahl wurde durch Anwendung folgender Formel berechnet, wobei A der ermittelten Zellzahl, B dem Verdünnungsfaktor (d. h. 20), C dem Multiplikationsfaktor der Neubauer-Zählkammer (d. h. 10) und D der Anzahl der ausgezählten Eckquadrate (d. h. 4) entspricht:

$$(A \times B \times C) / D = \text{Zellzahl/ml}$$



**Abb. 3.1. Raster der Neubauer-Zählkammer** (aus Lindl, 2002)

### 3.1.3. Kultivierung von HUVEC

Humane umbilikale venöse Endothelzellen (HUVEC) wurden bis zu 15 Passagen für Experimente verwendet, dann verlieren sie ihre zelltypspezifische Morphologie (Wachstum in Monolayern, Weibel-Palade-Körper) und endothelzellspezifischen Oberflächenmarker (z.B.

CD31, CD54, CD62E, Mutin *et al.*, 1997). HUVEC wurden von der Firma Cambrex bezogen und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Einfriermedium gelagert, je  $5 \times 10^5$  Zellen pro ml Einfriermedium. Um die EC in Kultur zu nehmen, wurde Endotheliales Wachstumsmedium-2 (EGM-2) auf  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  erwärmt, die Zellen wurden zügig im Wasserbad aufgetaut, in 5 ml Endotheliales Wachstumsmedium-2 in einem mit Gelatine beschichteten Zellkulturgefäß ( $25\text{ cm}^2$ ) ausplattiert und bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$ -Begasung inkubiert. Die Zellen wurden bei 70-80 % Konfluenz passagiert und mit einer Verdünnung von 1:4 ausplattiert. Für die Passage der HUVEC-Zellen wurden diese einmal mit 10 ml warmer PBS-Lösung im Zellkulturgefäß ( $75\text{ cm}^2$ ) gespült und mit 1,5 ml warmer TE-Lösung abgelöst. Die enzymatische Ablösung der TE-Lösung wurde durch Zugabe von 5 ml FCS-haltigem Medium gestoppt. Die Zellen wurden bei  $300 \times g$  pelletiert und im Endotheliales Wachstumsmedium-2 für weitere Passagen oder im Einfriermedium für die Lagerung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufgenommen (Nachman und Jaffe, 2004, 1973, Gordon *et al.*, 1983, Folkman *et al.*, 1979).

### 3.1.4. Zellpräparationen

#### Endotheliale Progenitorzellpräparation aus humanem Blut

Endotheliale Progenitorzellen (EPCs) wurden aus humanem peripheren Blut isoliert (Asahara, 1997, Asahara, 1999b), dazu wurden mononukleäre Zellen auf Fibronectin kultiviert und nicht adhärenenten Zellen nach 4d verworfen (Kalka, 2000, Vasa, 2001, Tepper, 2002). Die Isolierung der EPCs erfolgte modifiziert nach den Protokollen von Asahara (1997) und Dimmeler (2001), die Prozedur wird hier im Folgenden kurz beschrieben.

Blutproben wurden von jungen, gesunden, freiwilligen Spendern in Natrium-Citrat-Monovetten entnommen. Im Anschluss wurde das Blut 1:1 mit PBS-Lösung (2 % FCS) verdünnt und über Dichtegradientenzentrifugation bei  $400 \times g$  mit Lymphozytentrennmedium die Isolierung der MNC durchgeführt. Die MNC wurden zweimal mit PBS-Lösung (2 % FCS) gewaschen, dazu wurden sie bei  $300 \times g$  pelletiert. Die Zellpellets wurden in Endotheliales Wachstumsmedium (EGM) mit 10 % FCS aufgenommen und in mit Fibronectin-beschichteten Zellkulturgefäßen ( $10\text{ cm}^2$ ) mit  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ $\text{cm}^2$  in 2,5 ml ausplattiert. Das Medium wurde ab dem 4 d alle zwei Tage durch frisches ersetzt. Nach 7 d Kultivierung wurden die Zellen für Versuche aus dem Zellkulturgefäß abgelöst. Dafür wurden die Zellen einmal mit warmer PBS-Lösung im Zellkulturgefäß gespült. Durch Zugabe von 0,5 ml/10  $\text{cm}^2$   $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  warmer Accutase-Lösung wurden die EPCs 2-3 min abgelöst. Die EPCs wurden einmal mit PBS-Lösung gewaschen und bei  $300 \times g$  pelletiert. Die Zellpellets wurden abhängig von durchgeführtem Experiment in Endotheliales Basalmmedium (EBM) oder PBS-Lösung aufgenommen. Die Durchführung der Versuche erfolgte direkt im Anschluss. Abweichend von obigen Protokoll wurden die EPCs für Färbungen mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^6/\text{cm}^2$  auf mit Fibronectin beschichtete Deckgläser (Durchmesser: 14 mm) in 24-Well-Zellkulturgefäßen ausplattiert.

### 3.1.5. Kultivierung von AD-293 Zellen

Die AD-293-Zellen der Firma Stratagene sind ein Derivat der HEK293-Zellen mit verbesserter Zelladhärenz und Plaqueformation. HEK293 sind humane embryonale Nierenzellen (*human embryonic kidney cells*), die mit gescherter DNA des Adenovirus Typ 5 transformiert sind. AD-293 und HEK293 Zellen produzieren das Adenovirusgen E1 in *trans* und ermöglichen die Produktion von infektiösen Viruspartikeln, wenn die Zellen mit E1-deletierten Adenovirusvektoren (wie dem *pAdEasy-1*) transfiziert sind. AD-293-Zellen wurden bei -80°C in Einfriermedium gelagert, je  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml Einfriermedium. Um sie in Kultur zu nehmen, wurde Kulturmedium auf 37 °C erwärmt, die Zellen wurden zügig im Wasserbad aufgetaut und einmal mit Kulturmedium gewaschen. Die Zellen wurden in 15 ml Kulturmedium in Zellkulturgefäßen mit 75 cm<sup>2</sup> ausplattiert und in 25 ml bei 150 cm<sup>2</sup>. Die AD-293-Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Die Zellen wurden bei 50 % Konfluenz passagiert und mit einer Verdünnung von 1:10 ausplattiert. Für die Passage der AD-293-Zellen wurden diese einmal mit 10 ml warmer PBS-Lösung im Zellkulturgefäß (75 cm<sup>2</sup>) gespült und mit 1,5 ml warmer TE-Lösung abgelöst. Die enzymatische Ablösung der TE-Lösung wurde durch Zugabe von 5 ml FCS-haltigem Medium abgestoppt. Die Zellen wurden bei 300 x g pelletiert und im Kulturmedium für weitere Passagen oder im Einfriermedium für die Lagerung bei -80 °C aufgenommen (Graham *et al.*, 1977, Ausubel *et al.*, 1987).

### 3.1.6. Transfektion von humanen Zellen

Zur Transfektion von humanen Zellen mit DNA wurde im Rahmen dieser Arbeit das Reagenz *Fugene 6* der Fa. Roche verwendet. *Fugene 6* ist eine sterile Mischung von Lipiden und anderen Komponenten in 80 % Ethanol. Das Reagenz bildet mit der einzuführenden DNA einem Komplex, welcher von den Zellen aufgenommen werden kann. Die Durchführung der Transfektionen erfolgte strikt nach beiliegendem Protokoll. *Fugene 6* wurde bei 4-8 °C aufbewahrt, vor Gebrauch stets gut durchgemischt und auf RT gebracht. Vor der Anwendung wurde *Fugene 6* nach Vorgaben des Protokolls in serumfreiem Medium verdünnt, dabei sollte das unverdünnte Reagenz nicht direkt mit Plastikoberflächen, wie 1,5ml-Reaktionsgefäßen, in Kontakt kommen. I.d.R. wurde *Fugene 6* in einem Verhältnis von 3:1 (µl:µg) mit DNA verwendet. Die Zellen wurden im Allgemeinen bei 50-80 % Konfluenz in 6-Well-Zellkulturplatten (10 cm<sup>2</sup>) in serumhaltigen Medium (10 % FCS) transfiziert. Der *Fugene 6*:DNA-Komplex wurde stets in folgender Reihenfolge zusammenpipettiert: als erstes wurde serumfreies Medium (~75 µl) in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß vorgelegt, dann wurden 15 µl *Fugene 6* direkt in das Medium pipettiert, vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 5 µg DNA zugeben, gut vermischt und 20 min bei RT inkubiert. Der *Fugene 6*:DNA-Komplex wurde dann tröpfchenweise zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden über Nacht bei

37 °C bei CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert und am nächsten Tag wurde das Medium zu niedrig Serumbedingungen (5 % FCS) gewechselt. Nach 24-48 h konnte die Genexpression mit verschiedenen Assays getestet werden.

### 3.1.7. Markierung von EPCs für *in vivo* Experimente

Die EPCs wurden vor *in vivo* Experimenten, d. h. ihrer Injektion in Mäuse, mit dem Fluoreszenzfarbstoff TAMRA (5- und 6-Carboxytetramethyl-Rhodamin, s. auch 3.5.) gefärbt (Byersdorfer, 2001). TAMRA färbt die Zellen an, ohne ihre Funktionalität einzuschränken, und ist daher für Funktionalitätsstudien von Zellen *in vivo* geeignet. Zur Färbung mit TAMRA wurden 10<sup>7</sup> Zellen in 1 ml EBM aufgenommen und 20 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Zur Zellsuspension wurden 4 µl TAMRA-Lösung (5 mM) gegeben, vermischt und weitere 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS-Lösung gewaschen und bei 400 x g pelletiert. Die Zellen wurden in 1 ml PBS-Lösung resuspendiert und gezählt (s. 3.1.2.). Die mit TAMRA-markierten Zellen wurden nur kurz bei 37 °C gelagert, bevor sie in die Mäuse injiziert wurden (500.000 Zellen/0,3 ml).

## 3.2. Nukleinsäureanalytik

### 3.2.1. Nukleinsäureextraktion

#### Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde abhängig von Größe, benötigter Menge und Quelle mit verschiedenen Kits der Firma Qiagen isoliert. In der Tabelle 3.2. wird die Anwendung der Kits erläutert.

**Tab. 3.2. Kits zur Isolierung abhängig von Größe, Menge und Quelle des Plasmids**

Name des Kits	Plasmid			
	Größe (kb)	Volumen der Kultur( ml)	Menge (µg)	Quelle
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	0,07-10	400 mg	20	Gel
<i>QiaPrep Miniprep Kit</i>	<10	>5 ml	20	Kultur
<i>Qiagen Plasmid Mini Kit</i>	>10	>5 ml	20	Kultur
<i>Qiagen Plasmid Maxi Kit</i>	10-150	100-500 ml	500	Kultur
<i>Endofree Plasmid Maxi Kit</i>	>50	100-250 ml	500	Kultur

Die Isolierungen wurden jeweils strikt nach dem im Kit beiliegenden Protokoll des Herstellers durchgeführt. Im Folgenden werden die Protokolle kurz beschrieben, für jede Isolierung wurden Bakterienkulturen, transformiert mit dem jeweiligen Plasmid, auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotikum (siehe Tab. 3.3.) ausplattiert. Einzelne Kolonien wurden mit einer sterilen Öse abgenommen, je 5 ml LB-Medium damit angeimpft und über Nacht bei 225 rpm und 37 °C inkubiert. Präparationen bis zu 20 µg Plasmid wurden mit dieser Kultur durchgeführt,

größere Mengen Plasmid wurden aus einer Kultur isoliert, die durch Verdünnung der 5ml-Kultur (1:500 - 1:1000) in bis 500 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum eine weitere Nacht bei 225 rpm und 37 °C inkubiert wurden. Zur Konservierung der mit dem jeweiligen Plasmid transformierten Bakterien wurden 0,8 ml der 5ml-Übernachtskultur mit 0,2 ml sterilem Glycerin vermischt und in Cryoröhrchen bei -80 °C gelagert.

**Tab. 3.3. Antibiotika zur selektiven Vermehrung von Plasmiden**

Antibiotikum	Stammlösung			Arbeitslösung
	Konzentration (mg/ml)	Lösungsmittel	Lagerung	Konzentration (µg/ml)
<b>Ampicillin</b>	50	Wasser	-20 °C	100
<b>Kanamycin</b>	10	Wasser	-20 °C	50

#### ***QIAquick Gel Extraction Kit***

Das *QIAquick Gel Extraction Kit* wurde verwendet, um die unterschiedlich großen Fragmente von Plasmiden nach einem Verdau mit Restriktionsenzymen voneinander zu trennen. Dazu wurde der komplette Restriktionsansatz mit einem 0,8 % Agarosegel aufzutrennt, mit Hilfe eines mitgelaufenen Größenmarkers wurde unter UV-Licht zügig das gewünschte Fragment mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Das DNA-Fragment wurde gemäß den Herstellerangaben aus dem Gel mit den dem Kit beige packten Puffern, Lösungen und Säulen isoliert. Das eluierte Fragment der Plasmid-DNA wurde anhand eines Agarosegels überprüft und anschließend bei -20 °C gelagert. Dieses Kit wurde auch zur Trennung von PCR-Produkten von unspezifischen Produkten und Primern verwendet.

#### ***QiaPrep Miniprep Spin Kit***

Das *QiaPrep Miniprep Spin Kit* wurde angewendet, wenn Plasmide nach Klonierungsschritten und deren Vermehrung in Bakterien überprüft werden sollten oder um kleine Mengen eines bestimmten Plasmides zu erhalten. Bei Verwendung dieses Kits sollte die zu isolierende Plasmid-DNA nicht größer als 10 kb sein. Die 5ml-Übernachtskultur wurde bei 6800 x g und RT pelletiert und der Überstand verworfen. Die Plasmid-DNA wurde gemäß den Herstellerangaben aus den Bakterienzellen mit den dem Kit beige packten Puffern, Lösungen und Säulen isoliert. Die eluierte Plasmid-DNA wurde anhand eines Restriktionsverdau und Agarosegels überprüft und anschließend bei -20 °C gelagert.

#### ***Qiagen Plasmid Mini Kit***

Das *Qiagen Plasmid Mini Kit* wurde angewendet, wenn Plasmide, die größer als 10 kb waren, nach Klonierungsschritten und deren Vermehrung in Bakterien überprüft werden sollten oder um kleine Mengen eines bestimmten Plasmides zu erhalten. Die 5ml-Übernachtskultur wurde 15 min bei 6000 x g und 4 °C pelletiert und der Überstand verworfen. Die Plasmid-DNA wurde gemäß den Herstellerangaben aus den Bakterienzellen mit den dem Kit beige packten Puffern,

Lösungen und Säulen isoliert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde anhand eines Restriktionsverdau und Agarosegels, bei Bedarf auch durch Sequenzierung, überprüft und anschließend bei -20 °C gelagert.

#### ***Qiagen Plasmid Maxi Kit***

Das *Qiagen Plasmid Maxi Kit* wurde angewendet, wenn große Mengen eines Plasmides isoliert werden sollten (>500 µg). Die Plasmide wurden bei der vorhergehenden *Qiagen Plasmid Mini* Präparation überprüft, ein Teil der 5ml-Kultur wurde 1:500 – 1:1000 in 100-500 ml LB-Medium verdünnt und über Nacht bei 225 rpm und 37 °C inkubiert. Das Volumen der Kultur wurde abhängig vom *origin of replication* des Plasmides gewählt, dieser reguliert die Kopienzahl des Plasmides in einer Bakterienzelle. Ein *high copy* Plasmid liegt in 300-1000 Kopien pro Zelle vor, während ein *low copy* Plasmid mit bis zu 20 Kopien vorkommt. Bei Isolierung eines *high copy* Plasmides wurden 100 ml Kultur und bei einem *low copy* Plasmid 500 ml verwendet.

Die Übernachtskultur wurde in mehreren Schritten in einem 50ml-Reaktionsgefäß 15 min bei 6000 x g und 4 °C pelletiert und der Überstand verworfen. Die Plasmid-DNA wurde gemäß den Herstellerangaben aus den Bakterienzellen mit den dem Kit beigegepackten Puffern, Lösungen und Säulen isoliert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde anhand eines Restriktionsverdau und Agarosegels, bei Bedarf auch durch Sequenzierung, überprüft und anschließend bei -20 °C gelagert.

#### ***Endofree Plasmid Maxi Kit***

Das *Endofree Plasmid Maxi Kit* wurde angewendet, wenn große Mengen von endotoxinfreier Plasmid-DNA isoliert werden sollten (>500 µg). Als Endotoxine bezeichnet man die Lipopolysaccharide der bakteriellen Membran, sie werden bei Lyse der Bakterien in großen Mengen freigesetzt. Endotoxine haben ähnliche chemische Eigenschaften wie Plasmid-DNA und werden in herkömmlichen Verfahren mit ihr koinzidiert. Da Endotoxine die Transfektionseffizienz von Plasmiden reduzieren und bei systemischer Gabe in Organismen (Tiere, Menschen) eine schwere Reaktion des Immunsystems auslösen, wurde dieses Kit zur Entfernung der Endotoxine während der Plasmidisolierung eingesetzt. Die endotoxinfreie Plasmid-DNA wurde für die Transfektion von eukaryotischen Zellen verwendet, da so eine deutlich verbesserte Transfektionseffizienz erreicht wurde. Das Plasmid wurde bei der vorhergehenden *Qiagen Plasmid Mini* Präparation überprüft, ein Teil der 5 ml Kultur wurde 1:500 - 1:1000 in 100-250 ml LB-Medium verdünnt und über Nacht bei 225 rpm und 37 °C inkubiert. Das Volumen der Kultur wurde abhängig vom *origin of replication* des Plasmides gewählt, dieser reguliert die Kopienzahl des Plasmides in einer Bakterienzelle. Ein *high copy* Plasmid liegt in 300-1000 Kopien pro Zelle vor, während ein *low copy* Plasmid mit bis zu 20

Kopien vorkommt. Bei Isolierung eines *high copy* Plasmides wurden 100 ml Kultur und bei einem *low copy* Plasmid 250 ml verwendet.

Die Übernachtskultur wurde in mehreren Schritten in einem 50ml-Reaktionsgefäß 15 min bei 6000 x g und 4 °C pelletiert und der Überstand verworfen. Die Plasmid-DNA wurde gemäß den Herstellerangaben aus den Bakterienzellen mit den dem Kit beigegepackten Puffern, Lösungen und Säulen isoliert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde anhand eines Restriktionsverdau und Agarosegels, bei Bedarf auch durch Sequenzierung, überprüft und anschließend bei -20 °C gelagert.

### **Isolierung von RNA**

Die Isolierung von RNA ist schwierig, da RNasen ubiquitär vorkommen, welche RNA sehr effizient abbauen. RNasen werden von allen Organismen als Schutz vor RNA-Viren produziert und sekretiert. Sie lassen sich nur schwer von Materialien entfernen, da es sich um sehr widerstandsfähige Enzyme handelt. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit DEPC-Wasser und RNase-freie Einwegmaterialien (Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße) der Firma Ambion oder Eppendorf zur RNA-Isolierung verwendet. DEPC-Wasser wurde durch die Zugabe von Diethylpyrocarbonat (1:1000) zu Wasser, Inkubation über Nacht unter ständigem Rühren und anschließendes Autoklavieren hergestellt, dabei wurden die RNasen inaktiviert. Die Isolierung von RNA erfolgte mit dem Reagenz *peqGOLD TriFast* aus Zellen der *in vitro* Kultur. *peqGOLD TriFast* ist eine einphasige Lösung der Firma peqlab auf der Basis von Phenol und Guanidinisothiocyanat zur Extraktion von RNA, DNA und Proteinen aus allen Materialien humanen, tierischen, pflanzlichen, bakteriellen und viralen Ursprungs.

Die Zellen wurden direkt aus der Zellkultur in der *peqGOLD TriFast* Lösung lysiert, dafür wurden nicht-adhärenente Zellen durch Zentrifugation bei 300 x g pelletiert und adhärenente Zellen wurden von Medium befreit. In der Regel wurden Zellen aus 6-Well-Zellkulturplatten oder 60cm<sup>2</sup>-Zellkulturplatten verwendet, dabei wurde 1ml *peqGOLD TriFast* Lösung je 6-Well verwendet und 2 ml je 60 cm<sup>2</sup>-Zellkulturplatte. Die RNA wurde gemäß den Herstellerangaben aus den lysierten Zellen durch Zugabe von Chloroform und Waschen mit Isopropanol und Ethanol isoliert. Die RNA wurde in 20 µl DEPC-Wasser gelöst und ihre Qualität anhand eines Agarosegels überprüft und anschließend bei -80 °C gelagert.

### **3.2.2. Nukleinsäureaufreinigung**

#### **Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Methode**

Diese Methode wurde verwendet, wenn Nukleinsäuren von Proteinen oder Pufferrückständen wie Salzen getrennt werden sollten (Lottspeich *et. al.*, 1998, Gassen *et. al.*, 1999, Mühlhardt, 2002). Die Nukleinsäurelösung wurde im Verhältnis 1:1 mit einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1) vermischt und 2 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Die

Zentrifugation führte zur Bildung von drei Phasen. Die obere, wässrige Phase enthielt die Nukleinsäure und wurde, ohne die untere, organische Phase und Interphase zu stören, abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Phenolreste in der Nukleinsäurehaltigen, wässrigen Phase wurden mit einer Natriumacetat-Ethanol-fällung entfernt, dafür wurden 2,5 Volumen 100 % Ethanol, 1 µl Glycogen (je 350 µl) und 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M) zugeben, vermischt und 2 h bei -80 °C inkubiert. Die Nukleinsäuren wurden 30 min bei 12.000 x g und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol 20 min bei 13.000 x g und 4 °C gewaschen und bei 37 °C getrocknet. Die DNA wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 3.2.3. Analyse von Nukleinsäuren

#### Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde photometrisch bestimmt. Das Absorptionsmaximum von DNA (RNA) liegt bei der Wellenlänge 260 nm, eine Extinktion von 1,0 bei dieser Wellenlänge entspricht einer Konzentration von 50 (40) µg/ml. Daraus ergibt sich unter Einbezug des Verdünnungsfaktors  $f$  und bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm folgende Formel zur Berechnung der DNA (RNA)-Konzentration einer Lösung:

$$\Delta E_{260-320} \times 50 (40) \times f = \mu\text{g DNA (RNA)/ml}$$

Zur photometrischen Bestimmung der Nukleinsäurelösung wurde die Extinktion der Lösung bei den Wellenlängen 260 nm, 280 nm und 320 nm bestimmt. Anhand dieser Messwerte ließ sich zusätzlich die Qualität der DNA (RNA) beurteilen. Bei der Wellenlänge 280 nm liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen. Bei einer reinen DNA(RNA)-Lösung beträgt der Quotient von  $E_{260}/E_{280}$  1,8-2,0, wenn die DNA-Lösung zu etwa 50 % Proteine enthält, liegt er bei 1,5. Die Extinktion bei der Wellenlänge 320 nm ist ein Indiz für die Verunreinigung der DNA(RNA)-Lösung z. B. mit Salzen. Der Extinktionswert  $E_{320}$  sollte bei annähernd 0 liegen. Die Nukleinsäurelösung wurde in der Regel 1:50 - 1:100 in Wasser verdünnt und die Extinktion in Quarzküvetten gemessen, da diese keine Eigenabsorption bei den verwendeten Wellenlängen haben (Lottspeich *et. al.*, 1998, Gassen *et. al.*, 1999).

#### Restriktionsanalyse von Nukleinsäuren

Die Restriktionsanalyse ist ein wichtiges Verfahren zur Charakterisierung, Identifizierung und Isolierung doppelsträngiger DNA (dsDNA). Das Verfahren wurde zur Herstellung der zur Klonierung verwendeten DNA-Fragmente und zur Identifizierung der entstandenen Klonierungsprodukte eingesetzt. In Tabelle 3.4. sind die Erkennungssequenzen, Temperaturoptima und die Art der Schnittstelle der verwendeten Restriktionsenzyme aufgelistet.

**Tab. 3.4. Charakteristika der verwendeten Restriktionsenzyme**

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz* / Schnittstelle	Temperatur-Optimum	BSA-Lösung	Art der Schnittstelle
<i>BamH I</i>	G <sup>▼</sup> GATCC CCTAG <sup>▲</sup> G	37 °C	ja	kohäsiv
<i>EcoR I</i>	G <sup>▼</sup> AATTC CTTAA <sup>▲</sup> G	37 °C	nein	kohäsiv
<i>EcoR V</i>	GAT <sup>▼</sup> ATC CTA <sup>▲</sup> TAG	37 °C	ja	glatt
<i>Hind III</i>	A <sup>▼</sup> AGCTT TTCGA <sup>▲</sup> A	37 °C	nein	kohäsiv
<i>Nhe I</i>	G <sup>▼</sup> CTAGC CGATC <sup>▲</sup> G	37 °C	ja	kohäsiv
<i>Pac I</i>	TTAAT <sup>▼</sup> TAA AAT <sup>▲</sup> TAATT	37 °C	ja	kohäsiv
<i>Pme I</i>	GTTT <sup>▼</sup> AAAC CAAA <sup>▲</sup> TTTG	37 °C	ja	glatt
<i>Sac I</i>	GAGCT <sup>▼</sup> C C <sup>▲</sup> TCGAG	37 °C	ja	kohäsiv
<i>Xba I</i>	T <sup>▼</sup> CTAGA AGATC <sup>▲</sup> T	37 °C	ja	kohäsiv
<i>Xho I</i>	C <sup>▼</sup> TCGAG GAGCT <sup>▲</sup> C	37 °C	ja	kohäsiv

\*Der obere Teil der Erkennungssequenz wurde konventionsgemäß von 3'-5'-Richtung angegeben.

Der Restriktionsansatz enthielt im Allgemeinen die dsDNA, das Restriktionsenzym, den optimalen Puffer (wurde mit Enzym geliefert) und abhängig vom verwendeten Enzym auch BSA-Lösung zur optimalen Funktionalität. Die Restriktion wurde beim Temperaturoptimum des verwendeten Enzyms für eine vom Experiment abhängige Dauer (meist 1 h) durchgeführt. Beim Einsatz von zwei Restriktionsenzymen ist zu beachten, dass diese möglicherweise verschiedene Puffer, Temperaturen oder BSA-Lösung benötigen. Die Hersteller von Restriktionsenzymen bieten für diesen Fall Tabellen an (siehe Abschnitt 7.7., Tab. 7.5), in denen die Enzyme einander gegenübergestellt sind und der optimale Puffer einer Enzym-Enzym-Kombination abgelesen werden kann. In Tabelle 3.5. wird beispielhaft ein Restriktionsansatz unter Verwendung von *EcoR V* und *BamH I* gezeigt.

**Tab. 3.5. Restriktionsansatz mit *EcoR V* und *BamH I***

Reagenz	Volumen (µl)
DNA-Lösung (1-2 µg)	10
NEB <i>BamH I</i> -Puffer (10x)	2
BSA-Lösung (10x)	2
<i>EcoR V</i> (10 U)	1
<i>BamH I</i> (10 U)	1
destilliertes Wasser	4
Σ	20

Dieser Ansatz würde für eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, mit 5 µl Ladepuffer vermischt und mit einem Agarosegel analysiert werden. Die Aktivität einer Enzymlösung wird in U (*unit*, Einheit) abgegeben und ist definiert über die Fähigkeit 1 µg DNA in einer Stunde in 50 µl Reaktionsvolumen unter optimalen Pufferbedingungen komplett zu spalten (Lottspeich *et al.*, 1998, Gassen *et al.*, 1999).

### Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Gelelektrophorese ist die wichtigste Methode zur Analyse von Nukleinsäuren, da eine schnelle und preiswerte Untersuchung bei großer Genauigkeit möglich ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Agarose zur Analyse von Nukleinsäuren verwendet. Die Agarose wurde entsprechend der Größe der zu analysierenden Nukleinsäuren laut Tab. 3.6. im 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle ungefähr 5 min bei 800 W gekocht, bis sich die Agarose aufgelöst hatte. Die Lösung wurde auf 50-60 °C abgekühlt, mit Ethidiumbromid versetzt (finale Konzentration: 0,5 µg/ml) und in die vorbereiteten Gelkammern (Volumen: max. 100 ml) gegossen. Das feste Gel wurde in die Elektrophorese-Kammer gelegt und die Kammer mit 1x TAE-Puffer befüllt. Die zu untersuchende Nukleinsäure wurde mit Ladepuffer vermischt und die Taschen mit den Proben beladen. Zusätzlich zu den Proben wurde eine Tasche mit einem DNA-Längenstandard geladen, dieser enthält eine Mischung von DNA-Fragmenten, deren Größen bekannt sind. Die Spannung wurde angelegt und nach 45-60 min konnte in der Regel mit UV-Licht ein Bild von den aufgetrennten Nukleinsäuren gemacht werden. Das dem Gel zugegebene Ethidiumbromid interkaliert zwischen den DNA-Doppelsträngen und macht DNA unter UV-Licht gut sichtbar, und der mitgelaufene DNA-Längenstandard ermöglicht eine Größenbestimmung (Lottspeich *et al.*, 1998, Gassen *et al.*, 1999, Mühlhardt, 2002).

**Tab. 3.6. Auftrennung von Nukleinsäuren abhängig von der Agarose-Konzentration**

Agarose-Konzentration (in % w/v)	Auftrennungsbereich linearer dsDNA (kb)
0,3	5- 60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

(nach Maniatis *et al.*, 1982)

### Sequenzierungen von Nukleinsäuremolekülen

Die Bestimmung der Sequenz von DNA-Molekülen, z.B. eines Plasmides, wurde durchgeführt, um Zwischen- oder Endprodukte einer Klonierung zu überprüfen. Die zu analysierende DNA wurde zusammen mit den entsprechenden *Primern* an die Firma MWG-Biotech, Ebersberg, geschickt, um dort mit automatisierten Sequenzierern nach dem Sanger-Verfahren analysiert zu

werden. Der Leserahmen der dort verwendeten Sequenzierer liegt bei 500 bis 1000 bp. Die zur Sequenzierung verwendeten *Primer* sind im Anhang unter 7.5. in der Tabelle 7.3 aufgelistet. Die zu analysierende DNA wurde nach den unter 3.2.1. und 3.2.2. beschriebenen Methoden isoliert und analysiert, bevor sie zur Sequenzierung eingeschickt wurde.

### 3.2.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur spezifischen Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Die Methode ermöglicht eine spezifische, hohe Ausbeute eines DNA-Fragments bei hoher Sensitivität. Die Spezifität der Reaktion wird durch *Primer* vorgegeben. *Primer* sind synthetisch hergestellte DNA-Oligonukleotide mit einer Länge von 20-30 Basen. Durch spezifische Hybridisierung der *Primer* an die komplementären Bereiche der DNA-Matrize wird der Bereich der Amplifikation festgelegt. Der *Primer* in 5'-3'-Richtung der DNA heißt *forward Primer* und der in 3'-5'-Richtung *reverse Primer*. Die PCR wird in der Regel mit 20-40 Zyklen durchgeführt, dabei besteht jeder Zyklus aus Denaturierung, Hybridisierung und Elongation. Die Denaturierung erfolgt bei 95 °C, dabei lösen die zwei komplementären DNA-Stränge voneinander. Bei der Hybridisierung verbinden sich die *Primer* mit den komplementären Sequenzen der DNA-Einzelstränge, sie wird *Primer*-abhängig bei 50-60 °C durchgeführt. Die Elongation erfolgt bei 72 °C, dem Temperatur-Optimum der *Taq*-DNA-Polymerase. Die dem Reaktionsgemisch beigefügten Desoxynucleotidtriphosphate werden von der *Taq*-DNA-Polymerase an den *Primer* komplementär zum DNA-Einzelstrang gebunden. Dann beginnt der Zyklus erneut mit der Denaturierung der DNA-Doppelstränge. Die Amplifikation der DNA-Fragmente findet annähernd exponentiell statt, d.h. die Anzahl der durch die *Primer* begrenzten DNA-Fragmente verdoppelt sich mit jedem Zyklus.

Die PCR wird in Thermocyclern durchgeführt, sie können mit den für PCR notwendigen Zeiten, Temperaturen und Anzahl der Zyklen programmiert werden. In Tab 3.7. wird ein typisches PCR-Programm dargestellt.

**Tab. 3.7. Allgemeines PCR-Programm**

	Temperatur	Zeiten	} 20-40 Zyklen
<b>initiale Denaturierung</b>	95 °C	5 min	
<b>Denaturierung</b>	95 °C	0.30-1 min <sup>**</sup>	
<b>Hybridisierung</b>	50-60 °C <sup>*</sup>	0.30-1.30 min <sup>**</sup>	
<b>Elongation</b>	72 °C	0.30-1.30 min <sup>**</sup>	
<b>finale Elongation</b>	72 °C	5 min	

<sup>\*</sup>abhängig von der *Primer*sequenz <sup>\*\*</sup>abhängig von der Größe des Produktes

Für die Amplifikation von DNA mit der Methode der PCR werden zusätzlich zur DNA-Matrize, *Primern* und *Taq*-DNA-Polymerase Desoxynucleotidtriphosphate, ein Puffer und

Magnesiumchlorid ( $MgCl_2$ ) zu optimalen Funktionalität der PCR-Reaktion und optional DMSO oder *Q-Solution* (Fa. Qiagen) zur verbesserten Denaturierung der DNA-Stränge benötigt. In der Tabelle 3.8. wird die allgemeine Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes aufgelistet. Prinzipiell wurde ein Ansatz für alle Proben zusammenpipettiert und in 0,2ml-PCR-Reaktionsgefäßen vorgelegt. Die Tabelle 3.8. zeigt beispielhaft die Zusammensetzung, wenn eine PCR mit zehn Proben durchgeführt wurde. Die DNA-Matrize wurde zum Abschluss zum jeweiligen beschrifteten PCR-Reaktionsgefäß gegeben, Plasmide und genomische DNA wurden für ein spezifischeres PCR-Ergebnis verdünnt. Die Proben wurden gut vermischt, in den programmierten Thermocycler platziert und das dem Einsatz entsprechende PCR-Programm gestartet. Laut der Beispielrechnung in Tab. 3.8. würden 21  $\mu$ l in jedes PCR-Reaktionsgefäß und dann 4  $\mu$ l DNA-Lösung dazu pipettiert.

**Tab. 3.8. Standard-PCR-Probenzusammensetzung**

	für eine Probe	für zehn Proben
Reagenz	Volumen ( $\mu$ l)	
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase-Puffer (10x)	2,5	25
dNTP-Lösung (10 mM)	0,5	5
$MgCl_2$ -Lösung (25 mM)	1,5	15
<i>forward Primer</i> -Lösung (100 $\mu$ M)	1	10
<i>reverse Primer</i> -Lösung (100 $\mu$ M)	1	10
<i>Q-Solution</i>	5	50
DNA-Matrize (cDNA 1:4)	4	
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase*	0,1	1
Wasser	9,4	94
$\Sigma$	25	210

\*rekombinant von der Fa. Qiagen

Bei jeder PCR sollten sowohl eine Probe ohne DNA-Matrize (zur Detektion möglicher Kontaminationen) und eine Probe mit bereits getesteter DNA-Matrize (zur positiven Kontrolle der PCR-Bedingungen) mitgeführt werden. Im Falle eines nicht erhaltenen PCR-Produktes können so erste Rückschlüsse auf mögliche Fehlerquellen gemacht werden. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese und anschließender UV-Licht-basierter Bilddokumentation (Lottspeich *et. al.*, 1998, Gassen *et. al.*, 1999, Mühlhardt, 2002).

### Reverse Transkriptions-PCR

Die Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR) wurde in zwei Schritten durchgeführt: Im ersten wurde die isolierte RNA in DNA umgeschrieben und im zweiten wurde die erhaltene DNA in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Die reverse Transkription ist die Übersetzung von RNA in cDNA (komplementäre DNA, *complementary DNA*). Dieser Vorgang wird durch reverse

Transkriptasen katalysiert, diese RNA-abhängigen DNA-Polymerasen synthetisieren mit Hilfe von *Primern* an einem RNA-Strang einen komplementären DNA-Strang. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die reverse Transkription mit dem *SuperScript III First-Strand Synthesis System* der Firma Invitrogen durchgeführt. Die reverse Transkription erfolgte strikt nach dem System beiliegenden Protokoll, in Tab. 3.9. ist der Ablauf und die Zusammensetzung des cDNA-Synthese-Mixes skizziert. Die Reaktion wurde mit den mitgelieferten *Random Hexamer-Primern* durchgeführt, diese bestehen aus einer zufälligen Sequenz von Nukleotiden und binden an verschiedenen Stellen der RNA. Die reverse Transkription wurde in fünf Schritten durchgeführt: Im ersten wurden die Sekundärstrukturen der RNA denaturiert, im zweiten wurden die *Primer* mit der RNA hybridisiert und im dritten wurde die cDNA mittels RTase und *Random Hexamer-Primern* synthetisiert. Der vierte Schritt diente der Termination der Synthesereaktion und im fünften wurde die RNA durch Zugabe des Enzyms RNase H abgebaut. Die cDNA-Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Bei gleichzeitiger reverser Transkription von verschiedenen Proben eines Experimentes wurde von allen Proben stets die gleiche Menge RNA zur besseren Vergleichbarkeit eingesetzt.

**Tab. 3.9. Durchführung der Reversen Transkription\***

Schritt		Reagenz	Volumen (µl)
		RNA (1pg-5µg)	8
		<i>Random hexamer-Primer</i> (50 µM)	1
		dNTP-Lösung (10 mM)	1
1.	Denaturierung	65 °C für 5 min	
		auf Eis für 1 min	
		<b>Zugabe von 10 µl cDNA Synthesis Mix mit folgender Zusammensetzung:</b>	
		RT-Puffer (10x)	2
		MgCl <sub>2</sub> -Lösung (25 mM)	4
		DTT (0,1 M)	2
		RNaseOUT	1
		SuperScript III RT	1
2.	Hybridisierung	25 °C für 10 min	
3.	cDNA-Synthese	50 °C für 50 min	
4.	Termination	85 °C für 5 min	
5.	RNA-Abbau	Zugabe von 1 µl RNase H	
		37 °C für 20 min	
		Aufbewahrung bei -20 °C	

\* nach Protokoll der Fa. Invitrogen

Die cDNA-Lösung wurde mit allen enthaltenen Molekülen (Nukleotide, Enzyme etc.) in die PCR eingesetzt, dafür wurde sie 1:4 mit Wasser verdünnt. Die Sequenzen der zur RT-PCR verwendeten genspezifischen *Primer*, deren Hybridisierungstemperaturen und die Produktgrößen

sind in der Tab. 7.4 im Anhang aufgelistet und das verwendete RT-PCR-Programm ist in Tab. 3.10. gezeigt. Abweichend von diesem Programm wurde die RT-PCR der 18SrRNA mit einer Primerabhängigen niedrigeren Hybridisierungstemperatur von 57 °C und weniger Zyklen (20-25) durchgeführt, da die 18SrRNA mit einer größeren Häufigkeit als die übrigen untersuchten Gene vorkommt. Die 18SrRNA-RT-PCR diente als Standard innerhalb der RT-PCR-Experimente, um die Genexpression der Proben anhand ihrer 18SrRNA-Expression zu normalisieren. Die 18SrRNA stellt eine gute interne Kontrolle in der relativen RT-PCR dar, da sie eine konstante Expression in allen untersuchten Proben unabhängig von ihrer Behandlung aufweist (Selvey *et al.*, 2001, Goidin *et al.*, 2001).

**Tab. 3.10. RT-PCR-Programm**

	Temperatur	Zeiten	} 27-35 Zyklen*
<b>initiale Denaturierung</b>	95 °C	5 min	
<b>Denaturierung</b>	95 °C	1 min	
<b>Hybridisierung</b>	60 °C	1 min	
<b>Elongation</b>	72 °C	1.30 min	
<b>finale Elongation</b>	72 °C	7 min	

\*abhängig von der relativen Häufigkeit des Genes

### Amplifikation sehr langer und fehlerfreier PCR-Produkte

Die Synthese sehr langer, fehlerfreier PCR-Produkte (>1 kb) wird durch die fehlende Korrekturaktivität (3'-5'-Exonuclease-Aktivität, *proof reading*) der *Taq*-DNA-Polymerase und ihre hohe Fehlerrate (1:100.000) eingeschränkt. Dieses Problem wird durch die Nutzung einer DNA-Polymerase mit 3'-5'-Exonuclease-Aktivität gelöst. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Herculase *enhanced DNA polymerase* der Fa. Stratagene verwendet. Dabei handelt es sich um ein Enzymgemisch mit einem großen Anteil *Pfu*-DNA-Polymerase, isoliert aus dem Bakterium *Pyrococcus furiosus*, und einem kleinen Anteil *Taq*-DNA-Polymerase. Die *Pfu*-DNA-Polymerase hat in Gegensatz zur *Taq*-DNA-Polymerase eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität, jedoch eine geringere Prozessivität, weshalb zur erhöhten Effizienz der Synthese ein Gemisch aus beiden Enzymen verwendet wird. Die PCR mit der Herculase *enhanced DNA polymerase* wird abweichend vom Standard-PCR-Protokoll ohne Zugabe von MgCl<sub>2</sub>-Lösung oder DMSO nur mit dem mitgelieferten Reaktionspuffer durchgeführt. Dieser veränderte PCR-Ansatz ist in Tabelle 3.11. skizziert.

**Tab. 3.11. Herculase enhanced DNA-Polymerase -PCR-Ansatz**

Reagenz	Volumen ( $\mu$ l)
Herculase Reaktions-Puffer (10x)	5
dNTP-Lösung (10 mM)	1
<i>forward Primer</i> -Lösung (100 $\mu$ M)	1
<i>reverse Primer</i> -Lösung (100 $\mu$ M)	1
DNA-Matrize (Plasmid-DNA 1:500)	1
Herculase enhanced DNA polymerase	0,5
Wasser	40,5
$\Sigma$	50

Das PCR-Programm zur Verwendung der Herculase enhanced DNA polymerase ist in Tab. 3.12. dargestellt. Bei anschließender Klonierung wurde das PCR-Produkt über ein Agarosegel aufgereinigt, so konnten eventuelle unspezifische Nebenprodukte der PCR entfernt werden. Das richtige PCR-Produkt wurde mit Hilfe des mitgelaufenen Größenstandards identifiziert, aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (s. 3.2.1.) aufgereinigt.

**Tab. 3.12. Herculase enhanced DNA-Polymerase-PCR-Programm**

	Temperatur	Zeiten	} 25 Zyklen *
<b>initiale Denaturierung</b>	95 °C	2 min	
<b>Denaturierung</b>	95 °C	30 sek	
<b>Hybridisierung</b>	65 °C	30 sek	
<b>Elongation</b>	72 °C	2 min	
<b>finale Elongation</b>	72 °C	5 min	

### 3.2.5. Amplifikation von Plasmiden

Plasmide sind zirkuläre, doppelsträngige DNA-Moleküle, die sich unabhängig vom bakteriellen Genom in Bakterien vermehren können. Plasmide finden heute vielfach Einsatz in der Biotechnologie und sind ihrer Funktion entsprechend modifiziert. Sie enthalten in der Regel einen Replikationsstart (*origin of replication, ori*), der die Replikation ermöglicht, ein Gen zur Selektion, meist eine Antibiotikaresistenz, und eine Stelle zur Klonierung von DNA-Fragmenten (*multiple cloning site*), die aus zehn bis zwanzig Erkennungssequenzen verschiedener, im Plasmid einmal schneidender Restriktionsenzyme besteht. Die Transformation von Bakterien mit Plasmiden erfolgte, um Plasmide in großer Anzahl korrekt zu vervielfältigen. Das bakterielle Wachstum ist unter optimalen Bedingungen exponentiell und hat somit auch die starke Vermehrung der Plasmide zur Folge. Weiterhin haben Bakterien Enzyme zur Korrektur von eventuellen Schäden der (Plasmid-)DNA. So lassen sich große DNA-

Fragmente kostengünstig und fehlerfrei in großen Mengen vermehren (Lottspeich *et. al.*, 1998, Gassen *et. al.*, 1999, Mühlhardt, 2002).

### **Transformation von Bakterien**

Als Transformation wird der Vorgang bezeichnet, bei dem DNA, meist in Form von Plasmiden, in ein Bakterium eingeschleust wird. Transformationen wurden entweder mit der Methode der Elektroporation oder des Calciumchlorid-Hitzeschocks durchgeführt. Bei der Calciumchlorid-Hitzeschock-Methode wurden die Zellwände der Bakterien durch Behandlung mit divalenten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen permeabilisiert. Diese kompetenten Bakterien wurden mit der zu transformierenden DNA inkubiert und einem kurzen Hitzeschock von 30-120 sek bei 42 °C ausgesetzt. Die Methode der Elektroporation wurde mit entsalzener Bakterienlösung und DNA in einer Elektroküvette mit einem Elektroporator bei 2,5 kV, 25  $\mu\text{F}$  und 200  $\Omega$  durchgeführt (Lottspeich *et. al.*, 1998, Gassen *et. al.*, 1999, Mühlhardt, 2002). In Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden kompetente Zellen der Firmen Invitrogen und Stratagene verwendet und entsprechend der Kompetenz der verwendeten Zellen mit einem der oben genannten Verfahren mit Plasmiden transformiert.

