

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der  
Kreislaufkrankheiten  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. C. Weber

**Expression von SDF-1 $\alpha$  und Mobilisierung von  
Progenitorzellen bei der Neointimabildung durch ungesättigte  
Lysophosphatidsäuren**

**Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von

Patricia Reinhard

aus

München

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Schober  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christian Schulz (Med I)  
Prof. Dr. Sigmund Silber  
Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel  
Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2016

# Inhalt

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1. Native Atherosklerose</b> .....	<b>7</b>
<b>1.2. Akzelerierte Arteriosklerose und Neointimabildung</b> .....	<b>9</b>
<b>1.3. Restenose und Neointimabildung</b> .....	<b>10</b>
<b>1.4. Herkunft der neointimalen SMCs</b> .....	<b>11</b>
<b>1.5. Stromal cell-derived factor (SDF)- 1<math>\alpha</math></b> .....	<b>13</b>
1.5.1. Struktur und Physiologie .....	13
1.5.2. Bedeutung von SDF-1 $\alpha$ und dessen Rezeptor CXCR4 in der Atherosklerose .....	15
1.5.3. Rolle der SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 Achse bei der Neointimabildung.....	16
<b>1.6. Hypoxia-inducible factor (HIF-)1<math>\alpha</math></b> .....	<b>18</b>
1.6.1. Struktur und Physiologie .....	18
1.6.2. Bedeutung von HIF-1 $\alpha$ bei atherosklerotischen Erkrankungen .....	20
1.6.3. Rolle von HIF-1 $\alpha$ bei der Neointimabildung.....	20
<b>1.7. Lysophosphatidsäuren (LPAs)</b> .....	<b>22</b>
1.7.1. Struktur und Physiologie .....	22
1.7.2. Bedeutung der LPA bei atherosklerotischen Erkrankungen.....	24
1.7.3. Rolle der LPA bei der Neointimabildung .....	26
<b>1.8. Fragestellung</b> .....	<b>27</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1. Antikörper, Reagenzien und Materialien</b> .....	<b>29</b>
2.1.1. Antikörper.....	29
2.1.2. Reagenzien .....	29
2.1.3. Lösungen .....	31
2.1.4. Geräte .....	33
2.1.5. Verbrauchsmaterialien .....	33
<b>2.2. Versuchsablauf</b> .....	<b>34</b>

<b>2.3. Mäusestämme und Tierhaltung</b> .....	<b>35</b>
<b>2.4. Anästhesie der Versuchstiere</b> .....	<b>35</b>
<b>2.5. Intraluminale Applikation von Lysophosphatidsäure (LPA)</b> .....	<b>35</b>
<b>2.6. Messung der SPCs im Vollblut</b> .....	<b>37</b>
2.6.1. Durchflusszytometrie (Fluorescence- Activated Cell Sorting, FACS®) .....	37
2.6.2. Blutabnahme über die Schwanzvene .....	38
2.6.3. Vorbereitung der Proben für die Messung .....	39
2.6.4. Messung und Auswertung der Proben .....	40
<b>2.7. Gewinnung und Vorbereitung der histologischen Präparate</b> .....	<b>41</b>
2.7.1. Entnahme der CCA .....	41
2.7.2. Paraffineinbettung und Herstellung der seriellen CCA-Schnitte .....	42
<b>2.8. Histologische Färbungen</b> .....	<b>42</b>
2.8.1. Modifizierte Movat-Pentachrom-Färbung .....	42
2.8.1.1. Reagenzien.....	43
2.8.1.2. Durchführung .....	44
2.8.2. Immunhistochemie .....	45
2.8.2.1. Immunhistochemische Färbung für $\alpha$ -SMA.....	46
2.8.3. Immunfluoreszenz.....	47
2.8.3.1. Immunfluoreszenzfärbung für MAC2 .....	47
2.8.3.2. Immunfluoreszenzfärbung für SDF-1 $\alpha$ .....	48
2.8.3.3. Immunfluoreszenzfärbung für HIF-1 $\alpha$ .....	50
<b>2.9. Mikroskopie und Morphometrische Analyse</b> .....	<b>51</b>
<b>2.10. Statistische Auswertung</b> .....	<b>52</b>
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>53</b>
<b>3.1. LPA20:4 und 1-AGP induzieren die Bildung einer Neointima</b> .....	<b>53</b>
<b>3.2. Aufbau der LPA induzierten Neointima</b> .....	<b>54</b>
<b>3.3 Ungesättigte LPAs induzieren die Expression von SDF 1<math>\alpha</math></b> .....	<b>55</b>
<b>3.4. Ungesättigte LPAs induzieren die Expression von HIF-1<math>\alpha</math></b> .....	<b>57</b>