#### ***MAX Efficiency DH5a competent cells***

Die *MAX Efficiency DH5a competent cells* wurden von der Firma Invitrogen bezogen und strikt nach dem beiliegenden Protokoll transformiert. *MAX Efficiency DH5a competent cells* sind chemisch kompetente Bakterien für allgemeine Klonierungsexperimente und Re-Transformationen, wenn z.B. Plasmidvektoren vervielfältigt werden sollten. Die chemisch kompetenten Zellen wurden bei -80 °C gelagert und zur Verwendung auf Eis aufgetaut. Je 100  $\mu\text{l}$  der aufgetauten Zellen wurden in Polypropylen-Reaktionsgefäße auf Eis pipettiert. Zu den Bakterien wurden 1  $\mu\text{l}$  DNA-Lösung mit 1-10 ng Plasmid gegeben, wobei Ligationsansätze zuvor 1:5 verdünnt wurden, und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde bei 42 °C 45 sek lang durchgeführt und die transformierten Zellen wurden 2 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden zur Regeneration mit 0,9 ml SOC-Medium versetzt und 1 h bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Die Bakterienlösung wurde mit verschiedenen Volumina, i.d.R. 50  $\mu\text{l}$ , 150  $\mu\text{l}$  und 800  $\mu\text{l}$  des Ansatzes, auf LB-Agar-Platten, mit dem Selektionsgen des Plasmids entsprechenden Antibiotikum versetzt, ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden einzelne Kolonien von mittlerer Größe gepickt und in 5ml-LB-Kulturen mit entsprechendem Antibiotikum kultiviert. Weitere Analysen erfolgten nach den unter 3.2.3. beschriebenen Verfahren.

#### ***XL10-Gold ultracompetent cells***

Die *XL10-Gold ultracompetent cells* wurden von der Firma Stratagene bezogen und strikt nach dem beiliegenden Protokoll transformiert. *XL10-Gold ultracompetent cells* sind chemisch kompetente Bakterien mit dem Hte-Phänotyp für die besonders effiziente Transformation von

sehr großen und ligierten Plasmiden. Die chemisch kompetenten Zellen wurden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und zur Verwendung auf Eis aufgetaut.  $100\text{ }\mu\text{l}$  der aufgetauten Zellen wurden in Polypropylen-Reaktionsgefäße auf Eis pipettiert und jeweils mit  $4\text{ }\mu\text{l}$  mitgelieferten  $\beta$ -Mercaptoethanol vermischt. Dieser Ansatz wurde 10 min auf Eis inkubiert und alle 2 min dabei vermischt. Zu diesem Ansatz wurden  $0,1\text{-}50\text{ ng}$  DNA oder  $2\text{ }\mu\text{l}$  eines Ligationsansatzes gegeben, vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde bei  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 sek lang durchgeführt und die transformierten Zellen wurden 2 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden zur Regeneration mit  $0,9\text{ ml}$  auf  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  vorgewärmten NZY<sup>+</sup>-Medium versetzt und 1 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 225 rpm geschüttelt.  $5\text{ }\mu\text{l}$ ,  $25\text{ }\mu\text{l}$  und  $100\text{ }\mu\text{l}$  der Bakterienlösung wurden auf LB-Agar-Platten, mit dem Selektionsgen des Plasmids entsprechenden Antibiotikum versetzt, ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden einzelne Kolonien von mittlerer Größe gepickt und in 5ml-LB-Kulturen mit entsprechendem Antibiotikum kultiviert. Weitere Analysen erfolgten nach dem unter 3.2.3. beschriebenen Verfahren.

#### ***BJ5183-AD-1 Electroporation competent cells***

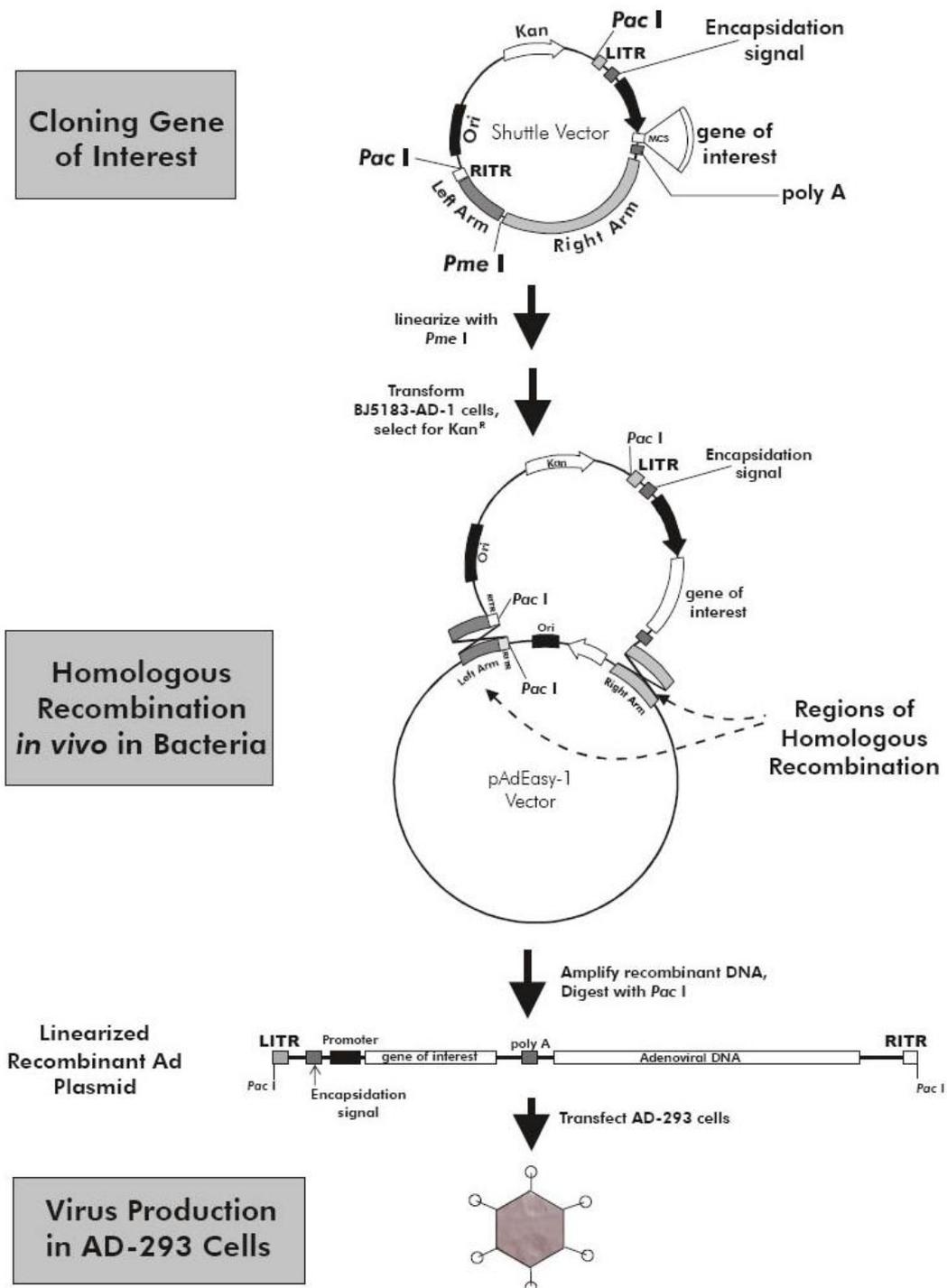
Die *BJ5183-AD-1 Electroporation competent cells* wurden von der Firma Stratagene bezogen und strikt nach dem beiliegenden Protokoll transformiert. *BJ5183-AD-1 Electroporation competent cells* sind elektrokompetente Bakterien, die das *pAdEasy-1* Plasmid enthalten und im Zusammenhang mit dem *Adeasy XL Adenoviral Vector System* der Firma Stratagene (s. Abschnitt 3.3.) verwendet wurden. Die *BJ5183-AD-1 Electroporation competent cells* wurden mit einem *Shuttle*-Vektor des Systems transformiert, in den das gewünschte Gen kloniert worden war. In den kompetenten Zellen findet die homologe Rekombination zwischen dem *Shuttle*-Vektor und dem *pAdEasy-1* Plasmid statt, daraus entstehen unter anderen Klone, die ein *pAdEasy-1* Plasmid mit dem gewünschten Gen enthalten. Diese Plasmide können zur Adenovirusproduktion in einer geeigneten Zelllinie (AdHEK 293) verwendet werden. Die produzierten Adenoviren können zur Expression des gewünschten Genes in eukaryotischen Zellen genutzt werden. Die elektrokompetenten Zellen wurden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und zur Verwendung auf Eis aufgetaut. Für jeden Transformationsansatz wurde eine Elektroküvette ( $0,2\text{ cm}$  Elektrodenabstand) und ein  $1,5\text{ml}$ -Reaktionsgefäß auf Eis platziert und der Elektroporator auf folgende Parameter eingestellt:  $2,5\text{ kV}$ ,  $25\text{ }\mu\text{F}$  und  $200\text{ }\Omega$ . Je  $40\text{ }\mu\text{l}$  der aufgetauten Zellen wurden in einem gekühlten  $1,5\text{ml}$ -Reaktionsgefäß zusammen mit  $1\text{ }\mu\text{l}$  *PmeI*-linearisierten *Shuttle*-Vektor ( $0,05\text{-}0,1\text{ }\mu\text{g}$ ) pipettiert und vermischt. Dieser Ansatz wurde in die gekühlte Elektroküvette überführt und die Elektroporation mit den obigen Parametern durchgeführt. Zur Reeneration der Bakterien wurden sofort  $1\text{ ml}$  steriles LB-Medium zugeben, in ein steriles  $15\text{ml}$ -Reaktionsgefäß pipettiert und 1 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 225 rpm inkubiert. Die Bakterienlösung wurde mit verschiedenen Volumina, i. d. R.  $50\text{ }\mu\text{l}$ ,  $150\text{ }\mu\text{l}$  und  $800\text{ }\mu\text{l}$  des Ansatzes, auf LB-Agar-Platten, mit dem Selektionsgen des Plasmids entsprechenden Antibiotikum versetzt,

ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden einzelne Kolonien von kleiner bis mittlerer Größe gepickt und in 5ml-LB-Kulturen mit entsprechendem Antibiotikum kultiviert. Das weitere Verfahren der adenoviralen Produktion ist unter 3.3. beschrieben.

### 3.3. Herstellung adenoviraler Konstrukte

Die Einsatzmöglichkeiten von Adenoviren sind vielseitig, sie eignen sich für den Transfer und die Expression von Genen *in vitro*, zur Beimpfung *in vivo* und zur Gentherapie (He TC, *et al.*, 1998, Benihoud K, *et al.*, 1999). Adenoviren sind in der Lage viele verschiedene Typen von Säugetierzellen zu infizieren und erreichen in der Virusproduktion hohe Titer von  $10^7$  bis  $10^8$  pfu/ml (*plaque forming units*, infektiöse Partikel). Im Gegensatz zu anderen viralen Systemen können Adenoviren auch nicht-teilende Zellen infizieren und der verwendete Adenovirus ist epichromosomal, d.h. er insertiert nicht im Wirtsgenom und zerstört so nicht dessen Gene. Die Analyse von entwicklungsbiologisch relevanten Genen in hämatopoetischen Stammzellen (HSC) ist mit der Anwendung von adenoviralen Konstrukten möglich (Kawabata K, *et al.*, 2006). Rekombinante Adenoviren sind geeignete Werkzeuge zur Analyse der Notch-Signaltransduktion in EPCs, sie wurden bereits erfolgreich von anderen Arbeitsgruppen zur Analyse von EPCs eingesetzt (Seeger FH, *et al.*, 2005, Rössig L, *et al.*, 2005, Murasawa *et al.*, 2002, Choi JH, *et al.*, 2004). Die Gene E1, notwendig für die Verpackung des Virusgenoms, und E3, welches die Umgehung des Wirtsimmunsystems ermöglicht, sind in den verwendeten viralen Konstrukten entfernt worden. Die Vermehrung der Viren ist daher außerhalb einer geeigneten Zelllinie nicht möglich. Durch die Deletion der Gene können bis zu 7,5 kb große DNA-Fragmente in den Adenovirus kloniert werden. Die Zelllinie AD-293 hat das fehlende Gen E1 im Genom integriert und kann *in vivo*, nach Transfektion mit dem rekombinanten Adenovirus, unvollständige zu infektiösen Viruspartikeln komplementieren. Zur Konstruktion und Herstellung der adenoviralen Konstrukte wurde das *Adeasy XL Adenoviral Vector System* der Firma Stratagene verwendet. Die Prozedur erfolgte genau nach der beigelegten Anweisung. In Abb. 3.2. wird die Konstruktion des rekombinanten Adenovirus dargestellt. Der rekombinante Adenovirus wurde in fünf Schritten hergestellt und produziert, im ersten Schritt wurde das zu untersuchende Gen in den ausgewählten *Shuttle*-Vektor kloniert und im zweiten wurde der rekombinante *Shuttle*-Vektor in den Bakterienstamm *BJ5183-AD-1* transformiert. Der Stamm *BJ5183-AD-1* enthält das *pAdEasy-1* Plasmid und ermöglicht die homologe Rekombination mit den *Shuttle*-Vektor, bei der unter anderen Klone entstehen, die ein *pAdEasy-1* Plasmid mit dem klonierten Gen enthalten. Im dritten Schritt werden die rekombinanten *pAdEasy-1* Plasmide zur Amplifikation in den rekombinationsdefizienten und Endonuclease-defizienten Bakterienstamm *XL10-Gold* transformiert. Im vierten Schritt wird die zur Adenovirusproduktion geeignete Zelllinie AD-293 mit den aufgereinigten, rekombinanten

*pAdEasy-1* Plasmiden transfiziert, diese produzieren dann vollständige, infektiöse Viruspartikel mit den zu untersuchenden Gen. Im fünften Schritt werden mit der Cäsiumchloridaufreinigung die infektiösen Adenoviren von Zellresten der AD-293-Zellen und unvollständigen Viruspartikeln getrennt. Die aufgereinigte Viruslösung kann z. B. zur Transfektion eines eukaryotischen Zelltypes verwendet werden, um so die Auswirkungen einer Überexpression des Genes beobachten zu können.



**Abb. 3.2. Produktion von rekombinanten Adenoviren unter Einsatz des AdEasy XL Adenoviral Vector System** (aus dem AdEasy XL Handbuch der Fa. Stratagene)

### Klonierung des zu untersuchenden Gens in einem *Shuttle*-Vektor

Das *Adeasy XL Adenoviral Vector System* bietet mehrere, verschiedene *Shuttle*-Vektoren an, im Rahmen dieser Arbeit wurde der Vektor *pShuttle-IRES-hrGFP-1* verwendet. Eine Plasmidkarte dieses Vektors ist im Anhang in Abb. 7.8. abgebildet. Der Vektor besteht aus folgenden Komponenten:

- einer Kanamycin-Resistenz zur Selektion von positiven Klonen.
- einer *multiple cloning site* unter der Kontrolle des CMV-Promoters (Cytomegalievirus), welche die Expression des zu untersuchenden Gens kontrolliert (s. auch 3.2.5.).
- einem an die *multiple cloning site* anschließenden *Flag*-Epitop, dabei handelt es sich um eine kurze Aminosäuresequenz, die eine einfache Aufreinigung oder Nachweis des untersuchten Gens ermöglicht.
- Ad5 Homologien, welche die homologe Rekombination mit den *pAdEasy-1* Plasmid ermöglichen.
- das Gen *hrGFP* (*humanized recombinant green fluorescent protein*) unter der Kontrolle der *IRES* (*internal ribosome entry site*), welches mit einem Fluoreszenzmikroskop die einfache Kontrolle ermöglicht, ob Zellen mit dem Adenovirus transfiziert sind.

Die untersuchte zu klonierende DNA-Sequenz durfte keine Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Pac I* und *Pme I* enthalten, da sie im weiteren Verlauf der Prozedur eingesetzt wurden. Weiterhin durften keine Schnittstellen der für die Klonierung verwendeten Restriktionsendonukleasen in der Sequenz vorhanden sein.

Die Klonierung wurde wie folgt durchgeführt: Das gewünschte Gen wurde mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen aus dem Vektor geschnitten und über ein Agarosegel und das *QIAquick Gel Extraction Kit* (s. 3.2.1. und 3.2.3.) vom restlichen Vektor getrennt. Der *Shuttle*-Vektor wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten und mit der gleichen Methode aufgereinigt. Die Ligation wurde in einem Ansatz von 20 µl durchgeführt. Dafür wurden 1 µl *Quick T4 DNA Ligase* (der Fa. NEB) mit 10 µl *2x Quick Ligation Buffer*, dem beiliegenden Reaktionspuffer, 50 ng Vektor und der dreifachen molaren Menge an ausgeschnittenem Gen vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Der Ligationsansatz wurde unverzüglich zur Transformation der *MAX Efficiency DH5a competent cells* verwendet, die Durchführung erfolgte strikt nach Protokoll (s. 3.2.5.). Die positiven Klone wurden anhand von Restriktionsanalysen (s. 3.2.2.) ermittelt und in großer Menge mit dem *Qiagen Plasmid Maxi Kit* (3.2.1.) isoliert. Bevor die positiven Klone zur homologen Rekombination in den Bakterienstamm *BJ5183-AD-1 Electroporation competent cells* transformiert wurden, wurden sie mit der Methode der Sequenzierung auf das richtige Insert kontrolliert (s. 3.2.3.).

Da die Sequenz des Gens mit der Methode der Restriktion nicht in allen Fällen unverändert in den *Shuttle*-Vektor kloniert werden konnte, stand als weitere Methode die PCR-basierte

Klonierung zur Verfügung. Dabei wurden Primer kreiert, die zu einem Teil aus einer Sequenz der Randregionen des Genes bestehen und an ihren anderen Ende die benötigte Restriktionsschnittstellen haben (s. Abschnitt 7.6., Tab. 7.4). Zur fehlerfreien PCR-basierten Klonierung wurde die PCR nach dem unter 3.2.4. beschriebenen Verfahren nach Protokoll mit der Herculase *enhanced DNA polymerase* der Fa. Stratagene durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel und das *QIAquick Gel Extraction Kit* aufgereinigt (s. 3.2.1. und 3.2.3.), nach dem oben beschriebenen Verfahren der Klonierung mit Restriktionsenzymen in den *Shuttle*-Vektor kloniert und der entstandene Klon wurde zur Kontrolle mit Restriktionsenzymen und Sequenzierung analysiert.

### **Transformation von BJ5183-AD-1-Bakterien mit dem rekombinanten Plasmid**

Die klonierten *Shuttle*-Vektoren, durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung verifiziert, wurden durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym *Pme I* linearisiert, da das Konstrukt nur eine *Pme I*-Schnittstelle enthält. Die Linearisierung ist notwendig, damit die homologe Rekombination in dem *BJ5183-AD-1 Electroporation competent cells* effizient stattfinden kann (siehe Abb. 3.2.). Der *Pme I*-Restriktionsverdau wurde wie unter Abschnitt 3.2.3. beschrieben durchgeführt. Der mit *Pme I* linearisierte Vektor wurde über ein Agarosegel und das *QIAquick Gel Extraction Kit* von nicht linearisierten Vektor und Puffer getrennt (s. 3.2.1. und 3.2.3.). Die isolierte DNA wurde in sterilem Wasser mit einer Konzentration von 0,05 µg/µl resuspendiert. Die Transformation der *BJ5183-AD-1 Electroporation competent cells* wurde exakt nach Protokoll durchgeführt (s. 3.2.5.). Als Antibiotikum zur Selektion der rekombinanten *Adeasy-1* Plasmide diente Kanamycin. Die Inkubation über Nacht bei 37 °C führte zu drei verschiedenen großen Kolonietypen, nur die sehr kleinen und mittleren Kolonien enthielten mit hoher Wahrscheinlichkeit die rekombinanten *Adeasy-1* Plasmide. Je Transformationsansatz wurden zehn sehr kleine Kolonien mit einer sterilen Öse abgenommen, je 5 ml LB-Medium mit Kanamycin damit angeimpft und über Nacht bei 225 rpm und 37 °C inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde mit dem *Qiagen Plasmid Mini Kit* isoliert und in 50 µl sterilem, destilliertem Wasser resuspendiert (s. 3.2.1.). Die Restriktionsanalyse wurde mit dem Enzym *Pac I* durchgeführt (s. 3.2.3.). Die positiven Klone ergaben ein Fragment von ~30 kb und, je nachdem an welchen Stellen des Plasmides die homologe Rekombination stattgefunden hat, ein weiteres Fragment von 3,0 kb (Rekombination des rechten und linken Ad5 Homologie-Arm) oder von 4,5 kb (Rekombination des rechten Ad5-Homologie-Arm und des Replikationsursprungs, dem *ori*). Für die weiteren Schritte der Adenoviralen Produktion wurden nur die kleineren, 33 kb großen Konstrukte verwendet, da diese schneller repliziert werden können als die größeren Konstrukte (34,5 kb).

### **Amplifikation des rekombinanten AdEasy-Plasmides**

Die positiven Konstrukte, also das *pAdeasy-1* Plasmid mit gewünschtem Gen, wurden zur fehlerfreien Amplifikation in den Bakterienstamm *XL10-Gold ultracompetent cells* transformiert. Dieser Stamm ist im Gegensatz zum *BJ5183-AD-1 Electroporation competent cells* defizient für die Gene *endA* (Endonuklease) und *recA* (Rekombinase). Diese Defizienzen stabilisieren das Insert im *pAdeasy-1* Plasmid und erhöhen die Ausbeute in Plasmidisolationen. Die Transformation wurde strikt nach Protokoll wie unter 3.2.5. beschrieben durchgeführt, Kanamycin diente als Antibiotikum zur Selektion der rekombinanten *pAdeasy-1* Plasmide. Die über Nacht entstandenen Kolonien wurden mit einer sterilen Öse abgenommen, je 5 ml LB-Medium mit Kanamycin damit angeimpft und über Nacht bei 225 rpm und 37 °C inkubiert. Die *pAdeasy-1* Plasmide wurden mit dem *Qiagen Plasmid Mini Kit* isoliert und anhand von Restriktionsanalysen mit dem Enzym *Pac I* kontrolliert. Die restliche Kultur wurde verwendet, um eine 500ml-LB-Kanamycin-Kultur anzupflanzen. Das *Endofree Plasmid Maxi Kit* wurde zur Isolierung einer großen, endotoxinfreien Menge der rekombinanten *pAdeasy-1* Plasmide genutzt. Die *pAdeasy-1* Plasmide wurden in einem großen Ansatz mit dem Restriktionsenzym *Pac I* verdaut (~50 µg, s. 3.2.3.), eine kleine Menge des Ansatzes wurde mit einem Agarosegel auf erfolgreiche Restriktion überprüft. Der restliche Restriktionsansatz wurde mit der Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Methode für die Transfektion der AD-293-Zellen aufgereinigt.

### **Produktion des rekombinanten Adenoviruses in AD-293-Zellen**

In diesem Schritt wurden Viren produziert, deshalb waren bei allen folgenden Schritten strikte Sicherheitsvorkehrungen zu treffen, um ungewollte Transfektionen oder Kreuzkontaminationen zu vermeiden. AD-293-Zellen wurden wie unter 3.1.4. beschrieben in Kultur genommen und mit den mit *Pac I* geschnittenen, aufgereinigten, rekombinanten *pAdEasy-1* Plasmiden (5 µg/Transfektion) wie unter 3.1.5. beschrieben mit *Fugene 6* transfiziert. Da der Vektor *pShuttle-IRE5-hrGFP-1* zur Virenproduktion verwendet wurde, führt die Transfektion von AD-293-Zellen mit den rekombinanten *pAdEasy-1* Plasmiden auch zur Expression von *hrGFP*, welche im Mikroskop mit entsprechendem Filter (489 nm) als grün fluoreszierend beobachtet werden kann. Nach ungefähr einer Woche lösten sich die transfizierten AD-293-Zellen ab und die primäre Virusstammlösung konnte geerntet werden. Dazu wurde das Medium verworfen, die Zellen in 1 ml sterilen PBS abgelöst und in ein Cryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden mit drei abwechselnden 5minütigen Inkubationen in einem Trockeneis-Methanolbad (-80° C) und einem 37 °C warmen Wasserbad aufgebrochen und der Virus freigesetzt. Die primäre Virusstammlösung wurde bei -80 °C aufbewahrt und ein kleiner Teil der Stammlösung zur Infektion von AD-293-Zellen verwendet. Die Viren wurden im mehreren Zyklen stark vermehrt (Infektionsdauer i. d. R. 2-3 d). Dabei wurde der Virus stets wie oben beschrieben geerntet und eine Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) wurde dabei stets zur Infektion von zehn frischen AD-293-Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) verwendet.

### **Cäsiumchloridaufreinigung der produzierten Viruspartikel**

Die Cäsiumchloridaufreinigung wurde durchgeführt, um die infektiösen Adenoviren von unvollständigen Viruspartikeln und Zellresten der AD-293-Zellen zu trennen (Maniatis, *et al.*, 1989). Die Viren wurden zunächst in großer Menge produziert, dafür wurden zwanzig Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) wie oben beschrieben mit Virus infiziert. Sobald sich die Zellen begannen abzulösen, wurden sie im Medium resuspendiert und 10 min bei 300 x g und 4 °C pelletiert. Die Zellpellets wurden in 2 ml PBS zusammengeführt und über Nacht bei -20 °C aufbewahrt. Die Zellen wurden durch abwechselnde Bäder in flüssigen Stickstoff (-196 °C) und im 37 °C warmen Wasserbad aufgebrochen. Die Zellreste der AD-293-Zellen wurden durch 10 min Zentrifugation bei 300 x g und 4 °C von der Viruslösung getrennt. Der virushaltige Überstand wurde abgenommen und das Pellet erneut in 2 ml PBS gelöst und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der Cäsiumchloridgradient wurde durch das Vorlegen von 3,5 ml Cäsiumchloridlösung (Dichte 1,4 g/ml) und das Überschichten mit 3,5 ml Cäsiumchloridlösung (Dichte 1,2 g/ml) hergestellt. Die 4 ml Viruslösung wurden vorsichtig auf den vorbereiteten, eisgekühlten Cäsiumchloridgradienten geschichtet. Der Gradient wurde 3 h bei 141.000 x g und 4 °C zentrifugiert und die untere, etwas dickere Virusbande, welche die vollständigen Viruspartikel enthielt, wurde durch Einstechen und Aufziehen mit einer Spritze entnommen (~1 ml). Die erhaltene Viruslösung wurde mit einem Volumen Virus-Aufbewahrungspuffer versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Konzentration der Viruslösung wurde photometrisch bestimmt (vergleiche 3.2.3.). Dafür wurde die Lösung 1:20 mit einer 0,1 % SDS-Lösung verdünnt und die Extinktion bei 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von 1,0 entspricht 10<sup>12</sup> viralen Partikeln/ml.

### **3.4. Proteinanalytik**

Die Expression von Genen kann auf der Translationsebene mit der Methode des Western Blottings schnell und einfach analysiert werden. Beim Western Blotting werden die isolierten Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch nach Größe aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und immunologisch gefärbt. Proteine haben dreidimensionale Strukturen, die denaturiert werden müssen, damit Proteine mit der Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden können. Die Quartärstrukturen der Proteine, d.h. Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Proteinen, werden durch die Bindung des anionischen Tensides SDS (*sodium dodecyl sulfate*) an Proteine inhibiert. Die Sekundärstrukturen, d.h. die dreidimensionale Faltung in einem Teilbereich eines Proteins, und die Tertiärstrukturen, d.h. die dreidimensionale Struktur eines Proteins, werden durch Erhitzung auf 95 °C (Zerstörung der Wasserstoffbrücken) und durch Inkubation mit β-Mercaptoethanol und Dithiothreitol (Reduktion der Disulfidbrücken) denaturiert.

### **Proteinextraktion**

Die Extraktion der Proteine erfolgte durchgehend bei 4 °C bzw. auf Eis, um dem Abbau der Proteine durch Proteasen vorzubeugen. Der 1x Protein-Lysis-Puffer enthielt Substanzen, die dem Abbau vorbeugen, u. a. Natriumvanadat, EDTA und Protease Inhibitoren der Fa Roche. Die Proteine wurden aus Zellen der Zellkultur isoliert, dazu wurde das Medium aspiriert und die Zellkulturgefäße auf Eis gelagert. Die Zellen wurden einmal mit kalter PBS-Lösung gewaschen und verbliebene Flüssigkeit restlos entfernt. Je 10 cm<sup>2</sup> Zellkulturgefäß wurden i. d. R. 100 µl 1x Protein-Lysis-Puffer verwendet, um die Zellen mit einem Schaber abzunehmen. Die Zelllösung wurde in ein frisches 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Zellschutt wurde 10 min bei 13.000 x g und 4 °C pelletiert und die Proteinlösung in ein frisches 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Proteine wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt. Um die Konzentration der Proteinlösung zu erhöhen, z. B. bei einer geringen Zellanzahl, kann das Volumen des 1x Protein-Lysis-Puffer auf 50-75 µl/10 cm<sup>2</sup> verringert werden.

### **Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Konzentration der Proteinlösung wurde mit dem Protein Assay nach Bradford (Fa. Bio-Rad) bestimmt. In diesem Assay binden Proteine an den Farbstoff Coomassie blue G-250 und verschieben dessen Absorptionsmaximum von der Wellenlänge 465 nm auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm kann zusammen mit einer Proteineichgerade zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung verwendet werden (Bradford, 1976, Read, 1981). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden für jede Probe 800 µl Wasser vorgelegt, 3 µl Proteinlösung zugegeben und mit 200 µl Bio-Rad-Reagenz vermischt. Als Nullwert wurden 800 µl Wasser mit 200 µl Bio-Rad-Reagenz gemischt. Die Proben wurde 5 min bei RT inkubiert und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm nach Eichung mit dem Nullwert gemessen. Zur Erstellung der Eichgerade wurde bei jeder Konzentrationsbestimmung die Extinktion von 1 µg, 2,5 µg, 5µg, 7,5 µg, 10 µg und 20 µg BSA mit dem Protein Assay gemessen. Die ermittelten Werte wurden in eine Exceltabelle zur Berechnung der Eichgerade eingeben. Mit der daraus hervorgehenden Geradengleichung wurde anhand der Extinktionswerte die Proteinkonzentration der Proben bestimmt.

### **SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Analyse von Proteinmischungen und ermöglicht die schnelle Bestimmung ihrer Molekulargewichte. Die SDS-PAGE basiert auf der Eigenschaft von SDS, das an die meisten Proteine in einem konstanten Masse-Ladungsverhältnis (1,4 g SDS/g Protein) bindet und für verschiedene Proteine vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften bewirkt. Die negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe können im elektrischen Feld in einer porösen Matrix aus Polyacrylamid nach

ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das diskontinuierliche Lämmli-System mit Tris-Glycin-Puffern verwendet. Das System besteht aus einem Sammelgel, dessen pH-Wert bei 6,8 liegt, und einem Trenngel, mit einem pH-Wert von 8,8. Das Sammelgel hatte stets einen Polyacrylamidgehalt von 5 %, während die Konzentration des Trenngels von der Größe des zu analysierenden Protein abhing (s. Tab. 3.13.). Die Gele enthalten 0,1 % SDS, welches eine Renaturierung der Proteine verhindert. Das Sammelgel bewirkt aufgrund seines niedrigeren pH-Wertes, der enthaltenen Chlorid-Ionen und der großen Porenweite des Gels die Fokussierung der Proteinbande. Im Trenngel mit einem höheren pH-Wert und kleineren Porenweite trennen sich die Proteine nach ihrer molekularen Größe.

**Tab. 3.13. Auftrennungskapazität der Trenngele**

Trenngel (% Polyacrylamid)	Proteingrößen (kDa)
12	10-60
10	30-120
8	50-200

(nach Maniatis, 1982)

Zur SDS-PAGE wurde das Gelelektrophorese System AB Electrophoresis Power Supply EPS 301 der Fa. Amersham Biosciences verwendet. Die mit diesem System hergestellten Polyacrylamidgele waren 1,5 mm dick und wurden zwischen einer Glasplatte und einer Alumina-Platte gegossen. Zuerst wurde das Trenngel wie in Tab. 3.14. beschrieben hergestellt, in die vorbereitete Gelform gegossen und mit 0,5 ml Isopropanol überschichtet. Nach der vollständigen Polymerisierung des Polyacrylamides wurde der Isopropanol entfernt und mit Wasser nachgespült. Auf das Trenngel wurde das Sammelgel (Herstellung s. Tab. 3.15.) gegossen und der Kamm, der die Taschen für die spätere Beladung mit den Proben formte, vorsichtig in das noch flüssige Sammelgel geschoben.

**Tab. 3.14. Herstellung des SDS-PAGE-Trenngels (10 ml)**

Reagenz	Polyacrylamidkonzentration des Trenngels		
	8 %	10 %	12 %
destilliertes Wasser	4,6	4,0	3,3
30 % Acrylamidlösung (Fa. BioRad)	2,7	3,3	4,0
Tris-Puffer (1,5 M, pH 8,8)	2,5	2,5	2,5
SDS-Lösung (10 %)	0,1	0,1	0,1
APS-Lösung (10 %)	0,1	0,1	0,1
TEMED-Lösung	0,006	0,004	0,004

Die Volumina sind in ml angegeben (nach Maniatis, 1982)

**Tab. 3.15. Herstellung des SDS-PAGE-Sammelgels (5 ml)**

Reagenz	Volumen (ml)
destilliertes Wasser	3,4
30 % Acrylamidlösung (Fa. BioRad)	0,83
Tris-Puffer (1,5 M, pH 6,8)	0,63
SDS-Lösung (10 %)	0,05
APS-Lösung (10 %)	0,05
TEMED-Lösung	0,005

(nach Maniatis, 1982)

Das fertige Gel wurde in den zur Herstellung verwendeten Platten in der Gelelektrophoresekammer platziert und die Kammer mit Tris-Glycin-SDS-Elektrophoresepuffer befüllt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:3 mit SDS-Proben-Puffer (nach Lämmli, 3x) vermischt, 5 min bei 95 °C gekocht und 5 min bei 13.000 x g und RT zentrifugiert. Die maximale Kapazität der Taschen im Polyacrylamidgel betrug ~45 µ. Alle Taschen wurden zur besseren Vergleichbarkeit mit der gleichen Menge an Protein beladen. Auf jedem Gel wurde eine Tasche mit 5 µl Proteingrößenmarker (Fa. Bio-Rad) beladen, um im weiteren Verlauf der Experimente die Größen der Protein bestimmen zu können. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wurde 2-3 h bei 100-125 V und 30 mA pro Gel durchgeführt (Lämmli, 1970, Rehm, 2002, Lin F, 1991).

### Western Blotting

Zur weiteren Analyse wurden die im Polyacrylamidgel nach Größe aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Membran aus Nitrocellulose übertragen. Die Nitrocellulosemembran hat eine hohe Proteinbindungskapazität und eignet sich für Protein- und Immunfärbungen. Für den Transfer wurde eine etwas größere Nitrocellulosemembran auf das Gel gelegt, die Vorder- und Rückseite des Stapels mit Whatman-Papier und Schwamm bedeckt und in einen Plastikrahmen fixiert in einer Transferkammer platziert. Die Kammer wurde mit Transferpuffer (1x) befüllt und der Transfer wurde bei 360 mAmp und ~170 V für 1,5 h bei äußerer Kühlung durch eine mit Eis befüllte Kammer durchgeführt (Towbin, 1979). Die Membran wurde nach dem Transfer markiert um die Ober- und Unterseite voneinander unterschieden zu können. Als Kontrolle ob der Transfer erfolgreich war, kann die Membran mit einer Ponceaurot-Lösung angefärbt werden. Dabei werden Proteine durch eine reversible Färbung als rote Banden sichtbar. Für die Färbung wurde die Membran 1-2 min in der Ponceaurot-Lösung geschwenkt und mit Wasser gespült. Die Färbung wurde durch dreimaliges Waschen der Membran mit TBST-Puffer entfernt und immunologische Färbungen durchgeführt (Li, 1989).

### Immunologische Färbung der Membran

Die immunologische Färbung von auf Membranen fixierten Proteinen ermöglicht die spezifische Darstellung von bestimmten Proteinen. Die Färbung erfolgt in zwei Schritten, im ersten Schritt wird ein primärer Antikörper zur spezifischen Markierung eines Proteins verwendet, dabei bindet er an das auf der Membran fixierte Protein. Im zweiten Schritt wird ein spezifischer sekundärer Antikörper zum Nachweis des gebundenen primären Antikörpers eingesetzt, indem dieser an den primären bindet. An den Fc-Teil des sekundären Antikörpers ist das Enzym Peroxidase gebunden. Peroxidase oxidiert Luminol und löst dabei ein chemiluminentes Signal aus, das entsprechende Filme belichten kann und so das Signal des gebundenen sekundären Antikörpers sichtbar macht.

Zur Färbung wurde die Membran für 1 h im Blocking-Puffer bei RT inkubiert. Dieser Schritt dient der Absättigung von unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Membran. Die Membran wurde mit dem gewünschten primären Antikörper im Blocking-Puffer über Nacht bei 4 °C in entsprechender Verdünnung (s. Tab. 3.16.) inkubiert, nur der Antikörper Anti-Actin wurde 1 h bei RT geschwenkt. Nichtgebundener primärer Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBST-Puffer entfernt und die Membran mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (s. Tab. 3.16., Verdünnung immer 1:4000) 2 h inkubiert. Die Membran wurde dreimal mit TBST-Puffer gewaschen (Ogata, 1983). Zur Entwicklung des Chemilumineszenz-Signals wurden die *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* der Firma Amersham Biosciences verwendet. Für die Entwicklung einer Membran wurden Reagenz A und B im Verhältnis 40:1 vermischt, auf der leicht abgetropften Membran verteilt und 1 min inkubiert. Die Entwicklung wurde in einer Dunkelkammer durchgeführt, damit die Filme (Fa. Kodak), die zur Belichtung des Chemilumineszenz-Signals eingesetzt wurden, nicht durch Tageslicht belichtet wurden. Die Filme wurden entsprechend der Größe der Membran zurechtgeschnitten und für 60 sek inkubiert und in der Entwicklermaschine (Fa. Protec) entwickelt. Je nach Stärke der Banden wurden weitere Filme entsprechend länger oder kürzer belichtet.

**Tab. 3.16. Anwendung der primären und sekundären Antikörper beim Immunoblot**

Primärer Antikörper	Verdünnung	Größe (kDa)	Quelle	Sekundärer Antikörper
Anti-Actin	1:5.000	42	Kaninchen	Anti-Kaninchen-HRP-konjugiert
bTAN 20	1:150	100-150	Ratte	Anti-Ratte-HRP-konjugiert
Cleaved Notch1 (Val1744)	1:1.000	110	Kaninchen	Anti-Kaninchen-HRP-konjugiert
Anti-Cre Antikörper	1:20.000	37	Kaninchen	Anti-Kaninchen-HRP-konjugiert
Anti-RBP-J kappa monoclonal antibody	1:500	65	Ratte	Anti-Ratte-HRP-konjugiert

## Strippen

Die gleichmäßige Beladung eines Polyacrylamidgeles wurde durch eine weitere Färbung der Membran mit dem Antikörper Anti-Actin nachwiesen. Dazu wurden die zuvor gebundenen Antikörper durch das Strippen entfernt. Dafür wurde die Membran 1 h bei 60 °C in 20 ml Stripping-Puffer inkubiert und dreimal 5 min in TBST-Puffer bei RT und 65 rpm gewaschen. Die Membran wurde für weitere Immunoblot-Färbungen 1 h mit Blocking-Puffer inkubiert und entsprechend des verwendeten Antikörpers weiterbehandelt (s. o.).

## 3.5. Immunhistochemie und Immuncytochemie

Die Immunhistochemie dient der schnellen Darstellung von Expressionsmustern in Geweben und die Immuncytochemie der Expressionsanalyse und Spezifizierung von Zellen. Die Färbung erfolgt mit Antikörpern oder anderen Substraten (z.B. Lectinen), die an Strukturen der Zellen wie z. B. Oberflächenrezeptoren oder das Cytoskelett binden. Die Antikörper und Substrate sind entweder direkt an einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt oder sie werden in einem zweiten Färbeschritt mit einem spezifisch an sie bindenden Antikörper oder Substrat, an den/das ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, gefärbt. Die Zellen und Gewebe werden vor der Färbung fixiert, damit sie sich während des Färbeprozesses nicht vom Objektträger oder Deckglas ablösen.

Die Färbungen wurden i. d. R. wie folgt durchgeführt: Zellen und Gewebe wurden mit Paraformaldehyd fixiert, mit BSA oder Ziegenserum geblockt und sequentiell mit Antikörpern und/oder Substraten gefärbt. Die Zellkerne wurden stets mit dem Farbstoff DAPI, der an Nucleinsäuren bindet, gegengefärbt. Die gefärbten Zellen oder Gewebe wurden mit *Fluorescent Mounting Medium* (Fa. DakoCytomation) bedeckt, einer zähflüssigen Lösung, die ein Anti-Bleichmittel enthält, und mit einem Deckglas abgedeckt. Die gefärbten Objekte wurden mit dem Mikroskop Axiovert 200 und den der Färbungen entsprechenden Fluoreszenz-Filtern (s. Tab. 3.17.) der Firma Zeiss fotografiert.

**Tab. 3.17. Immunhisto- und immuncytochemische Fluoreszenzfarbstoffe: Anregungs- und Emissionswellenlänge**

Trivialname	chemische Bezeichnung	Anregung (nm)	Emission (nm)
DAPI	Diamidinophenylindoldihydrochlorid	358	463
Dil	Diocadecyltetramethylindocarbocyaninperchlorat	551	565
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>	488	509
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat	495	517
TAMRA	5- und 6-Carboxytetramethyl-Rhodamin	549	577

(nach Fa. Zeiss)

### 3.5.1. Doppelfärbung von EPCs

Die Anzahl der EPCs wurde durch die Doppelfärbung ermittelt, einer in der Literatur beschriebenen Methode EPCs zu identifizieren (Asahara, 1999, Dimmeler, 2001, Rehman, 2003). Zur Doppelfärbung wurden die EPCs wie unter 3.1.4. beschrieben auf mit Fibronectin beschichteten Deckgläsern in 24-Well-Zellkulturgefäßen ausplattiert. Nach 7 d wurden die Zellen *in vitro* mit Dil-markierten, acetylierten LDL (*human low density Lipoprotein* der Fa. Harbor Bio-Products) gefärbt, mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert und mit den FITC-markierten Lectin aus *Ulex europaeus* und DAPI gefärbt. Zur *in vivo* Dil-Ac-LDL-Färbung wurde das Medium der EPCs mit Dil-Ac-LDL-Lösung (finale Konzentration: 2,4 µg/ml) versetzt (Voyta, 1984). Die Zellen wurden 1 h bei 37 °C und CO<sub>2</sub>-Begasung im Brutschrank inkubiert. Die PFA-Lösung (8 %) wurde 1:2 mit PBS-Lösung verdünnt und die Zellen wurden in PFA-Lösung (4 %) fixiert. Die fixierten Zellen wurden dreimal mit PBS-Lösung gewaschen und zum Blockieren unspezifischer Bindungen für 1 h in BSA-Lösung vor Licht geschützt geblockt. Die Zellen wurden dreimal mit PBS-Lösung gewaschen und zur Färbung mit *Ulex*-Lectin für 2 h in PBS-Lösung mit einer *Ulex*-Lectin-Konzentration von 20 µg/ml vor Licht geschützt geschwenkt. Die EPCs wurden dreimal mit PBS-Lösung gewaschen und zur Färbung mit DAPI in destillierten Wasser mit einer Konzentration von 0,5 µg DAPI/ml vor Licht geschützt inkubiert. Die Deckgläser mit den fixierten, gefärbten Zellen wurden aus den 24-Well-Zellkulturgefäßen entnommen, einmal in destilliertes Wasser getaucht, mit einem Tropfen *Fluorescent Mounting Medium* auf Objektträgern (Zellseite nach unten) platziert und mit Nagellack fixiert. Die gefärbten Zellen wurden mit 200facher Vergrößerung an einem Zeiss-Mikroskop fotografiert. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit dem Programm Adobe Photoshop CS, in dem die Bilder der verschiedenen Fluoreszenzen übereinander gelegt wurden und die Anzahl der doppelt positiven Zellen ermittelt wurde.

### 3.5.2. TUNEL-Färbung von apoptotischen Zellkernen

Die TUNEL-Färbung ermöglicht eine spezifische Anfärbung von apoptotischen Zellkernen. Als Apoptose wird der programmierte Zelltod bezeichnet, den die Zelle aufgrund von (fehlenden) Signalen ihrer Umwelt begeht. Die Apoptose ist im Gegensatz zur pathologischen Nekrose ein physiologischer, organisierter Prozess. Im Allgemeinen beginnt die Apoptose mit der Reduktion des Zellvolumens und der Kondensation des Chromatins. Im weiteren Verlauf wird die DNA von zelleigenen Endonukleasen in definierte Stücke zerteilt. Die Zelle segmentiert sich in apoptotische Vesikel, die von umliegenden Zellen und Macrophagen phagozytiert werden. Die TUNEL-Methode (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) wurde 1992 erstmals von Gavrieli beschrieben. Bei der TUNEL-Methode werden die durch die Endonukleasen entstehenden, freien Hydroxylgruppen der DNA durch das Enzym terminale

Deoxynucleotidyltransferase (TdT) mit Fluoreszenz-markierten Nukleotiden verbunden. Diese Markierung ermöglicht im Fluoreszenzmikroskop die Unterscheidung von vitalen und apoptotischen Zellen (Gavrieli, 1992, Negoescu, 1996, Labat Moleur, 1998).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das *ApopTag Plus Fluorescein in Situ Apoptosis Detection Kit* (Fa. Chemicon) zur TUNEL-Färbung verwendet. Mit diesem Kit wird die Färbung in zwei Schritten durchgeführt: Im ersten werden die DNA-Enden durch das Enzym TdT mit Digoxigenin-markierten Nukleotiden verbunden, im zweiten werden die Digoxigenin-Nucleotide mit einem spezifischen an FITC gekoppelten Antikörper detektiert. Die Durchführung erfolgte strikt nach Herstellerprotokoll. Die EPCs wurden zur TUNEL-Färbung wie unter 3.1.4. beschrieben auf mit Fibronectin beschichteten Deckgläsern in 24-Well-Zellkulturgefäßen ausplattiert. Nach 7 d wurden die Zellen mit PFA-Lösung (2 %) fixiert und dreimal mit PBS-Lösung gewaschen. Als Positivkontrolle der TUNEL-Färbung wurde an auf einem Deckglas fixierten EPCs ein Verdau der DNA mit dem Enzym DNase, welches DNA-Stränge in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  an zufälligen Stellen hydrolysiert, durchgeführt. Zum DNase-Verdau wurde DN-Puffer (s. 2.3.) auf das Deckglas gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Der Puffer wurde abgenommen, 10 µl DN-Puffer und 10 µl DNase-Lösung (s. 2.3.) wurden vermischt, auf das Deckglas gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Das Deckglas wurde fünfmal mit Wasser und zweimal in PBS-Lösung gewaschen. Nach diesem Schritt wurde die Färbung mit allen Deckgläsern weitergeführt. Alle ab hier verwendeten Puffer und Lösungen entstammen dem *ApopTag Plus Fluorescein in Situ Apoptosis Detection Kit*. Die Deckgläser wurden mit *Equilibration Buffer* bedeckt und 10 min bei RT inkubiert. Der Puffer wurde aspiriert, 77 µl *Reaction Buffer* und 33 µl *TdT Enzyme* vermischt, 20 µl dieses Puffergemisches wurden auf jedes Deckglas gegeben und 1 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch den *Stop/Wash Buffer* (1:35 in PBS-Lösung verdünnt) abgestoppt. Die Deckgläser wurden kurz mit wenig verdünnten *Stop/Wash Buffer* gespült, in 1 ml Puffer 15 sek kurz geschwenkt und 10 min bei RT inkubiert. Die Deckgläser wurden dreimal in PBS-Lösung gewaschen und die Lösung wurde restlos aspiriert. Die Digoxigenin-markierten Nucleotide wurden mit *Anti-Digoxigenin Fluorescein* detektiert. Dazu wurden *Anti-Digoxigenin Fluorescein* und *Blocking Solution* vermischt und 25 µl dieser Lösung auf jedes Deckgläser gegeben und 30 min vor Licht geschützt bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Deckgläser wurden viermal in PBS-Lösung gewaschen und mit DAPI (1:2000 in Wasser verdünnt) vor Licht geschützt gegengefärbt. Die Deckgläser wurden zweimal in PBS-Lösung gewaschen und mit einem Tropfen *Fluorescent Mounting Medium* auf Objektträgern (Zellseite nach unten) platziert und mit Nagellack fixiert. Die gefärbten Zellen wurden mit 200facher Vergrößerung an einem Zeiss-Mikroskop fotografiert.

### 3.5.3. Herstellung von Gewebeschnitten

Die Integrität des zu untersuchenden Gewebe ist für die Immunhistochemie von großer Bedeutung, da die Analyse von zerstörten Gewebe nicht möglich ist. Die Präparation, Fixierung und das Schneiden der Gewebe muss exakt nach Protokoll durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Gewebe durch die Perfusionsfixation mit Paraformaldehyd-Lösung (2 %) *in situ* fixiert (s. 3.7.4.). Nach der Entnahme wurde das Gewebe in PFA-Lösung (2 %) fixiert und durch die Inkubation in Sucrose-Lösung (15 %) für 3 h und ÜN in Sucrose-Lösung (30 %) stabilisiert. Das Gewebe wurde in die Gefrierlösung *Jung Tissue Freezing Medium* (Fa. Leica) eingebettet. Zur Einbettung in der Gefrierlösung wurde das Lösungsmittel Isopentan mit Hilfe von flüssigem Stickstoff auf circa -80 °C abgekühlt. Die Gewebe wurden auf Kork in der gewünschten Position platziert, mit Gefrierlösung bedeckt und durch vorsichtiges Eintauchen in das abgekühlte Isopentan für 3 sek eingefroren. Die eingebetteten Gewebe wurden in Alufolie eingewickelt bis zum Schneiden bei -20 °C aufbewahrt. Zum Schneiden wurde der Kork von den Geweben entfernt. Die Gewebe wurden im -15 °C - -20 °C kalten Kryostat CM 1900 (Fa. Leica) fixiert und in 10-15 µm dünnen Schnitten auf Objektträger gebracht. Die auf Objektträger gebrachten Gewebeschnitte wurden über Nacht bei RT getrocknet und bis zu weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

### 3.5.4. Färbung von Gewebeschnitten

Die Färbung von Gewebeschnitten wurde im Allgemeinen in fünf Schritten durchgeführt:

1. Fixierung der Schnitte mit Paraformaldehyd
2. Blockieren unspezifischer Bindung durch Ziegen Serum
3. Inkubation mit primärem (und sekundärem) Antikörper/Substrat
4. Färbung der Zellkerne mit DAPI
5. Eindecken mit Eindeckmedium und Deckglas

Zur Fixierung mit Paraformaldehyd wurden die Objektträger in PFA-Lösung (4 %) inkubiert und dreimal in PBS-Lösung gewaschen. Die Gewebe wurden in einer feuchten Kammer platziert, mit 250 µl Block-Lösung bedeckt und für 1 h bei RT vor Licht geschützt inkubiert. Die Gewebe wurden mit einer der drei nachfolgend beschriebenen Färbungen gefärbt. Die weitere Durchführung ist unter dem jeweiligen Antikörper/Substrat beschrieben. Nach der spezifischen Antikörper- oder Substratfärbung erfolgte die Färbung der Zellkerne. Dafür wurden die Objektträger 1 min in DAPI-Lösung bei RT inkubiert und kurz in Wasser gewaschen. Die Gewebe wurden abschließend mit Eindeckmedium (*Fluorescent Mounting Medium*) bedeckt und mit einem Deckglas abgedeckt. Die gefärbten Gewebe wurden mit 200facher Vergrößerung am Zeiss-Mikroskop fotografiert. Die Auswertung der Bilder erfolgte

mit dem Programm Adobe Photoshop CS, in dem die Bilder der verschiedenen Fluoreszenzen übereinander gelegt wurden.

### **Isolectin B4-Färbung**

Isolectin B4 färbt spezifisch endotheliale Zellen in Nicht-Primaten wie Mäusen an und wird aus *Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia* isoliert (Asahara, 1999a). Das hier verwendete Isolectin B4 ist mit Biotin konjugiert und wird in einem zweiten Schritt mit FITC-konjugierten Avidin D, welches spezifisch an Biotin bindet, gefärbt. Zur Färbung wurde die Isolectin B4-Stammlösung mit PBS-Lösung 1:100 verdünnt und mit einer Konzentration von 5 µg/ml verwendet. Die Block-Lösung wurde abgenommen, 250 µl der verdünnten Isolectin B4-Lösung auf jeden Objektträger gegeben und für 2 h bei RT vor Licht geschützt in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Objektträger wurden dreimal in PBS gewaschen, die Avidin D:FITC-Lösung wurde 1:100 mit PBS-Lösung verdünnt und je 250 µl der verdünnten Avidin D:FITC-Lösung wurden auf die Objektträger gegeben. Die Gewebe wurden 1 h bei RT vor Licht geschützt in einer feuchten Kammer inkubiert und dreimal in PBS-Lösung gewaschen.

### **Färbung der glatten Gefäßmuskulatur**

Die glatte Gefäßmuskulatur wurde im Rahmen dieser Arbeit mit dem spezifischen, monoklonalen, mit FITC konjugierten Antikörper *anti- $\alpha$ -smooth muscle actin* (Fa. Sigma) angefärbt. Der Antikörper wurde 1:400 in einer Lösung, die je zur Hälfte aus Block-Lösung und PBS-Lösung bestand, verdünnt. Die Block-Lösung wurde abgenommen, 250 µl der verdünnten Antikörper-Lösung auf jeden Objektträger gegeben und für 2 h bei RT vor Licht geschützt in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Objektträger wurden dreimal in PBS gewaschen.

### **Färbung von humanen Endothelzellen, Monocyten und Neutrophilen**

Der verwendete Antikörper PECAM-1 (H-300) (sc-8306, Fa. Santa Cruz) färbt spezifisch humane Endothelzellen, Monocyten und Neutrophile an. Der Antikörper PECAM1 wird im Kaninchen produziert und in einem zweiten Schritt der Färbung mit FITC-konjugierten Anti-Kaninchen-Antikörper gefärbt. Der Antikörper PECAM1 wurde 1:100 in einer Lösung, die je zur Hälfte aus Block-Lösung und PBS-Lösung bestand, verdünnt. Die Block-Lösung wurde abgenommen, 250 µl der verdünnten Antikörper-Lösung auf jeden Objektträger gegeben und ÜN bei 4 °C vor Licht geschützt in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Objektträger wurden dreimal in PBS gewaschen. Der FITC-konjugierte Anti-Kaninchen-Antikörper wurde 1:200 in einer Lösung, die je zur Hälfte aus Block-Lösung und PBS-Lösung bestand, verdünnt. Je 250 µl der Antikörper-Lösung wurden auf die Objektträger gegeben. Die Gewebe wurden 2 h bei RT vor Licht geschützt in einer feuchten Kammer inkubiert und dreimal in PBS-Lösung gewaschen.

### 3.6. Fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse

Die Fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse (Durchflusszytometrie) ist ein Verfahren, das die schnelle Analyse einer großen Anzahl von Zellen ermöglicht. Mit der Durchflusszytometrie können verschiedene Parameter auf Einzelzellniveau ermittelt werden: die Zellgröße, die Granularität und die Fluoreszenz von gebundenen, fluoreszierenden Antikörpern und Substraten. Das FACS-Gerät (*fluorescent activated cell sorting/scanning*) transportiert die durch einen Flüssigkeitsstrom vereinzelt Zellen in einer Kapillare an einem Laser vorbei. Das dabei entstehende Streulicht der Zellen und die emittierte Strahlung der Fluoreszenzfarbstoffe werden durch ein System von Fotodetektoren in elektrische Signale umgewandelt und nach Weiterleitung der Informationen an einen Computer mit dem entsprechenden Programm analysiert. Anwendungsbeispiele der Durchflusszytometrie sind die Analyse der Expression von Rezeptoren auf der Zelloberfläche, der Zellteilungsaktivität und von apoptotischen/nekrotischen Zellen.

Zur Durchführung der Durchflusszytometrie wurden die Zellen in eine Einzelzellsuspension gebracht, mit spezifischen Antikörpern oder Substraten gefärbt und im FACS-Gerät und dem entsprechenden Computerprogramm analysiert. Im Folgenden wurden die Färbungen mit EPCs beschrieben. Bei der Untersuchung von HUVEC mit der FACS-Analyse wurden diese nach den gleichen Protokollen gefärbt und analysiert.

#### 3.6.1. FACS-Analyse der Expression von Rezeptoren

Zur Analyse der Expression von Rezeptoren wurden EPCs wie unter 3.1.4. beschrieben isoliert, in mit Fibronectin-beschichteten Zellkulturgefäßen (10 cm<sup>2</sup>) mit 1,5x10<sup>6</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert und nach 7 d mit Accutase-Lösung abgelöst. Die Zellen wurden pelletiert und einmal in FACS-Lösung gewaschen. Die EPCs wurden in 0,5 ml FACS-Block-Lösung resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (s. 3.1.2.). Die Zellen wurden auf FACS-Röhrchen verteilt, je Röhrchen mindestens 50.000 Zellen in 50 µl. Die FACS-Block-Lösung enthält humanes Immunglobulin, welches an Fc-Rezeptoren der EPCs bindet und die unspezifische Bindung von Antikörpern verhindert. Anhängig von der Verwendung eines direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierten oder eines unkonjugierten Antikörpers wurde die Färbung in einem oder in zwei Schritten durchgeführt. Die Antikörper wurden i.d.R. mit einer Konzentration von 1 µg je 10<sup>6</sup> Zellen eingesetzt.

#### Direkt mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierter Antikörper

Je ein FACS-Röhrchen wurde für die Färbung eines Rezeptors genutzt, dazu wurden je 1 µl Antikörperlösung (s. Tab. 3.18.) zu den EPCs gegeben, vermischt und 30 min auf Eis vor Licht geschützt inkubiert. Die FACS-Analyse wurde direkt im Anschluss durchgeführt. Dazu wurden 0,5 ml FACS-Lösung zu den Zellen gegeben, vermischt und die FACS-Röhrchen im Gerät

platziert und gemessen. Als Kontrollen der Färbung wurden Isotypkontrollen verwendet, d. h. Antikörper mit dem gleichen Isotyp und dem gleichen Fluoreszenzfarbstoff wie die verwendeten, jedoch ohne die Fähigkeit zur spezifischen Bindung an die Zellen. Eine Messung wurde mit ungefärbten Zellen durchgeführt, um die Autofluoreszenz der Zellen zu ermitteln. Die Anregung des verwendeten Farbstoffes R-Phycoerythrin erfolgte mit dem Laser der Wellenlänge 488 nm, die Emission wurde im Kanal FL-2 detektiert (siehe Tab. 3.21.).

**Tab. 3.18. Verwendete direkt konjugierte Antikörper der FACS-Analyse**

Antigen/ Name des Antikörpers	konjugierter Fluoreszenzfarbstoff	Hersteller
Isotypkontrolle	R-Phycoerythrin	Pharmigen, BD Biosciences
VEGF-R2/ KDR	R-Phycoerythrin	ReliaTech
vWF	R-Phycoerythrin	Oncogene
CD14	R-Phycoerythrin	Pharmigen, BD Biosciences
CD31	R-Phycoerythrin	Pharmigen, BD Biosciences
CD38	R-Phycoerythrin	Pharmigen, BD Biosciences
CD62E	R-Phycoerythrin	Pharmigen, BD Biosciences
CD184/ CXCR4	R-Phycoerythrin	Pharmigen, BD Biosciences

### Unkonjugierter Primärantikörper und mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierter Sekundärantikörper

Für die Färbung eines Rezeptors wurde je ein FACS-Röhrchen genutzt. Zur Färbung wurde je 1 µl Primärantikörperlösung (s. Tab. 3.19.) zu den EPCs gegeben, vermischt und 30 min auf Eis vor Licht geschützt inkubiert.

**Tab. 3.19. Anwendung primärer und sekundärer Antikörper bei der FACS-Analyse**

Primärer Antikörper	Quelle des Primärantikörpers	Sekundärer Antikörper	Quelle des Sekundärantikörpers
CD14	Maus	Anti-Maus FITC-konjugiert F(ab') <sub>2</sub> -Fragment	Ziege
CD18	Maus	Anti-Maus FITC-konjugiert F(ab') <sub>2</sub> -Fragment	Ziege
CD31/ PECAM-1	Maus	Anti-Maus FITC-konjugiert F(ab') <sub>2</sub> -Fragment	Ziege
CD54/ ICAM-1	Maus	Anti-Maus FITC-konjugiert F(ab') <sub>2</sub> -Fragment	Ziege
CD141/ Thrombomodulin	Maus	Anti-Maus FITC-konjugiert F(ab') <sub>2</sub> -Fragment	Ziege
CD202b/ TIE-2	Maus	Anti-Maus FITC-konjugiert F(ab') <sub>2</sub> -Fragment	Ziege
VEGFR-2/ KDR	Maus	Anti-Maus FITC-konjugiert F(ab') <sub>2</sub> -Fragment	Ziege

Die Zellen wurden pelletiert und der Überstand abgeschüttet. Die Zellen wurden in jeweils 50  $\mu\text{l}$  FACS-Block-Lösung resuspendiert und zur Färbung wurden je 1,5  $\mu\text{l}$  Sekundärantikörperlösung (s. Tab. 3.19.) zu den EPCs gegeben, vermischt und 30 min auf Eis vor Licht geschützt inkubiert. Die FACS-Analyse wurde direkt im Anschluss durchgeführt, dazu wurden 0,5 ml FACS-Lösung zu den Zellen gegeben, vermischt und die FACS-Röhrchen im Gerät platziert und gemessen. Als Kontrolle der Färbung wurde ein FACS-Röhrchen nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert und als Kontrolle der Autofluoreszenz der Zellen wurde eine FACS-Messung mit ungefärbten Zellen durchgeführt. Die Anregung des verwendeten Farbstoffes Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) erfolgte mit dem Laser der Wellenlänge 488 nm, die Emission wurde im Kanal FL-1 detektiert (siehe Tab. 3.21.).

### 3.6.2. Zellzyklusanalyse

Die Vermehrung der Zellen durch Teilung hängt von Umweltbedingungen (Nährstoffen, Sauerstoffversorgung, etc.) und Signalen anderer Zellen ab. Unter guten Bedingungen durchlaufen viele Zellen die Phasen des Zellzyklus und teilen sich (s. Abb. 3.3.). Beim Durchlaufen des Zellzyklus verändert sich der DNA-Gehalt der Zellen (s. Abb. 3.3.), er entspricht in der G1-Phase einem diploiden Chromosomensatz ( $2n$ ), während der S-Phase verdoppelt er sich auf  $4n$ . Nach der G2-Phase folgt die Mitose und die Zelle teilt sich in zwei Zellen mit diploidem Chromosomensatz.

Durch Behandlung mit Inhibitoren und Aktivatoren kann die Vermehrung der Zellen verhindert oder verstärkt werden. Diese Veränderungen können mit der Zellzyklusanalyse detektiert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Analyse des Zellzyklus durch die Messung des DNA-Gehaltes mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid. Propidiumiodid interkaliert mit doppelsträngigen Nukleinsäuremolekülen und emittiert nach Anregung durch einen Laser mit der Wellenlänge 488 nm Licht mit einer Wellenlänge von 600 nm.

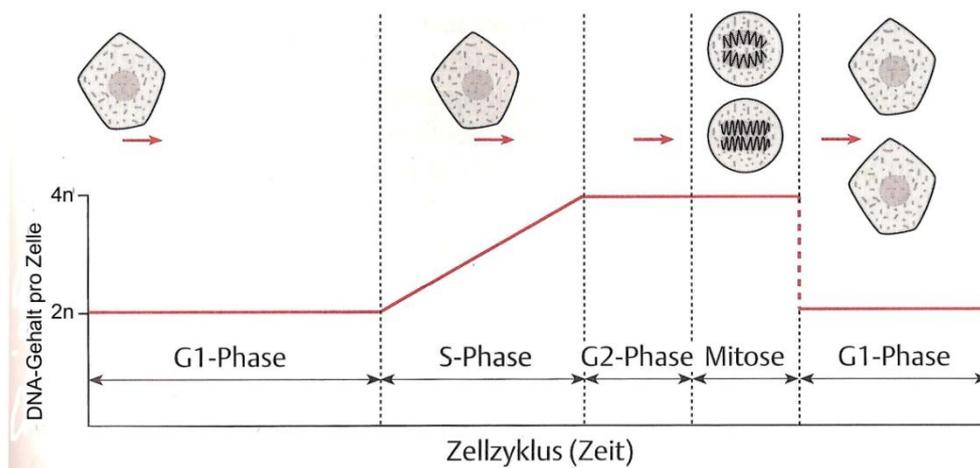


Abb. 3.3. Zellzyklus und DNA-Gehalt (nach Knippers, 2001)

### Fixierung und Färbung der Zellen

Die EPCs wurden wie unter 3.1.4. isoliert, in mit Fibronectin-beschichteten Zellkulturgefäßen (10 cm<sup>2</sup>) mit 1,5x10<sup>6</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert und mit Accutase-Lösung abgelöst. Die Zellen wurden pelletiert und einmal in PBS-Lösung gewaschen. Die EPCs wurden durch Resuspendierung in 1 ml eiskalter Fixierungslösung und 10 min Inkubation bei 4 °C fixiert. Die Pelletierung der Zellen erfolgte durch 7 min Zentrifugation bei 300 x g und RT. Die Zellen wurden einmal in PBS-Lösung gewaschen. Zur Färbung wurde das Zellpellet in Propidiumiodid-Färbelösung resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und 15 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden bis zur FACS-Analyse vor Licht geschützt gelagert (Yamamoto, 2003).

### 3.6.3. Apoptose Nekrose Bestimmung

Die frühen Phasen der Apoptose führen zu einer Veränderung der Zelloberfläche, wie der Translokation der im Inneren der Plasmamembran gelegenen Phosphatidylserine (PS) an die Außenseite. Die auf der Zelloberfläche exponierten Phosphatidylserine können spezifisch mit dem Phospholipid-bindenden, Fluorescein-konjugierten Annexin-V detektiert werden. Die Translokation der PS ist nicht auf den Vorgang der Apoptose beschränkt, auch während der Nekrose findet sie statt (vgl. 3.5.2.). Zur Differenzierung zwischen den zwei verschiedenen Arten des Zelltodes wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) gegengefärbt, dieser kann nur in nekrotische Zellen mit permeabler Cytoplasmamembran eindringen, während in der frühen Phase der Apoptose die Plasmamembran noch intakt ist (Vermees, 1995). Die Färbung mit Annexin-V und Propidiumiodid ermöglicht die Unterscheidung zwischen vitalen, nekrotischen und apoptotischen Zellen (Übersicht s. Tab. 3.20.).

**Tab. 3.20. Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose nach Annexin-V/PI-Färbung**

Zustand der Zelle	Annexin-V	Propidiumiodid
vital	negativ	negativ
nekrotisch	positiv	positiv
apoptotisch	positiv	negativ

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Analyse der Apoptose/Nekrose mit dem *Annexin-V-FLUOS Staining Kit* (Fa. Roche) exakt nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die EPCs wurden wie unter 3.1.4 isoliert, in mit Fibronectin-beschichteten Zellkulturgefäßen (10 cm<sup>2</sup>) mit 1,5x10<sup>6</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert und mit Accutase-Lösung abgelöst. Die Zellen wurden pelletiert und einmal in PBS-Lösung gewaschen. Die Färbelösung *Annexin-V-FLUOS labeling solution* wurde durch Vermischung von 20 µl *Annexin-V-FLUOS labeling reagent*, 20 µl *Propidium iodide solution* und 1 ml *Incubation buffer* hergestellt. Die EPCs wurden auf FACS-

Röhrchen verteilt, mindestens 50.000 Zellen je Röhrchen und 5 min bei 300 x g und RT pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen, die Zellpellets jeweils in 50 µl *Annexin-V-FLUOS labeling solution* resuspendiert und 15 min bei RT vor Licht geschützt inkubiert. In jedes FACS-Röhrchen wurden zur Analyse im FACSCalibur 250 µl *Incubation buffer* gegeben und die Messung wie unter 3.6.4. beschrieben durchgeführt. Die Anregung beider Farbstoffe erfolgte mit einem Laser der Wellenlänge 488 nm, die Emission jedoch wurde bei Annexin-V in dem Kanal FL-1 und bei PI im Kanal FL-2 detektiert (siehe Tab. 3.21.).

### 3.6.4. FACS-Analyse

Die FACS-Analysen wurden mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur mit Argon-Ionen-Laser (488 nm) und den zugehörigen Lösungen FACS Flow, FACS Rinse, FACS Clean (alles von BD Biosciences) durchgeführt. Das FACS-Gerät wurde mit dem FACS *Calbrite Beads*, zellgroßen Kunststoffkügelchen ohne und mit Fluoreszenzmarkierung jeden Monat nach Herstellerangaben kalibriert. Die FACS-Messungen wurden mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC und PE durchgeführt und je Oberflächenmarker wurden zwei bis drei FACS-Röhrchen mit der entsprechenden Antikörperfärbung gemessen. Je FACS-Röhrchen wurden i. d. R. 10.000 Zellen gemessen. Die Zellzyklusanalysen erfolgten mit dem Farbstoff Propidiumiodid und die Apoptose-Nekrose-Analysen mit dem FITC-konjugierten Annexin-V. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, die zur Anregung genutzten Laser und die zur Detektion genutzten Kanäle sind in der Tabelle 3.21. ausgeführt. Die Analyse der mit dem FACSCalibur gewonnenen Daten erfolgte mit dem Computerprogramm CellQuest Pro Version 5.1.1 (BD Biosciences).

**Tab. 3.21. FACS-Fluoreszenzfarbstoffe: Anregungs- und Emissionswellenlänge**

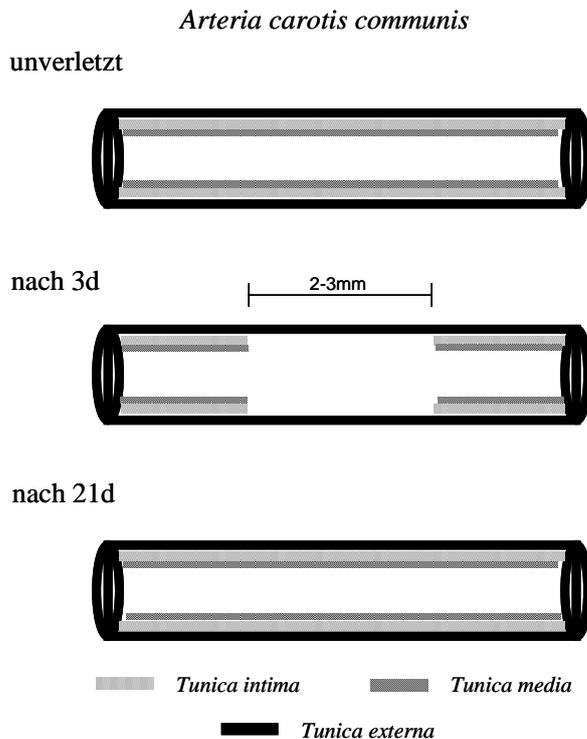
Trivialname	chemische Bezeichnung	Wellenlänge (nm)			FACSCalibur
		Anregung	Emission	Laser	Kanal
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat	495	517	488	FL-1
FLUOS	Fluorescein	488	518	488	FL-1
PE	R-Phycoerythrin	488-564	575	488	FL-2
PI	Propidiumiodid	488-530	620	488	FL-2

(nach Fa. Zeiss)

### 3.7. Murines Carotis-Verletzungsmodell

Das Carotis-Verletzungsmodell ermöglicht die Analyse der Regeneration und Reendothelialisierung der *Arteria carotis communis* (Halsschlagader), nachdem diese perivaskulär verletzt wurde. Die Reendothelialisierung kann durch die Gabe von Zellen wie z. B. EPCs verbessert werden und erlaubt die Untersuchung der Funktionalität von Zellen *in vivo* (Werner, 2003). Die Carotis-Verletzung wurde erfolgreich von verschiedenen Gruppen im

Mausmodell durchgeführt (Lindner, *et al.* 1993, Kumar *et al.*, 1997, Xu, 2004). 1997 beschrieb Carmeliet eine Variante unter Verwendung eines Microcoagulators, der mit einer unter Spannung stehenden Pinzette das Gewebe verletzt (Carmeliet, 1997a, Carmeliet, 1997b). Die *A. carotis communis* hat einen rechten und einen linken Part, der rechte entspringt dem brachiocephalen Gefäß, während der linke dem Aortenbogen entstammt (*left common carotid artery*, s. Abb. 3.5.).



**Abb. 3.4. Vereinfachtes Modell der Carotidenverletzung** (nach Carmeliet, 1997)

In den durchgeführten Experimenten wurde stets die linke Carotis verletzt und analysiert, die rechte wurde nur als Kontrolle der Fluoreszenzfärbung entnommen. In Abbildung 3.4. ist der Verlauf einer Carotidenverletzung dargestellt, in der unverletzten Carotis sind die *Tunica intima* (Endothelzellen) und die *T. media* (Muskelschicht) von der *T. externa* (Adventitia) umhüllt. Die mit dem Microcoagulator herbeigeführte Verletzung führt zur Denudation (Abtragung) von Endothelzellen und zur Zerstörung der glatten Gefäßmuskelnzellen. In dem 2-3 mm langen Bereich der perivaskulären Verletzung ist nach drei Tagen die *T. intima* abgetragen und die glatten Gefäßmuskelnzellen sind abgestorben (s. Abb. 3.4.). Die Reendothelialisierung und Regeneration des Gewebes erfolgen von beiden Seiten der Verletzung durch Zellteilungen und Migration der unverletzten *T. intima* und *T. media*. Die komplette Regeneration des Gewebes dauert ohne Beeinflussung drei Wochen (Liehn, 2004), durch die Gabe von Zellen kann die Reendothelialisierung beschleunigt werden (Werner, 2003).

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Carotis-Verletzungsmodell sollte die beschleunigte Reendothelialisierung der Carotis nach der Gabe von Zellen analysieren, um so die Funktionalität der humanen EPCs *in vivo* untersuchen zu können. Deshalb wurde der

immundefiziente Mausstamm NMRI<sup>nu/nu</sup> verwendet. Die Mäuse dieses Stammes haben keinen Thymus und entwickeln keine vollständige Immunabwehr (Wortis *et al.*, 1971, Cordier *et al.*, 1980). Die während des Experiments injizierten humanen EPCs werden vom Immunsystem der Maus nicht als fremd erkannt und zerstört, wie es bei einer normalen Maus mit funktionalem Thymus der Fall wäre. Die Analyse der Reendothelialisierung erfolgte über die Evans Blue Färbung. Dabei wurde der Farbstoff kurz vor der Euthanasierung des Tieres injiziert und färbte ähnlich wie Trypan Blau tote Zellen an (s. 3.1.2.). Der Nachweis der injizierten EPCs erfolgte durch vorherige *in situ* Markierung der Zellen mit dem Farbstoff TAMRA und spezifische Immunfluoreszenzfärbungen an aus der verletzten Carotis hergestellten Gewebeschnitten.

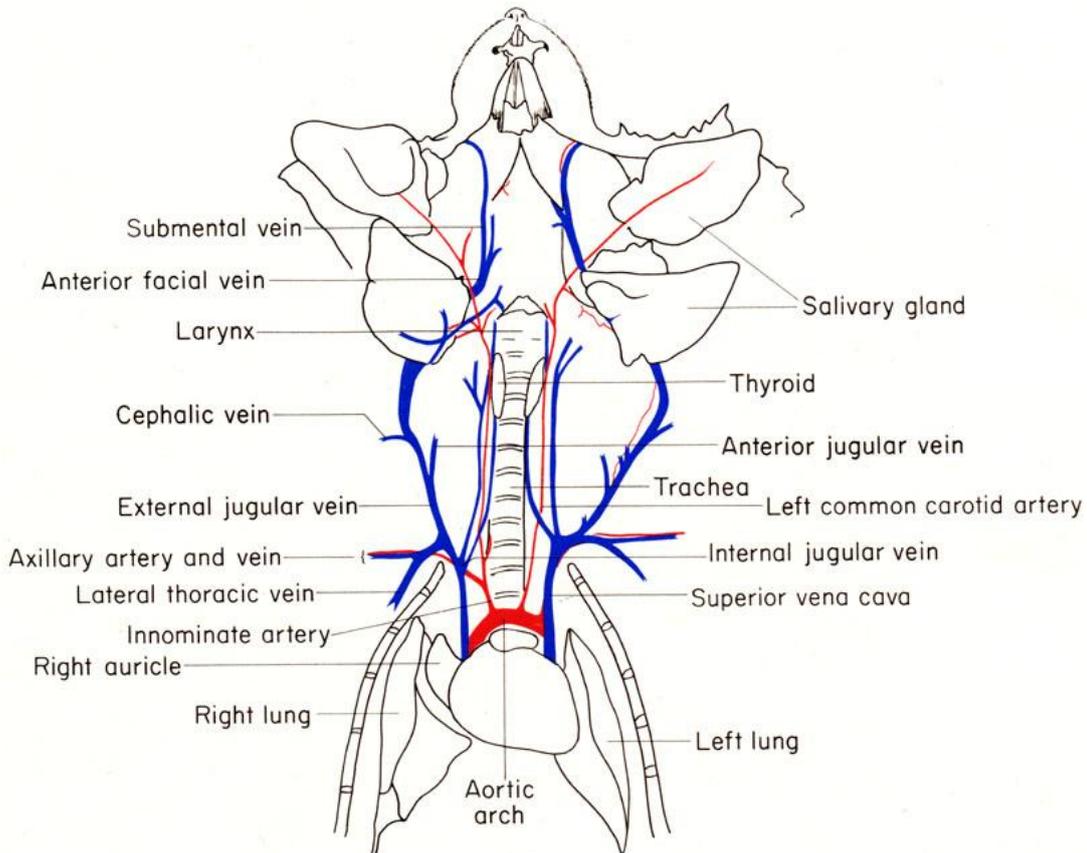
### 3.7.1. Maushaltung

Für diese Experimente wurden männliche, thymusaplastische NMRI<sup>nu/nu</sup>-Mäuse aus der Eigenzucht des Institutes für Versuchstierkunde der Medizinischen Hochschule Hannover, Leitung Prof. Dr. Hedrich, eingesetzt. Die verwendeten Nacktmäuse entstammen einem Auszuchtstamm, der sich gegenüber Inzuchtstämmen durch eine erhöhte Widerstandsfähigkeit auszeichnet. Die Haltung der Tiere erfolgte in autoklavierten, mit Filterhauben versehenen Makrolonkäfigen (inklusive Streu), welche in Laminar-Flow-Gestellen untergebracht wurden. Die Raumtemperatur betrug konstant 25 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit in den Käfigen von 70 %. Die Fütterung und Tränke erfolgten *ad libitum* mit sterilem Hochleistungsfutter und Wasser, die Mäuse unterlagen einem natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus. Die Haltungsbedingungen sollen eine keim- und stressreduzierende Umgebung für die Mäuse schaffen, so kann eine Reproduzierbarkeit der Experimente gewährleistet werden.

### 3.7.2. Operationstechnik

Die Carotidenverletzung wurde wie folgt durchgeführt: 8-10 Wochen alte, männliche NMRI<sup>nu/nu</sup>-Mäuse wurden mit 150 mg/kg Körpergewicht Ketaminhydrochlorid (Ketanest, Fa. Pharmacia) und 0,1 mg/kg Körpergewicht Xylazinhydrochlorid (Rompun 2 %, Fa. Bayer) anästhesiert. Unter einem Operationsmikroskop wurde durch mediale Öffnung der ventralen Seite des Halses mit einem Skalpell die linke Carotis etwa 2 cm posterior der Bifurkation freigelegt. Die Abbildung 3.5. zeigt den Verlauf der Blutgefäße im Hals einer Maus, die Carotis (*left common carotid artery*, rot eingefärbt) liegt lateral der Trachea. Die Verletzung der freigelegten, linken Carotis erfolgte durch einen bipolaren Microcoagulator (Elektrotom 80B, Fa. Martin) mit einer Spannung von 1,4 V für 2 sek mit Abständen von 1 mm auf einer Länge von 4 mm. Die Spannung wurde durch die Spitzen einer Micropinzette (Breite der Spitze: 200 µm, Fischer) ohne mechanischen Druck auszuüben an der Arterie angelegt. Die Tiere wurden zugenäht und bis zum Aufwachen mit einer Infrarotlampe bestrahlt, da sie in Narkose ihre Körpertemperatur nicht halten können. 3 h nach Durchführung der Operation wurden den

Mäusen die EPCs injiziert, je Tier 500.000 Zellen in 150 µl PBS (s. 3.1.4.) in die Schwanzvene, Kontrolltiere bekamen nur 150 µl PBS injiziert. Die EPCs wurden zum Nachweis durch Immunfluoreszenzfärbungen zuvor durch *in situ* Färbung mit dem Farbstoff TAMRA markiert (s. 3.1.7.). Zur Analyse der Reendothelialisierung mit der Evans Blue Färbung erfolgte keine Markierung der Zellen.



**Abb. 3.5. Verlauf der Blutgefäße im Hals der Maus** (von Margaret J. Cook)

### 3.7.3. *In situ*-Färbung und Entnahme der Carotis

Evans Blue ist ein Diazofarbstoff, der wasserlöslich und lipidunlöslich ist und eine hohe Spezifität zur Bindung an Serumalbumin hat. Der Farbstoff wurde ursprünglich zur Messung des Blutvolumens verwendet, eignet sich aufgrund seiner Eigenschaften auch zur Färbung toter Zellen. Evans Blue kann die permeable Cytoplasmamembran toter Zellen infiltrieren, die intakte Cytoplasmamembran vitaler Zellen kann es nicht durchdringen (Matsuda, 1995). Nach Injektion in die Maus färbt es die toten, glatten Gefäßmuskelzellen (s. 3.5.4.) blau an und ermöglicht die makroskopische Detektion der Größe des verletzten Areals. Zur Analyse der Reendothelialisierung wurden den Mäusen eine Woche nach der perivaskulären Verletzung jeweils 200 µl der Evans Blue Lösung in die Schwanzvene injiziert und die Tiere 10 min später euthanasiert. Die Operationsnaht wurde aufgetrennt, die Carotis inklusive der Bifurkation mit einer Länge von ~1 cm entnommen und in PBS gespült. Die Carotis wurde longitudinal aufgetrennt, kurz in Formalin (37 %) geschwenkt und mit feinen Minutiennadeln (Durchmesser:

0,1 mm, Länge: 10 mm, Fa. Fine Science Tools) in einer mit Silikon beschichteten Petrischale (Herstellung: siehe unten) *en face* fixiert. Die Carotis wurde zusammen mit einem Größenstandard fotografiert und mit dem Computerprogramm Axiovision Rel. 4.4.1.0 der Firma Zeiss analysiert, d. h. es wurde die Größe der Gesamtfläche des Lumen der Carotis und reendothelialisierte Fläche bestimmt. Durch die Evans Blue Färbung ist die reendothelialisierte Fläche weiß und die nekrotische blau gefärbt. Die Reendothelialisierung der Carotis wurde dabei als prozentualer Anteil der reendothelialisierten Fläche an der Gesamtfläche ausgedrückt (Lindner, 1993, Carmeliet, 1997b, Liehn, 2004).

### **Silikon beschichtete Petrischalen**

Zur Beschichtung der Petrischalen mit einer 4-5 mm hohen transparenten Silikonschicht wurde das Produkt Sylgard 184 Silicone Elastomere (Fa. Dow Corning) verwendet. Die zwei Komponenten des Produktes wurden im Verhältnis 10:1 (*base:curing agent*) miteinander vermischt bis sie eine einheitliche Farbe hatten. Die Masse wurde in Petrischalen (Durchmesser: 35 mm) verteilt. Die befüllten Petrischalen wurden bei 250 x g 10 min zentrifugiert, damit sich die Masse gleichmäßig im Gefäß verteilte. Das Silikon wurde ÜN bei RT unter dem Abzug zur Polymerisierung gelagert.

### **3.7.4. Entnahme der Carotis zur Fluoreszenzfärbung**

Zum Nachweis der injizierten EPCs wurde die Carotis durch die Perfusionsfixation fixiert. Dabei wird der euthanasierten Maus durch eine intrakardiale Kanüle Paraformaldehyd-Lösung mit einem Druck von 90 mmHg verabreicht. Die Carotis wird zusammen mit dem umliegenden Muskel- und Bindegewebe entnommen und in PFA und Sucrose fixiert. Zur Perfusionsfixation wurde der euthanasierten Maus eine Kanüle ins Herz gestochen, eine Spritze wurde mit Hilfe eines Stativs auf einer Höhe von 1,20 m (~90 mmHg) befestigt und über einen Schlauch mit der Kanüle befestigt. Der Vorhof des Herzens wurde entfernt damit die einströmende Flüssigkeit wieder herauslaufen kann. Zuerst wurde das Blut mit ~10 ml PBS-Lösung aus der Maus gespült, mit ~10 ml Paraformaldehyd-Lösung (2 %) wurden die Gewebe fixiert und das PFA mit ~10 ml PBS-Lösung aus der Maus entfernt. Die Carotis wurde zusammen mit dem umliegenden Muskel- und Bindegewebe entnommen und in PFA-Lösung (2 %) fixiert. Das Gewebe wurde durch die Inkubation in Sucrose-Lösung (15 %) für 3 h und ÜN in Sucrose-Lösung (30 %) stabilisiert. Das Gewebe wurde in der Gefrierlösung *Jung Tissue Freezing Medium* (Fa. Leica) eingebettet im Kryostat CM 1900 (Fa. Leica) in 10-15 µm dünne Querschnitte geschnitten (s. 3.5.3.).

### 3.8. *In vitro* Experimente

Die Funktionalität der EPCs kann mit verschiedenen Assays analysiert werden. Typische Funktionen der EPCs wurden in 1.1.2. ausführlich beschrieben. Im Folgenden werden die durchgeführten Assays beschrieben, welche die Adhäsion, Migration und die Fähigkeit der EPCs, das Wachstum von HUVEC in tubusartigen Formationen zu beeinflussen, analysieren.

#### 3.8.1. Adhäsionsassay

Für den Adhäsionsassay wurden EPCs mit HUVECs koinkubiert und die Veränderung der EPCs durch ihr verschlechtertes Adhärenzverhalten gemessen. Die EPCs wurden für 7 d unter in 3.1.3. beschriebenen Bedingungen kultiviert und abgelöst. Die HUVECs wurden wie unter 3.1.2. beschrieben kultiviert und abgelöst. Die Zellen wurden in 24-Well-Zellkulturgefäße auf mit Fibronectin beschichteten Deckgläsern ausplattiert. Die Zellen wurden sequentiell in den Assay eingesetzt: Zuerst wurden die HUVECs in 0,5 ml EGM (10 % FCS) ausplattiert, 20.000 Zellen/2 cm<sup>2</sup> für die Koinkubation mit den EPCs. Die mit AcLDL-markierten EPCs wurden 24 h später in EGM (10 % FCS) in der Assay eingesetzt (60.000 Zellen/2 cm<sup>2</sup>), je nach gewählter Bedingung wurden manche *Wells* mit dem Wachstumsfaktor VEGF (s. 3.1.1., 50 ng/ml) versetzt. Eine Kontrolle wurde ohne VEGF durchgeführt. Die Kokultur wurde 16 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, der Assay wurde mit Paraformaldehyd fixiert und die Zellkerne wurden mit dem Farbstoff DAPI gefärbt. Die Deckgläser wurden mit der Zellseite nach unten auf Objektträgern platziert und die Zellen mit 200facher und 400facher Vergrößerung in der Fluoreszenzmikroskopie fotografiert (Ceradini, 2004, Chavakis, 2005).

#### 3.8.2. Migrationsassay

Im Migrationsassay wurden die migratorischen Fähigkeiten der EPCs nach Behandlung in einer modifizierten Boydenkammer (*cell culture inserts*, linker Teil der Abb. 3.6.) der Firma BD gegen einen Wachstumsfaktor-Gradienten analysiert. Die *cell culture inserts* wurden in dem zugehörigen 24-Well-Zellkulturgefäß platziert und mit Fibronectin beschichtet (s. 3.1.1.). Die EPCs wurden für 7 d unter den in 3.1.3. beschriebenen Bedingungen kultiviert und abgelöst. In die untere Kammer (unter dem *cell culture insert*) wurde 0,8 ml Endotheliales Basis Medium pipettiert und mit den Wachstumsfaktoren VEGF oder 10 % fötalem Kälberserum (FCS) versetzt. Die Kontrolle wurde ohne Serum oder Wachstumsfaktor durchgeführt. Je *Well* wurden 100.000 Zellen in 0,25 ml Endotheliales Basis Medium in das Insert gegeben (Querschnitt des Aufbaus, rechter Teil der Abb. 3.6.). Der Assay wurde für 4 h bei 37 °C und CO<sub>2</sub>-Begasung im Brutschrank inkubiert. Das untere Medium wurde in frische 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt, bei 300 x g und RT 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in 50 µl PBS-Lösung aufgenommen. Die Zellzahl wurde wie unter 3.1.2. beschrieben bestimmt. Die *cell culture inserts* wurden mit

einem Wattestäbchen an der Oberfläche von aufliegenden Zellen befreit und die migrierten Zellen an der Unterseite mit Paraformaldehyd fixiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und die migrierten Zellen bei 200facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop fotografiert und ausgezählt (Asahara, 1999a, Vasa, 2001, Urbich, 2005, Walter, 2005).