3.5. Ungesättigte LPAs induzieren die Mobilisation glatter Muskelvorläuferzellen (SPCs).....	58
4. Diskussion .....	61
4.1. Ungesättigte LPAs induzieren eine neointimale Hyperplasie .....	62
4.2. Die LPA induzierte Neointimabildung ist mit der Expression von SDF-1 $\alpha$ assoziiert .....	63
4.3. Die LPA induzierte Neointimabildung ist mit der Expression von HIF-1 $\alpha$ assoziiert .....	65
4.4. Die Neointimabildung durch ungesättigte LPAs ist mit der Mobilisation glatter Muskelvorläuferzellen (SPCs) assoziiert .....	65
4.5. Klinischer Ausblick .....	67
5. Zusammenfassung .....	68
6. Referenzen .....	71
7. Abkürzungsverzeichnis .....	91
8. Danksagung .....	94
9. Publikationen und Vorträge .....	95

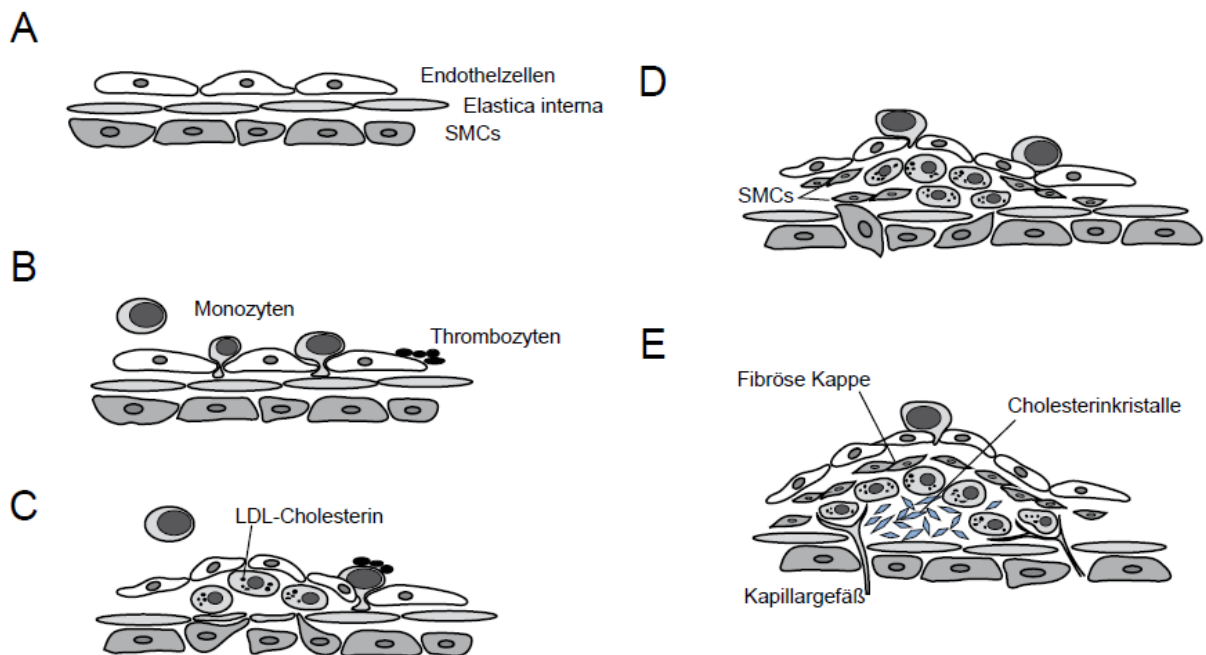
### 1. Einleitung

Fast jeder zweite Todesfall in Deutschland geht auf eine Erkrankung des Herz-Kreislauf-Systems zurück. Laut des statistischen Bundesamts waren 2012 40,2% aller Todesfälle auf eine Erkrankung des Herz-Kreislauf-Systems zurückzuführen. Somit waren 2012, kardiovaskuläre Erkrankungen, von denen vor allem ältere Menschen betroffen sind, die häufigste Todesursache in Deutschland (1). Angesichts der steigenden Lebenserwartung und der wachsenden Anzahl chronischer Herz-Kreislauf-erkrankung ist mit einer weiteren Zunahme der Zahlen zu rechnen. Störungen des Herz-Kreislauf-Systems manifestieren sich aber auch bereits im Alter unter 50 Jahren. Zu den Risikofaktoren zählen Übergewicht, Rauchen, Bluthochdruck, ein erhöhter Cholesterinspiegel und Diabetes. Die Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursacht hohe Kosten: Allein der Anteil der Herz-Kreislauf-Medikamente beträgt rund ein Viertel der gesamten Arzneimittelausgaben der gesetzlichen Krankenversicherung. Zu den Ausgaben für Diagnostik und Behandlung kommen noch die Aufwendungen für die Rehabilitation der Herzinfarkt- und Schlaganfallpatienten, die nach ihrer Entlassung aus dem Krankenhaus weiterhin betreut werden müssen, hinzu (2). Die häufigste Ursache für Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sind atherosklerotische Gefäßveränderungen in der koronaren-, zerebralen-, und peripheren Zirkulation (3). Die Pathophysiologie der Atherosklerose ist komplex und noch nicht vollständig geklärt. Im Rahmen der „*response to injury*“-Hypothese wird die Atherosklerose als chronischer Entzündungsprozess angesehen, der je nach Stadium zur Ausbildung von charakteristischen Plaquetypen führt (4-6). Klinisch manifestiert sich dieser Entzündungsprozess auf zwei Wegen. Im Verlauf von Jahre bis Jahrzehnte kann sich eine progredienten Stenosierung eines Gefäßes entwickeln, die bei einer Einschränkung des Lumens von über 70-80%, zu einer Ischämie des versorgten Gewebes führen kann. Zum anderen kann im Rahmen einer akuten klinischen Manifestation von meistens geringer gradigen Plaques (< 50% Stenose) eine Verlegung des Gefäßes durch einen Thrombus auftreten (4). Pathogenetisch können zwei Formen der Atherosklerose unterschieden werden, eine native und eine akzelerierte Arteriosklerose.