**Abb. 3.6. Aufbau der modifizierten Boydenkammer** (von BD Biosciences)

### 3.8.3. Tube Formationassay

Der Tube Formationassay wurde eingesetzt, um die indirekten Fähigkeiten von EPCs das Wachstum in tubusartigen Formationen von HUVECs zu beeinflussen. Dazu wurde das Reagenz Matrigel Matrix der Firma BD Biosciences verwendet. Die Matrigel Matrix wird aus den Überständen der Tumorzelllinie des Maus-Sarcoms Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) gewonnen. Diese Überstände enthalten große Mengen an extrazellulären Proteinen, wie Laminin, Collagen IV, Heparansulfat-Proteoglycane, Entactin und Nidogen. Die Überstände werden aufgereinigt und die Wachstumsfaktoren wurden entfernt. Die Matrigel Matrix ist unter 10 °C flüssig und kann zur Beschichtung von Zellkulturgefäßen verwendet werden. Bei Erwärmung auf 37 °C wird die Matrix fest und kann zur Durchführung verschiedener Assays genutzt werden.

Die Beschichtung der Zellkulturplatten wurde aus oben genannten Grund auf Eis durchgeführt. Ebenso wurden alle anderen verwendeten Materialien (Pipettenspitzen, 1,5ml-Reaktionsgefäße) gekühlt. Zur Beschichtung von 48-Well-Zellkulturplatten (1 cm<sup>2</sup>) wurde das Matrigel Matrix auf Eis aufgetaut und je 1 cm<sup>2</sup> wurden 45 µl Matrigel mit sterilen Pipetten verteilt. Die beschichteten Zellkulturgefäße wurden für 30 min im 37°C-Schrank inkubiert. Für den Tube Formationassay wurden EPCs mit HUVECs koinkubiert und die Veränderung der EPCs indirekt durch ein verbessertes Wachstum der HUVECs gemessen. Die EPCs wurden für 7 d unter in 3.1.3. beschriebenen Bedingungen kultiviert und abgelöst. Die HUVECs wurden wie unter 3.1.2. beschrieben kultiviert und abgelöst. Die Zellen wurden sequentiell in den Assay eingesetzt: Zuerst wurden die HUVECs in EGM (10 % FCS) ausplattiert, 25.000 Zellen/1 cm<sup>2</sup> für die Kontrolle und 15.000 Zellen/1 cm<sup>2</sup> bei Koinkubation mit EPCs. Die mit AcLDL-markierten EPCs wurden 4 h später in den Assay eingesetzt (25.000 Zellen/1 cm<sup>2</sup>). Dabei wurde das Medium von den HUVECs abgenommen und die EPCs in EGM (2 % FCS) zugegeben. Der

Assay wurde nach 16 h, 24 h und 48 h mit Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie bei 200facher Vergrößerung fotografiert (Tepper, 2002, Verma, 2004).

### **3.9. Analyse der Zellproliferation und Zytotoxizität**

#### **3.9.1. Analyse der Zellproliferation**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Zellproliferation der EPCs nach Behandlung mit Inhibitoren mit dem *CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Fa. Promega) evaluiert. Die Messung der Zellproliferation erfolgt durch die Quantifizierung der zellulären Umsetzung des Salzes Tetrazolium in das Salz Formazan in Form von blauen Farbstoffaggregaten. Die Zugabe einer Lyse-/Stopplösung lysiert die Zellen und bringt die farbigen Aggregate in Lösung. Die Absorption der blau gefärbten Probe wird im Mikrotiterplattenleser mit der Wellenlänge 570 nm bestimmt. Die Intensität der Absorption ist direkt proportional zur Zellproliferation: Je mehr Zellen metabolisch aktiv sind, desto stärker ist die Blaufärbung.

Der Test wurde strikt nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die EPCs wurden zur Bestimmung der Zellproliferation wie unter 3.1.4. beschrieben auf mit Fibronectin beschichteten Deckgläsern in 24-Well-Zellkulturgefäßen ausplattiert. Die Zellen wurden von 0 d bis 7 d mit dem Inhibitor (Konzentration s. Ergebnisteil) inkubiert. Nach 7 d wurden die Zellen gewaschen und das Medium von EGM (20 % FCS) zu Phenolrot-freien, 1 g/ml Glucose haltigen DMEM ohne Serum gewechselt, da Phenolrot und Serum die Ergebnisse des Testes verfälschen können. Die EPCs wurden 4 h in 300 µl DMEM und 45 µl *Dye Solution* bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 300 µl *Solubilization/Stop Solution* und 1 h Inkubation bei RT im Dunkeln abgestoppt und die Zellen lysiert. Die Überstände wurden in eine Flachboden-96-Well-Zellkulturplatte überführt und im Mikrotiterplattenleser (Fa. Laboratory Instruments SLT) die Absorption der Testwellenlänge 570 nm und der Referenzwellenlänge 630nm bestimmt. Als Kontrollen für den Test wurden zum einen Medium ohne Zellen und zum anderen Medium mit Zellen und mit dem Lösungsmittel des Inhibitors inkubiert. Die Kontrollen und Proben des Testes wurden als Triplet durchgeföhrt.

#### **3.9.2. Analyse der Zytotoxizität bzw. Zytolyse**

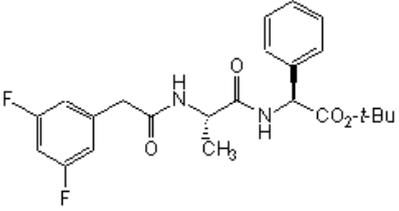
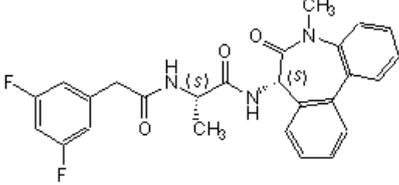
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der nekrotische Zelltod in Folge von Zytotoxizität bzw. Zytolyse mit dem *Cytotoxicity Detection Kit* (Fa. Roche) evaluiert. Der Test basiert auf der Quantifizierung der Aktivität des Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH), welches schnell nach Schädigungen der Plasmamembran freigesetzt wird. Die Aktivität der LDH im Zellkulturüberstand korreliert direkt mit der Anzahl der lysierten Zellen. Die Analyse der LDH-Aktivität erfolgt durch eine Farbreaktion, bei welcher das hellgelbe Tetrazoliumsalz durch die

Lactat-Dehydrogenase in das rote Formazansalz umgewandelt wird. Die Intensität des Farbumschlags wird mit einem Mikroplattenleser bei der Wellenlänge 490 nm gemessen. Der Test wurde strikt nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurden die EPCs wie unter 3.1.4. beschrieben auf mit Fibronectin beschichteten Deckgläsern in 24-Well-Zellkulturgefäßen ausplattiert. Nach 6 d wurden die Zellen gewaschen und das Medium zu Niedrigserumbedingungen gewechselt (EBM, 2 % FCS), da im Serum geringe LDH-Aktivitäten nachgewiesen werden können. Die Zellen wurden von 0 d bis 7 d mit dem Inhibitor (Konzentration s. Ergebnisteil) inkubiert. Die Überstände der Kulturen wurden in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt und 10 min bei 250 x g und RT zentrifugiert, um die Lösung von Zellen zu befreien. Je Probe wurden 100 µl des Überstandes in die Vertiefungen einer Flachboden-96Well-Zellkulturplatte überführt. Die Proben und Kontrollen wurden als Triplets durchgeführt. Die *Reaction Mixture* wurde durch Vermischen von 25 µl *Catalyst* mit 1125 µl *Dye Solution* hergestellt. Zu den Überständen wurden 100 µl *Reaction Mixture* gegeben, geschüttelt und 30 min bei RT vor Licht geschützt inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 µl 1 N HCl-Lösung abgestoppt und die Absorption der Testwellenlänge 490 nm und der Referenzwellenlänge 630 nm im Mikrotiterplattenleser (Fa. Laboratory Instruments SLT) bestimmt. Als Kontrolle des Hintergrundes wurden 200 µl frisches Medium verwendet und als Kontrolle der maximalen LDH-Aktivität wurden 100 µl Überstand von Zellen, die in 1 % Triton-X-100 (in Medium verdünnt) lysiert wurden, mit 100 µl *Reaction Mixture* inkubiert und gemessen.

### 3.10. Inhibition des Notch-Signalweges

Die Inhibition von Signaltransduktionswegen ist ein essentielles Werkzeug in der molekularbiologischen Analyse. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die in Tabelle 3.22. aufgelisteten Inhibitoren zur Inhibition des Notch-Signalweges verwendet.

**Tab. 3.22. Verwendete Inhibitoren und ihre Wirkung**

Substanz	Wirkung	Referenz
<p><i>γ-Secretase Inhibitor IX</i>, DAPT, GSI</p> 	Verhindert die spaltende Aktivität der $\gamma$ -Sekretase	Dovey, 2001, Sastre, 2001, Geling, 2002, Androutsellis-Theotokis, 2006
<p><i>γ-Secretase Inhibitor XX</i>, DBZ, GSI II</p> 	Verhindert die spaltende Aktivität der $\gamma$ -Sekretase	Milano, 2004, van Es, 2005

Der  $\gamma$ -Secretase Inhibitor IX (DAPT) wurde mit einer Konzentration von 30  $\mu$ M als Stammlösung und der  $\gamma$ -Secretase Inhibitor XX (DBZ) als 3  $\mu$ M-Stammlösung jeweils in DMSO gelöst. Die Verdünnung der  $\gamma$ -Secretase Inhibitor Stammlösungen erfolgte in ebenfalls DMSO. Alle Stammlösungen und ihre Verdünnungen wurden bei -20 °C gelagert und für maximal drei Monate nach Herstellung der Lösung verwendet. Die eingesetzte Konzentration der Inhibitoren und die Dauer der Inkubation ist im Ergebnisteil bei den jeweiligen Versuchen vermerkt.

Als weitere Möglichkeit der Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase wurde ein rekombinantes Immunglobulin, das mit dem Protein Jagged verbunden ist (Jagged-IgG, Fa. R&D Systems), eingesetzt. Dieser Ligand von Notch wirkt in Lösung inhibierend (Hicks, 2002). Als Kontroll-IgG wurde ein rekombinantes, humanes IgG<sub>1</sub>Fc eingesetzt (Fa. R&D Systems). Die Immunglobuline wurden gemäß Beipackzettel mit 100  $\mu$ g in 200  $\mu$ l PBS mit 0,1 % BSA mit einer Konzentration von 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l rekonstituiert. Die Immunglobulin-Lösungen und ihre Verdünnungen wurden bei 4°C gelagert und für maximal einen Monate nach Rekonstitution verwendet.

## 4. Ergebnisse

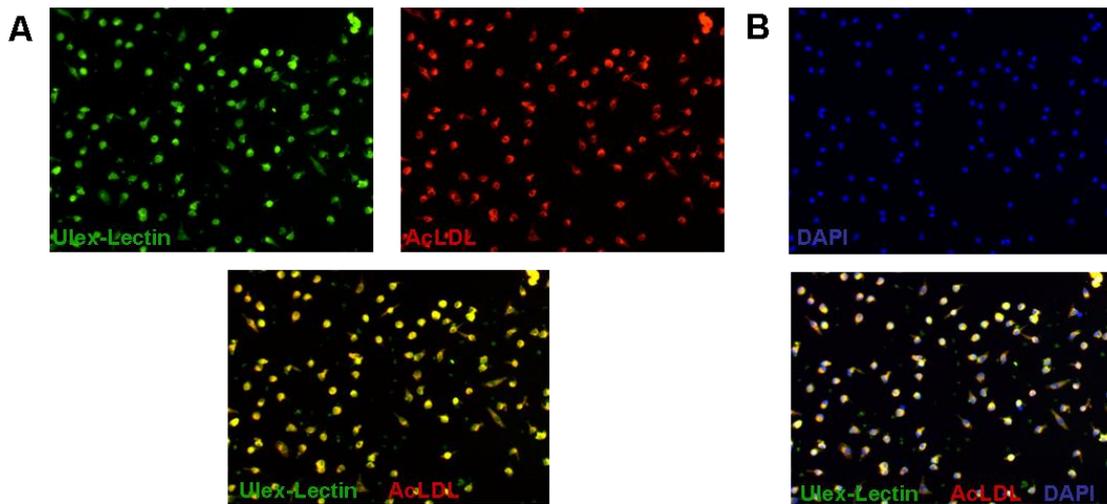
Der erste Abschnitt der Ergebnisse befasst sich mit dem Nachweis der durch die Kultivierung isolierten EPCs und der Analyse der Notch-Expression auf EPCs. Im nächsten Abschnitt wurde die Veränderung der EPCs unter Inhibition des Notch-Signalweges mit dem  $\gamma$ -Secretase-Inhibitor IX (DAPT) ermittelt; dazu wurden funktionale und vitale Eigenschaften der EPCs analysiert. Des Weiteren wurde der alternative  $\gamma$ -Secretase-Inhibitor XX (DBZ) und ein inhibitorisch wirkendes Jagged-Immunglobulin eingesetzt. Im dritten Teil der Ergebnisse wurde die veränderte Funktionalität der EPCs nach Notch-Inhibition *in vivo* im Carotis Verletzungsmodell untersucht. Der Einsatz eines dominant negativen rekombinanten RBP-J-Adenovirus zur Inhibition des Notch-Signalweges in der EPC-Kultur wurde im vierten Abschnitt beschreiben. Im fünften Teil wurden Unterschiede in der Expression von Oberflächenrezeptoren mit der FACS-Analyse ermittelt, der reduziert exprimierte CXCR4-Rezeptor wurde im sechsten Abschnitt untersucht.

### 4.1. Nachweis und Analyse der EPC

#### 4.1.1. Nachweis der EPC-Kultur durch Doppelfärbung

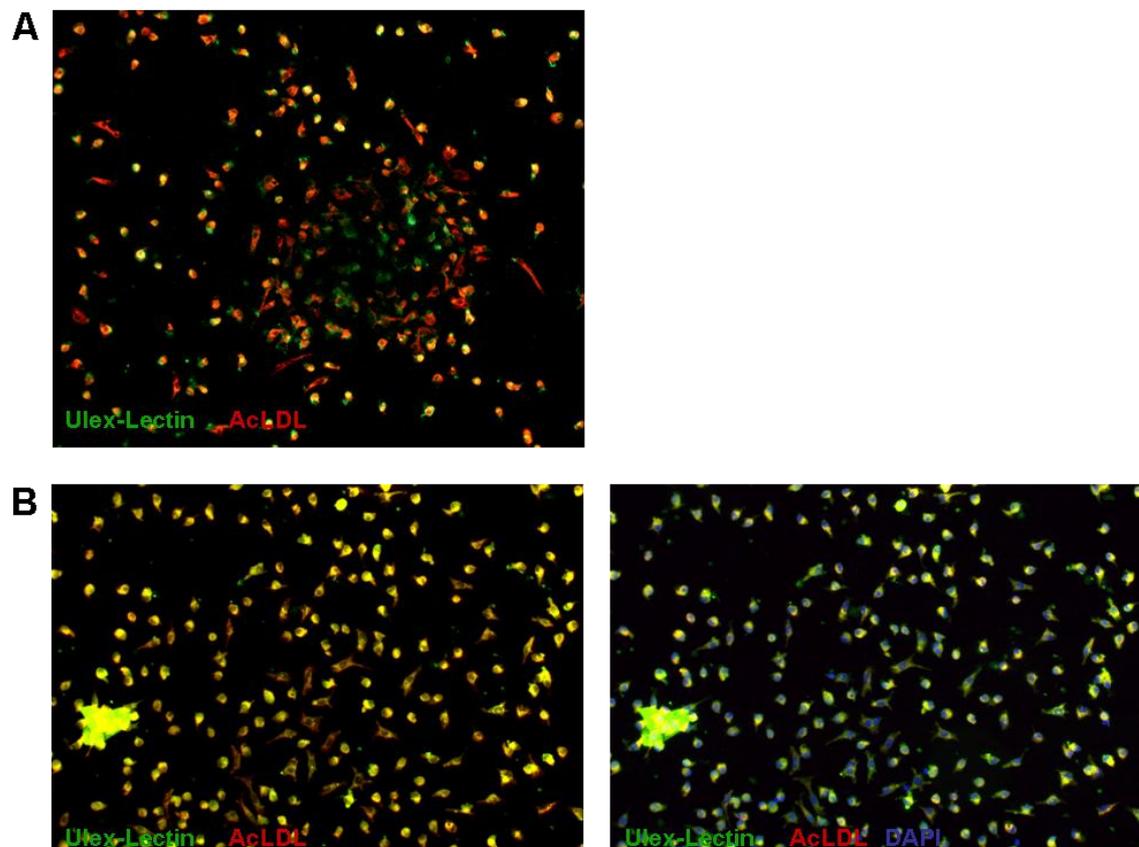
Die endothelialen Progenitorzellen (EPCs) wurden aus humanem peripherem Blut nach modifiziertem Protokoll von Asahara (1997) und Dimmeler (2001) isoliert. Das Blut wurde jungen, gesunden, freiwilligen Spendern abgenommen. Die enthaltenen mononukleären Zellen wurden durch Ficollgradientenzentrifugation vom restlichen Blut abgetrennt und in Endotheliales Wachstumsmedium (EGM, Fa. Cambrex) auf mit Fibronectin-beschichteten Deckgläsern in Zellkulturgefäßen mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Am 7 d der Kultivierung wurden die EPCs *in vitro* mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff DIL konjugierten, acetylierten LDL (*low density lipoprotein*, Fa. CellSystems) angefärbt. Die EPCs wurden mit Paraformaldehyd fixiert, mit dem grünen FITC-konjugierten Lectin aus *Ulex europaeus* und die Zellkerne mit DAPI (beides Fa. Sigma Aldrich) blau gegengefärbt (Asahara, 1997). Die Deckgläser wurden auf Objektträgern mit *Fluorescent Mounting Medium* (Fa. Dako Cytomation) platziert, mit dem Mikroskop Axiovert 200 und dem Programm Axiovision (Fa. Zeiss) fotografiert. Die Abbildung 4.1. zeigt Bilder der gefärbten EPCs, welche mit den entsprechenden Fluoreszenzfiltern aufgenommen wurden.

In 4.1.A sind die Aufnahmen des grünen und roten Fluoreszenzkanals und ihre Überlagerung abgebildet, während 4.1.B das Bild des blauen Kanal und die Überlagerung aller Kanäle zeigt. Die Kombination des grünen und roten Kanals zeigt nur gelbe Zellen, welche durch ihre doppelt positive Färbung für das Lectin und AcLDL als EPC identifiziert wurden (Asahara, 1997, Dimmeler, 2001). Die weitere Überlagerung mit dem Bild des blauen Kanals zeigte, dass alle EPC einen intakten Zellkern besitzen.



**Abb. 4.1. Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen vom 7 d der EPC-Kultur** (200x Vergrößerung) **A** in grün *Ulex europaeus*-Lectin und in rot AcLDL, der untere Teil der Abbildung zeigt die Überlagerung der beiden Bilder, **B** in blau DAPI zur Kernfärbung, der untere Teil zeigt die Überlagerung aller Kanäle

Abbildung 4.2.A zeigt die überlagerte Aufnahme einer EPC-Kolonie im grünen und roten Fluoreszenzkanal, das Bild 4.2.B gibt eine repräsentative Aufnahme einer EPC-Kultur wieder. Die positiven Färbungen mit AcLDL und Lectin aus *Ulex europaeus* wiesen die Zellen als EPCs aus (Asahara, 1997).



**Abb. 4.2. EPC-Kolonie und EPC-Kultur am 7 d der Kultivierung** (200x Vergrößerung) **A** EPC-Kolonie, in grün *Ulex europaeus*-Lectin und in rot AcLDL überlagert, **B** EPC-Kultur, links *Ulex europaeus*-Lectin (grün) und AcLDL (rot) kombiniert, rechts überlagert mit dem blauen Kanal (DAPI, Kernfärbung)

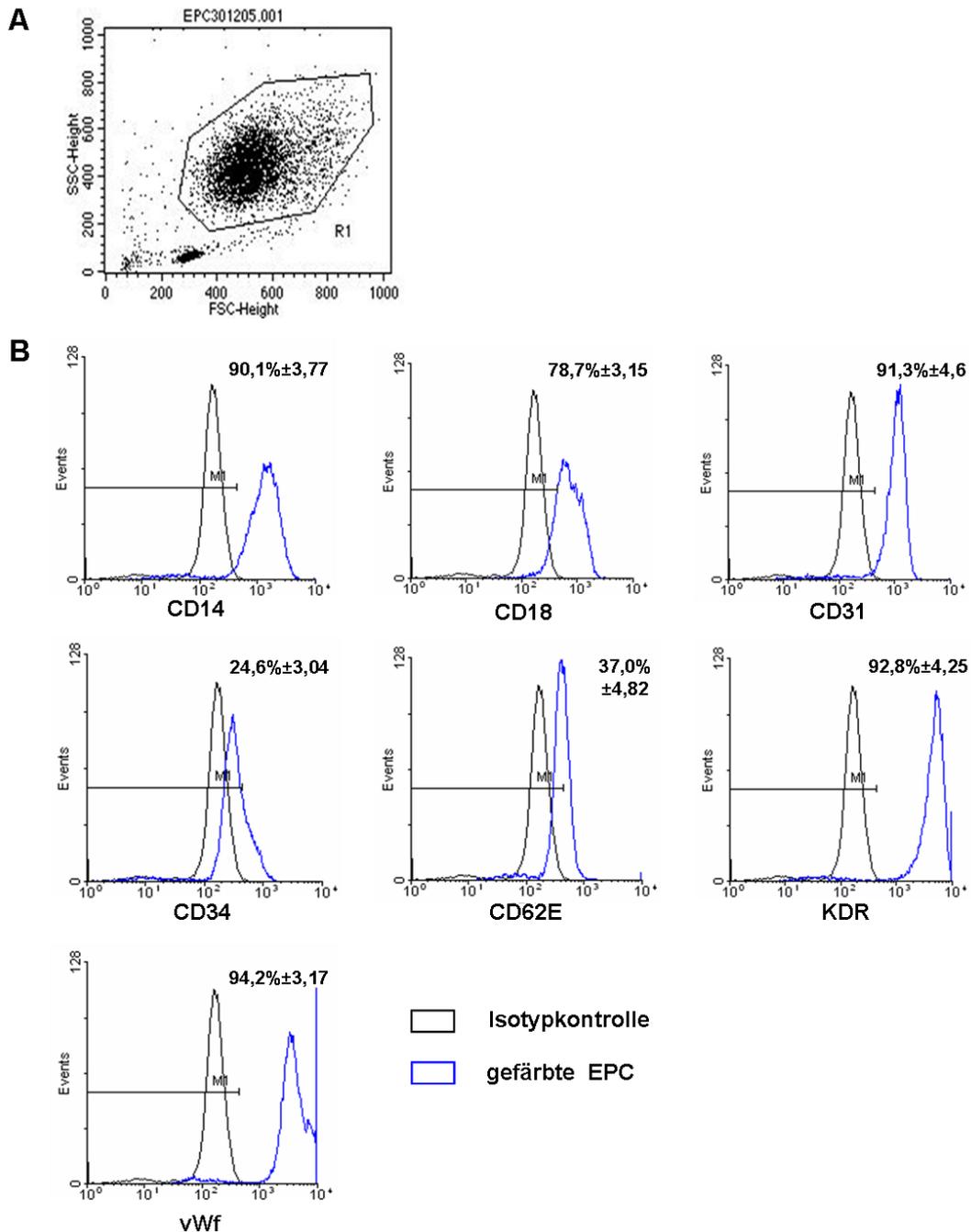
### 4.1.2. Nachweis spezifischer EPC-Marker in der FACS-Analyse

Zum Nachweis spezifischer EPC-Marker in der FACS-Analyse wurden die EPCs wie unter 4.1.1. beschrieben isoliert und in Endotheliales Wachstumsmedium (EGM) in mit Fibronectin-beschichteten Zellkulturgefäßen mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Am 7 d der Kultivierung wurden die EPCs mit Accutase-Lösung (Fa. PAA laboratories) abgelöst und in PBS mit 2 % FCS resuspendiert. Die EPCs wurden auf FACS-Röhrchen mit mindestens 50.000 Zellen verteilt, mit dem primären Antikörper (Konzentration:  $1 \mu\text{g}/10^6$  Zellen) und 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  humanen Immunglobulin 30 min bei 4 °C vor Licht geschützt inkubiert. Die Zellen wurden einmal in PBS mit 2 % FCS gewaschen und mit dem sekundären, FITC-konjugierten Antikörper (Konzentration:  $1 \mu\text{g}/10^6$  Zellen) und 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  humanen Immunglobulin (beides Fa. dianova) 30 min bei 4 °C vor Licht geschützt inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden in den FACS-Röhrchen in PBS mit 2 % FCS resuspendiert. Mindestens 10.000 EPCs je FACS-Röhrchen wurden im FACSCalibur (Fa. BD Biosciences) mit einem Argon-Ionen-Laser gemessen, die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts wurde im Fluoreszenzkanal FL-1 ermittelt.

Abb. 4.3.A zeigt einen typischen Dot Plot einer FACS-analysierten EPC-Kultur. In dieser Art der Darstellung werden die Zellen gemäß der Messwerte der FACS-Analyse als einzelne Punkte im Graphen wiedergegeben. Bei dem in 4.3.A abgebildeten Dot Plot handelt es sich um einen Scatter Plot, d. h. die Zellen werden abhängig von der Intensität des Vorwärts- (*forward scatter*, FSC) und Seitenstreulichts (*side scatter*, SSC) dargestellt. Dabei gilt, je intensiver das Vorwärtsstreulicht ist, desto größer ist die Zelle. Kleine Zellen werden im unteren Teil und große Zellen im oberen Teil der Grafik abgebildet. Die Menge an Seitenstreulicht korreliert mit der Granularität der Zelle, schwach granulare Zellen befinden sich im linken Teil des Graphen, die stark granularen im rechten. Im Scatter Plot der EPC-Kultur sind zwei Zellpopulationen zu erkennen, eine homogene mit kleinen, schwach granularen Zellen im unteren, linken Teil der Grafik und eine heterogene mit größeren, granularen Zellen. Die Analyse der Oberflächenmarker (Abb. 4.3.B) zeigte, dass nur auf der heterogenen Population EPC-spezifische Marker wie PECAM-1 (CD31), CD14, KDR und der von Willebrand-Faktor (vWF) exprimiert wurden (Urbich, 2004, Kalka, 2007). Daher wird in den folgenden Darstellungen der FACS-Analyse stets die heterogene Population dargestellt (Rehman, 2003).

In Abb. 4.3.B werden die Ergebnisse der FACS-Analyse in Form eines Histogramms dargestellt. Die X-Achse hat dabei eine exponentielle Skala, welche die Intensität des Fluoreszenzsignals angibt, während die Y-Achse die Anzahl der Ereignisse in einem bestimmten Kanal zeigt, d. h. Zellen mit einer bestimmten Fluoreszenzintensität. Die Intensität des Fluoreszenzsignals wird beim FACSCalibur in 1024 Kanälen gemessen, je nach eingestellter Verstärkung des Signals verschieben sich die Kurven nach links (schwächere Verstärkung) oder rechts (stärkere Verstärkung). Die Isotypkontrolle, also die Färbung der

EPCs mit einem Fluoreszenz-markierten, primären Antikörper gleichen Isotyps aber ohne Spezifität, wurde im Histogramm durch eine schwarze Kurve mit weißer Fläche dargestellt. Die Verschiebung der blauen Kurve im Vergleich zur Isotypkontrolle nach Färbung der EPCs mit spezifischen Antikörpern ist ein Maßstab für die Anzahl des auf der Zelle vorhandenen Rezeptors. Je weiter die Kurve nach rechts im Histogramm wandert, desto mehr Rezeptor ist auf der Oberfläche der Zellen vorhanden.

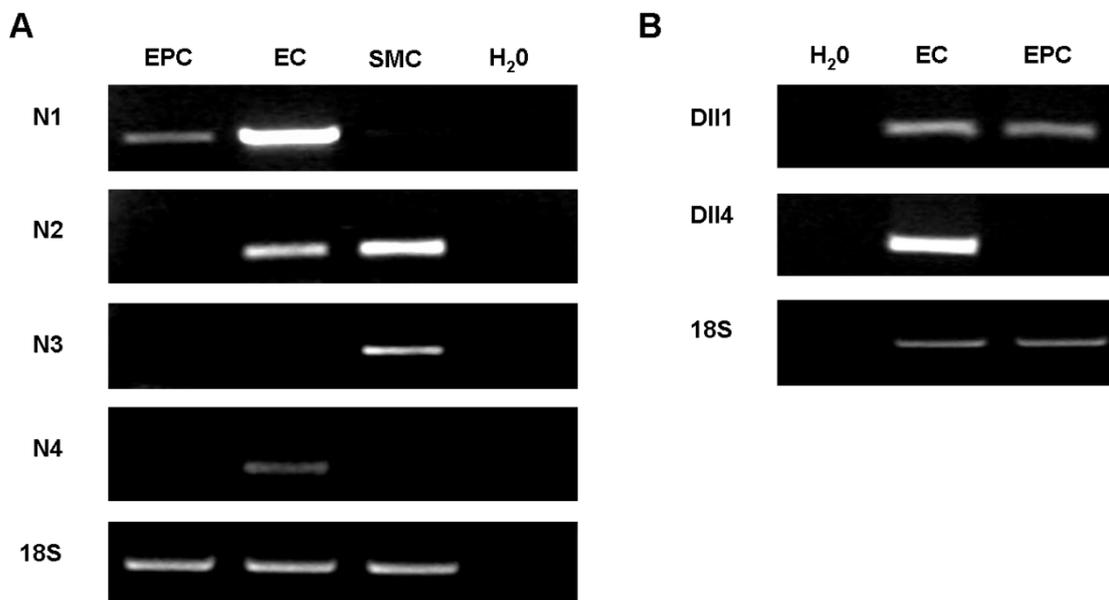


**Abb. 4.3. FACS-Analyse der Oberflächenrezeptoren auf EPCs** **A** EPC-Kultur im Dot Plot durch die Parameter Vorwärts- (FSC) und Seitenstreulicht (SSC) dargestellt, **B** EPC-Kultur mit angefärbten Oberflächenmarkern (CD14, CD18, CD31, CD34, CD62E, KDR, vWF), die Isotypkontrolle als schwarze und die gefärbten EPCs als blaue Kurve.

Die Histogramme in Abb. 4.3.B zeigen, dass die analysierten Zellen EPC-spezifische Oberflächenrezeptoren exprimierten. Die kultivierten EPCs zeigten sowohl die Expression monozytärer Marker (CD14: 90,1 %  $\pm$  3,77 %, CD18: 78,7 %  $\pm$  3,5 %) als auch die von Markern, welche auf Monocyten und Endothelzellen (CD31: 91,3 %  $\pm$  4,6 %) exprimiert werden. EPCs werden in der Literatur durch die gemeinsame Expression von hämatopoetischen und endothelialen Marker definiert (Urbich, 2004). Die im Rahmen dieser Arbeit kultivierten EPCs zeigten sowohl die Expression von hämatopoetischen (CD34: 24,6 %  $\pm$  3,04 %) als auch von endothelialen Markern (CD62E: 37,6 %  $\pm$  4,82 %, KDR: 92,8 %  $\pm$  4,25 %, vWf: 94,2 %  $\pm$  3,17 %), (Kalka, 2007, Rehman, 2003).

#### 4.1.3. Expression von Notch und seines Liganden auf EPCs

Zum Nachweis der Expression von Notch-Rezeptoren in der RT-PCR wurden die EPCs wie unter 4.1.1. beschrieben isoliert und in Endotheliales Wachstumsmedium (EGM) in mit Fibronectin-beschichteten Zellkulturgefäßen mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Am 7 d der Kultivierung wurde das Medium abgenommen und die EPCs in *peqGOLD TriFast*-Lösung (Fa. peqlab) abgelöst und lysiert.



**Abb. 4.4. Expression von Notch1 und seines Liganden Deltalike1 auf EPCs mittels RT-PCR** **A** Die Expression von Notch1-4 mittels RT-PCR in EPCs, Endothelzellen (ECs) und glatten Gefäßmuskelzellen (SMCs), die 18SrRNA-PCR wurde als Kontrolle der cDNA-Quantität durchgeführt, **B** Die Expression von Deltalike1 und 4 mittels RT-PCR in EPCs und ECs, die 18SrRNA-PCR als Kontrolle der cDNA-Quantität

Die RNA wurde durch Vermischung mit Chloroform und Zentrifugation von den übrigen Zellbestandteilen abgetrennt und verbliebene Phenol-Chloroformreste wurden durch Ethanol-fällungen entfernt. Die RNA wurde mit dem *SuperScript III First-Strand Synthesis System* (Fa. Invitrogen) unter Verwendung von *Random hexamer Primern* in cDNA

umgeschrieben. Die Reverse Transkription der RNA in cDNA wurde durch eine PCR mit den Primern für die 18SrRNA überprüft (siehe Abb. 4.4.A und B unterste Spalte), diese PCR diente als Indikator für die Quantität der cDNA-Lösung.

Die Expression von Notch1 und seinem Liganden Deltalike1 wurde in EPCs durch eine PCR mit den entsprechen Primer in Abb. 4.4.A und B jeweils in der obersten Spalte gezeigt. Die übrigen bekannten Mitglieder der Notch-Rezeptorfamilie (Notch2, -3, -4) und Deltalike4 wurden nicht auf EPC exprimiert. HUVECs exprimierten die Rezeptoren Notch1, -2 und -4 und die Liganden Deltalike1 und -4. Die Notch-Rezeptoren 2 und 3 wurden von glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert.

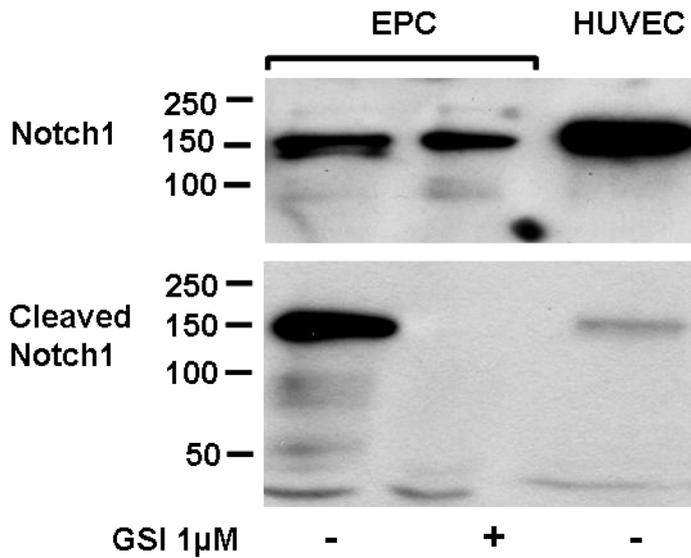
## 4.2. Inhibition des Notch-Signalweges in EPCs *in vitro*

### 4.2.1. Nachweis der Inhibition der Notch-Prozessierung in EPCs

Der Nachweis der Inhibition der Notch-Prozessierung erfolgte durch Western Blotting, dazu wurden die EPCs wie unter 4.1.1. beschrieben isoliert und in Endotheliales Wachstumsmedium (EGM) in mit Fibronectin-beschichteten Zellkulturgefäßen mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Die EPCs wurden jeden Tag mit dem  $\gamma$ -Secretase-Inhibitor DAPT (Fa. Calbiochem; Konzentration: 1  $\mu$ M; Androutsellis-Theotokis, 2006) behandelt, da der Inhibitor in DMSO (Fa. Sigma) gelöst wurde, wurden die EPCs zur Kontrolle mit dem gleichen Volumen DMSO inkubiert. Am 7 d der Kultivierung wurde das Medium abgenommen, die EPCs einmal mit PBS gespült und mit 1x Protein-Lysis-Puffer lysiert. Die Proteinlösung wurde durch Zentrifugation von Zelldebris abgetrennt und die Proteinkonzentration mit dem Bradfordtest (Fa. Bio-Rad Laboratories) bestimmt. Die Proteine wurden in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Fa. Amersham Biosciences) nach Größe aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran (Fa. Whatman Schleier&Schuell) übertragen. Die auf der Membran fixierten Proteine wurden immunologisch mit Antikörpern angefärbt und mit einer chemiluminenten Reaktion (Fa. Amersham Biosciences) sichtbar gemacht. Das chemiluminente Signal wurde zur Belichtung eines Filmes (Fa. Kodak) genutzt, das Signal wurde durch Entwicklung des Filmes (Fa. Protec Medizintechnik) abgebildet.

In der oberen Spalte der Abbildung 4.5. wird die Färbung der Proteinproben von unbehandelten und mit GSI behandelten EPCs und HUVECs mit einem Notch1-spezifischen Antikörper (bTAN 20, Fa. DSHB) gezeigt. In der unteren Spalte von Abb. 4.5. wird die Färbung mit einem Antikörper abgebildet, welcher spezifisch nur durch die  $\gamma$ -Secretase an der Aminosäure Val-1744 gespaltenen Notch1-Rezeptor bindet (Cleaved Notch1, Fa. Cell Signaling). Die Mengen an produzierten Notch1-Rezeptor waren in beiden EPC-Proben annähernd gleich, jedoch ist in der mit DAPT-behandelten Probe keine Prozessierung des Notch1-Rezeptors beobachtet worden. Die unbehandelten EPCs zeigten eine starke Bande an prozessierten Notch1, die HUVECs nur

eine sehr schwache Bande. Die Prozessierung des Notch1-Rezeptors durch die  $\gamma$ -Secretase wurde durch Behandlung mit dem GSI-Inhibitor DAPT blockiert.



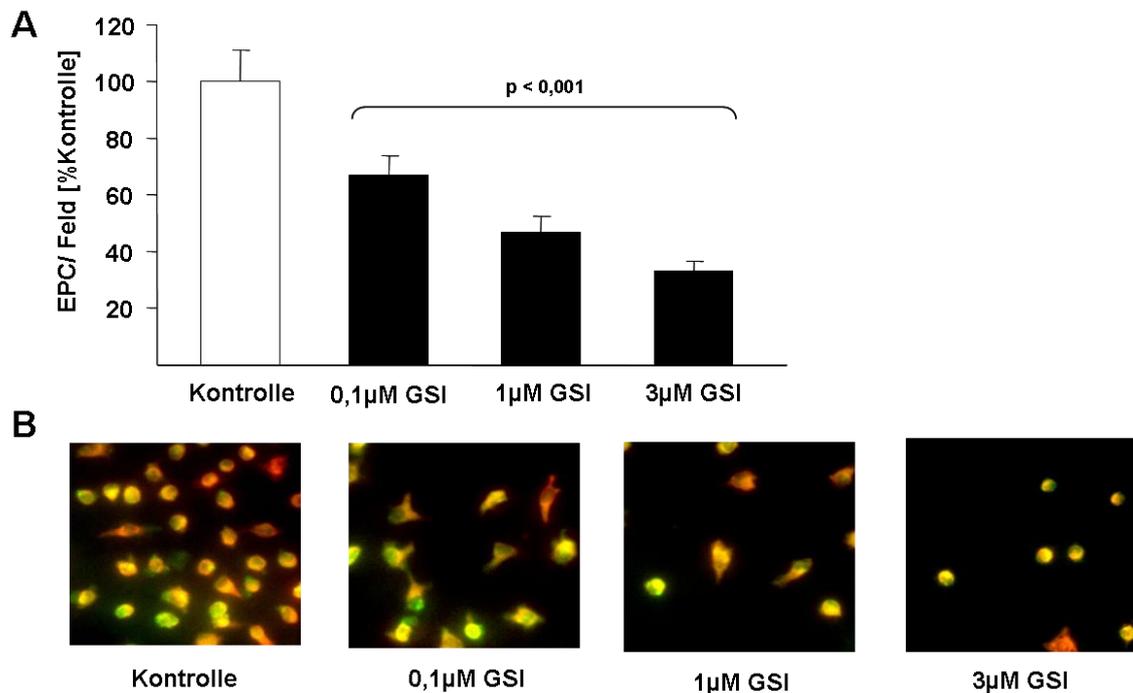
**Abb. 4.5. Inhibition der Notch-Prozessierung in EPCs nach Inkubation mit dem GSI-Inhibitor DAPT** Der obere Teil zeigt die immunologische Färbung des Notch1-Rezeptors mit dem Antikörper bTAN 20, der untere Teil zeigt die Färbung des prozessierten Notch1-Rezeptors mit dem Antikörper cleaved Notch1(Val1744) in Proteinproben aus EPCs (unbehandelt und behandelt mit dem GSI-Inhibitor DAPT) und HUVECs

#### 4.2.2. Reduktion der Zellzahl und Kolonien in der EPC-Kultur

##### Analyse der Zellzahl in der EPC-Kultur nach Inkubation mit DAPT

Die Reduktion der Zellzahl nach Inkubation mit dem GSI-Inhibitor DAPT wurde durch die Doppelfärbung mit Lectin aus *Ulex europaeus* und AcLDL nachgewiesen, dazu wurden die EPCs wie unter 4.1.1. beschrieben isoliert und in Endotheliales Wachstumsmedium (EGM) auf mit Fibronectin-beschichteten Deckgläsern in Zellkulturgefäßen mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Die EPCs wurden jeden Tag mit dem  $\gamma$ -Secretase-Inhibitor DAPT (Konzentrationen: 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M) behandelt und da der Inhibitor in DMSO gelöst wurde, wurden die EPCs zur Kontrolle mit dem gleichen Volumen DMSO inkubiert. Die Doppelfärbung der Zellen wurde wie unter 4.1.1. beschrieben am 7 d der Kultivierung durchgeführt.

Die in Abbildung 4.6.A dargestellte Grafik zeigt die Beziehung zwischen der DAPT-Konzentration und der EPC-Zahl, je höher die Konzentration an DAPT ist, desto geringer ist die Anzahl der adhären EPCs. Bei einer Konzentration von 0,1  $\mu$ M DAPT reduziert sich die Zellzahl auf  $66,6 \% \pm 6,67 \%$ , bei 1  $\mu$ M auf  $47,0 \% \pm 5,34 \%$  und bei 3  $\mu$ M auf  $33,0 \% \pm 3,12 \%$ . In 4.6.B sind die zur Kontrolle und den verschiedenen DAPT-Konzentrationen gehörigen Bilder abgebildet, sie stellen repräsentative Aufnahmen der unterschiedlichen Kulturbedingungen dar.

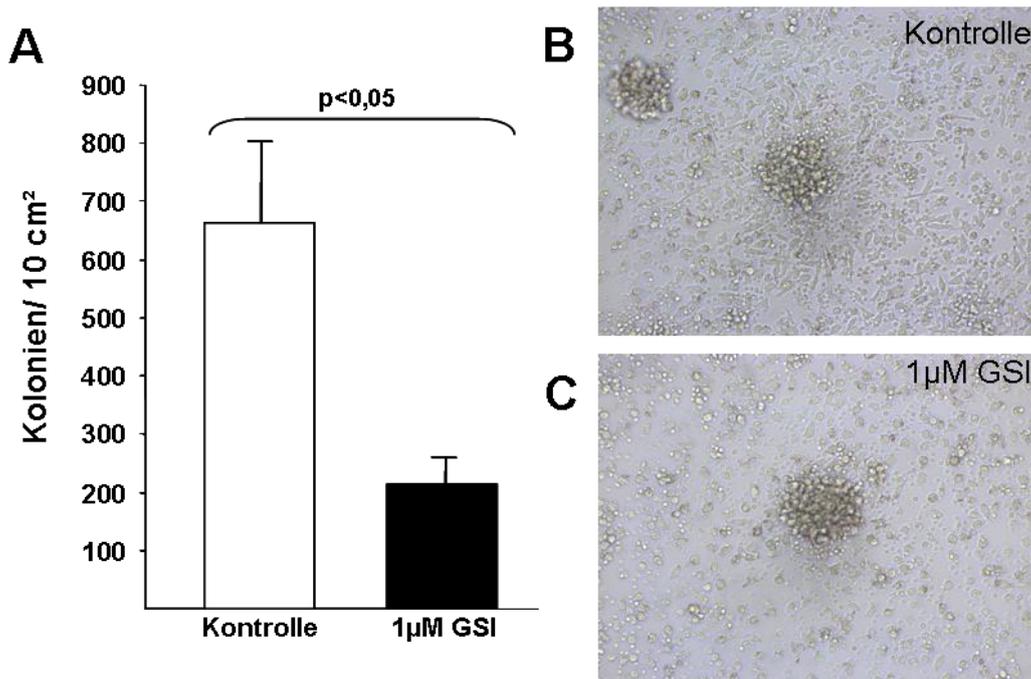


**Abb. 4.6. DAPT-Dosis-Wirkungskurve in EPCs** A EPC-Zahl in % der Kontrolle/mikroskopischen Feld, die EPCs wurden zur Kontrolle mit DMSO inkubiert und für die Dosis-Wirkungskurve mit den Konzentrationen 0,1 µM, 1 µM und 3 µM des GSI-Inhibitors DAPT behandelt,  $p < 0,001$  B in grün *Ulex europaeus*-Lectin und in rot AcLDL, die Abbildung zeigt die Überlagerung der beiden Färbungen, (200x Vergrößerung)

#### Analyse der Koloniezahl in der EPC-Kultur nach Inkubation mit DAPT

Zum Nachweis der Reduktion der Anzahl der Kolonien in der EPC-Kultur nach Inkubation mit dem GSI-Inhibitor DAPT wurden die EPCs wie unter 4.1.1. beschrieben isoliert und in Endotheliales WachstumsmEDIUM (EGM) in mit Fibronectin-beschichteten Zellkulturgefäßen mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Die EPCs wurden jeden Tag mit dem  $\gamma$ -Secretase-Inhibitor DAPT (Konzentration: 1 µM) behandelt und die Kontrolle mit dem gleichen Volumen des Lösungsmittels des Inhibitors (DMSO). Die Kulturen wurden am 7 d mit PBS gewaschen und die Anzahl der Kolonien mit einem Stereomikroskop bei 100facher Vergrößerung bestimmt.

Die in Abbildung 4.7.A dargestellte Grafik zeigt die Reduktion der Anzahl der Kolonien in der EPC-Kultur nach Inkubation mit dem GSI-Inhibitor DAPT. Die durchschnittliche Anzahl der Kolonien pro 10 cm<sup>2</sup> sinkt von  $662 \pm 141,42$  auf  $214 \pm 45,25$  nach Behandlung mit DAPT (1 µM). In 4.7.B und C sind die zugehörigen Aufnahmen abgebildet, sie sind repräsentativ für die zwei Kulturbedingungen. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die EPC-Kolonien nach Inkubation mit DAPT ihre typische Morphologie nicht aufweisen (4.7.C), wie sie in Abb. 4.7.B zu sehen ist. Eine EPC-Kolonie hat im Allgemeinen eine zentrale Anhäufung von runden Zellen, von welcher sich in ausstrahlender Anordnung dünne, flache Zellen anlagern (Hill, 2003). Die dünnen, flachen Zellen sind um die meisten EPC-Kolonien der mit DAPT-behandelten Kultur nicht vorhanden gewesen.



**Abb. 4.7. Reduktion der Koloniezahl in der EPC-Kultur nach Inkubation mit DAPT** A Anzahl der Kolonien pro 10 cm<sup>2</sup> nach Inkubation mit DMSO oder 1 µM DAPT,  $p < 0,05$  B, C Aufnahme von EPC-Kolonien im Phasenkontrast, 200x Vergrößerung, B Kontrolle (DMSO), C EPC-Kultur mit DAPT behandelt (1 µM)

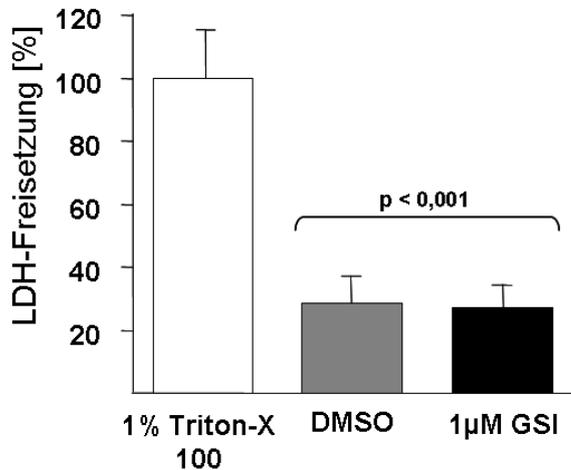
#### 4.2.3. Die Analyse vitaler Eigenschaften der EPCs nach DAPT-Inkubation zeigt keine signifikanten Veränderungen

##### Analyse der Nekrose in der EPC-Kultur nach Inkubation mit DAPT

Nekrotische Zellen in der EPC-Kultur nach DAPT-Behandlung wurden durch die Messung des Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH) mit dem *Cytotoxicity Detection Kit* (Fa. Roche) nachgewiesen, dazu wurden die EPCs wie unter 4.1.1. beschrieben isoliert und in Endotheliales Wachstumsmedium (EGM) auf mit Fibronectin-beschichteten Deckgläsern in Zellkulturgefäßen mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Die EPCs wurden jeden Tag mit dem  $\gamma$ -Secretase-Inhibitor DAPT (Konzentration: 1 µM) und als Kontrolle mit dem gleichen Volumen Lösungsmittel (DMSO) des Inhibitors behandelt. Das Medium wurde am 6 d von EGM (20 % FCS) zu EBM (2 % FCS) gewechselt, um einen niedrigeren Hintergrund während der LDH-Messung zu erhalten. Die Überstände der EPC-Kulturen wurden am 7 d abgenommen, durch Zentrifugation von Zellen befreit und die Konzentration der Lactat-Dehydrogenase im Kulturüberstand ermittelt. Die maximale LDH-Abgabe der EPCs wurde durch Inkubation der Zellen in 1 % Triton-X 100-Lösung bestimmt, während reines Medium (EBM, 2 % FCS) als Hintergrund gemessen wurde.

Die Grafik in Abb. 4.8. gibt die Ergebnisse der LDH-Bestimmung wieder, der Messwert des Hintergrundes wurde von allen Messwerten abgezogen. Die LDH-Konzentration der Proben wurde als Prozentwert des LDH-Maximalwertes abgegeben. Die Konzentration an LDH lag bei

der DMSO-Kontrolle bei  $28,5 \% \pm 8,30 \%$  und bei der mit DAPT behandelten EPC-Kultur bei  $27,4 \% \pm 7,14 \%$  des LDH-Maximalwertes. Die Behandlung der EPC-Kultur mit DAPT führte zu keiner signifikanten Veränderung der LDH-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle.



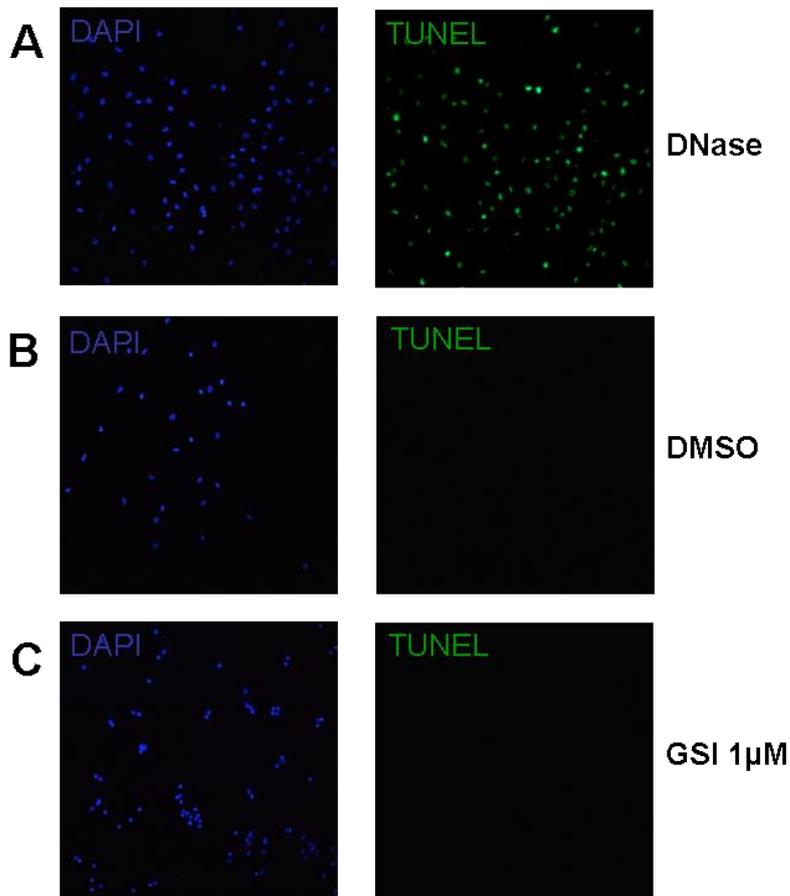
**Abb. 4.8. Freisetzung von LDH nach Inkubation mit dem GSI-Inhibitor DAPT** LDH-Freisetzung als % des Maximalwertes angeben, nach Inkubation mit DMSO oder 1 µM DAPT,  $p < 0,001$

#### Analyse der Apoptose in der EPC-Kultur nach DAPT-Behandlung

Apoptotische Zellen in der EPC-Kultur nach Inkubation mit dem GSI-Inhibitor DAPT wurden zum einen durch die TUNEL-Färbung mit dem *ApopTag Plus Fluorescein in Situ Apoptosis Detection Kit* (Fa. Chemicon) nachgewiesen, dazu wurden die EPCs wie unter 4.1.1. beschrieben isoliert und in Endothelialem Wachstumsmedium (EGM) auf mit Fibronectin-beschichteten Deckgläsern in Zellkulturgefäßen mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Die EPCs wurden jeden Tag mit dem  $\gamma$ -Secretase-Inhibitor DAPT (Konzentration: 1 µM) und als Kontrolle mit dem gleichen Volumen Lösungsmittel (DMSO) des Inhibitors behandelt. Am 7 d der Kultivierung wurden die EPCs mit Paraformaldehyd-Lösung (2 %) fixiert und in zwei Schritten gefärbt. Im ersten Schritt wurden die durch den Prozess der Apoptose zerkleinerte DNA mit dem Enzym Deoxynucleotidyltransferase (TdT) mit Digoxigenin-markierten Nukleotiden verbunden und im zweiten wurden die markierten Nukleotide mit einem spezifischen, FITC-konjugierten Antikörper detektiert. Zur positiven Kontrolle der Färbung wurde die DNA der EPCs auf einem Deckgläschen durch einen DNase-Verdau zerkleinert. Die Zellkerne wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gegengefärbt. Die TUNEL-Färbung wurde mit einem Zeissmikroskop bei 200facher Vergrößerung dokumentiert.

In Abbildung 4.9. wird die TUNEL-Färbung der EPC-Kultur nach Inkubation mit DMSO und DAPT gezeigt. Die TUNEL-Färbung färbt apoptotische Zellkerne grün und die DAPI-Färbung alle Zellkerne blau an. In Abb. 4.9.A ist die Positivkontrolle der TUNEL-Färbung dargestellt, alle Zellkerne (blau) sind durch den DNase-Verdau positiv (grün). Abb. 4.9.B zeigt die mit DMSO behandelten EPCs, die Zellkerne sind negativ für die TUNEL-Färbung. In Abbildung

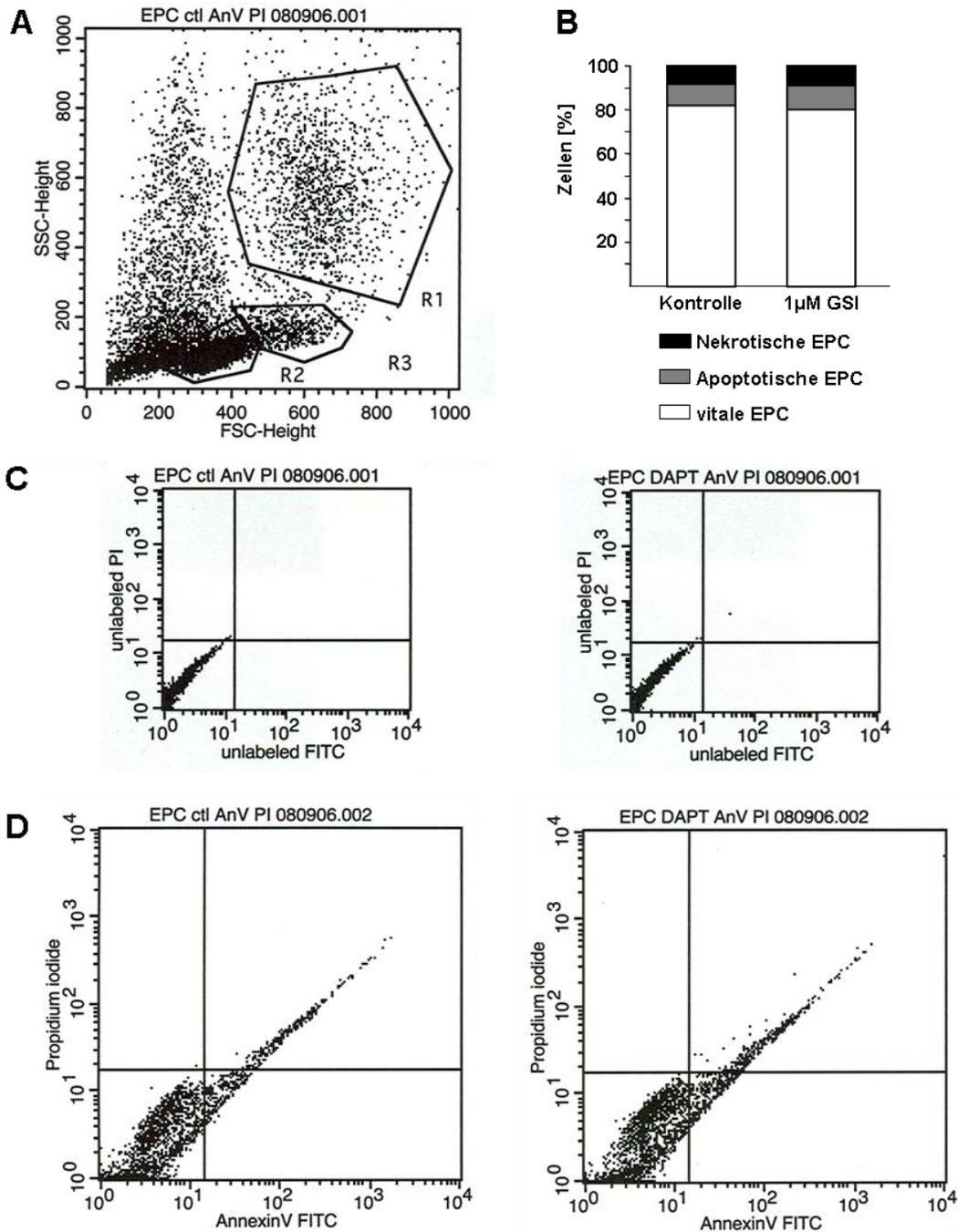
4.9.C sind die mit DAPT behandelten EPCs dargestellt, auch hier ist die TUNEL-Färbung negativ. Die Inkubation mit DAPT oder DMSO hatte keine Apoptose in der EPC-Kultur zur Folge.



**Abb. 4.9. TUNEL-Färbung apoptotischer Zellkerne nach DAPT-Behandlung** (200x Vergrößerung), DAPI-Färbung (blau), TUNEL-Färbung (grün) **A** Positivkontrolle der TUNEL-Färbung durch DNase-Verdau, **B** DMSO behandelte EPC-Kultur, **C** mit DAPT behandelte EPC-Kultur (1  $\mu$ M)

Der Nachweis apoptotischer Zellen in der EPC-Kultur nach DAPT-Behandlung erfolgte zum anderem durch die Färbung mit Annexin-V und Propidiumiodid (PI) und die darauf folgende Analyse im Durchflusszytometer. Die EPCs wurden dazu wie unter 4.1.1. beschrieben isoliert und in Endotheliales Wachstumsmedium (EGM) in mit Fibronectin-beschichteten Zellkulturgefäßen mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Die EPCs wurden jeden Tag mit dem  $\gamma$ -Secretase-Inhibitor DAPT (Konzentration: 1  $\mu$ M) und als Kontrolle mit dem gleichen Volumen Lösungsmittel (DMSO) des Inhibitors behandelt. Am 7 d der Kultivierung wurden die EPCs mit Accutase-Lösung (Fa. PAA laboratories) abgelöst und in PBS mit 2 % FCS resuspendiert. Die EPCs wurden auf FACS-Röhrchen mit mindestens 50.000 Zellen verteilt und durch Zentrifugation pelletiert. Die Zellpellets wurden in 50  $\mu$ l Färbelösung *Annexin-V-FLUOS labeling solution* des *Annexin-V-FLUOS Staining Kit* (Fa. Roche) resuspendiert, die Färbelösung enthält FITC-konjugiertes Annexin-V und Propidiumiodid. Die Zellen wurden 15 min bei RT vor Licht geschützt inkubiert. Die Zellsuspensionen wurden zur

Analyse im FACSCalibur mit 250  $\mu$ l *Incubation buffer* versetzt und mindestens 10.000 EPCs je FACS-Röhrchen wurden im FACSCalibur (Fa. BD Biosciences) analysiert. Die Emission der angeregten Fluoreszenzfarbstoffe wurde von Annexin-V in dem Kanal FL-1 und von PI im Kanal FL-2 detektiert.



**Abb. 4.10. Annexin-V-PI-Färbung apoptotischer EPCs nach Inkubation mit DAPT** **A** Repräsentativer Scatter Plot der EPC-Kultur, das Gate R1 entspricht der analysierten EPC-Kultur, **B** Prozentuale Verteilung der nekrotischen, apoptotischen und vitalen EPCs der Zellpopulation R1 nach Behandlung mit DMSO und DAPT (1  $\mu$ M), **C, D** Darstellung der Zellpopulation R1 in Dot Plots, auf der Y-Achse die Intensität der PI-Färbung und auf der X-Achse die Intensität der Annexin-V-Färbung, links die Kontrolle, rechts die DAPT behandelten EPCs **C** Die ungefärbten EPCs (DMSO und DAPT) im unteren rechten Quadranten, **D** Nach der Annexin-V-PI-Färbung sind die nekrotischen EPCs in den beiden oberen Quadranten abgebildet, die vitalen im unteren linken und die apoptotischen im unteren rechten

In Abb. 4.10. werden die Ergebnisse der FACS-Analyse nach der Färbung mit Annexin-V und Propidiumiodid dargestellt. Abb. 4.10.A zeigt einen repräsentativen Scatter Plot der in diesen Experimenten analysierten EPC-Kulturen, in den übrigen Graphen dieser Abbildung werden die Analysen der Zellpopulation R1 dargestellt (s. auch Abschnitt 4.1.2.). In Abb. 4.10.B ist die prozentuale Verteilung von nekrotischen, apoptotischen und vitalen EPCs nach DMSO- und DAPT-Behandlung dargestellt. Der vitale Anteil der EPCs nach DMSO-Behandlung lag bei  $81,19 \% \pm 1,17 \%$  bzw. nach DAPT-Behandlung bei  $80,08 \% \pm 0,63 \%$  und der Anteil der nekrotischen Zellen der Kontrolle bei  $8,15 \% \pm 1,59 \%$  und der GSI-behandelten Zellen bei  $8,65\% \pm 0,06$ . Die apoptotischen Zellen hatten einen Anteil von  $9,96 \% \pm 0,42 \%$  nach Inkubation mit DMSO und  $11,28 \% \pm 0,57 \%$  nach Inkubation mit DAPT.

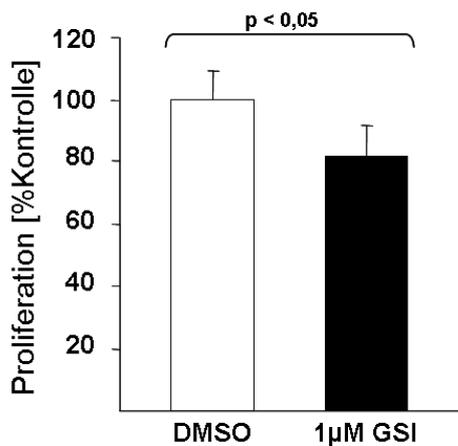
In den Abbildungen 4.10.C und D werden die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse als Dot Plot dargestellt, dabei wird die Intensität der Propidiumiodid-Färbung auf der Y-Achse und die Intensität der Annexin-V-Färbung auf der X-Achse abgebildet. In Abb. 4.10.C ist die Analyse der ungefärbten Zellen dargestellt, der linke Graph zeigt die DMSO behandelte EPC-Kultur und der rechte die DAPT behandelte. Das Kreuz unterteilt die Graphik in vier Quadranten, den oberen linken und rechten und den unteren linken und rechten. Das Kreuz wurde in den Graphen mit den ungefärbten Zellen so platziert, dass sich mehr als 99,00 % der ungefärbten Zellen im unteren rechten Quadranten befinden. Die Position des Kreuzes im Graphen der ungefärbten Zellen wurde zur Auswertung der Annexin-V-PI-Färbung auf die Graphen mit den gefärbten EPCs übertragen. Das Kreuz ermöglicht die Unterscheidung von apoptotischen, nekrotischen und vitalen Zellen, vitale Zellen sind negativ für beide Färbungen und befinden sich im unteren linken Quadranten. Apoptotische Zellen sind positiv für die Annexin-V-Färbung, aber negativ für die PI-Färbung und werden im unteren rechten Quadranten dargestellt. Alle für die PI-Färbung positiven Zellen sind nekrotisch und sind in den beiden oberen Quadranten abgebildet. Die Annexin-V-PI-Färbung wird in den beiden Graphiken der Abb. 4.10.D dargestellt, die linke Graphik zeigt die DMSO behandelten Zellen und die rechte die mit DAPT inkubierten. Die Behandlung mit DAPT führte zu keinem signifikanten Anstieg der Apoptose bzw. der Nekrose in der EPC-Kultur im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrollkultur.

#### **Analyse der Proliferation in der EPC-Kultur nach Inkubation mit DAPT**

Die Proliferation der EPC nach Inkubation mit dem GSI-Inhibitor DAPT wurde zum einen mit dem *CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Fa. Promega) gemessen (Iwaguro, 2002), dazu wurden die EPCs wie unter 4.1.1. beschrieben isoliert und in Endotheliale Wachstumsmilieu (EGM) auf mit Fibronectin-beschichteten Deckgläsern in Zellkulturgefäßen mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Die EPCs wurden jeden Tag mit dem  $\gamma$ -Secretase-Inhibitor DAPT (Konzentration: 1  $\mu$ M) und als Kontrolle mit dem gleichen Volumen

Lösungsmittel (DMSO) des Inhibitors behandelt. Am 7 d der Kultivierung wurde das Medium abgenommen und Phenolrot-freies, Serum-freies DMEM (1 g Glucose/ml) auf die Zellen gegeben, da sowohl Phenolrot als auch Serum die Ergebnisse des Testes beeinflussen. 45  $\mu$ l *Dye Solution* des Testes wurden zu den EPCs gegeben und diese 4 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von *Solubilization/Stop Solution* und 1h Inkubation im Dunkeln gestoppt und die Zellen lysiert. Die gefärbten Überstände der Zellen wurden in eine Flachboden-96-Well-Zellkulturplatte übertragen. Die Intensität der Blaufärbung wurde in einem Mikroplattenlesegerät bei der Wellenlänge 570 nm detektiert, als Referenzwellenlänge wurde die Absorption bei 630 nm gemessen. Als Kontrolle des Hintergrundes wurde der Test mit Medium, das ohne Zellen inkubiert wurde, durchgeführt. Der dabei erhaltene Messwert wurde von den übrigen Messwerten abgezogen.

In Abbildung 4.11. sind die Ergebnisse des Testes nach Inkubation mit DMSO und DAPT in Form einer Grafik dargestellt. Der Messwert der mit DMSO inkubierten EPCs wurde als Maximalwert für die Proliferation unter diesen experimentellen Bedingungen definiert und lag bei 100 %  $\pm$  8,13 %, der Messwert der mit DAPT behandelten EPC lag bei 81,61 %  $\pm$  9,21 %. Die Reduktion der Proliferation ist signifikant ( $p < 0,05$ ), jedoch ist die Standardabweichung sehr groß. Die Inkubation mit DAPT führte zu einer signifikanten, schwachen Reduktion der Proliferation der EPC-Kultur im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrollkultur.



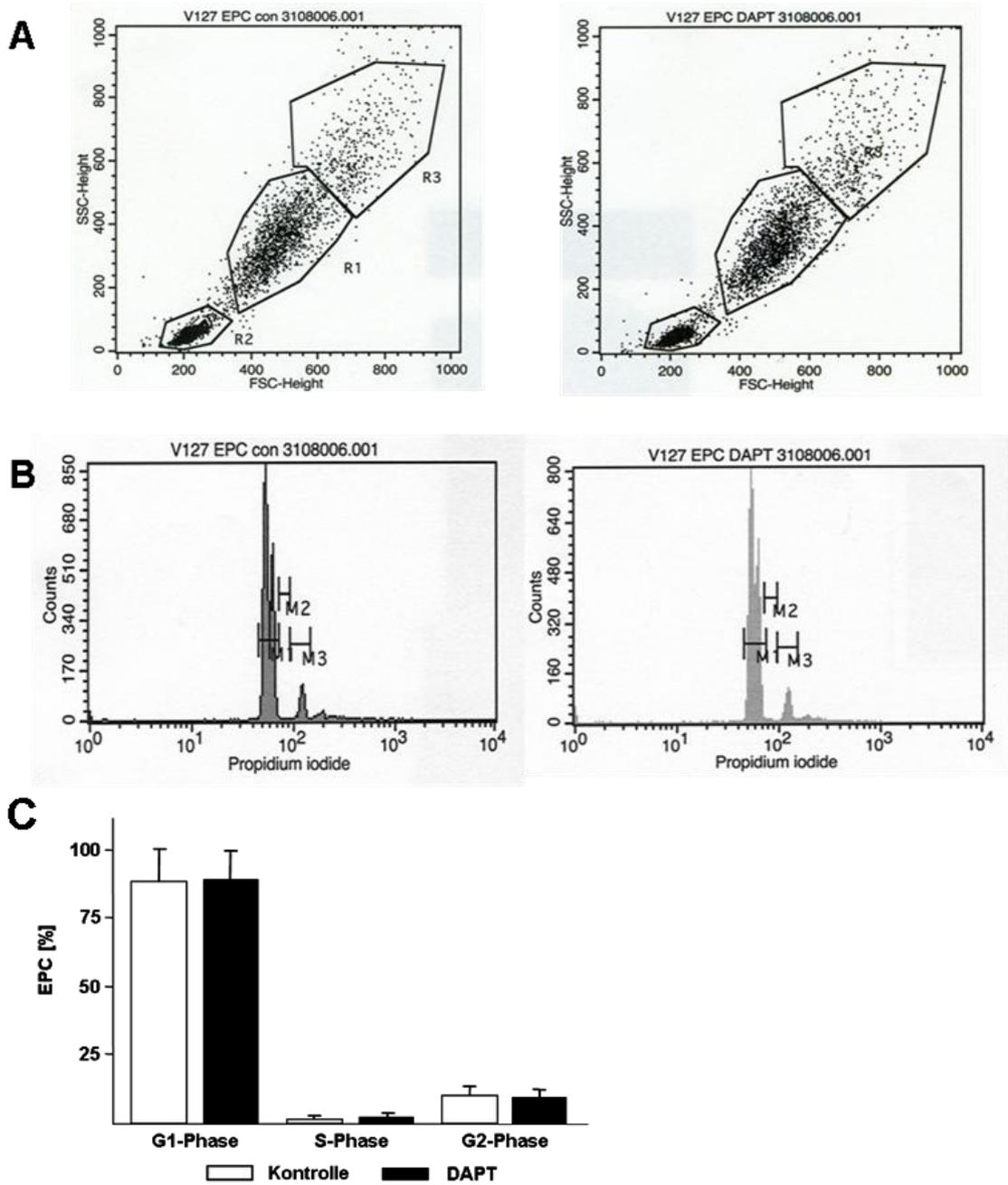
**Abb. 4.11. Zellproliferation der EPCs nach Inkubation mit dem GSI-Inhibitor DAPT** Proliferation der EPC-Kultur als % des Maximalwertes angegeben, nach Inkubation mit DMSO oder 1  $\mu$ M DAPT,  $p < 0,05$

Die Proliferation der EPCs nach Inkubation mit dem GSI-Inhibitor DAPT wurde zum anderen durch die Zellzyklusanalyse nach Propidiumiodid-Färbung und darauf folgender Analyse im Durchflusszytometer analysiert. Die EPCs wurden dazu wie unter 4.1.1. beschrieben isoliert und in Endotheliales Wachstumsmedium (EGM) in mit Fibronectin-beschichteten Zellkulturgefäßen mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Die EPCs wurden jeden Tag mit dem  $\gamma$ -Secretase-Inhibitor DAPT (Konzentration: 1  $\mu$ M) und als Kontrolle mit dem gleichen Volumen Lösungsmittel (DMSO) des Inhibitors behandelt. Am 7 d der Kultivierung

wurden die EPCs mit Accutase-Lösung (Fa. PAA laboratories) abgelöst und in PBS mit 2 % FCS resuspendiert. Die EPCs wurden auf FACS-Röhrchen mit mindestens 50.000 Zellen verteilt und durch Zentrifugation pelletiert. Die Zellen wurden durch 10 min Inkubation bei 4 °C in eiskalter Fixierungslösung fixiert und mit PBS (2 % FCS) gewaschen. Die Zellpellets wurden in 1 ml Propidiumiodid-Färbelösung resuspendiert und 15 min bei 37 °C im Brutschrank vor Licht geschützt inkubiert. Der Färbelösung ist RNase zugefügt, welche die doppelsträngigen RNA-Strukturen in den Zellen abbaut. Der Abbau der RNA ermöglicht die Analyse der reinen DNA-Menge der Zellen und verhindert Verfälschung durch Detektion von RNA. Die Proben wurden im FACSCalibur (Fa. BD Biosciences) mit mindestens 10.000 EPCs je FACS-Röhrchen analysiert. Die Emission des angeregten Fluoreszenzfarbstoffs Propidiumiodid wurde im Kanal FL-2 detektiert.

Abb. 4.12. zeigt die Ergebnisse der FACS-Analyse nach Propidiumiodid-Färbung, in Abb. 4.12.A sind die repräsentativen Scatter Plots der analysierten EPC-Kulturen nach DMSO- und DAPT-Behandlung abgebildet. Die übrigen Graphen der Abbildung 4.12. geben die Analysen der Zellpopulation R1 wieder (s. auch Abschnitt 4.1.2.). In Abb. 4.12.B ist die Verteilung der EPCs in die verschiedenen Phasen des Zellzyklus in Form eines Histogramms dargestellt. Die X-Achse gibt die Intensität der Propidiumiodid-Färbung mit einer exponentiellen Skala wieder, während die Y-Achse die Anzahl der Ereignisse in einem bestimmten Kanal zeigt, d. h. Zellen mit einer bestimmten Fluoreszenzintensität. Propidiumiodid interkaliert in doppelsträngige DNA und ermöglicht die Detektion der Phasen des Zellzyklus (s. auch Abb. 3.3.), eine Zelle in der G1-Phase hat einen einfachen Chromosomensatz (2n), in der S-Phase (Synthese) verdoppelt der Chromosomensatz und liegt in der G2-Phase bei 4n. Die Menge der Zellen, die sich in der S- und G2-Phase befinden, sind ein Maß für die Proliferation in der EPC-Kultur. Das linke Histogramm in 4.12.B zeigt die PI-Färbung der EPC nach DMSO-Behandlung, die EPCs verteilen sich auf zwei Maxima. Das erste Maximum repräsentiert Zellen der G1-Phase (2n), das zweite die Zellen der G2-Phase (4n). Die Intensität der Fluoreszenzfärbung ist beim zweiten Maximum doppelt so stark wie beim ersten, der Zusammenhang zwischen DNA-Menge und interkalierten Propidiumiodid ist linear. Das Tal zwischen den beiden Maxima stellt die Zellen in der S-Phase dar. Im rechten Histogramm der Abb. 4.12.B ist die Zellzyklusanalyse der EPC nach Inkubation mit DAPT abgebildet, auch in dieser Abbildung sind zwei Maxima und ein Tal zu beobachten. Abbildung 4.12.C fasst die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse in einer Grafik zusammen, der Anteil der EPCs in der G1-Phase nach DMSO-Behandlung lag bei 88,05 % ± 11,44 % bzw. nach DAPT-Behandlung bei 88,37 % ± 11,49 % und der Anteil der Zellen in der G2-Phase bei der Kontrolle bei 9,77 % ± 1,27 % und der GSI-behandelten Zellen bei 9,33 % ± 1,21 %. In der S-Phase befanden sich 1,04 % ± 0,14 % der Zellen nach Inkubation mit DMSO und 1,81 % ± 0,24 % nach Inkubation mit DAPT. Die Inkubation der EPCs mit dem GSI-

Inhibitor DAPT führte zu keiner Veränderung der Proliferation im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrollkultur.

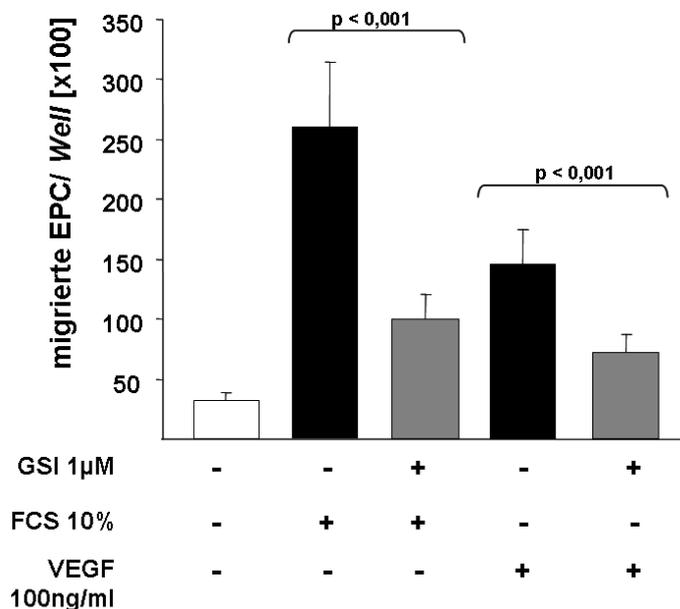


**Abb. 4.12. Zellzyklus-Analyse der EPCs nach DAPT-Behandlung** **A** Repräsentativer Scatter Plot der EPC-Kultur, das Gate R1 entspricht der analysierten EPC-Kultur, nach Behandlung mit DMSO (links) und mit DAPT (rechts) **B** Darstellung der Zellpopulation R1 im Histogramm, auf der X-Achse die Intensität der PI-Färbung und auf der Y-Achse die Anzahl der Ereignisse in einem Kanal, die Marker M1, M2 und M3 begrenzen die G1-, S- und G2-Phase, DMSO- (links) und DAPT-Behandlung (rechts) **C** Prozentuale Verteilung der Zellpopulation R1 in G1-, S- und G2-Phase nach Behandlung mit DMSO und DAPT (1  $\mu$ M)

#### 4.2.4. Die Analyse funktionaler Eigenschaften der EPCs nach DAPT-Behandlung zeigt deutliche Reduktion der Migration, Adhäsion und Tubusformation

##### Analyse der Migration der EPCs nach Inkubation mit DAPT

Zur Durchführung des Migrationsassays wurden die EPCs wie unter 4.1.1. beschrieben isoliert und in Endothelialem Wachstumsmedium (EGM) in mit Fibronectin-beschichteten Zellkulturgefäßen mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Die EPCs wurden jeden Tag mit dem  $\gamma$ -Secretase-Inhibitor DAPT (Konzentration: 1  $\mu$ M) und als Kontrolle mit dem gleichen Volumen Lösungsmittel (DMSO) des Inhibitors behandelt. Am 7 d der Kultivierung wurden die EPCs mit Accutase-Lösung (Fa. PAA laboratories) abgelöst und in PBS resuspendiert. Die modifizierte Boydenkammer wurde mit Fibronectin beschichteten *cell culture inserts* und dem zugehörigen 24-Well-Zellkulturgefäß zusammengesetzt (Fa. BD Biosciences). Der untere Teil der Kammer (s. Abb. 3.6.) wurde mit EBM, EBM (10 % FCS) oder EBM (100 ng/ml VEGF) befüllt und die mit DAPT (1  $\mu$ M) oder DMSO behandelten EPCs (100.000 Zellen/Kammer) wurden in Endothelialen Basis Medium in die obere Kammer (s. Abb. 3.6.) gegeben. Der Assay wurde für 4 h bei 37 °C und CO<sub>2</sub>-Begasung im Brutschrank inkubiert. Die in die untere Kammer migrierten EPCs wurden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (Asahara, 1999a, Vasa, 2001, Urbich, 2005, Walter, 2005).



**Abb. 4.13. Migration der EPCs nach Behandlung mit DAPT signifikant reduziert** Die Y-Achse gibt die Anzahl der migrierten EPCs nach Behandlung mit DMSO oder DAPT und die X-Achse die experimentellen Bedingungen wieder, 10 % FCS oder VEGF (100 ng/ml) als Stimuli, als Negativkontrolle EBM ohne Serum oder Wachstumsfaktoren ( $p < 0,001$ )

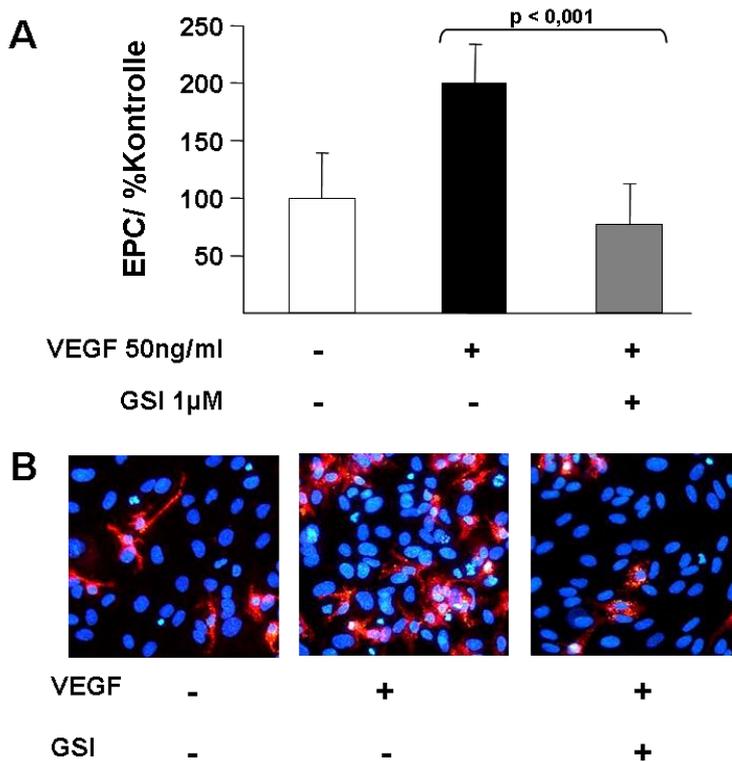
In Abbildung 4.13. sind die Ergebnisse des Migrationsassays dargestellt, die Y-Achse gibt die Anzahl der migrierten EPCs und die X-Achse die verschiedenen, experimentellen Bedingungen wieder. Als Negativkontrolle des Tests diente Medium (EBM) ohne Serum oder

Wachstumsfaktoren, unter diesen Bedingungen migrierten  $3.247,5 \pm 588,3$  EPCs in die untere Kammer. Die Positivkontrolle des Assays wurde mit Medium, das 10 % FCS enthielt, durchgeführt, unter dieser Bedingung migrierten  $26.002,5 \pm 5.294,1$  DMSO behandelte EPCs und  $9.999,5 \pm 2.058,8$  mit DAPT inkubierte EPCs. Mit dem Wachstumsfaktor VEGF (100 ng/ml) als physiologischem Impuls migrierten  $14.497,4 \pm 2.941,2$  mit DMSO inkubierte EPCs und  $7.252,5 \pm 1.470,6$  mit DAPT behandelte EPCs in die untere Kammer. Die Inkubation der EPCs mit dem GSI-Inhibitor DAPT führte zu einer signifikanten Reduktion der migratorischen Fähigkeiten ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrollkultur.

### **Analyse der Adhäsion der EPCs nach DAPT-Behandlung**

Zur Durchführung des Adhäsionsassays wurden die EPCs wie unter 4.1.1. beschrieben isoliert und in Endothelalem Wachstumsmedium (EGM) in mit Fibronectin-beschichteten Zellkulturgefäßen mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Die EPCs wurden jeden Tag mit dem  $\gamma$ -Secretase-Inhibitor DAPT (Konzentration: 1  $\mu$ M) und als Kontrolle mit dem gleichen Volumen Lösungsmittel (DMSO) des Inhibitors behandelt. Am 7 d der Kultivierung wurden die EPCs wie unter 4.1.1. beschrieben mit DIL-konjugierten AcLDL *in vitro* gefärbt und mit Accutase-Lösung (Fa. PAA laboratories) abgelöst. Am Tag zuvor wurden HUVECs (humane endotheliale venöse Endothelzellen) in Endothelalem Wachstumsmedium (EGM, 10 % FCS) auf mit Fibronectin-beschichteten Deckgläsern in Zellkulturgefäßen mit einer Dichte von 10.000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Die durch die AcLDL-Färbung markierten EPCs wurden am 7 d mit 30.000 Zellen/cm<sup>2</sup> in EGM (10 % FCS und 50 ng/ml VEGF) zu den HUVECs gegeben. Nach 16 h Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt. Die Deckgläser wurden auf Objektträgern mikroskopiert und bei 200facher Vergrößerung fotografiert (Iwaguro, 2002, Ceradini, 2004, Chavakis, 2005).

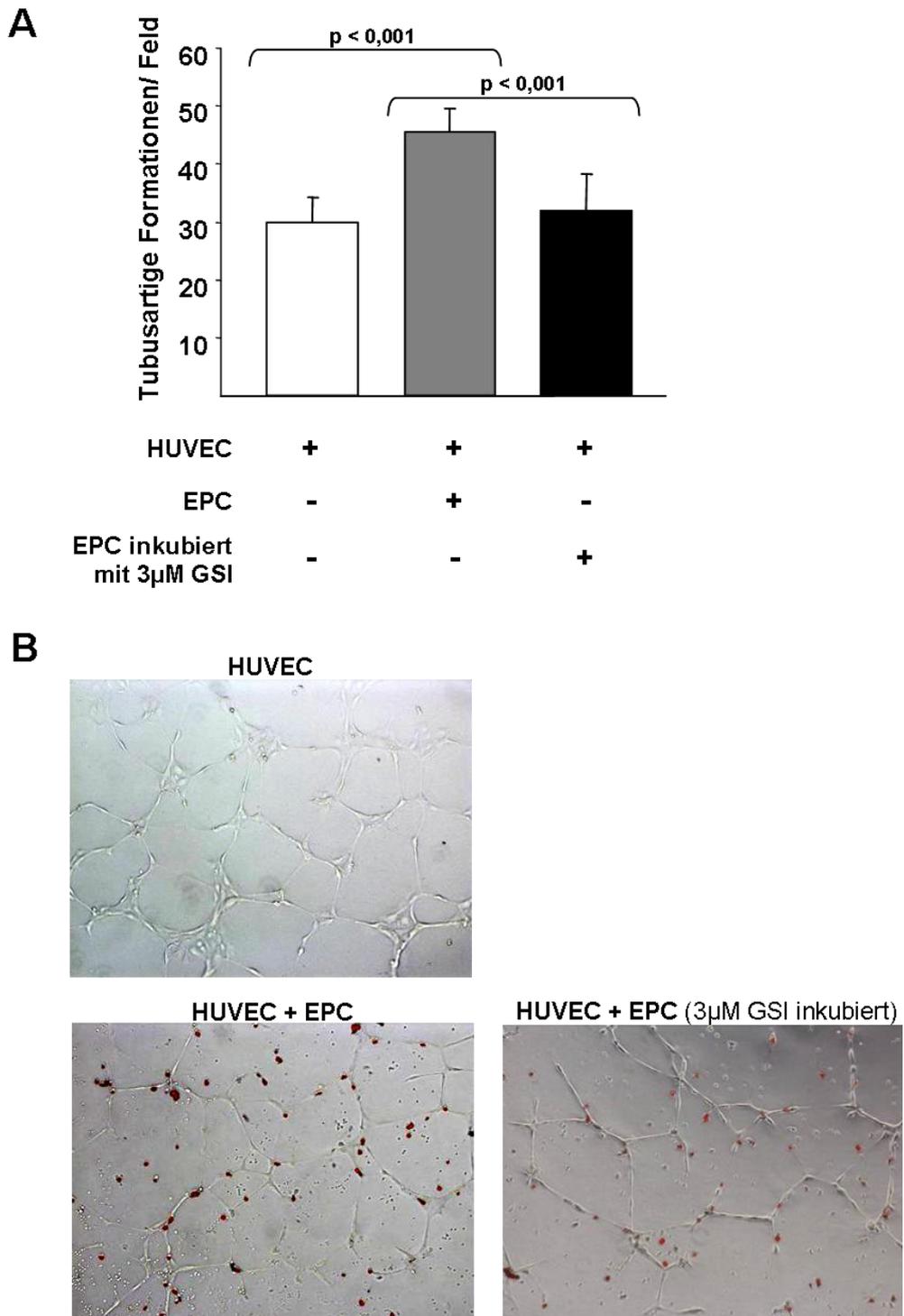
In Abbildung 4.14. werden die Ergebnisse des Adhäsionsassays dargestellt, die Y-Achse gibt die Anzahl der adhärenierten EPCs als Prozent der Kontrolle und die X-Achse die verschiedenen experimentellen Bedingungen wieder. Die Kontrolle des Tests wurde in EGM (10 % FCS) ohne den Wachstumsfaktor VEGF durchgeführt, unter dieser Bedingung adhärenierten 100 %  $\pm$  38,67 % der EPCs auf den HUVECs. Die DMSO behandelten EPCs, welche mit den Wachstumsfaktor VEGF (50 ng/ml) in EGM (10 % FCS) inkubiert wurden, adhärenierten zu 200,6 %  $\pm$  33,75 % auf dem HUVEC-Monolayer. Die mit DAPT inkubierten EPCs der gleichen Bedingung adhärenierten zu 76,2 %  $\pm$  36,56 % auf den HUVECs. Die Behandlung der EPCs mit dem GSI-Inhibitor DAPT führte zu einer signifikanten Reduktion der Adhäsion der EPCs auf einen HUVEC-Monolayer in Gegenwart des Wachstumsfaktors VEGF ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zu DMSO behandelten EPCs.