### 1.1. Native Atherosklerose

Die Atherosklerose wird heute als chronisch inflammatorischer Prozess der Gefäßwand als Antwort auf Lipoproteinablagerungen verstanden, der durch verschiedene Stadien der Plaquebildung gekennzeichnet ist und zu vulnerablen Plaques führen kann, die ein erhöhtes Risiko für eine Plaqueruptur und Atherothrombose besitzen (5). Die Bildung von atherosklerotischen Plaques verläuft typischerweise im Laufe von Jahrzehnten langsam progredient. Die atherosklerotischen Plaques entstehen überwiegend an arteriellen Bifurkationen, z.B. der Koronararterien, oder unter Aortenkurvaturen auf dem Boden der dort herrschenden gestörten Blutverhältnisse. Die durch eine laminare Strömung hervorgerufene hohe Wandschubspannung ist in diesen Bereichen durch turbulente Strömungsverhältnisse deutlich reduziert. Die niedrige Wandschubspannung schädigt jedoch die Endothelzellen und führt zu einer gesteigerten endothelialen Permeabilität, wodurch der Einstrom von low-density Lipoproteinen (LDL) in die Gefäßwand erhöht wird. Subendothelial abgelagertes LDL wird chemisch verändert, meist durch Oxidation, wodurch potentiell zytotoxisches oxidiertes LDL entsteht. Ferner kommt es zur inflammatorischen Aktivierung der Endothelzellen, charakterisiert durch die Expression von Adhäsionsmolekülen, wie z. B. P-Selektin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) und vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). Dies begünstigt die Adhäsion von Monozyten an den Endothelzellen und deren Einwanderung in die Gefäßwand, wo sie in Makrophagen differenzieren (Abb1). Diese Makrophagen nehmen oxidiertes LDL auf und lagern das enthaltene Cholesterin intrazellulär ab, wodurch es zur Schaumzellbildung kommt. Schaumzellen liegen als „fatty-streaks“ organisiert vor und sind die frühe Erscheinungsform der Atherosklerose (Typ 1, Einteilung nach Stary) (Abb1C). Neben Makrophagen finden sich in fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose zunehmend auch glatte Muskelzellen (smooth muscle cells, SMCs) in der Gefäßwand (Typ II). Die Phagozyten setzen Zytokine frei, welche die Proliferation von glatten Muskelzellen und die Produktion von extrazellulärer Matrix stimulieren (7). Die anhaltende Aufnahme von LDL-Cholesterin führt zur Apoptose der Schaumzellen und zur extrazellulären Ablagerung von Cholesterinkristallen (Typ III-Läsion, Abb. 1D). Läsionen des Typs I–III führen noch zu keiner Gefäßstenosierung und sind als Zufallsbefund oft schon bei unter 30-jährigen zu finden (8). Konfluiert das extrazelluläre Cholesterin zu einem hoch thrombogenen Lipidkern, spricht man von Typ IV Läsionen oder Athero-