**Abb. 4.14. Adhäsion der EPCs nach DAPT-Behandlung vermindert** **A** Die Y-Achse gibt die Anzahl der adhären EPCs als % der Kontrolle nach Behandlung mit DMSO oder DAPT auf einem HUVEC-Monolayer und die X-Achse die experimentellen Bedingungen wieder, alle Bedingungen wurden in EGM (10% FCS) durchgeführt, unter Testbedingungen diente VEGF (50ng/ml) als zusätzlicher Stimulus ( $p < 0,001$ ) **B** Repräsentative Bilder der verschiedenen, experimentellen Bedingungen, Fluoreszenzmikroskopische Bilder überlagert (EPCs: rot, Zellkerne: blau), (200x Vergrößerung)

#### Analyse der Tubusformation in EPC-HUVEC-Kokultur nach DAPT-Inkubation

Zur Durchführung des Tubusformationsassays wurden die EPCs wie unter 4.1.1. beschrieben isoliert und in Endotheliales Wachstumsmedium (EGM) in mit Fibronectin-beschichteten Zellkulturgefäßen mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Die EPCs wurden jeden Tag mit dem  $\gamma$ -Secretase-Inhibitor DAPT (Konzentration: 3  $\mu$ M) und als Kontrolle mit dem gleichen Volumen Lösungsmittel (DMSO) des Inhibitors behandelt. Am 7 d der Kultivierung wurden die EPCs wie unter 4.1.1. beschrieben mit DIL-konjugierten AcLDL *in vitro* gefärbt und mit Accutase-Lösung (Fa. PAA laboratories) abgelöst. HUVECs (humane endotheliale venöse Endothelzellen) wurden mit Trypsin-EDTA-Lösung (Fa. Invitrogen) abgelöst und in mit Matrigel beschichteten Zellkulturgefäßen (1 cm<sup>2</sup>) mit einer Dichte von 25.000 Zellen/cm<sup>2</sup> bzw. 15.000 Zellen/cm<sup>2</sup> bei Koinkubation mit EPCs ausplattiert. Die durch die AcLDL-Färbung markierten EPCs (15.000 Zellen/cm<sup>2</sup>) wurden in EBM (2 %FCS) zu den HUVECs gegeben. Nach 16 h Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurden die entstandenen Strukturen bei 200facher Vergrößerung in Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie fotografiert. Die Auswertung erfolgt durch Zählung der tubusartigen Strukturen, die als viermal so lang wie weit definiert sind, in zehn zufälligen Arealen jeder Bedingung (Tepper, 2002, Verma, 2004).



**Abb. 4.15. Tubusartige Formationen in EPC-HUVEC-Kokultur sind nach DAPT-Behandlung der EPCs vermindert** **A** Die Y-Achse gibt die Anzahl der tubusartigen Strukturen / Gesichtsfeld von HUVECs oder der Kokultur mit DMSO oder DAPT (3  $\mu$ M) behandelten EPCs und die X-Achse die experimentellen Bedingungen wieder, alle Bedingungen wurden in EBM (2 % FCS) durchgeführt, ( $p < 0,001$ ) **B** Repräsentative Bilder der verschiedenen, experimentellen Bedingungen, untere Reihe: Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopische Bilder überlagert (EPCs: rot), (200x Vergrößerung)

In Abbildung 4.15. sind die Ergebnisse des Tubusformationsassays wiedergegeben, Abb. 4.15.A zeigt eine Grafik mit der Zusammenfassung der Analyse. Die Y-Achse gibt die Anzahl der tubusartigen Formationen pro Gesichtsfeld und die X-Achse die verschiedenen experimentellen

Bedingungen wieder. Die Kontrolle des Tests wurde mit HUVECs durchgeführt, dabei formierten sich  $30 \pm 4,1$  tubusartige Strukturen pro Gesichtsfeld, während die Kokultur mit DMSO behandelten EPCs zur Formation von  $45,5 \pm 4,0$  tubusartigen Strukturen führte ( $p < 0,001$ ). Die Kokultur mit den EPCs, die mit DAPT inkubiert wurden, resultierte in der Formation von  $32,0 \pm 6,3$  tubusartigen Strukturen. Die Inkubation der EPCs mit dem GSI-Inhibitor DAPT führte zu einer signifikanten Verminderung der Formation von tubusartigen Strukturen ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zur Kokultur mit DMSO behandelten EPCs. Die Anzahl der tubusartigen Formationen bei Kokultur mit DAPT inkubierten EPCs sinkt annähernd auf das Niveau der Kontrolle zurück. Abb. 4.15.B zeigt repräsentative Bilder der verschiedenen Bedingungen des Tubusformationsassays (200fache Vergrößerung).

Die Kokulturen (untere Reihe) wurden in Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie fotografiert und in Photoshop wurden die Durchlichtbilder mit den durch DIL-AcLDL fluoreszenzrot-markierten EPC-Bildern überlagert. Die überlagerten Bilder zeigen, dass die rot gefärbten EPCs zu einem sehr großen Teil auf den Tubus formierenden HUVECs adhären und scheinbar an der Strukturbildung teilnehmen.

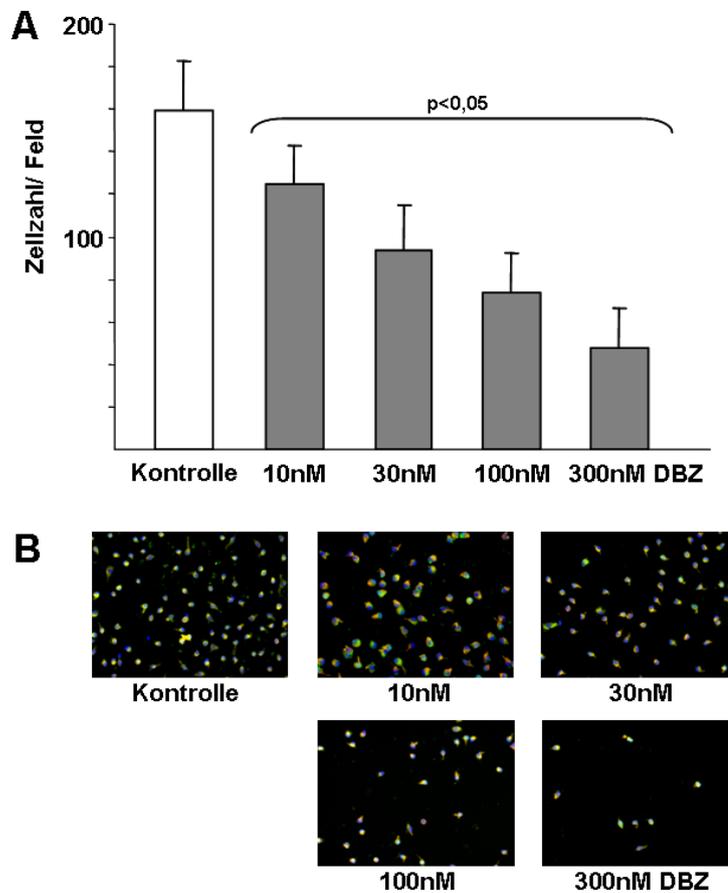
#### **4.2.5. Der $\gamma$ -Secretase-Inhibitor XX und das Jagged-IgG zeigen Reduktion der Zellzahl**

##### **$\gamma$ -Secretase-Inhibitor XX (DBZ) zeigt eine ähnliche Dosis-Wirkungskurve wie DAPT**

Die Reduktion der Zellzahl nach Inkubation mit dem GSI-Inhibitor DBZ wurde durch die Doppelfärbung mit Lectin aus *Ulex europaeus* und AcLDL nachgewiesen, dazu wurden die EPCs wie unter 4.1.1. beschrieben isoliert und in Endotheliales Wachstumsmedium (EGM) auf mit Fibronectin-beschichteten Deckgläsern in Zellkulturgefäßen mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Die EPCs wurden jeden Tag mit dem  $\gamma$ -Secretase-Inhibitor DBZ (Konzentrationen: 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM) behandelt und da der Inhibitor in DMSO gelöst wurde, wurden die EPCs zur Kontrolle mit dem gleichen Volumen DMSO inkubiert. Die Doppelfärbung der Zellen wurde wie unter 4.1.1. beschrieben am 7 d der Kultivierung durchgeführt.

Die in Abbildung 4.16.A dargestellte Grafik zeigt die Beziehung zwischen der DBZ-Konzentration und der EPC-Zahl, je höher die Konzentration an DBZ ist, desto geringer ist die Anzahl der adhären EPCs. Bei der DMSO behandelten Kontrolle betrug die Anzahl der EPCs/Gesichtsfeld  $159,0 \pm 28,21$ , bei einer Konzentration von 10 nM DBZ reduzierte sich die Zellzahl auf  $124,4 \pm 19,74$ , bei 30 nM auf  $93,83 \pm 23,12$ , bei 100 nm auf  $73,50 \pm 18,73$  und bei 300 nM auf  $47,71 \pm 18,80$  ( $p < 0,05$ ). In 4.6.B sind die zur Kontrolle und den verschiedenen DBZ-Konzentrationen gehörigen Bilder abgebildet, sie stellen repräsentative Aufnahmen der verschiedenen Kulturbedingungen dar. Die Behandlung der EPC-Kultur mit DBZ führte zu

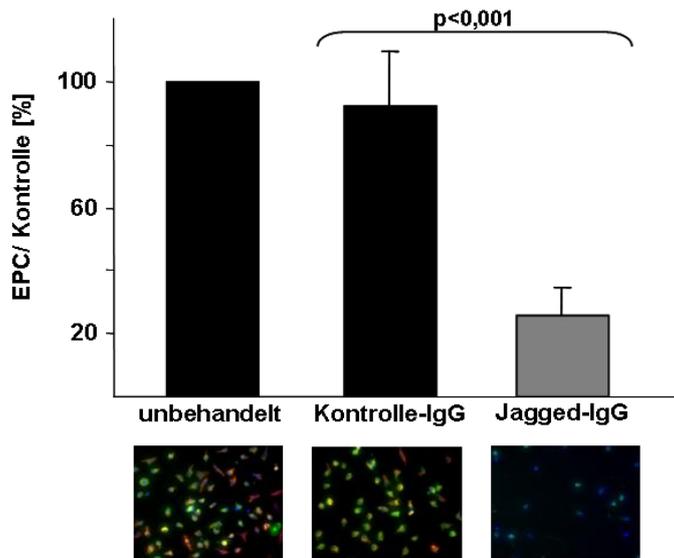
einer signifikanten Reduktion der adhären EPCs im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrollkultur ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 4.16. DBZ-Dosis-Wirkungskurve in EPC-Kultur** **A** EPC-Zahl/Gesichtsfeld, die EPCs wurden zur Kontrolle mit DMSO inkubiert und für die Dosis-Wirkungskurve mit den Konzentrationen 10 nM, 30 nM, 100 nM und 300 nM des GSI-Inhibitors DBZ behandelt, ( $p < 0,05$ ), **B** in blau DAPI, in grün *Ulex europaeus*-Lectin und in rot AcLDL, die Abbildung zeigt die Überlagerung der drei Färbungen, (200x Vergrößerung)

### Das den Notch-Rezeptor blockierende Immunglobulin Jagged-IgG reduziert die EPC-Zahl

Die Reduktion der Zellzahl nach Inkubation mit dem Immunglobulin Jagged-IgG (Fa. R&D Systems) wurde durch die Doppelfärbung mit Lectin aus *Ulex europaeus* und AcLDL nachgewiesen, dazu wurden die EPCs wie unter 4.1.1. beschrieben isoliert und in Endothelialem Wachstumsmedium (EGM) auf mit Fibronectin-beschichteten Deckgläsern in Zellkulturgefäßen mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Die EPCs wurden am ersten und am vierten Tag mit dem rekombinanten Jagged-IgG und dem Kontroll-IgG (Konzentration: 50 µg/ml) behandelt. Die Doppelfärbung der Zellen wurde wie unter 4.1.1. beschrieben am 7 d der Kultivierung durchgeführt.



**Abb. 4.17. Reduzierte EPC-Zahl nach Notch-Inhibition durch Jagged-IgG** Die Y-Achse gibt die Anzahl der adhären EPCs als % der Kontrolle nach Behandlung mit dem Kontroll-IgG oder dem Jagged-IgG (50 µg/ml) und die X-Achse die experimentellen Bedingungen wieder, ( $p < 0,001$ ), die Bilder unter der Grafik stellen repräsentative Aufnahmen der jeweiligen Kulturbedingungen dar (200x Vergrößerung)

Die in Abbildung 4.17. dargestellte Grafik zeigt die Ergebnisse nach der Inkubation der EPCs mit dem Jagged-IgG und Kontroll-IgG, die Y-Achse gibt die Anzahl der adhären EPCs als Prozent der unbehandelten Kontrolle und die X-Achse die verschiedenen, experimentellen Bedingungen wieder. Bei der unbehandelten Kontrolle lag die Anzahl der EPCs pro Gesichtsfeld bei 100 %, nach Inkubation mit dem Kontroll-IgG (50 µg/ml) bei 92 % ± 17 % und nach Behandlung mit dem Jagged-IgG (50 µg/ml) bei 26 % ± 9 % ( $p < 0,05$ ). Unter der Grafik in 4.17. sind die zu den unbehandelten, mit dem Kontroll-IgG und Jagged-IgG inkubierten EPC-Kulturen gehörigen Bilder abgebildet, sie stellen repräsentative Aufnahmen der verschiedenen Kulturbedingungen dar. Die Inkubation der EPC-Kultur mit Jagged-IgG führte zu einer signifikanten Reduktion der adhären EPCs im Vergleich zur mit dem Kontroll-IgG behandelten EPC-Kultur.

#### 4.2.6. Transfektion der EPCs mit einem dominant negativen RBP-J-Adenovirus führte zur Reduktion der EPC-Zahl

##### Transfektion der EPCs mit Adenoviren resultierte in Reduktion der EPC-Zahl

Der dominant negative, rekombinante RBP-J-Adenovirus wurde mit dem *Adeasy XL Adenoviral Vector System* (Fa. Stratagene) und dem Plasmid pCMX-N/RBP-J (R218H) von Kazuki Kuroda (Ottawa Health Research Institute), bezogen über das Riken BioResource Center (Tokyo, Japan), hergestellt. Dazu wurde das Gen mit Hilfe einer PCR durchgeführt mit Gen-spezifischen Primern (s. Abschnitt 7.5., Tab. 7.4.) und der Herculase *enhanced DNA polymerase* (Fa. Stratagene) amplifiziert. Durch die speziell designten Primer und die PCR wurde am 5'-Ende

des Gens eine Restriktionsschnittstelle für das Enzym *EcoR V* und am 3'-Ende eine für das Enzym *Xho I* eingebaut. Die amplifizierte DNA wurde über ein Agarosegel und das *QIAquick Gel Extraction Kit* (Fa. Qiagen) aufgereinigt. Das aufgereinigte Produkt und der *Shuttle*-Vektor *pShuttle-IRES-hrGFP-1* (Fa. Stratagene) wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoR V* und *Xho I* (Fa. NEB) verdaut. Das verdaute PCR-Produkt und der *Shuttle*-Vektor wurden über Agarosegel und das *QIAquick Gel Extraction Kit* von unverdauten Produkt oder Vektor getrennt. Das Gen wurde mit der *Quick T4 DNA Ligase* (Fa. NEB) in den *Shuttle*-Vektor kloniert und in den Bakterienstamm *MAX Efficiency DH5 $\alpha$  competent cells* zur Amplifikation transformiert. Die durch Restriktionsanalyse bestimmten, positiven Klone wurden in großer Menge mit dem *Qiagen Plasmid Maxi Kit* (Fa. Qiagen) isoliert und mittels Sequenzierung auf die korrekte Sequenz überprüft. Zur homologen Rekombination mit dem *pAdEasy-1* Plasmid wurden die klonierten *Shuttle*-Vektoren durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym *Pme I* linearisiert und in den Bakterienstamm *BJ5183-AD-1* transformiert. In diesen Bakterien fand die homologe Rekombination zwischen dem Vektor und dem Plasmid statt, dabei entstanden Rekombinanten, die das *pAdEasy-1* Plasmid mit RBP-J-Gen enthielten. Die Klone wurden mit *Qiagen Plasmid Mini Kit* isoliert und durch Restriktionsanalyse mit dem Enzym *Pac I* überprüft. Positive Klone wurden zur fehlerfreien Amplifikation in den Bakterienstamm *XL10-Gold ultracompetent cells* transformiert. Die rekombinanten *pAdEasy-1* Plasmide wurden mit dem *Endofree Plasmid Maxi Kit* in großer Menge isoliert und durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung verifiziert. Zur Virusherstellung wurde das rekombinante *pAdEasy-1* Plasmid im großen Ansatz mit dem Restriktionsenzym *Pac I* verdaut (~50  $\mu$ g) und durch Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Fällung aufgereinigt. Die *Pac I* verdauten Plasmide wurden mit dem Transfektionsreagenz *Fugene 6* (Fa. Roche) in die AD-293-Zellen eingebracht. Die eukaryotischen Zellen produzierten rekombinante Adenoviren, welche bei Infektion von Zellen das dominant negative RBP-J-Protein ins Zellinnere entlassen. Die von den AD-293-Zellen produzierten Adenoviren werden mit einem Cäsiumchloridgradienten aufgereinigt und aufkonzentriert. Die Konzentration der Adenovirus-Lösung wurde photometrisch bestimmt.

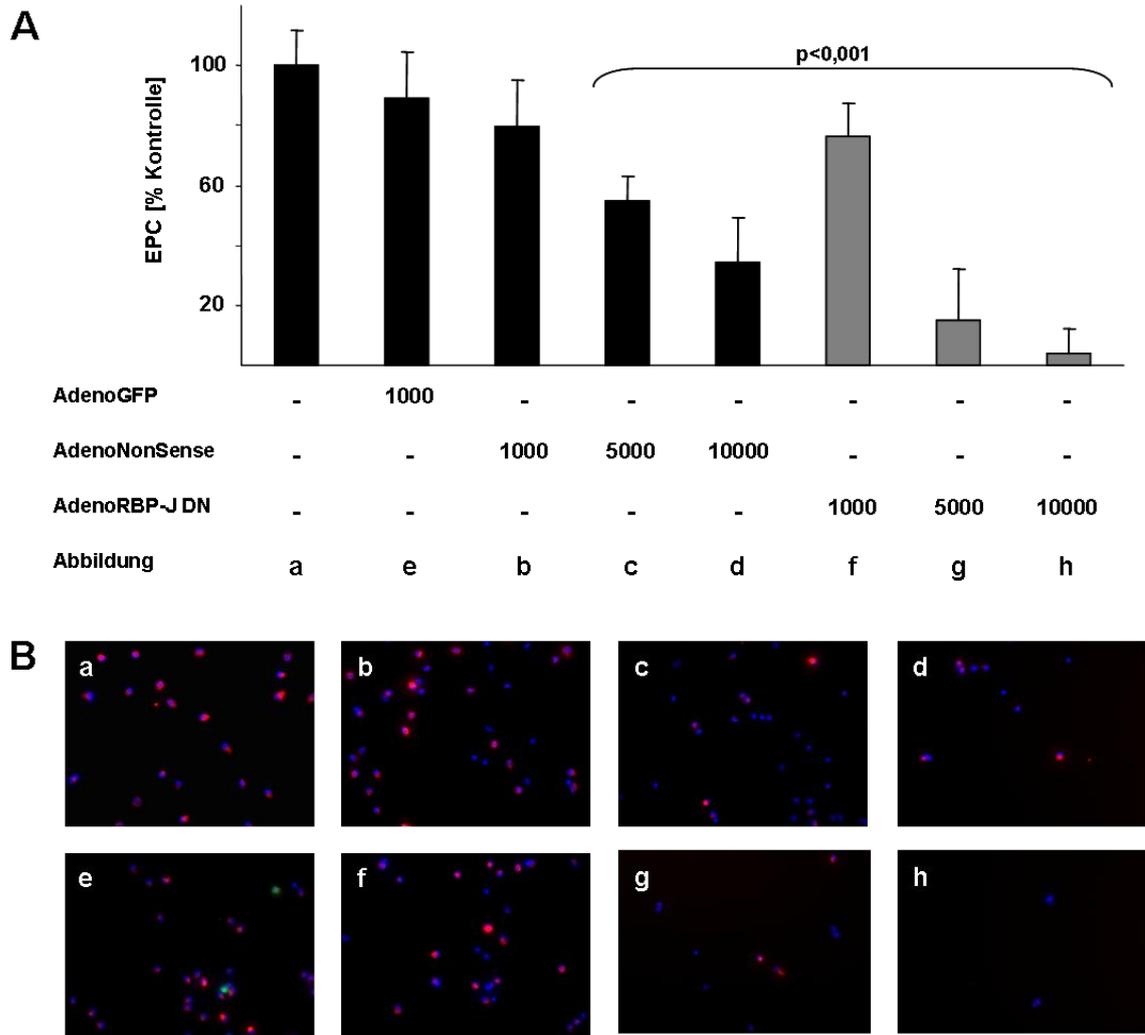
Die Reduktion der Zellzahl nach Infektion mit dem rekombinanten RBP-J-Adenovirus wurde durch die Färbung mit AcLDL nachgewiesen, dazu wurden die EPCs wie unter 4.1.1. beschrieben isoliert und in Endotheliales Wachstumsmedium (EGM) in mit Fibronectin-beschichteten Zellkulturgefäßen mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Die EPCs wurden am zweiten Tag einmal mit PBS gewaschen und mit dem RBP-J-Adenovirus in verschiedenen Konzentration (siehe Tab. 4.1.) in EGM (2 % FCS) für 4 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach 4 h erfolgte die Zugabe von EGM (20 % FCS). Als Kontrolle wurden die EPCs ohne Virus, mit einem GFP exprimierenden Adenovirus und mit einem Non-Sense-Adenovirus (exprimiert Protein unbekannter Funktion) inkubiert (Konzentrationen: s. Tab. 4.1.).

Die Färbung der EPCs mit AcLDL wurde wie unter 4.1.1. beschrieben am 7 d der Kultivierung durchgeführt.

**Tab. 4.1. Konzentration der Adenoviren zur Transfektion der EPCs**

Adenovirus	Konzentration [Viruspartikel/Zelle]
dom. neg. RBP-J-Adenovirus	1.000, 5.000, 10.000
Non-Sense-Adenovirus	1.000, 5.000, 10.000
GFP-Adenovirus	1.000

Die in Abbildung 4.18.A dargestellte Grafik fasst die Ergebnisse der Transfektion der EPCs mit Adenoviren zusammen. Die Y-Achse gibt die Anzahl der AcLDL-positiven EPCs als Prozent der unbehandelten Kontrolle und die X-Achse die verschiedenen, experimentellen Bedingungen wieder. Bei der unbehandelten Kontrolle lag die Anzahl der EPCs pro Gesichtsfeld bei  $100 \% \pm 11,9 \%$ , nach Inkubation mit dem GFP-Adenovirus (1.000 Viruspartikel/Zelle) bei  $89,9 \% \pm 15,5 \%$  und nach Behandlung mit dem Non-Sense-Adenovirus unter Einsatz von 1.000 Viruspartikel pro Zelle bei  $79,9 \% \pm 15,2 \%$ , bei 5.000 bei  $54,9 \% \pm 8,2 \%$  und bei 10.000 bei  $34,6 \% \pm 14,9 \%$ . Die Inkubation mit dem dominant negativen RBP-J-Adenovirus führte unter Einsatz von 1.000 Viruspartikel pro Zelle zu  $76,3 \% \pm 11,1 \%$  AcLDL-positiven Zellen, bei 5.000 zu  $15,1 \% \pm 17,1 \%$  und bei 10.000 zu  $4,01 \% \pm 8,0 \%$ . Die Reduktion der EPC-Zahl nach Inkubation mit dem dominant negativen RBP-J-Adenovirus ist statistisch signifikant, so hat die unbehandelte EPC-Kultur im Vergleich mit den verschiedenen Konzentrationen des RBP-J-Adenovirus einen p-Wert kleiner 0,001 und die mit dem Non-Sense-Adenovirus behandelten EPCs im Vergleich mit den verschiedenen Konzentrationen des RBP-J-Adenovirus ebenfalls einen p-Wert kleiner 0,001 (Konzentrationen: 5.000 und 10.000 Viruspartikel/ Zelle). In Abb. 4.18.B sind die zu den verschiedenen, experimentellen Bedingungen gehörigen repräsentativen, übereinander gelagerten Aufnahmen der EPC-Kulturen abgebildet, die Zellkerne sind mit DAPI blau und die EPCs mit AcLDL rot gefärbt. Die Transfektion der EPCs mit dem dominant negativen RBP-J-Adenovirus führte zur einer signifikanten Reduktion der Zellzahl im Vergleich zu den EPC-Kulturen, welche mit einem Non-Sense-Adenovirus transfiziert wurden ( $p < 0,001$ ).



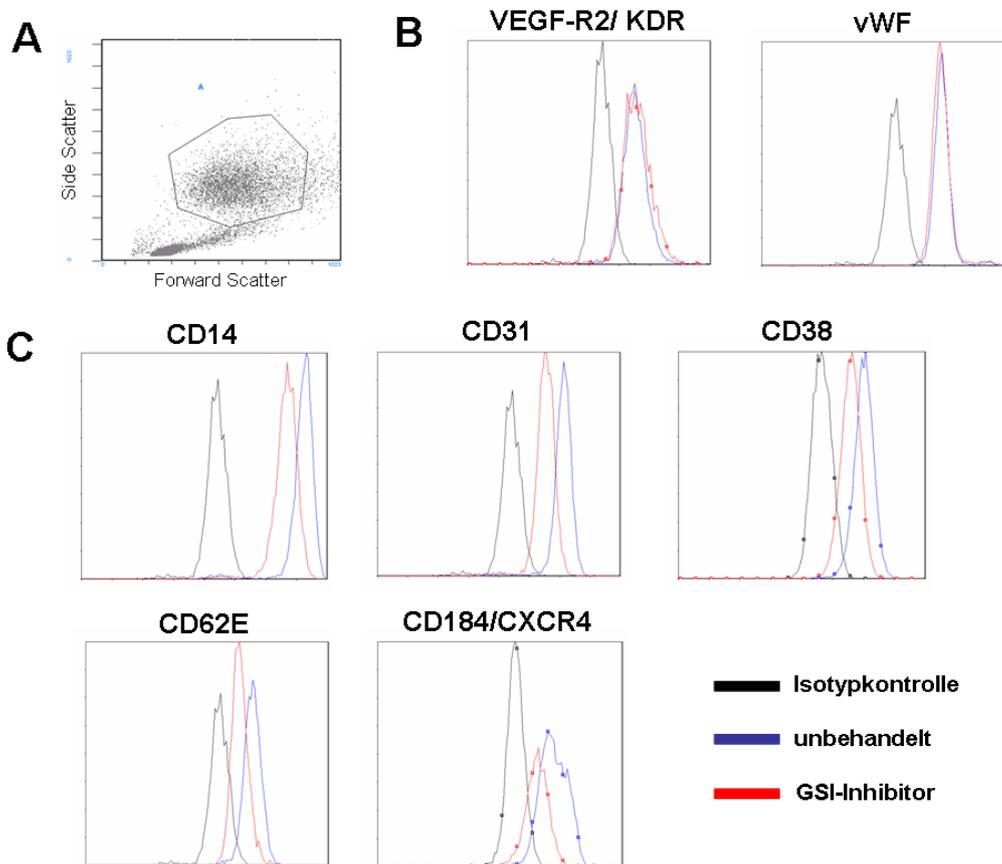
**Abb. 4.18. Die Transfektion mit einem dominant negativen, rekombinanten RBP-J-Adenovirus führt zur Reduktion der EPC-Zahl** **A** EPC-Zahl als % der Kontrolle dargestellt, die EPCs wurden zur Kontrolle mit den Adenoviren AdenoGFP (1.000 Viruspartikel/Zelle) und AdenoNonSense (1.000, 5.000, 10.000 Viruspartikel/Zelle) inkubiert, der dominant negative AdenoRBP-J DN wurde mit 1.000, 5.000, 10.000 Viruspartikeln pro Zelle eingesetzt, ( $p < 0,001$ ) **B a-h** Zellkerne in blau (DAPI) und EPCs in rot (AcLDL), 200x Vergrößerung, **a** unbehandelte EPC-Kultur, **e** Transfektion mit AdenoGFP, **b-d** Transfektion mit AdenoNonSense mit 1.000 (**b**), mit 5.000 (**c**) und 10.000 (**d**) Partikeln pro Zelle, **f-h** Transfektion mit AdenoRBP-J DN mit 1.000 (**f**), mit 5.000 (**g**) und 10.000 (**h**) Viruspartikeln pro Zelle

#### 4.2.7. FACS-Analyse nach Inhibition des Notch-Signalweges in EPCs

##### Veränderung der exprimierten Oberflächenrezeptoren auf EPCs nach Inkubation mit dem $\gamma$ -Secretase-Inhibitor DAPT

Die Veränderung der Expression von EPC-spezifischen Oberflächenrezeptoren nach Inkubation mit dem  $\gamma$ -Secretase-Inhibitor DAPT wurde in der FACS-Analyse nachgewiesen. Dazu wurden die EPCs wie unter 4.1.1. beschrieben isoliert und in Endothelialem Wachstumsmedium (EGM) in mit Fibronectin-beschichteten Zellkulturgefäßen mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Am 7 d der Kultivierung wurden die EPCs mit Accutase-Lösung (Fa. PAA laboratories) abgelöst und in PBS mit 2 % FCS resuspendiert. Die EPCs wurden auf FACS-Röhrchen mit mindestens 50.000 Zellen verteilt, mit dem Fluoreszenzfarbstoff R-Phycoerythrin konjugierten Antikörpern versetzt (Konzentration:  $1 \mu\text{g}/10^6$  Zellen) und 30 min bei 4 °C vor

Licht geschützt inkubiert. Die Zellen wurden in den FACS-Röhrchen in 0,5 ml PBS mit 2 % FCS resuspendiert. Mindestens 10.000 EPCs je FACS-Röhrchen wurden im FACSCalibur (Fa. BD Biosciences) mit einem Argon-Ionen-Laser gemessen, die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts wurde im Fluoreszenzkanal FL-2 ermittelt.



**Abb. 4.19. FACS-Analyse der Oberflächenrezeptoren auf EPCs nach DAPT-Inkubation** A EPC-Kultur im Scatter Plot, X-Achse stellt das Vorwärts- (FSC) und die Y-Achse das Seitenstreulicht (SSC) dar, B, C Isotypkontrolle in schwarz, unbehandelte EPCs in blau und mit DAPT behandelte EPCs in rot, B FACS-Analyse der Oberflächenmarker VEGF-R2 und vWF zeigt keine Veränderung der Expression nach Inkubation mit DAPT C Färbung der Marker CD14, CD31, CD38, CD62E und CD184 (CXCR4) zeigt eine deutliche Reduktion der Expression auf DAPT behandelten EPCs

Abb. 4.19.A zeigt einen typischen Scatter Plot einer FACS-analysierten EPC-Kultur, in dem Scatter Plot sind zwei Zellpopulationen zu erkennen. Wie in Abschnitt 4.1.2. beschrieben, basieren alle übrigen Graphen dieser Abbildung auf der heterogenen Population mit den größeren, granularen Zellen. Die Graphen der Abbildungen 4.19.A und 4.19.B geben auf der X-Achse mit einer exponentiellen Skala die Intensität des Fluoreszenzsignals an, während die Y-Achse die Anzahl der Ereignisse in einem bestimmten Kanal zeigt, d. h. Zellen mit einer bestimmten Fluoreszenzintensität. Die Isotypkontrolle ist in den Grafiken in schwarz, die unbehandelten, gefärbten in blau und die DAPT behandelten, gefärbten EPCs in rot dargestellt. Die Isotypkontrolle zeigt die Eigenfluoreszenz der EPCs und die Kreuzaktivität der Antikörper nach Inkubation mit einem R-Phycoerythrin konjugierten, unspezifischen Antikörper. Die Analyse der EPC-spezifischen Oberflächenmarker VEGF-Rezeptor 2 und von-Willebrand-

Faktor in Abb. 4.19.B zeigt, dass die Inkubation mit DAPT keine verringerte Expression zur Folge hat. Die Färbung der Oberflächenmarker CD14, PECAM-1 (CD31), CD38, CD62E und CD184 (CXCR4) zeigte eine deutliche Reduktion der Expression nach Behandlung der EPCs mit DAPT durch eine signifikante Verschiebung der roten Kurve nach rechts ( $p < 0,05$ ).

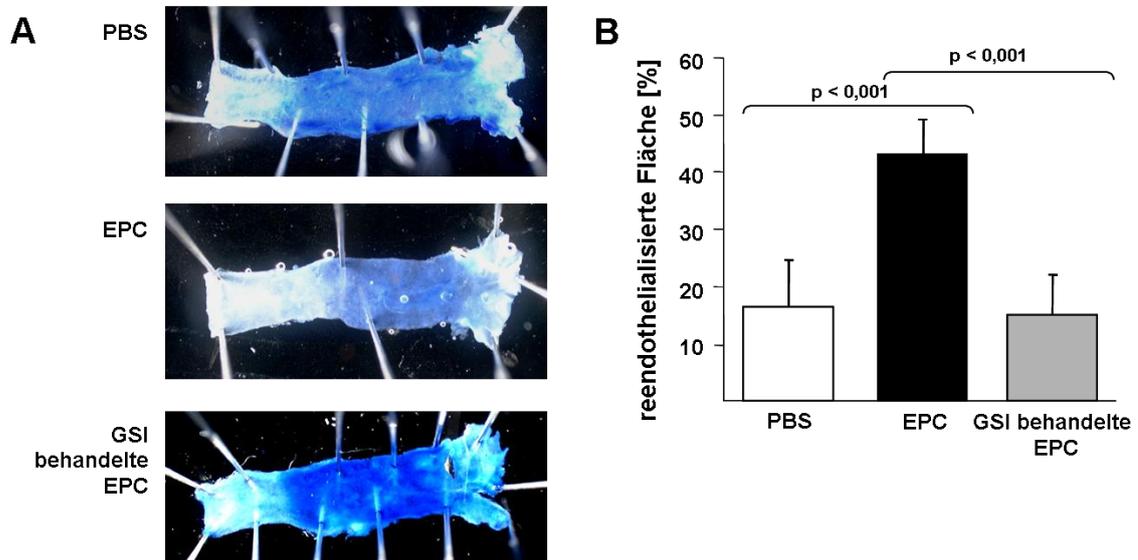
### **4.3. Analyse der Inhibition des Notch-Signalweges in EPCs *in vivo***

#### **4.3.1. DAPT behandelte EPCs führen zu deutlich reduzierter Reendothelialisierung in murinen Carotidenverletzungsmodell**

Die Analyse der Reendothelialisierung und der Einfluss der DMSO und DAPT behandelten humanen EPCs im Modell der murinen Carotidenverletzung wurde wie folgt durchgeführt: 8-10 Wochen alte, männliche  $\text{NMR1}^{\text{m/m}}$ -Mäuse wurden anästhesiert, die linke Carotis posterior der Bifurkation freigelegt und mit einem bipolaren, unter elektrischer Spannung stehenden Microcoagulator (Elektrotom 80B, Fa. Martin) auf einer Länge von 4 mm verletzt. Der freigelegte Halsbereich wurde vernäht und 3 h nach der Operation wurde den Mäusen 150  $\mu\text{l}$  PBS-Lösung ohne Zellen, mit 500.000 DMSO behandelten EPCs oder mit 500.000 DAPT behandelten EPCs in die Schwanzvene injiziert. Zur Analyse der Reendothelialisierung wurde den Mäusen am 7 d nach der Operation 10 min vor Tötung Evans Blue Lösung in die Schwanzvene injiziert. Nach der Tötung der Tiere wurde die Carotis inklusive der Bifurkation mit einer Länge von ~1 cm entnommen und in PBS gespült. Die Carotis wurde longitudinal aufgetrennt, in Formalin (37 %) fixiert und mit Minutiennadeln in einer mit Silikon beschichteten Petrischale *en face* präpariert. Die Carotis wurde zusammen mit einem Größenstandard fotografiert und mit dem Computerprogramm Axiovision Rel. 4.4.1.0 der Firma Zeiss analysiert, d. h. es wurde die Größe der Gesamtfläche des Lumens der Carotis und die der reendothelialisierten Fläche bestimmt. Durch die Evans Blue Färbung ist die reendothelialisierte Fläche weiß und die nekrotische blau gefärbt. Die Reendothelialisierung der Carotis wurde dabei als prozentualer Anteil der reendothelialisierten Fläche an der Gesamtfläche ausgedrückt (Lindner, 1993, Carmeliet, 1997b, Liehn, 2004).

In Abb. 4.20. sind die Analysen der Reendothelialisierung zusammengefasst, Abb. 4.20.A zeigt repräsentative Aufnahmen der präparierten Carotiden. Die oberste Aufnahme zeigt die Carotis einer Maus, die nach der Carotidenverletzung 150  $\mu\text{l}$  PBS-Lösung injiziert bekommen hatte, die reendothelialisierte Fläche (weiß) macht nur einen kleinen Anteil der gesamten Fläche des Lumens aus. Der Großteil der Fläche des Lumens ist nekrotisch (Blaufärbung). Die Carotis der mittleren Aufnahme wurde einer Maus entnommen, welcher 500.000 DMSO behandelte EPCs in PBS-Lösung injiziert wurden, die reendothelialisierte Fläche macht in dieser Carotis fast die Hälfte der Gesamtfläche aus. Die unterste Aufnahme zeigt die Carotis einer Maus, der nach Carotidenverletzung 500.000 DAPT behandelte EPCs in PBS-Lösung injiziert wurden, die reendothelialisierte Fläche macht knapp ein Viertel der Gesamtfläche aus. Abb. 4.20.B fasst die

Ergebnisse in einer Grafik zusammen, die Y-Achse gibt die reendothelialisierte Fläche in Prozent der Gesamtfläche und die X-Achse die verschiedenen, experimentellen Bedingungen wieder.



**Abb. 4.20. DAPT behandelte EPCs führen zu reduzierter Reendothelialisierung im Vergleich zu DMSO behandelten EPCs** **A** Repräsentative Aufnahmen von Carotiden nach postoperativer Injektion von PBS, DMSO behandelten EPCs oder DAPT behandelten EPCs, am 7 d mit Evans Blue gefärbt und entnommen (5x Vergrößerung) **B** Die Y-Achse gibt die reendothelialisierte Fläche als Prozent der Gesamtfläche des Lumens nach Injektion von PBS, 500.000 DMSO behandelten oder 500.000 DAPT behandelten EPCs und die X-Achse die experimentellen Bedingungen wieder, ( $p < 0,001$ )

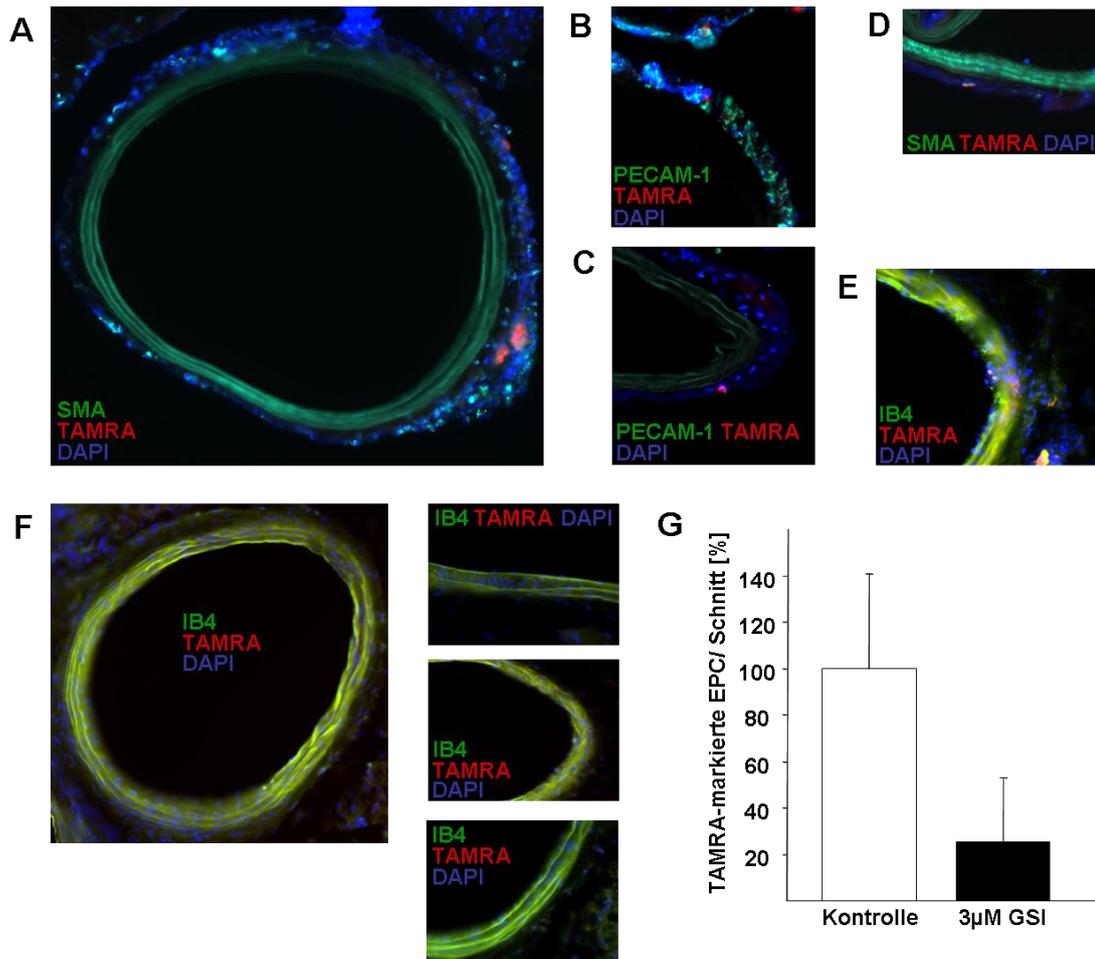
Die Mäuse, denen nach der Carotidenverletzung PBS-Lösung injiziert wurde, hatten im Durchschnitt nach 7 d eine reendothelialisierte Fläche von 16,51 %  $\pm$  8,07 % der Gesamtfläche des Lumens. Nach der Injektion von 500.000 DMSO behandelten EPCs lag der Anteil der reendothelialisierten Fläche an der Gesamtfläche des Lumens bei 43,16%  $\pm$  6,89 %. Die Mäuse, denen nach der Carotidenverletzung 500.000 DAPT behandelte EPCs injiziert wurden, hatten nach 7 d eine reendothelialisierte Fläche von 15,05 %  $\pm$  7,57 %. Die Injektion von EPCs in Mäuse nach Carotidenverletzung führt zu einer starken Reendothelialisierung im Vergleich zur Injektion von reiner PBS-Lösung ( $p < 0,001$ ). Die Injektion von DAPT behandelten EPCs in Mäuse nach Carotidenverletzung hatte eine schwache Reendothelialisierung im Vergleich zur Injektion von DMSO behandelten EPCs zur Folge ( $p < 0,001$ ). Die mit DAPT behandelten EPCs scheinen die Fähigkeit die Reendothelialisierung positiv zu beeinflussen zu verlieren.