mata (Abb. 1E). Dieser Lipidkern kann im Verlauf durch eine fibröse Kappe, Bestehend aus SMCs und extrazellulärer Matrix, gegenüber dem Lumen abgegrenzt werden (Typ V). Typ IV und Typ V Läsionen könne zu einer zunehmenden Lumeneinengung der betroffenen Arterien führen. Kommt es durch atherosklerotische Plaques zu einer Lumeneinengung von 70–80%, so ist eine kritische Reduktion des Blutflusses mit den typischen klinischen Symptomen einer koronaren Herzkrankheit (KHK) oder peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) die Folge. Rupturiert die fibröse Kappe (Typ VI Läsion) werden aus dem Plaque und der Gefäßwand prokoagulatorische Faktoren, wie z.B. tissue factor (TF), freigesetzt, die zu einer lokalen Thrombosierung mit der Gefahr eines akuten Gefäßverschlusses, wie z. B. im Rahmen eines Myokardinfarkts, führen können (7). Zusätzliche Risikofaktoren, wie arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, stammbetonte Adipositas und Bewegungsmangel, können die Progression der Atherosklerose beschleunigen (9, 10) (11-13).



**Abb. 1:** Schematische Entstehung der Atherosklerose. (A) Normale Gefäßwand. In der ersten Phase kommt es zur Thrombozytenaggregation und Anhaftung von Monozyten (B) Nach Transmigration differenzieren die Monozyten in der Gefäßintima zu Makrophagen, phagozytieren LDL-Cholesterin und bilden den „fatty streak“ (C). Durch chemotaktische Stimuli, die aus den Entzündungszellen sezerniert werden, werden SMCs zur Migration und Proliferation angeregt. Durch Deposition von EZM-Bestandteilen entsteht über den Schaumzellen eine fibröse Kappe aus SMCs und EZM (D) Im fortgeschrittenen Stadium entsteht der sogenannte Lipidkern, der neben Schaumzellen, extrazelluläre Cholesterinkristalle, Kalzifikationen und Zelldebris enthält. (E) (14)



## 1.2. Akzelerierte Arteriosklerose und Neointimabildung

Im Gegensatz zur nativen Atherosklerose entsteht die akzelerierte Arteriosklerose in Folge einer akuten mechanischen Verletzung einer atherosklerotischen Gefäßwand bereits innerhalb weniger Monate und stellt einen Reparaturvorgang dar zur Aufrechterhaltung der Gefäßintegrität (Neointimabildung). Die atherosklerotische Vorschädigung des Gefäßes fördert jedoch eine überschießende Neointimabildung, die wiederum zur Lumeneinengung führen kann. Die akzelerierte Arteriosklerose findet man am häufigsten in Form der Restenose bei Patienten nach einer perkutanen Intervention, im Rahmen einer Transplantatvaskulopathie oder nach Anlage eines Koronararterien-Bypass (v.a. mit venösen Bypass-Gefäßen) (15). Die akute Gefäßverletzung im Rahmen einer perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie (PTCA) mit oder ohne Stentimplantation führt zu einer endothelialen Denudation und zu einer Verletzung der Media (15). Durch die intimale Ansammlung von vorwiegend SMCs aber auch von Leukozyten kommt es zu einer Ausbildung einer Neointima, die zu einer vaskulären Stenosierung führen kann. Auch wenn die initiale PTCA eine primäre angiographische Erfolgsrate von über 90% hat, liegt die Zahl der Reinterventionen weiterhin auf hohem Niveau. Je nach Risikoprofil der Patienten und Komplexität der Koronarmorphologie (und/oder Mehrgefäßerkrankungen) beträgt die Reinterventionsrate nach PTCA mit/ohne Stentimplantation trotz medikamentöser Maximaltherapie 30-50% (16-20). In Abhängigkeit von der Gefäßgröße, Lage und Art der Läsion und Vorbehandlung kann die Restenoserate jedoch bis zu 73% betragen. Die Restenose stellt somit eine wesentliche Limitation in der interventionellen Kardiologie dar (21-25).