#### 4.3.2. DAPT behandelte EPCs *homen* nicht zur Verletzung *in vivo* im Carotis-Verletzungsmodell

Zum Nachweis der injizierten, humanen EPCs im Modell der murinen Carotidenverletzung wurden die Operationen und Injektionen der EPCs wie im Abschnitt 4.3.1. beschrieben durchgeführt. Die EPCs wurden zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff TAMRA gefärbt

(Byersdorfer, 2001), dazu wurden sie am 7 d mit Accutase-Lösung abgelöst und in EBM mit TAMRA (20  $\mu\text{M}$ ) für 10 min 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden in PBS gewaschen, resuspendiert und den Mäusen postoperativ injiziert. Am 3 d nach der Operation wurden die Gefäße der Mäuse durch Perfusionsfixation fixiert und beide Carotiden (die linke, verletzte und die rechte, unverletzte) inklusive des umliegenden Muskel- und Bindegewebes nach Euthanasierung entnommen. Das Gewebe wurde durch die Inkubation in PFA-Lösung (2 %) für 10min, in Sucrose-Lösung (15 %) für 3 h und in ÜN in Sucrose-Lösung (30 %) fixiert. Das Gewebe wurde in der Gefrierlösung *Jung Tissue Freezing Medium* (Fa. Leica) eingebettet im Kryostat CM 1900 (Fa. Leica) in 10-15  $\mu\text{m}$  dünne Querschnitte geschnitten. Die Gewebeschnitte wurden bei -20 °C aufbewahrt und zur Färbung in Paraformaldehyd-Lösung (4 %) fixiert. Das unspezifische Binden der zur Färbung verwendeten Antikörper wurde durch Inkubation der Schnitte mit Ziegen Serum inhibiert. Die Färbung erfolgte durch die sequenzielle Inkubation mit primären und sekundären Antikörper oder durch die Inkubation mit einem mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Substrat/Antikörper. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt und die Schnitte mit Eindeckmedium und Deckgläsern eingedeckt. Die gefärbten Gewebe wurden mit 200facher Vergrößerung am Zeiss-Mikroskop fotografiert. Die Bilder der verschiedenen Fluoreszenzen wurden mit dem Programm Adobe Photoshop CS überlagert und ausgewertet.

In Abb. 4.21. wird die Analyse der TAMRA-markierten EPCs und ihrer Fähigkeit in die verletzte Areal der Carotiden zu *homen*, also zu wandern, dargestellt. Die Abbildungen 4.21.A-D zeigen Aufnahmen von verletzten Carotiden im Querschnitt und in das verletzte Areal eingewanderten, TAMRA-markierten EPCs (in rot). Die humanen EPCs sind nicht im Lumen, sondern im umliegenden (Binde-)Gewebe zu finden. Die Färbung der glatten Gefäßmuskulatur (SMA) und des Endothels (PECAM-1) stellt die Carotide in grün dar, die Zellkerne sind in blau angefärbt. Das gefärbte Endothel der verletzten Carotiden zeigt kaum Zellkerne, was auf das Absterben der Zellen nach der Carotidenverletzung zurückzuführen ist. In den unverletzten Carotiden (Abb. 4.21.E-F) sind im Gegensatz dazu viele Zellkerne zu sehen, was den vitalen Zustand der Carotide zeigt. Abb. 4.21.E zeigt eine unverletzte Carotis im Querschnitt, angefärbt mit Isolectin B4, welches an murine, endotheliale Zellen bindet. Im grün gefärbten Endothel der unverletzten Carotide sind viele Zellkerne im Endothel und eingewanderte EPCs (rot) zu sehen. Abb. 4.21.F zeigt mehrere Gewebeschnitte von unverletzten Carotiden im Querschnitt (Isolectin B4, grün), viele Zellkerne sind im grün gefärbten Endothel zu beobachten. In Abbildung 4.21.G werden die Ergebnisse der Auszählung der eingewanderten EPCs pro Gewebeschnitt zusammengefasst, die Y-Achse gibt die humanen, TAMRA-markierten EPCs pro Gewebeschnitt als Prozent der DMSO behandelten Kontrolle und die X-Achse die experimentellen Bedingungen wieder.



**Abb. 4.21. DAPT behandelte EPCs *homen* schlechter in das verletzte Gewebe der Carotiden** A-F 200x Vergrößerung, Zellkerne (DAPI, blau), EPCs (TAMRA, rot) A-D Repräsentative Aufnahmen von verletzten Carotiden im Querschnitt und eingewanderten EPCs A, D Die glatten Muskelzellen der Carotiden sind grün angefärbt (SMA, FITC) B, C Die Endothelzellen der Carotiden sind in grün angefärbt (PECAM-1, FITC) E, F Gesunde Carotiden im Querschnitt, das Endothel mit Isolectin B4 grün angefärbt, G Die Y-Achse gibt die humanen, TAMRA-markierten EPCs pro Gewebeschnitt als Prozent der DMSO behandelten Kontrolle nach Injektion von 500.000 DMSO behandelten oder 500.000 DAPT-behandelten EPCs und die X-Achse die experimentellen Bedingungen wieder, ( $p < 0,001$ )

Als Positivkontrolle des *Homings* wurden den Mäusen postoperativ 500.000 DMSO behandelte EPCs in PBS injiziert, im Durchschnitt wurden bei diesen Mäusen  $3,33 \pm 1,35$  EPCs pro Gewebeschnitt gezählt, bei denen, die 500.000 DAPT behandelte EPCs erhielten, nur  $0,84 \pm 0,92$  Zellen. Diese Ergebnisse werden in der Grafik als Prozent der Kontrolle wiedergegeben, die DAPT behandelten EPCs waren zu  $25 \% \pm 28 \%$  der Kontrolle in den Gewebeschnitten vorhanden. Die Behandlung der EPCs mit DAPT führte zu einem signifikant schlechteren *Homing* nach postoperativer Injektion bei Carotiden verletzten Mäusen im Vergleich zu injizierten, DMSO behandelten EPCs ( $p < 0,001$ ).

## 5. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Rolle der Notch-Signaltransduktion in EPCs zu evaluieren und dessen mögliche Funktion durch Steuerung der EPCs in der physiologischen und pathologischen Reendothelialisierung und Neovaskularisierung von Gefäßsystemen zu ermitteln. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen diese These, die Expression des Notch1-Rezeptors und seiner Liganden in EPCs konnte nachgewiesen werden und die Modifikation des Notch-Signalweges beeinflusste den Phänotyp und die Funktionalität von EPCs signifikant.

Die Identität der myeloischen EPCs konnte durch die in der Literatur beschriebenen Marker und Färbungen nachgewiesen und die Expression des Notch-Rezeptors und seiner Liganden in EPCs konnte auf Transkriptions- und Translationsebene gezeigt werden. Die Inhibition der humanen myeloischen EPCs durch die  $\gamma$ -Sekretase und durch den Einsatz eines Adenoviruses, welches eine dominant negative Form des Transkriptionsfaktors RBP-J exprimiert, wurde mit verschiedenen funktionellen und analytischen Assays auf eine Rolle der Notch-Signaltransduktion in der Entwicklung und Differenzierung untersucht. Die funktionellen Assays zeigten, dass die Funktionalität der EPCs nach Inhibition des Notch-Signalweges vermindert ist. Weiterhin zeigte die FACS-Analyse bei den Notch-inhibitierten EPCs im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine Reduktion des Markers CXCR4, dem Rezeptor des Chemokins SDF-1. Die verminderte Funktionalität der EPCs nach Inhibition des Notch-Signalweges konnte im *in vivo* Modell der Carotidenverletzung bestätigt werden.

Die Hauptaussagen dieser Arbeit sind die Charakterisierung der isolierten EPCs, die Analyse der Expression vom Notch-Rezeptor und seinen Liganden in den isolierten EPCs, die Inhibition des Notch-Signalweges in EPCs mit Analyse der Funktionalität und die Übertragung der Ergebnisse in ein adaptives *in vivo* Modell zur Endothelregeneration in Mäusen. Diese Aussagen sollen in den folgenden Abschnitten erläutert werden.

### 5.1. Charakterisierung der EPC-Kultur

Durch die in der Literatur beschriebene Kultivierung konnten aus peripherem Blut isolierte MNCs in speziellem Endothelzellmedium auf mit Fibronectin beschichteten Zellkulturgefäßen myeloische EPCs isoliert werden (s. 4.1.1., Tepper, 2002, Kalka, 2001). Der in der Fachliteratur definierte Phänotyp der myeloischen EPCs konnte durch Aufnahme von acetylierten LDL und Bindung von Lektin aus *Ulex europaeus* verifiziert werden (s. 4.1.1., Kalka 2000, Vasa, 2001). Die Analyse der Oberflächenmarker zeigte zwei Zellpopulation im Scatter Plot, nur die größere heterogene Zellpopulation war positiv für Färbungen mit EPC-spezifischen Markern wie PECAM-1 (CD31), CD14, KDR und dem von Willebrand-Faktor (vWF) (s. 4.1.2., Urbich, 2004, Kalka, 2007). Diese Beobachtung wurde bereits in der Literatur beschrieben (Rehman, 2003), daher wurde im Rahmen dieser Arbeit stets die heterogene Population in den

Auswertungen dargestellt. Die Expression von monozytären Markern (CD14: 90,1 %  $\pm$  3,77 %, CD18: 78,7 %  $\pm$  3,5 %), Monozyten- und Endothelzellmarkern (CD31: 91,3 %  $\pm$  4,6 %), hämatopoetischen (CD34: 24,6 %  $\pm$  3,04 %) und endothelialen Markern (CD62E: 37,6 %  $\pm$  4,82 %, KDR: 92,8 %  $\pm$  4,25 %, vWF: 94,2 %  $\pm$  3,17 %) auf den kultivierten EPCs bestätigte den in der Literatur beschriebenen EPC-Phänotyp (Urbich, 2004, Kalka, 2007, Rehman, 2003). Die für diese Arbeit isolierten EPCs stammen wahrscheinlich aus dem myeloischen Arm der hämatopoetischen Progenitorzellen, welche sich durch ihre strukturellen und funktionellen Fähigkeiten bei der Neovaskularisierung und Reendothelialisierung auszeichnen (persönliche Kommunikation mit Dr. F. Limbourg, MHH).

## **5.2. Notch1 und seine Liganden sind in myeloischen EPCs exprimiert**

Die Expression von Notch1 und Delta-like1 konnte in EPCs auf Translations- bzw. Expressionsebene nachgewiesen werden (s. 4.1.3. und 4.2.1.) und zeigt die Involvierung des Notch1-Rezeptors in die Entwicklung von hämatopoetischen Zellen und Systemen. HUVECs exprimierten Notch1, -2, -4, Delta-like1 und -4, während glatte Gefäßmuskelzellen Notch2 und -3 exprimierten. Da auf mRNA-Ebene nur die Expression von Notch1 in der isolierten EPC-Kultur detektiert werden konnte, wurde auf Transkriptionsebene nur die Expression von Notch1 untersucht. Diese konnte in EPCs und HUVECs nachgewiesen werden, jedoch konnte nur in den EPCs eine starke Prozessierung von Notch1 zu NICD beobachtet werden. Dieser starke Unterschied in der Prozessierung zwischen endothelialen Progenitorzellen und reifen Endothelzellen deutet die unterschiedliche Funktionalität des Notch-Signalweges in der Entwicklung endothelialer Zellen an. Vermutlich spielt der Notch-Signalweg eine größere Rolle in der Entwicklung und Funktionalität von EPCs als in HUVECs.

## **5.3. Der Phänotyp und die Funktionalität von EPCs wird durch den Notch-Signalweg reguliert**

Initiale Experimente nach Inkubation der EPC-Kultur mit DAPT, einem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor, zeigten eine reduzierte Zellzahl und erniedrigte Anzahl von Kolonien (s. 4.2.2.). Die Dosis-Wirkungskurve zeigte eine signifikante Relation zwischen Wirkstoff und Effekt. Die Inhibition der Notch-Signaltransduktion konnte auf Proteinebene verifiziert werden, nach Inkubation mit DAPT wurde die Prozessierung des Notch-Rezeptors und die Abspaltung von NICD komplett inhibiert (s. 4.2.1.). Die weitergehenden Analysen der Wirkung der Notch1-Inhibition in EPCs zeigten keine Erhöhung der Nekrose oder Apoptose (s. 4.2.3.). Die reduzierte Zellzahl der EPC-Kultur nach Inkubation mit  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor muss sich also durch einen anderen Mechanismus erklären lassen. Die Analyse der Zellproliferation nach Inhibition von Notch

zeigte eine geringe, aber nicht signifikante Reduktion der Proliferation der EPC-Kultur (s. 4.2.3.), welche die großen Unterschiede in der Zellzahl nach Inkubation mit DAPT nicht erklärt. Weiterhin konnte der leichte Unterschied in der Proliferation nicht durch Analysen des Zellzyklus bestätigt werden.

Die Funktionalität der EPCs nach Modulation des Notch-Signalweges wurde *in vitro* mit dem Adhäsions-, dem Migrationsassay und der Tubusformation analysiert. Die funktionellen Eigenschaften der EPCs wurden durch die Behandlung mit DAPT vermindert. So sank die Migration nach DAPT-Behandlung auf unter 50 % der Positivkontrolle, die Adhäsion von EPCs auf einen Endothelzellmonolayer lag unter 40 % der Positivkontrolle. Weiterhin ist die Tubusformation durch Endothelzellen nach Koinkubation mit EPCs, nach Vorbehandlung der EPCs mit DAPT, auf 70 % der Positivkontrolle reduziert (s. 4.2.4.). Die Reduktion der EPC-Zahl nach Notch-Inhibition konnte durch andere inhibitorisch agierende Substanzen verifiziert werden, so führte der  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor XX (DBZ) zu einer Dosis-abhängigen Reduktion der Zellzahl. Auch die Inkubation mit Jagged-IgG, einem rekombinanten Antikörper des Notch-Liganden, welcher die Notch-Signaltransduktion durch Bindung an Notch inhibiert, zeigte eine Reduktion der EPC-Zahl auf unter 30 % der Positivkontrolle (s. 4.2.5.). Der Einsatz eines Adenovirus zur Inhibition der Notch-Signaltransduktion konnte die Beobachtung der reduzierten EPC-Zahl im Vergleich zur Kontrolle bestätigen (s. 4.2.6.).

Die Analyse der Expression der Oberflächenmarker in der Durchflusszytometrie zeigte, dass verschiedene Marker wie CD14, CD31, CD38, CD62E und CD184/CXCR4 in DAPT-behandelten EPCs im Vergleich zu unbehandelten EPCs schwächer exprimiert sind, andere Marker wie der VEGF-Rezeptor oder der von Willebrand-Faktor zeigen keine Veränderung der Oberflächenexpression (s. 4.2.7.).

#### **5.4. Endothelregeneration und -funktion nach Behandlung mit Notch-inhibierten EPCs vermindert**

Die *in vitro* Ergebnisse zur verminderten Funktionalität der EPCs nach Inkubation mit dem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT konnten *in vivo* in einem adaptiven Modell zur Endothelregeneration, dem Carotidenverletzungsmodell, bestätigt werden. Die Notch-Inhibition der DAPT-behandelten EPCs führte im murinen Carotidenverletzungsmodell zu einer reduzierten Reendothelialisierung im Vergleich zu unbehandelten EPCs. Die DAPT-behandelten EPCs konnten in den verletzten Carotiden nur 35 % der Fläche im Vergleich zur Positivkontrolle reendothelialisieren (s. 4.3.1.). Weiterhin zeigten histologische Analysen des Carotidengewebes, dass die DAPT-behandelten EPCs schlechter zum verletzten Gewebe homen, nur 25 % der Positivkontrolle homen in das verletzte Gewebe (s. 4.3.2.).

## 5.5. Das Fazit

In Mäusen konnte bereits gezeigt werden, dass die Notch-Signaltransduktion für die vaskuläre Morphogenese essentiell ist (Krebs, 2000). Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigen die Relevanz von Notch1 in humanen myeloischen Progenitorzellen. Bisher konnte noch nicht hinreichend geklärt werden, welche Funktion Notch1 in humanen myeloiden Progenitorzellen im Rahmen der vaskulären Regeneration hat. In einem *in vitro* Mausmodell mit der Zelllinie 32D (abgeleitet von murinen myeloiden Progenitorzellen), konnte gezeigt werden, dass Notch1 und Notch2 die Differenzierung in Granulozyten in Gegenwart von Cytokinen inhibieren (Bigas, 1998). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass das Notch-Signaling im Mausmodell die neuronale Stammzellzahl *in vitro* und *in vivo* über HES3 und Sonic hedgehog (Zielgene von Notch, s. 1.2.2.) erhöht (Androutsellis-Theotokis, 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Notch1, ähnlich wie in anderen Entwicklungssystemen, die primitive Hämatopoese auf zwei Arten beeinflusst: Erstens durch Erhöhung der Stammzellerneuerung und zweitens durch Beeinflussung der Zelllinienentwicklung (Stier, 2002). Wie können die Daten dieser Arbeit in diesem Zusammenhang interpretiert werden, welche Wirkung hat die Notch-Inhibition auf die myeloiden EPCs? Eine These wäre, dass Notch in diesen Zellen zur Selbsterneuerung benötigt wird und dass daher bei Inhibition des Notch-Signalweges die Zellzahl in Vergleich zur Kontrolle niedriger ist. Jedoch lassen sich die weitergehenden funktionellen Defizite nicht über die reduzierte Zellzahl erklären. Wahrscheinlich ist die Notch-Signaltransduktion für die Induktion der funktionellen Fähigkeiten der EPCs in der vaskulären Regeneration erforderlich, wie die Migration zum regenerierenden Gewebe oder die Sekretion von Cytokinen und Wachstumsfaktoren zur beschleunigten Regeneration des verletzten Gewebes.

Der Einfluss von Notch auf die Entwicklung und Funktionalität konnte in der vorliegenden Arbeit nicht komplett geklärt werden. Dennoch konnte nachgewiesen werden, dass Notch1 eine wichtige Rolle in der Entwicklung von EPCs spielt. Bei Inhibition des Notch-Signalweges werden alle wichtigen Funktionen, welche EPCs in der physiologischen und pathologischen Reendothelialisierung und Neovaskularisierung von Gefäßsystemen haben (s. auch 1.1.2.), vermindert. Der genaue Mechanismus wie Notch die Entwicklung und Funktionalität in EPCs steuert, muss in weiteren Arbeiten untersucht werden. Ein möglicher Ansatz wäre die weitere Analyse der Expression der Oberflächenmarker z.B. der Adhäsionsmoleküle CD62E (E-Selectin), CD38 oder des chemotaktischen Moleküls CXCR4 und dessen Regulation der Funktionalität und Entwicklung.

Für die weitergehende Fragestellung einer klinischen Relevanz der Notch1-Modulation in EPCs im Patienten, muss der Mechanismus der Regulation von Notch1 zur Funktionalität und Entwicklung von EPCs genauer analysiert werden, die vorliegende Arbeit hat die Grundlagen zu weiteren Analysen bereitet.

## 6. Quellenverzeichnis

### 6.1. Literaturverzeichnis

Adams RH, *et al.*, Roles of ephrinB and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis, *Genes Dev* 13:295-306, 1999.

Adams RH, Molecular control of arterial-venous blood vessel identity, *J Anat* 202:105-112, 2003.

Adams RH, Nerve cell signposts in the blood vessel roadmap, *Circulation Res* 98:440-442, 2006.

Aicher A, *et al.*, Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells, *Nature Med* 9(11):1370-1376, 2003.

Anderson DM, *et al.*, Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms, *Cell* 63(1):235-243, 1990

Androutsellis-Theotokis A, *et al.*, Notch signaling regulates stem cell numbers *in vitro* and *in vivo*, *Nature* 442(7104):823-826, 2006.

Anfosso F, *et al.*, Activation of human endothelial cells via S-Endo-1 antigen (CD146) stimulates the tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase p125<sup>FAK</sup>, *J Biol Chem* 273(41):26852-26856, 1998.

Alva JA and Iruela-Arispe ML, Notch signaling in vascular morphogenesis, *Curr Opin Hematol* 11:278-283, 2004.

Artavanis-Tsakonas S, *et al.*, Notch signaling, *Science* 268:225-232, 1995.

Artavanis-Tsakonas S, Notch signaling: cell fate control and signal integration in development, *Science* 284:770-776, 1999.

Asahara T, *et al.*, Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis, *Science* 275:964-967, 1997.

Asahara T, *et al.*, VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells, *EMBO J* 18(14):3964-3972, 1999a.

Asahara T, *et al.*, Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization, *Circulation Res* 85:221-228, 1999b.

Asahara T and Kawamoto A, Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis, *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C572-C579, 2004.

Assmus B, *et al.*, Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI), *Circulation* 106:3009-3017, 2002.

Assmus B, Urbich C, *et al.*, HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes, *Circulation Res* 92:1049-1055, 2003.

Ausubel FM, *et al.*, Current protocols in molecular biology, *John Wiley & Sons, New York*, 1987.

Bevilacqua MP, *et al.*, Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule, *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:9238, 1987.

Benihoud K, Yeh P and Perricaudet M, Adenovirus Vectors for gene delivery, *Curr Opin Biotechnol* 10(5):440-447, 1999.

- Bigas A, *et al.*, Notch1 and Notch2 inhibit myeloid differentiation in response to different cytokines, *Mol Cell Biol* 18(4):2324-2333, 1998.
- Blaumueller CM, *et al.*, Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasmamembrane, *Cell* 90:281-291, 1997.
- Bleul CC, *et al.*, The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry, *Nature* 382(6594):829-33, 1996a.
- Bleul CC, *et al.*, A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), *J Exp Med* 184:1101-1109, 1996b.
- Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding, *Anal. Biochem* 72:248-254, 1976.
- Brennan K and Gardner P, Notching up another pathway, *BioEssays* 24:405-410, 2002.
- Breviario F, *et al.*, Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/Cadherin-5), an endothelium-specific cadherin; *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15(8):1229-1239, 1995.
- Brou C, *et al.*, A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: The role of the disintegrin-metalloprotease TACE, *Mol Cell* 5:207-216, 2000.
- Byersdorfer CA and Chaplin DD, Visualization of early APC/T cell interactions in the mouse lung following intranasal challenge, *J Immunol* 167(12):6756-64, 2001.
- Campbell NA: Biologie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 1997.
- Carlos TM, Harlan JM, Leukocyte-endothelial adhesion molecules, *Blood* 84:2068-2101, 1994.
- Carmeliet P, *et al.*, Impaired arterial neointima formation in mice with disruption of the plasminogen gene, *J Clin Invest* 99(2):200-208, 1997a.
- Carmeliet P, *et al.*, Vascular wound healing and neointima formation induced by perivascular electric injury in mice, *Am J Pathol* 150(2):761-776, 1997b
- Carmeliet P, Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis, *Nature* 6(3):389-395, 2000.
- Carmeliet P, Angiogenesis in health and disease, *Nature Med* 9(6):65-660, 2003a.
- Carmeliet P, Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases, *Nature* 4:710-720, 2003b.
- Ceradini DJ, *et al.*, Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1, *Nature Med* 10(8):858-864, 2004.
- Chavakis T, *et al.*, Role of  $\beta$ -integrins for homing and neovascularisation capacity of endothelial progenitor cells, *J Exp Med* 201(1):63-72, 2005.
- Chen JZ, *et al.*, Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia, *Clin Sci (Lond)* 107:273-280, 2004.
- Chiba, S, Concise Review: Notch signaling in Stem cell systems, *Stem Cells* 24:2437-2447, 2006.
- Cho HJ, *et al.*, Regulation of endothelial cell and endothelial progenitor cell survival and vasculogenesis by Integrin-linked Kinase, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1154-1160, 2005.
- Choi JH, *et al.*, Augmentation of therapeutic angiogenesis using genetically modified human endothelial progenitor cells with altered glycogen synthase kinase-3 $\beta$  activity, *J Biol Chem* 279(47):49430-49438, 2004.
- Cines DB, *et al.*, Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders, *Blood* 91(10):3527-3567, 1998.
- Cleaver O and Melton DA, Endothelial signaling during development, *Nature Med* 9(6):661-

668, 2003.

Coffman C, *et al.*, Xotch, the *Xenopus* homolog of *Drosophila notch*, *Science* 249:1438-1441, 1990.

Conlon RA, *et al.*, Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites, *Development* 121:1533-1545, 1995.

Cordier AC and Haumont SM, Development of thymus, parathyroids, and ultimobranchial bodies in NMRI und nude mice, *Am J Anat*, 157(3):227-263, 1980.

Das I, *et al.*, Notch oncoproteins depend on  $\gamma$ -secretase/presenilin activity for processing and function, *J Biol Chem* 279(29):30771-30780, 2004.

de la Pompa JL, *et al.*, Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis, *Development* 124:1139-1148, 1997.

Dimmeler S, *et al.*, HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway, *J Clin Invest* 108(3):391-397, 2001.

Domenga V, *et al.*, Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells, *Genes Dev* 18:2730-2735, 2004.

Dovey HF, *et al.*, Functional  $\gamma$ -secretase inhibitors reduce  $\beta$ -amyloid peptide levels in brain, *J Neurochem* 76:173-181, 2001.

Drake CJ, Embryonic and adult vasculogenesis, *Birth Defects Research (Part C)* 69:73-82, 2003.

Du XL, *et al.*, Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site, *J Clin Invest* 108:1341-1348, 2001.

Duarte A, *et al.*, Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development, *Genes Dev* 18:2474-2478, 2004.

Dzierzak E, Ontogenic emergence of definitive hematopoietic stem cells, *Curr Opin Hematol* 10:229-234, 2003.

Ellisen LW, *et al.*, TAN-1, the human homolog of the *Drosophila notch* gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms, *Cell* 66:649-661, 1991.

Eriksson U und Alitalo K, VEGF receptor 1 stimulates stem-cell recruitment and new hope for angiogenesis therapies, *Nature Med* 8:775-777, 2002.

Fehon RG, *et al.*, Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*, *Cell* 61:523-534, 1990.

Ferrara N, *et al.*, Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene, *Nature* 380:439-442, 1996.

Ferrero E, *et al.*, The metamorphosis of a molecule: from soluble enzyme to the leukocyte receptor CD38, *J Leukoc Biol* 65:151, 1999.

Fischer A, *et al.*, The Notch target genes *Hey1* and *Hey2* are required for embryonic vascular development, *Genes Dev* 18:901-911, 2004.

Folkman J, *et al.*, Long-term culture of capillary endothelial cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 76(10):5217-5221, 1979.

Folkman J, Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease, *Nat Med* 1:27-31, 1995.

Fortini ME, Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling, *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:673-684, 2002.

Fre S, *et al.*, Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine, *Nature* 435:964-968, 2005.

- Fujiyama S, *et al.*, Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells, *Circ Res* 93:980-989, 2003.
- Gaiano N, Fishell G, The role of notch promoting glial and neural stem cell fates, *Annu Rev Neurosci* 25:471-490, 2002.
- Gale NW, *et al.*, Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development, *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15949-15954, 2004.
- Gassen HG und Schrimpf G (Hrsg), Gentechnische Methoden, 2. Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin*, 1999.
- Gavrieli Y, *et al.*, Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation, *J Cell Biol* 119(3):493-501, 1992.
- Gehling UM, *et al.*, In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells, *Blood* 95(10):3106-3112, 2000.
- Geling A, *et al.*, A  $\gamma$ -secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish, *EMBO reports* 3(7):688-694, 2002.
- Gill M, *et al.*, Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)/AC133(+) endothelial precursor cells, *Circulation Res* 88:167-174, 2001.
- Gordon PB, *et al.*, Long-term culture of human endothelial cells, *In Vitro* 19:661-671, 1983.
- Goidin D, *et al.*, Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations, *Anal Biochem* 295(1):17-21, 2001.
- Graham FL, *et al.*, Characteristics of a human cell line transformed by DNA from adenovirus type 5, *J Gen Virol* 36(1):59-74, 1977.
- Grant MB, *et al.*, Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization, *Nature Med* 8(6):607-612, 2002.
- Greenwald I, Rubin GM, Making a difference: The role of cell-cell interactions in establishing separate identities for equivalent cells, *Cell* 68:271-281, 1992.
- Gulati R, *et al.*, Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood, *Circulation Res* 93:1023-1025, 2003.
- Hadland BK, *et al.*, A requirement for Notch1 distinguishes 2 phases of definitive hematopoiesis during development, *Blood* 104:3097-3105, 2004.
- Hamada Y, *et al.*, Mutation in ankyrin repeats of the mouse Notch2 gene induces early embryonic lethality, *Development* 126:3415-3424, 1999.
- Han H, *et al.*, Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision, *Int Immunol* 14:637-645, 2002.
- Han W, *et al.*, A soluble form of human Delta-like-1 inhibits differentiation of hematopoietic progenitor cells, *Blood* 95:1616-1625, 2000.
- Handgretinger R, *et al.*, Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells, *Ann N Y Acad Sci* 996:141-151, 2003.
- Hasserjian RP, *et al.*, Modulated expression of notch1 during thymocyte development, *Blood* 88:970-976, 1996.
- Hatse S, *et al.*, Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly restricted to CXCR4, *FEBS Lett* 527:255-262, 2002.

- Hattori K, *et al.*, Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment, *Nature Med* 8:841-849, 2002.
- He TC, *et al.*, A simplified system for generating recombinant adenoviruses, *Proc Natl Acad Sci USA* 95(5):2509-2514, 1998.
- Heeschen C, *et al.*, Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease, *Circulation* 109:1615-1622, 2004.
- Heitzer T, *et al.*, Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease, *Circulation* 104:2673-2678, 2001.
- Hicks C, *et al.*, A secreted Delta1-Fc fusion protein functions both as an activator and inhibitor of Notch1 signaling, *J Neurosci Res* 68:655-667, 2002.
- Hill JM, *et al.*, Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, cardiovascular risk, *N Engl J Med* 348(7):593-600, 2003.
- Hoflinger S, *et al.*, Analysis of Notch1 function by in vitro T cell differentiation of Pax5 mutant lymphoid progenitors, *J Immunol.* 173(6):3935-3944, 2004.
- Hrabe de Angelis M, *et al.*, Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1, *Nature* 386:717-721, 1997.
- Hristov M, *et al.*, Endothelial Progenitor Cells: Mobilization, Differentiation, and Homing, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1185-1189, 2003.
- Hur J, *et al.*, Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularogenesis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:288-293, 2004.
- Hwang JH, *et al.*, Overexpression of stromal cell-derived factor-1 enhances endothelium-supported transmigration, maintenance, and proliferation of hematopoietic progenitor cells, *Stem Cells Dev* 15(2):260-268, 2006.
- Ikuta K, Weissman IL, Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation, *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1502, 1992.
- Ingram DA, *et al.*, Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood, *Blood* 104(9):2752-2760, 2004.
- Ishibashi M, Molecular mechanisms for morphogenesis of the central nervous system in mammals, *Anat Sci Int* 79:226-234, 2004.
- Ishikawa M, Asahara T, Endothelial Progenitor Cell Culture for Vascular Regeneration, *Stem Cells and Development*, 13(4):344-349, 2004.
- Isner JM, Asahara T, Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization, *J Clin Invest* 103:1231-1236, 1999.
- Iso T, *et al.*, HERP1 is a cell type-specific primary target of notch, *J Biol Chem* 277(8):6598-6607, 2002.
- Iso T, *et al.*, Notch signaling in vascular development, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:543-553, 2003a.
- Iso T, *et al.*, HES and HERP families: Multiple effectors of the Notch signaling pathway, *J Cell Physiol* 194:237-255, 2003b.
- Iwaguro H, *et al.*, Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration, *Circulation* 105:732-738, 2002.
- Iwami J, Masuda H and Asahara T, Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future, *J Cell Mol Med* 8(4):488-497, 2004.
- Jaffe EA, *et al.*, Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification

- by morphology and immunological criteria, *J Clin Invest* 52:2745-2756, 1973.
- Jiang R, *et al.*, Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice, *Genes Dev* 12:1046-1057, 1998.
- Jin DK, *et al.*, Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4<sup>+</sup> hemangiocytes, *Nature Med* 12(5):557-567, 2006.
- Joutel A, Tournier-Lasserre E, Notch signalling pathway and human diseases, *Semin Cell Dev Biol* 9(6):619-625, 1998.
- Kageyama R, *et al.*, Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation, *Exp Cell Res* 306:343-348, 2005
- Kalka C, *et al.*, Transplantation of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization, *Proc Natl Acad Sci USA* 97(7):3422-3427, 2000a.
- Kalka C, *et al.*, Vascular endothelial growth factor (165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects, *Circ Res* 86:1198-1202, 2000b.
- Kato H, *et al.*, Involvement of RBP-J in biological functions of mouse Notch1 and its derivatives, *Development* 124:4133-4141, 1997.
- Kawabata K, *et al.*, Adenovirus vector-mediated gene transfer into stem cells, *Mol Pharm* 3(2):95-103, 2006.
- Kawamoto A, *et al.*, Therapeutic potential of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia, *Circulation* 103:634-637, 2001.
- Kitagawa M, *et al.*, A human protein with sequence similarity to Drosophila mastermind coordinates the nuclear form of notch and a CSL protein to build a transcriptional activator complex on target promoters, *Mol Cell Biol* 21:4337-4346, 2001.
- Knipper R, Molekulare Genetik, 8. Auflage, *Georg Thieme Verlag Stuttgart New York*, 2001.
- Kocher AA, *et al.*, Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function, *Nature Med* 7:430-436, 2001.
- Kollet O, *et al.*, Rapid and efficient homing of human CD34(+)/CD38(-/low)/CXCR4(+) stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice, *Blood* 97:3283-3291, 2001.
- Kondo T, *et al.*, Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1442-1447, 2004.
- Krankel N, *et al.*, Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:698-703, 2005.
- Krebs LT, *et al.*, Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice, *Genes Dev* 14:1343-1352, 2000.
- Krebs LT, *et al.*, Characterization of Notch3-deficient mice: Normal embryonic development and absence of genetic interactions with Notch1 mutation, *Genesis* 37:139-143, 2003.
- Krebs LT, *et al.*, Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants, *Genes Dev* 18:2469-2473, 2004.
- Kumano K, *et al.*, Notch1 inhibits differentiation of hematopoietic cells by sustaining GATA-2 expression, *Blood* 98:3283-3289, 2001.
- Kumano K, *et al.*, Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells, *Immunity* 18:699-711, 2003.
- Kumar A and Lindner V, Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2238-2244, 1997.

- Labat Moleur F, *et al.*, TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation und improvement, *J Histochem Cytochem* 46:327-334, 1998.
- Lämmlli UK, Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227:680-685, 1970.
- Lai EC, *et al.*, Keeping a good pathway down: Transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins, *EMBO Rep* 3:840-845, 2002.
- Lapidot T, Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions, *Ann N Y Acad Sci* 938:83-95, 2002.
- Laufs U, *et al.*, Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis, *Circulation* 109:220-226, 2004.
- Laufs U, *et al.*, Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:809-814, 2005.
- Lawson ND and Weinstein BM, Arteries and veins: making a difference with zebrafish, *Nature* 3:674-682, 2002.
- Lee SH, *et al.*, Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction, *N Engl J Med* 342:626-633, 2000.
- Lefort K, Dotto GP, Notch signaling in the integrated control of keratinocyte growth/differentiation and tumor suppression, *Semin Cancer Biol* 14(5):374-386, 2004.
- Llevadot J, *et al.*, HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells, *J Clin Invest* 108:399-405, 2001.
- Lévesque JP, *et al.*, Disruption of the CXCR4/CSCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide, *J Clin Invest* 110:187-196, 2003.
- Liehn EA, *et al.*, Blockade of keratinocyte-derived chemokine inhibits endothelial recovery and enhances plaque formation after arterial injury in ApoE-deficient mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1891-1896, 2004.
- Li K, *et al.*, Quantification of proteins in the subnanogram and nanogram range: comparison of the aurodyne, ferridye and india ink staining methods, *Anal Biochem* 182:44-47, 1989.
- Li L, *et al.*, The human homolog of rat Jagged1 expressed by marrow stroma inhibits differentiation of 32D cells through interaction with Notch1, *Immunity*;8:43-55, 1998.
- Liles WC, *et al.*, Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist, *Blood* 102:2728-2730, 2003.
- Limbourg A, *et al.*, Notch Ligand delta-like 1 is essential for postnatal arteriogenesis, *Circ Res* 100:363-371, 2007.
- Limbourg FP, *et al.*, Essential role of endothelial Notch1 in Angiogenesis, *Circulation* 111:1826-1832, 2005.
- Lin F, *et al.*, Eosin Y staining of proteins in polyacrylamide gels, *Anal Biochem* 196:279-283, 1991.
- Lin Y, *et al.*, Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood, *J Clin Invest* 105(1):71-77, 2000.
- Lindner V, Fingerle J and Reidy MA, Mouse model of arterial injury, *Circulation Res*, 73:792-796, 1993.
- Lindl T, Zell- und Gewebe-Kultur, 5. Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin*, 2002.
- Liu ZJ, *et al.*, Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial

- endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis, *Mol Cell Biol* 23:14-25, 2003.
- Logeat F, *et al.*, The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase, *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8108-8112, 1998.
- Loomans CJ, *et al.*, Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes, *Diabetes* 53:195-199, 2004.
- Lopez-Farre A, *et al.*, Role of nitric oxide in autocrine control of growth and apoptosis of endothelial cells, *Am J Physiol* 272:H760-H768, 1997.
- Lottspeich F und Zorbas H (Hrsg.), Bioanalytik, *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin*, 1998.
- Lowell S, *et al.*, Stimulation of human epidermal differentiation by delta-notch signalling at the boundaries of stem-cell clusters, *Curr Biol* 10(9):491-500, 2000.
- Luttun A, *et al.*, Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1, *Nature Med* 8(8):831-840, 2002.
- Maillard I, *et al.*, Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway, *Annu Rev Immunol* 23:945-974, 2005.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J: Molecular cloning: A laboratory manual, *Cold spring Harbor Laboratory*, 1982.
- Masuda H and Asahara T, Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration, *Cardiovasc Res* 58(2):390-398, 2003.
- Matsuda R, *et al.*, Visualization of dystrophic muscle fibers in Mdx mouse by vital staining with Evans Blue: Evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle, *J Biochem* 118:959-964, 1995.
- Matthys P, *et al.*, AMD3100, a potent and specific antagonist of the stromal cell-derived factor-1 chemokine receptor CXCR4, inhibits autoimmune joint inflammation in IFN- $\gamma$  receptor-deficient mice, *J Immunol* 167:4686-4692, 2001.
- Meyer GP, *et al.*, 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* 113:1287-1294, 2006.
- Milano J, *et al.*, Modulation of Notch processing by  $\gamma$ -secretase inhibitors causes intestinal goblet cell metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation, *Toxicol Sci* 82:341-358, 2004.
- Millauer B, *et al.*, High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis, *Cell* 72:835-846, 1993.
- Milner LA, *et al.*, A human homologue of the Drosophila developmental gene, Notch, is expressed in CD34<sup>+</sup> hematopoietic precursors, *Blood* 83(8):2057-2062, 1994.
- Milner LA, *et al.*, Inhibition of granulocytic differentiation by mNotch1, *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13014-13019, 1996.
- Milner LA und Bigas A, Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation, *Blood* 93(8):2431-2448, 1999.
- Mohr OL, Character changes caused by mutation of an entire region of a chromosome in Drosophila, *Genetics* 4:275-282, 1919.
- Montagnani M, *et al.*, Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca<sup>2+</sup> but requires phosphorylation by Akt at Ser1179, *J Biol Chem* 276:30392-30398, 2001.
- Mühlhardt C, Molekularbiologie/ Genomics, *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin*, 2002.

- Muller WA, Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response, *Lab Invest* 82:521-533, 2002.
- Murasawa S, *et al.*, Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells, *Circulation* 106:1133-1139, 2002.
- Murdoch C, CXCR4: chemokine receptor extraordinaire, *Immunol Rev* 177:175-184, 2000.
- Murohara T, *et al.*, Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization, *J Clin Invest* 105:1527-1536, 2000.
- Murtaugh LC, *et al.*, Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation, *Proc Natl Acad Sci USA* 100(25):14920-14925, 2003.
- Mutin M, *et al.*, Immunologic phenotype of cultured endothelial cells: quantitative analysis of cell surface molecules, *Tissue Antigens* 50(5):449-458, 1997.
- Mutin M, *et al.*, Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells, *Blood* 105:71-77, 1999.
- Nachman RL and Jaffe EA, Endothelial cell culture: Beginnings of modern vascular biology, *J Clin Invest*, 114(8):1037-1040, 2004.
- Nagasawa T, Role of chemokine SDF-1/PBSF and its receptor CXCR4 in blood vessel development, *Ann N Y Acad Sci* 947:112-115, discussion 115-116, 2001.
- Negoescu A, *et al.*, *In situ* apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell populations, *J Histochem Cytochem* 44(9):959-968, 1996.
- Newman PJ, The biology of PECAM-1, *J Clin Invest* 99:3-8, 1997.
- Nicolas M, *et al.*, Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin, *Nat Genet* 33(3):416-421, 2003.
- Oellers N, *et al.*, bHLH proteins encoded by the Enhancer of split complex of *Drosophila* negatively interfere with transcriptional activation mediated by proneural genes, *Mol Gen Genet* 244(5):465-473, 1994.
- Ogata K, *et al.*, Detection of toxoplasma membrane antigens transferred from SDS-polyacrylamide gel to nitrocellulose with monoclonal antibody and avidin-biotin, peroxidase anti-peroxidase and immunoperoxidase methods, *J Immunol Methods* 65:75-82, 1983.
- Okada S, *et al.*, Enrichment and characterization of murine hematopoietic stem cells that express c-kit molecule, *Blood* 78(7):1706-1712, 1991.
- Okada S, *et al.*, In vivo and In vitro stem cell function of c-kit- and sca-1-positive murine hematopoietic cells, *Blood* 80(12):3044-3050, 1992.
- Okochi M, *et al.*, Presenillins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1, *EMBO J* 21:5408-5416, 2002.
- Orlic D, *et al.*, Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium, *Nature* 410:701-705, 2001a.
- Orlic D, *et al.*, Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival, *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10344-10349, 2001b.
- Papayannopoulou T, Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization, *Blood* 103:1580-1585, 2004.
- Pear WS, *et al.*, Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles, *J Exp Med* 183(5):2283-2291, 1996.
- Peichev M, *et al.*, Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors, *Blood* 95:952-958, 2000.
- Peled A, *et al.*, The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on

- vascular endothelium under shear flow, *J Clin Invest* 104:1199-1211, 1999.
- Pillarisetti K, Gupta SK, Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1): SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction, *Inflammation* 25:293-300, 2001.
- Plate KH, *et al.*, Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis, *Cancer Res* 53:5822-5827, 1993.
- Poulson DF, The effects of certain X-chromosome deficiencies on the embryonic development in *Drosophila melanogaster*, *J Exp Zool* 83:271-325, 1940.
- Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 258. Auflage, *Walter de Gruyter Berlin New York*, 1998.
- Pui JC, *et al.*, Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination, *Immunity* 11:299-308, 1999.
- Quinn TP, *et al.*, Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium, *Proc Nat Acad Sci* 90:7533-7537, 1993.
- Radtke F, *et al.*, Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1, *Immunity* 10:547-558, 1999.
- Radtke F, *et al.*, Notch regulation of lymphocyte development and function, *Nat Immunol* 5(3):247-253, 2004.
- Rafii S, *et al.*, Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration, *Nature Med* 9:702-712, 2003.
- Rangarajan A, *et al.*, Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation, *EMBO J* 20(13):3427-3436, 2001.
- Read S and Northcote D, Minimization of variation in the response to different proteins of the coomassie blue G dye-binding assay for protein, *Anal. Biochem* 116:53-64, 1981.
- Rehm H, Der Experimentator: Proteinchemie/Proteomics, *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin*, 2002.
- Rehman J, *et al.*, Peripheral blood „endothelial progenitor cells“ are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors, *Circulation* 107:1164-1169, 2003.
- Reyes M, *et al.*, Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow, *J Clin Invest* 109:337-346, 2002.
- Ridker PM, High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease, *Circulation* 103:1813-1818, 2001.
- Risau W, *et al.*, Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies, *Development* 102:471-478, 1988.
- Risau W, Mechanisms of angiogenesis, *Nature* 386:671-674, 1997.
- Robert-Moreno A, *et al.*, RBPjk-dependent Notch function regulates *Gata2* and is essential for the formation of intra-embryonic hematopoietic cells, *Development* 12(5):1117-1126, 2004.
- Roberts N, *et al.*, Progenitor cells in vascular disease, *J Cell Mol Med* 9:583-591, 2005.
- Rookmaaker MB, *et al.*, Bone marrow-derived cells contribute to endothelial repair after thrombotic microangiopathy, *Blood* 99(3):1095, 2002.
- Rookmaaker MB, *et al.*, Endothelial progenitor cells: Mainly derived from monocyte/macrophage-containing CD34<sup>-</sup> mononuclear cell population and only in part from the hematopoietic stem cell-containing CD34<sup>+</sup> mononuclear cell population, *Circulation* 108:e150, 2003.
- Rookmaaker MB, *et al.*, CD34<sup>+</sup> cells home, proliferate, and participate in capillary formation,

- and in combination with CD34<sup>+</sup> cells enhance tube formation in a 3-dimensional matrix, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1843-1850, 2005.
- Rosenkilde MM, *et al.*, Molecular mechanism of AMD3100 antagonism in the CXCR4 receptor, *J Biol Chem* 279(4):3033-3041, 2004.
- Rössig L, *et al.*, Histone deacetylase activity is essential for the expression of *HoxA9* and for endothelial commitment of progenitor cells, *J Exp Med* 201(11):1825-1835, 2005
- Ruggeri ZM, Von Willebrand factor, *Curr Opin Hematol* 10(2):142-149, 2003.
- Rumpold H, *et al.*, Endothelial progenitor cells: source for therapeutic vasculogenesis, *J Cell Mol Med* 8:509-518, 2004.
- Saiki RK, *et al.*, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science* 239(4839):487-491, 1988.
- Salomon D, *et al.*, Extrajunctional distribution of N-cadherin in cultured human endothelial cells, *J Cell Sci* 102(1):7-17, 1992.
- Sandri M, *et al.*, Effects of exercise and ischemia on mobilization and functional activation of blood-derived progenitor cells in patients with ischemic syndromes: results of 3 randomized studies, *Circulation* 111:3391-3399, 2005.
- Sastre M, *et al.*, Presenilin-dependent  $\gamma$ -secretase processing of  $\beta$ -amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch, *EMBO reports* 2(9):835-841, 2001.
- Sata M, *et al.*, Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis, *Nature Med* 8(4):403-409, 2002.
- Schachinger V, *et al.*, Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease, *Circulation* 101:1899-1906, 2000.
- Schmeisser A, *et al.*, Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions, *Cardiovasc Res* 49:671-680, 2001.
- Schmidt RF, Thews G, Lang F: Physiologie des Menschen. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York*, 28. Auflage, 2000.
- Schmidt-Lucke C, *et al.*, Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: Proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair, *Circulation* 111:2981-2987, 2005.
- Schroeter EH, *et al.*, Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain, *Nature* 393:382-386, 1998.
- Schuster MD, *et al.*, Myocardial neovascularization by bone marrow angioblasts results in cardiomyocyte regeneration, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H525-H532, 2004.
- Seeger FH, *et al.*, p38 Mitogen-activated protein kinase downregulates endothelial progenitor cells, *Circulation* 111:1184-1191, 2005.
- Selvey S, *et al.*, Beta-actin--an unsuitable internal control for RT-PCR, *Mol Cell Probes*, 15(5):307-311, 2001.
- Shalaby F, *et al.*, Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice, *Nature* 376:62-66, 1995.
- Shen Q, *et al.*, Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells, *Science* 304(5675):1338-1340, 2004.
- Shawber CJ and Kitajewski J, Notch function in the vasculature: insights from zebrafish, mouse and man, *BioEssay* 26:225-234, 2004.
- Shi Q, *et al.*, Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells, *Blood* 92:392-367,

1998.

Shutter JR, *et al.*, Dll4, a novel Notch Ligand expressed in arterial endothelium, *Genes Dev* 14, 1313–1318, 2000.

Soligo D, *et al.*, Expression of integrins in human bone marrow, *Br J Haematol* 76:323-332, 1990.

Springer TA, Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm, *Cell* 76:301-314, 1994.

Sternberg PW, Lateral inhibition during vulval induction in *Caenorhabditis elegans*, *Nature* 335:551-554, 1988.

Stier S, *et al.*, Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome, *Blood* 99(7):2369-2378, 2002.

Strehlow K, *et al.*, Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation, *Circulation* 107:3059-3065, 2003.

Swiatek PJ, *et al.*, Notch1 is essential for postimplantation development in mice, *Genes Dev* 8:707-719, 1994.

Takahashi T, *et al.*, Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization, *Nature* 5(4):434-438, 1999.

Tateishi-Yuyama E, *et al.*, Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and randomised controlled trial, *Lancet* 360:427-435, 2006.

Tepper OM, *et al.*, Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures, *Circulation* 106:2781-2786, 2002.

Torres-Vazquez J, *et al.*, Molecular distinction between arteries and veins, *Cell Tissue Res* 314:43-59, 2003.

Towbin H, *et al.*, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354, 1979.

Urbich C, *et al.*, Shear stress-induced endothelial cell migration involves integrin signaling via the fibronectin receptor subunits alpha(5) and beta(1), *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:69-75, 2002.

Urbich C, *et al.*, Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells, *Circulation* 108:2511-2516, 2003.

Urbich C and Dimmeler S, Endothelial progenitor cells: Characterization and role in vascular biology, *Circulation Res* 95:343-353, 2004.

Urbich C, *et al.*, Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization, *Nature Med* 11(2):206-213, 2005.

Uyttendaele H, *et al.*, Vascular patterning defects associated with expression of activated Notch4 in embryonic endothelium, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(10):5643-5648, 2001.

Vajkoczy P, *et al.*, Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis, *J Exp Med* 197:1755-1765, 2003.

van Es JH, *et al.*, Notch/ $\gamma$ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells, *Nature* 435:959-963, 2005.

Varnum-Finney B, *et al.*, The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells, *Blood* 91:4084-4091, 1998.

Varnum-Finney B, *et al.*, Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are

- immortalized by constitutive Notch1 signaling, *Nature Med* 6(11):1278-1281, 2000.
- Vasa M, *et al.*, Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease, *Circulation* 103:2885-2890, 2001a.
- Vasa M, *et al.*, Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease, *Circulation Res* 89:E1-7, 2001b.
- Verma S, *et al.*, C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function, *Circulation* 109:r91-r100, 2004.
- Vermes I, *et al.*, A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V, *J Immunol Methods* 184(1):39-51, 1995.
- Villa N, *et al.*, Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels, *Mech Dev* 108, 161–164, 2001.
- Voyta JC, *et al.*, Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein, *J Cell Biology* 99(6):2034-2040, 1984.
- Walker L, *et al.*, The Notch/Jagged pathway inhibits proliferation of human hematopoietic progenitors in vitro, *Stem Cells* 17:162-171, 1999.
- Walter DH, *et al.*, Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells, *Circulation* 105:3017-3024, 2002.
- Walter DH, *et al.*, Impaired CXCR4 signaling contributes to the reduced neovascularization capacity of endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease, *Circulation Res* 97:1142-1151, 2005.
- Washburn T, *et al.*, Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision, *Cell* 88:833-843, 1997.
- Weissman IL, Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution, *Cell* 100:157-168, 2000.
- Werner N, *et al.*, Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointima formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibition, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1567-1572, 2002.
- Werner N, *et al.*, Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury, *Circulation Res* 93:17-24, 2003.
- Werner N, *et al.*, Clinical and therapeutical implications of EPC biology in atherosclerosis, *J Cell Mol Med* 10(2):318-332, 2006.
- Wharton KA, *et al.*, Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats, *Cell* 43:567-581, 1985.
- Williams DE, *et al.*, Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene, *Cell* 63(1):167-174, 1990.
- Wilson A and Radtke F, Multiple functions of Notch signaling in self-renewing organs and cancer, *FEBS Letters* 580:2860-2868, 2006.
- Wollert KC, *et al.*, Intracoronary autologous bone marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial, *Lancet* 364:141-148, 2004.
- Wortis HH, *et al.*, Abnormal development of the thymus in „nude“ mice, *J Exp Med* 134(3 Pt 1):681-692, 1971.
- Wright DE, *et al.*, Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines, *J Exp Med* 195:1145-1154, 2002.

- Wu L, *et al.*, MAML1, a human homologue of *Drosophila* mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors, *Nature Genet* 26:484-489, 2000.
- Xue Y, *et al.*, Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1, *Hum Mol Genet* 8:723-730, 1999.
- Yamaguchi JI, *et al.*, Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization, *Circulation* 107:1322-1328, 2003.
- Yamamoto K, *et al.*, Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress, *J Appl Physiol* 95:2081-2088, 2003.
- Yamamoto K, *et al.*, Molecular evaluation of endothelial progenitor cells in patients with ischemic limbs, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:e192-e196, 2004.
- Yin AH, *et al.*, AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells, *Blood* 90(12):5002-5012, 1997.
- You LR, *et al.*, Suppression of Notch signalling by the COUP-TFII transcriptions factor regulates vein identity, *Nature* 435:98-104, 2005.
- Zhao Y, *et al.*, A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 100(5):2426-2431, 2003.
- Zou YR, *et al.*, Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development, *Nature* 393:595-599, 1998.

## 6.2. Internetquellen

American Heart Association	<a href="http://www.americanheart.org/">http://www.americanheart.org/</a>
The Anatomy of the Laboratory Mouse Margaret J. Cook	<a href="http://www.informatics.jax.org/cookbook/subjectindex.shtml">http://www.informatics.jax.org/cookbook/subjectindex.shtml</a>
Genome Bioinformatics, University of California (UCSC)	<a href="http://genome.ucsc.edu">http://genome.ucsc.edu</a>
Human Gene Mutation Database (HGMD)	<a href="http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php">http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php</a>
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	<a href="http://www.genome.jp/kegg/">http://www.genome.jp/kegg/</a>
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM</a>
Statistisches Bundesamt, Deutschland	<a href="http://www.destatis.de/">http://www.destatis.de/</a>
World Health Organization	<a href="http://www.who.int/en/">http://www.who.int/en/</a>

## 7. Anhang

### 7.1. Glossar

Angioblast	undifferenzierte Vorläuferzelle des kardiovaskulären Systems, kann Endothelzellen bilden
CAD	kardiovaskuläre Erkrankung ( <i>coronary artery disease</i> )
Chemokine	Chemokine sind chemotaktische Cytokine, welche Leukozyten aktivieren und deren Migration lenken; sie werden in zwei Unterfamilien eingeteilt, die CXC- und CC-Chemokine (Bleul, 1996)
CMV-Promotor	starker Promotor des Cytomegalievirus
CVD	kardiovaskuläre Erkrankung ( <i>cardiovascular disease</i> )
Cytokine	Proteine und Peptide zur Zell-Zellkommunikation, können von verschiedenen Zellen produziert werden und vermitteln Effekte bei nahegelegenen Zellen, aber auch im ganzen Organismus
<i>de novo</i>	erneut, wieder, von neuem
E	Tag der embryonalen Entwicklung ( <i>embryonic day</i> )
EBM	Endotheliales Basalmedium ( <i>endothelial basal medium</i> )
EBM-2	Endotheliales Basalmedium-2 ( <i>endothelial basal medium-2</i> )
ECs	Endothelzellen ( <i>endothelial cells</i> )
EGM	Endotheliales Wachstumsmedium ( <i>endothelial growth medium</i> )
EGM-2	Endotheliales Wachstumsmedium-2 ( <i>endothelial growth medium-2</i> )
Entoderm	eines der drei Keimblätter im Embryo, bildet u.a. Leber, Thymus, Epithel und Drüsen des Mitteldarmes
Ektoderm	eines der drei Keimblätter im Embryo, bildet u.a. Haut, Nervengewebe, Sinneszellen
EPCs	endotheliale Progenitorzellen ( <i>endothelial progenitor cells</i> )
<i>en face</i>	von oben, Aufsicht
<i>gain-of-function</i>	Experiment, das die Funktion eines Rezeptors durch Anschalten/Überexpression des Genes/Proteins analysiert
Glatte Gefäßmuskulzelle	Muskulzellen, sind Teil der Tunica media in Blutgefäßen, ( <i>smooth muscle cells, SMC</i> )
Hämangioblast	gemeinsame Vorläuferzelle der hämatopoetischen und endothelialen Zellen
HMG-CoA Reduktase Inhibitoren	Hydroxymethylglutaryl Coenzyme A Reduktase Inhibitoren, auch als Statine bezeichnet
<i>homen, Homing</i>	beschreibt die Wanderung und Adhäsion von Zellen, z.B. des lymphatischen Systems, an eine verletzte oder entzündete Stelle des Organismus
HPCs	hämatopoetische Progenitorzellen ( <i>hematopoietic progenitor cells</i> )
HSCs	hämatopoetische Stammzellen ( <i>hematopoietic stem cells</i> )
<i>in situ</i>	am ursprünglichen Ort

<i>in vitro</i>	in einer künstlichen Umgebung, im Gefäß
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
KDR	alternative Bezeichnung für den VEGFR-2 ( <i>kinase insert domain receptor</i> ), in Maus Flk1 ( <i>fetal liver kinase-1</i> ) oder Flt
Knöchel-Arm-Index	Blutdruckverhältnis zwischen Armen und Beinen, Indikator für Durchblutungsstörungen
LDL	Lipoprotein das als Transportmittel für lipophile Substanzen, z.B. Cholesterin, im Blut agiert ( <i>low density lipoprotein</i> )
<i>loss-of-function</i>	Experiment, das die Funktion eines Rezeptors durch Ausschalten/Inaktivierung des Genes/Proteins analysiert
Mesoderm	eines der drei Keimblätter im Embryo, bildet u.a. Muskulatur, Blut/Blutgefäßen, Binde- und Stützgewebe
Mitogen	die Zellteilung anregendes, regulierendes Protein
MMLV-RTase	Reverse Transkriptase des Moloney-Maus-Leukämie-Virus
MNCs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes ( <i>mononuclear cells</i> )
<i>multiple cloning site</i>	Polylinker; Sequenz in einen Vektor zur einfachen Klonierung, die Erkennungssequenzen von verschiedenen, im Vektor nur einmal schneidenden Restriktionsendonukleasen enthält
Myeloide Zellen	aus dem Knochenmark stammende Vorläuferzellen der im peripheren Blut vorkommenden, nicht lymphatischen Zellen (Granulozyten, Dendritische Vorläuferzellen, Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten)
Null-Maus	auch <i>Knock-Out</i> (K.O.)-Maus, eine Maus bei der beide Allele eines Genes zerstört wurden, z.B. Notch1-Null-Maus
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> ), Methode zur Vervielfältigung begrenzter DNA-Fragmente
Perizyten	mesenchymal-ähnliche Zellen, welche das Endothel der Blutgefäße zusammen mit den glatten Gefäßmuskelzellen umgeben ( <i>mural cells</i> ), relativ undifferenzierte Zellen, Regulation des EC-Wachstums und der
perinatal	Zeitraum kurz um die Geburt
PIPES	Piperazinbisethansulfonsäure
<i>Primer</i>	synthetisch hergestellte DNA-Oligonukleotide zur Begrenzung der DNA-Fragmente während der PCR
<i>Remodeling</i>	beschreibt die Umwandlung bestehender Strukturen in neue während der Embryogenese oder in der postnatalen Neovaskularisierung
Stromazellen	stellt die Gesamtheit aller Zellen im Knochenmark dar, mit Ausnahme der Stammzellen
TAQ-DNA-Polymerase	das Enzym DNA-Polymerase isoliert aus dem thermophilen Bakterium <i>Thermus aquaticus</i>
TUNEL	Methode zur Darstellung apoptotischer Zellkerne ( <i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i> )
U	Einheit mit der die Aktivität eines Enzyms ausgedrückt wird ( <i>unit</i> )
UV-Licht	Ultraviolettes Licht (254nm-366nm)

VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor ( <i>vascular endothelial growth factor</i> ), ein Mitogen, das spezifisch auf EC wirkt
VEGFR-2	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor 2 ( <i>vascular endothelial growth factor receptor-2</i> ), Rezeptor des Mitogens VEGF wirkt, alias KDR, Maushomolog: Flk1

## 7.2. Rezeptoren und Oberflächenmarker

Tab. 7.1. Rezeptoren und Oberflächenmarker

Rezeptor/ Oberflächenmarker	
Aktin ( <i>actin</i> )	Protein des Cytoskeletts und der kontraktile Strukturen
CD14	LPS-Rezeptor (Lipopolysaccharid), Monozyten und Neutrophile Granulozyten
CD18	Teil des $\beta_2$ Integrinrezeptor
CD31	CD31, auch PECAM-1 ( <i>platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i> ) genannt, wird von zirkulierenden Thrombozyten, Monozyten, Neutrophilen u.a. Zellen exprimiert. CD31 ist eine der Hauptkomponenten der interzellulären EC-Bindungen, vermittelt die transendotheliale Migration von Leukozyten, Angiogenese und die Integrin-Aktivierung (Newman, 1997).
CD34	CD34 wird von frühen lymphohämatopoetischen Stamm-/Progenitorzellen und den ECs kleiner Gefäße exprimiert. CD34 vermittelt möglicherweise die stationäre Phase von Stamm-/Progenitorzellen im Knochenmark und deren Zell-Zelladhäsion mit den Zellen des Knochenmarks (Krause, 1996).
CD38	CD38 ist ein multifunktionales Ectoenzym, welches weit verbreitet auf Zellen und in Geweben, vor allem auf Leukozyten exprimiert wird; CD38 vermittelt Zelladhäsion, Signaltransduktion und Calcium-Signaling (Ferrero, 1999).
CD54	ICAM-1 ( <i>intercellular adhesion molecule-1</i> )
CD62E	CD62E, auch E-Selectin genannt, vermittelt Leukozyten <i>Rolling</i> auf aktiviertem Endothel während der Inflammation und könnte eine Rolle in der Angiogenese spielen (Bevilacqua, 1987).
CD133	CD133, auch AC133 genannt, wird von primitiven hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen exprimiert (Gehling, 2000, Peichev, 2000, Yin, 2002).
CD141	CD141, Thrombomodulin
CD146	CD146, auch S-Endo-1, PIH12, MUC18 und MCAM genannt, ist an den interendothelialen Verbindungen lokalisiert und vermittelt wahrscheinlich Zell-Zelladhäsion. CD146 wird von ECs, EPCs und HSCs exprimiert (Anfosso, 1998, Rafii, 2003).

Rezeptor/ Oberflächenmarker	
c-Kit	c-Kit, auch SCF ( <i>stem cell factor</i> ), SF ( <i>steel factor</i> ) oder MGF ( <i>mast cell growth factor</i> ) genannt, wird von primitiven Stammzellen exprimiert und spielt eine essentielle Rolle in den frühen Stadien der Hämatopoese. c-Kit ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor und der Ligand des c-Kit-Rezeptors (CD117, proto-onkogen Protein c-Kit), (Anderson, 1990, Okada, 1991, Okada, 1992, Ikuta, 1992).
CXCR4	CXCR4 (auch CD184) ist der Rezeptor für das CXC Chemokin SDF-1 und ist involviert in die B-Lymphopoese, Myelopoese, Kardiogenese und Blutgefäßbildung. CXCR4 wird ubiquitär von Blut- und Gewebezellen exprimiert (Bleul, 1996, Murdoch, 2000).
eNOS/NOS III	Nitridoxidase in Neuronen und Endothelzellen
EphB4	Ligand ist EphrinB2, spielt eine Rolle in der arteriovenösen Entwicklung der Blutgefäße
Ephrin-B2	Ligand ist EphB4, spielt eine Rolle in der arteriovenösen Entwicklung der Blutgefäße
Jagged 1	ein Notch-Ligand
LDL	LDL ( <i>low density lipoprotein</i> ) wird von Monozyten, ECs, EPCs und HSCs inkorporiert, diese Zellen können über die Aufnahme von acetylierten und mit dem Farbstoff DIL markierten LDL ( <b>DIL-Ac-LDL</b> ) charakterisiert werden (Asahara, 1997, Asahara, 1999, Dimmeler, 2001, Rehman, 2003).
$\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin	$\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin
TIE2	Angiopoeitinrezeptor
Ulex europaeus Lektin	Aus der Pflanze <i>Ulex europaeus</i> wird Lektin isoliert, d.h. ein Glykoprotein, das spezifisch an eine bestimmte Kohlenhydratstruktur bindet. Das <i>Ulex</i> -Lektin kann mit Farbstoffen markiert werden und bindet spezifisch an Oberflächenstrukturen von ECs, EPCs, HSCs und Monozyten (Asahara, 1997, Asahara, 1999, Dimmeler, 2001, Rehman, 2003).
VE-Cadherin	VE-Cadherin, ( <i>vascular endothelial cadherin</i> ) auch Cadherin 5, CDH5 oder CD144 genannt, wird spezifisch von ECs/EPCs exprimiert und vermittelt Zellaggregation und Zell-Zelladhäsion (Salomon, 1992, Breviario, 1995).
VEGFR-1	VEGFR1, auch CD308 (in Maus: Flt1) genannt, bindet die Wachstumsfaktoren VEGF-A, -B und PlGF ( <i>placental growth factor</i> ), stimuliert z.B. die Angiogenese und das Kollateralwachstum in ischämischen Herzen/Gliedmaßen und vermittelt die Entlassung von Zellen aus dem Knochenmark. VEGFR1 wird u.a. von Knochenmarkzellen, Monozyten und Stammzellen exprimiert (Luttun, 2002, Hattori, 2002, Eriksson, 2002).

Rezeptor/ Oberflächenmarker	
VEGFR-2, KDR, Flk1	VEGFR2, auch CD309, KDR ( <i>kinase insert domain receptor</i> ) oder Flk1 ( <i>fetal liver kinase-1</i> ) genannt, wird spezifisch von ECs/EPCs exprimiert und ist der Rezeptor für das Mitogen VEGF-A, den einzigen Wachstumsfaktor der spezifisch auf ECs wirkt (Millauer, 1993, Plate, 1993, Quinn, 1993).
vWF	vWF, (von Willebrand-Faktor), wird von HSCs, EPCs und ECs exprimiert und vermittelt die Aggregation von Thrombozyten bei vaskulären Verletzungen (Ruggeri, 2003, Rafii, 2003).

### 7.3. Sequenzen der Primer zur Amplifikation von cDNA

Tab. 7.2. Primersequenzen zur Amplifikation von cDNA

Gen	Spezies	Produktgröße/ Hybridisierungs- Temperatur	Richtung	Sequenz
<b>18S rRNA</b>	human	510bp	<i>Forward</i>	CCT GCG GCT TAA TTT GAC TC
		57°C	<i>Reverse</i>	GGC CTC ACT AAA CCA TCC AA
<b>CXCR4</b>	human	350bp	<i>Forward</i>	CAG CAG GTA GCA AAG TGA CG
		60°C	<i>Reverse</i>	AGG GAA GCG TGA TGA CAA AG
<b>Delta1</b>	human	495bp	<i>Forward</i>	TTG CTG TGT CAG GTC TGG AG
		60°C	<i>Reverse</i>	ACA CAC GAA GCG GTA GGA GT
<b>Delta4</b>	human	458bp	<i>Forward</i>	GAC CAC TTC GGC CAC TAT GT
		60°C	<i>Reverse</i>	CCA TCC TCC TGG TCC TTA CA
<b>eNOS</b>	human	385bp	<i>Forward</i>	TGC TGG CAT ACA GGA CTC AG
		60°C	<i>Reverse</i>	TAG GTC TTG GGG TTG TCA GG
<b>EphB4</b>	human	604bp	<i>Forward</i>	TAT TCG GAC AAA CAC GGA CA
		60°C	<i>Reverse</i>	TGT AGG TGG GAT CGG AAG AG
<b>EphrinB2</b>	human	406bp	<i>Forward</i>	CTC AAC TGT GCC AAA CCA GA
		60°C	<i>Reverse</i>	CTG AAG CAA TCC CTG CAA AT
<b>Notch1</b>	human	666bp	<i>Forward</i>	GAC ATC ACG GAT CAT ATG GA
		60°C	<i>Reverse</i>	CTC GCA TTG ACC ATT CAA AC
<b>Notch2</b>	human	512bp	<i>Forward</i>	ATG ACT GCC CTA ACC ACA GG
		60°C	<i>Reverse</i>	TTT TCC TGC ATG CTC ACA AG
<b>Notch3</b>	human	491bp	<i>Forward</i>	CAG GTG AGA GCT GCA GTC AG
		60°C	<i>Reverse</i>	AAT GTC CAC CTC GCA ATA GG
<b>Notch4</b>	human	500bp	<i>Forward</i>	GTC CTC CCT CCT TCT GTT CC
		60°C	<i>Reverse</i>	GGC TGA CAG AGT TGT CTG GA

## 7.4. Sequenzen der Primer zur Sequenzierung der Plasmide

Tab. 7.3. Primersequenzen zur Sequenzierung der Plasmide

Plasmid		Sequenz	Position im Vektor
pShuttle-IHRES-hrGFP-1	<b>Forward:</b>	CTC ACG GGG ATT TCC AAG TC	749 - 768
	<b>Reverse:</b>	ATG CAG TCG TCG AGG AAT TG	1075 - 1094

## 7.5. Sequenzen der Primer zur Klonierung von AdRBP-J

Tab. 7.4. Primersequenzen zur Klonierung von AdRBP-J

Plasmid		Sequenz
pCMX-N/RBP-J	<i>Forward</i> (mit EcoRV-Schnittstelle):	CAT GCA GAT ATC ATG CCC TCC GGT TTT CCT CA
	<i>Reverse</i> (mit XhoI-Schnittstelle, kein Stopcodon):	CAT GCA CTC GAG GGA CAC CAC GGT TGC TGT GGA
pCMX-N/RBP-J (R218H)	<i>Forward</i> (mit EcoRV-Schnittstelle):	CAT GCA GAT ATC ATG CCC TCC GGT TTT CCT CA
	<i>Reverse</i> (mit XhoI-Schnittstelle, kein Stopcodon):	CAT GCA CTC GAG GGA CAC CAC GGT TGC TGT GGA

## 7.6. Verwendung von Puffern bei Kombination von Restriktionsenzymen

Tab. 7.5. Verwendung von NEB-Puffern bei Einsatz von zwei Restriktionsenzymen

Enzym		AatII	AvrII	BamHI	BglII	BsgI	EagI	EcoRI	EcoRV	HindIII	KpnI	MseI	NcoI	NdeI	NheI	NotI	PstI	PvuI	SacI	SacII	SalI	SmaI	SpeI	SphI	XbaI	XhoI	XmaI
	<b>NEBuffer</b>	4	2	B	3	4	3	E	3	2	1	2	4	4	2	3	3	3	1	4	3	4	2	2	2	2	4
<b>AatII</b>	4	-	4	s	s	4	s	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	s	4	4	s	4	4	4	4	4	4
<b>AvrII</b>	2	4	-	s	3	4	3	E	2	2	1	2	2	4	2	3	3	3	1	2	s	4	2	2	2	2	4
<b>BamHI</b>	B	s	s	-	B	s	B	E	B	s	s	s	B	B	s	B	B	B	s	B	B	s	B	B	s	B	s
<b>BglII</b>	3	s	3	B	-	4	3	E	3	2	2	2	3	3	2	3	3	3	2	s	3	s	2	2	2	3	s
<b>BsgI</b>	4	4	4	s	4	-	s	4	4	2	s	2	4	4	4	3	3	3	1	4	s	4	2	4	2	4	4
<b>EagI</b>	3	s	3	B	3	s	-	E	3	s	s	3	3	3	2	3	3	3	s	s	3	s	3	3	3	3	s
<b>EcoRI</b>	E	4	E	E	E	4	E	-	E	E	2	E	E	E	E	E	E	E	s	E	E	s	E	E	2	E	s
<b>EcoRV</b>	3	4	2	B	3	4	3	E	-	2	2	2	3	2	2	3	3	3	2	2	3	4	2	2	2	3	4
<b>HindIII</b>	2	4	2	s	2	2	s	E	2	-	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	s	4	2	2	2	2	s
<b>KpnI</b>	1	4	1	s	2	s	s	2	2	2	-	1	1	1	1	2	1	2	1	1	s	s	1	1	2	1	4
<b>MseI</b>	2	4	2	s	2	2	3	E	2	2	1	-	2	2	2	2	2	3	2	2	3	2	2	2	2	2	4
<b>NcoI</b>	4	4	2	B	3	4	3	E	3	2	1	2	-	4	2	3	3	3	1	4	3	4	2	2	2	2	4
<b>NdeI</b>	4	4	4	B	3	4	3	E	2	2	1	2	4	-	4	3	3	3	4	4	3	4	2	2	2	4	4
<b>NheI</b>	2	4	2	s	2	4	2	E	2	2	1	2	2	4	-	2	2	2	1	4	s	4	2	2	2	2	4
<b>NotI</b>	3	4	3	B	3	3	3	E	3	2	2	2	3	3	2	-	3	3	4	4	3	4	2	2	3	3	4
<b>PstI</b>	3	4	3	B	3	3	3	E	3	2	1	2	3	3	2	3	-	3	1	2	3	4	2	2	3	3	4
<b>PvuI</b>	3	s	3	B	3	3	3	E	3	2	2	3	3	3	2	3	3	-	2	s	3	s	2	2	3	3	s
<b>SacI</b>	1	4	1	s	2	1	s	s	2	2	1	2	1	4	1	4	1	2	-	4	s	4	1	1	4	1	4
<b>SacII</b>	4	4	2	B	s	4	s	E	2	2	1	2	4	4	4	4	2	s	4	-	s	4	2	4	2	4	4

Enzym		AatII	AvrII	BamHI	BglII	BsgI	EagI	EcoRI	EcoRV	HindIII	KpnI	MseI	NcoI	NdeI	NheI	NotI	PstI	PvuI	SacI	SacII	SalI	SmaI	SpeI	SphI	XbaI	XhoI	XmaI
	NEBuffer	4	2	B	3	4	3	E	3	2	1	2	4	4	2	3	3	3	1	4	3	4	2	2	2	2	4
<b>SalI</b>	3	s	s	B	3	s	3	E	3	s	s	3	3	3	s	3	3	3	s	s	-	s	s	s	3	3	s
<b>SmaI</b>	4	4	4	s	s	4	s	s	4	4	s	2	4	4	4	4	4	s	4	4	s	-	4	4	4	4	4
<b>SpeI</b>	2	4	2	B	2	2	3	E	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	s	4	-	2	2	2	4
<b>SphI</b>	2	4	2	B	2	4	3	E	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	4	s	4	2	-	2	2	4
<b>XbaI</b>	2	4	2	s	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	4	2	3	4	2	2	-	2	4
<b>XhoI</b>	2	4	2	B	3	4	3	E	3	2	1	2	2	4	2	3	3	3	1	4	3	4	2	2	2	-	4
<b>XmaI</b>	4	4	4	s	s	4	s	s	4	s	4	4	4	4	4	4	4	s	4	4	s	4	4	4	4	4	-

(aus NEB Katalog, 2006) E = EcoRI-Puffer B = BamHI-Puffer s = sequenzielle Restriktion

### 7.7. Plasmidkarten

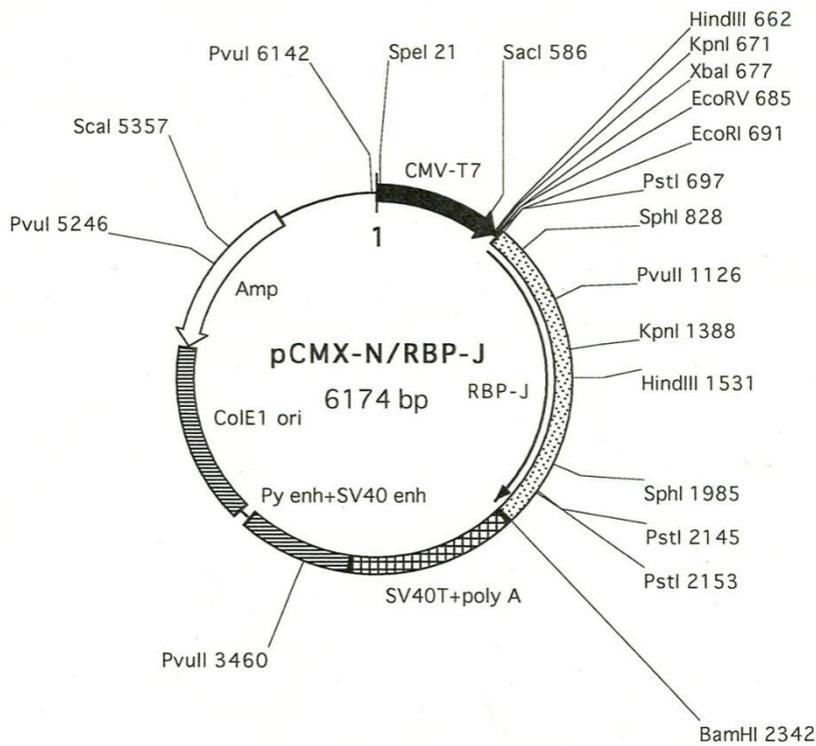
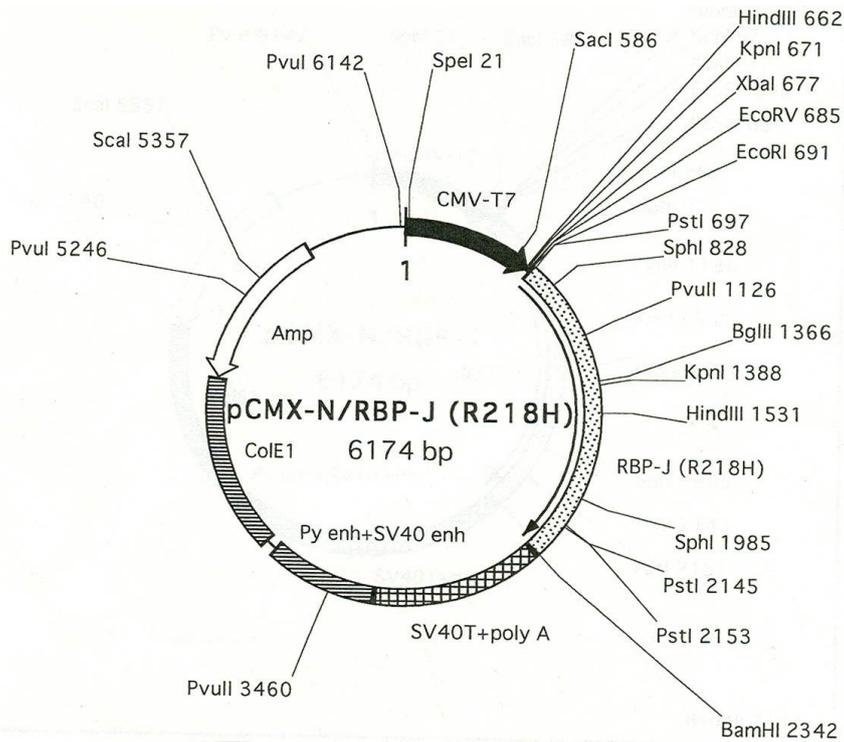
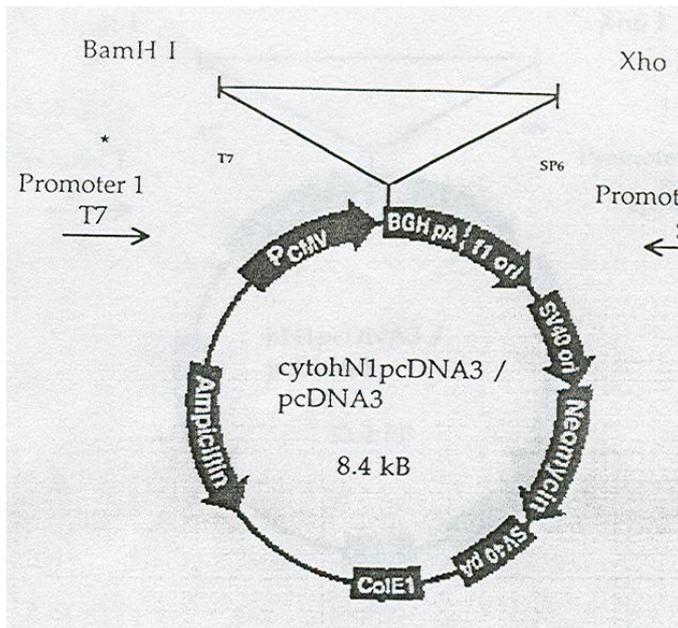


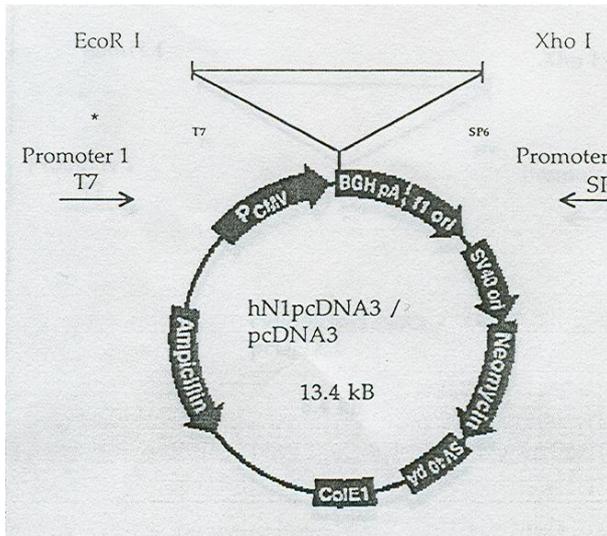
Abb. 7.1. *pCMX-N/RBP-J* Plasmidkarte (vom Riken BioResource Center, Tokyo, Japan)



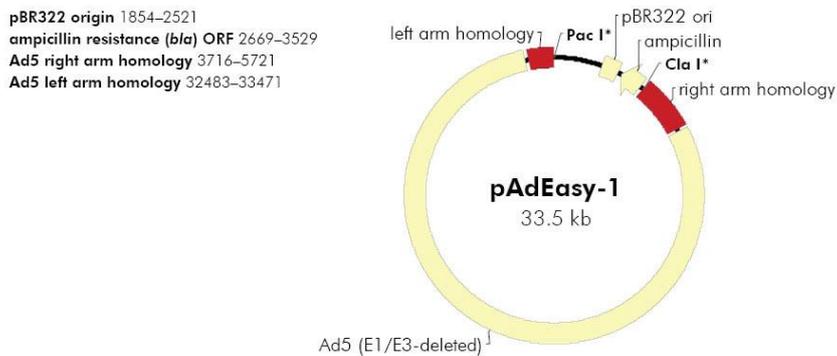
**Abb. 7.2. pCMX-N/RBP-J (R218H) Plasmidkarte** (vom Riken BioResource Center, Tokyo, Japan)



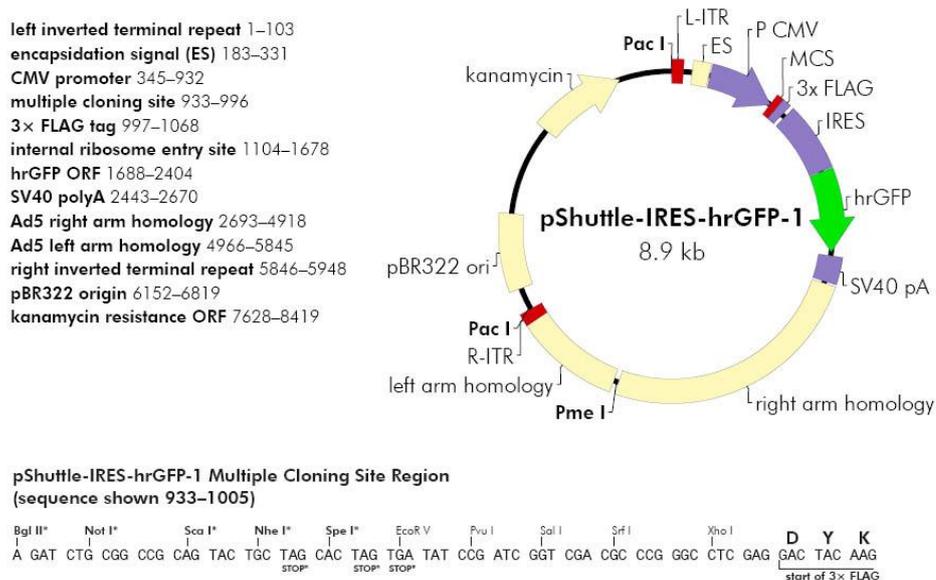
**Abb. 7.3. cytohN1pcDNA3 Plasmidkarte** (von S. Artavanis-Tsakonas, Harvard Medical School, Boston, USA)



**Abb. 7.4. *hN1pcDNA3* Plasmidkarte** (von S. Artavanis-Tsakonas, Harvard Medical School, Boston, USA)



**Abb. 7.5. *pAdEasy-1* Plasmidkarte** (aus dem *AdEasy XL* Handbuch der Fa. Stratagene)



**Abb. 7.6. *pShuttle-IRES-hrGFP-1* Plasmidkarte** (aus dem *AdEasy XL* Handbuch der Fa. Stratagene)

## Lebenslauf

**Name:** Diana Elligsen-Merkel, geb. Elligsen

**Anschrift:** Schillingstr. 13, 44139 Dortmund

**Geburtstag:** 02.07.1980

**Geburtsort:** Hannover

**Familienstand:** verheiratet

**Schulbildung:** 1986 bis 1990 Grundschule Albert-Schweitzer-Schule,  
Hannover  
1990 bis 1999 Integrierte Gesamtschule Linden, Hannover  
1999 Abitur

**Studium:** WS 1999/2000 bis SS 2004 Studium der Diplom-Biologie an der  
Universität Hannover  
WS 2003/04 Diplom-Hauptprüfung mit dem Hauptfach Genetik  
und den Nebenfächern Mikrobiologie und Immunologie  
bis SS 2004 Diplomarbeit mit dem Thema: "Suche nach  
Deletionen und Rearrangements des *FBNI*-Gens bei Marfan-  
Patienten" bei Prof. Dr. med. J. Schmidtke, Humangenetik,  
Medizinische Hochschule Hannover

**Beruflicher Werdegang:** **Juli 2004-September 2006** Promotion zu dem Thema  
„Untersuchungen zur Rolle des Notch-Signalweges in  
endothelialen Progenitorzellen in der vaskulären Regeneration“  
bei Prof. Dr. med. H. Drexler in der Abteilung Kardiologie und  
Angiologie in der Medizinischen Hochschule Hannover  
**Juli 2007-Januar 2008** Klinische Forschung in der CRO IFE  
Europe GmbH, Essen  
**Februar 2008-heute** Entwicklung pharmokologischer  
Substanzen in der CRO Cellact Pharma GmbH, Dortmund

**Fortbildungen**

**Gentechnische Sicherheit**, Medizinische Hochschule  
Hannover, 2003

**Versuchstierkunde**, Medizinische Hochschule Hannover, 2004

**Wissenschaftlicher Grundkurs Durchflußzytometrie**, BD  
Heidelberg, 2005

## Liste wissenschaftlicher Veröffentlichungen

Singh KK, Elligsen D, Liersch R, Schubert S, Pabst B, Arslan-Kirchner M, Schmidtke J, **Multi-exon out of frame deletion of the FBN1 gene leading to a severe juvenile onset cardiovascular phenotype in Marfan syndrome, J Mol Cell Cardiol. 2006 Dec 23; [Epub ahead of print].**

Limbourg A, Ploom M, Elligsen D, Sorensen I, Ziegelhoeffer T, Gossler A, Drexler H, Limbourg FP, **The Notch Ligand Delta-Like 1 is Essential for Postnatal Arteriogenesis, Circ Res. 2007 Jan 18; [Epub ahead of print]**

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und nicht bereits als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet habe.

Alle benutzten Hilfsmittel und zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen sind vollständig angegeben.

Dortmund, im Dezember 2009

## **Danksagung**

Prof. Dr. med. Helmut Drexler und Dr. med. Florian Limbourg danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Abteilung Kardiologie und Angiologie der Medizinischen Hochschule Hannover anfertigen zu können. Mein besonderer Dank gebührt Prof. Dr. phil. Denise Hilfiker, Dr. Beate Fiedler, Dr. Mortimer Korf-Klingebiel und Dr. Nils-Holger Zschemisch, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Dr. med. Sajoscha Sorrentino danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der *in vivo* Experimente.

PhD. Merlin Ploom, Anja Quint und PhD. Inga Soerensen möchte ich für ihren steten Beistand auf dem langen Leidensweg zum Dokortitel danken.

Dieser Weg ist sowohl von Höhen als auch von Tiefen geprägt. Besonders dankbar bin ich meinem Mann Jonas Merkel, der mich in dieser Zeit auf so vielfältige Art und Weise unterstützt hat. Meiner Mutter und meinem Bruder möchte ich dafür danken, dass sie stets an mich geglaubt haben. Auch bei der Familie meines Mannes möchte ich mich für ihre moralische Unterstützung während der letzten Jahre, speziell bei Annette Merkel, bedanken.

Einen besonders herzlichen Dank möchte ich Thomas Reichling und Dr. Michael Bauland für ihr geduldiges Korrekturlesen meiner Dissertation aussprechen.