	native Atherosklerose	akzelerierte Arteriosklerose
Verletzung	Endotheliale Dysfunktion	Endotheliale Denudation ± Mediaverletzung
Thrombozyten	+	+++
Monozyten	+++	+
SMCs	+	+++
Frühphase	Lipidablagerung, Monozyteninfiltration	Thrombozytenadhäsion, neointimale SMCs
Verlauf	Jahrzehnte	Monate bis wenige Jahre

Tabelle 1: Unterschiede zwischen der nativen Atherosklerose und der akzelerierten Arteriosklerose (15)

### 1.3. Restenose und Neointimabildung

Bei der PTCA kommt es durch die Gefäßdehnung zu einer Gefäßverletzung. Die Restenose ist eine (Über-)Reaktion des Heilungsprozesses in Arterien nach einer mechanischen Verletzung. Zwei wesentliche Faktoren tragen zur Restenose bei: die Neointimabildung und das negative Gefäßremodelling (26, 27). Das morphologische Korrelat der Restenose ist die Bildung einer Neointima durch die Akkumulation von SMCs. Diese Neointimabildung trägt wesentlich zum Lumenverlust nach Stentimplantation bei (28, 29). Da die neointimale Akkumulation von SMCs zu einem wesentlichen Teil durch die Proliferation dieser Zellen entsteht, wird die Neointima auch als intimale Hyperplasie bezeichnet. Die intimale Hyperplasie ist eine histologische Bezeichnung für Gewebe, das durch Zellproliferation und Deposition von extrazellulärer Matrix in der Intima der Gefäßwand auftritt. Die zur Neointimabildung führende Reaktion auf eine mechanische Gefäßschädigung lässt sich in vier Phasen unterteilen (30):

1. Die mechanische Phase, die durch das frühe elastische Zurückspringen (elastischer Recoil) nach der mechanischen Ausdehnung des Gefäßes gekennzeichnet ist.
2. Die thrombotische Phase, während der es zur Thrombozytenaggregation an der geschädigten Gefäßwand kommt.
3. Die proliferative Phase, bei der sich auf Grund der Proliferation und Migration der medialen und intimalen vaskulären SMCs (VSMCs) die neointimale Hyperplasie bildet.
4. Die Phase des Remodellings, eine pathologische Anpassung, die eine chronische und schrittweise Umwandlung des Zell- und Proteingehalts in der Media und Adventitia beinhaltet. Zusätzlich kommt es zu einer vermehrten Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen und zu einer Veränderung des Phänotyps der SMCs von einem „kontraktilen“ zu einem „synthetisierenden“ Typ

Auslösende Faktoren der Restenose nach Ballonangioplastie oder Stentimplantation sind die Zerstörung des Endothels, das Eindringen der Plaquestruktur und die Dehnung des gesamten betroffenen Gefäßabschnittes. Durch den Wegfall der intakten endothelialen Oberfläche, kommt es zur Anlagerung von aktivierten Thrombozyten, die verstärkt Adhäsionsmoleküle (P-Selektine) exprimieren, und zu einer Ansammlung von Fibrin und Erythrozyten (31-33). Charakteristisch für die Frühphase nach

Gefäßverletzung ist außerdem eine sehr hohe Rate der Apoptose von medialen SMCs (34). Zirkulierende Leukozyten (v.a. neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten) adhären im Rahmen einer Entzündungsreaktion über ihre Oberflächenintegrine (z.B. Mac-1) an das entstandene Geflecht aus Thrombozyten und Fibrin. Durch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, wie dem fibroblast growth factor (FGF), dem platelet-derived growth factor (PDGF) oder dem transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) aus Makrophagen, Thrombozyten, Endothelzellen, SMCs und Fibroblasten, kommt es zur Aktivierung und Proliferation von SMCs (35, 36). Eine Hemmung dieser Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel durch Inhibierung der Signaltransduktion von PDGF-Rezeptoren durch spezifische Antikörper oder durch Tyrosinkinase-Inhibitoren, reduziert die Neointimabildung in unterschiedlichen experimentellen Modellen der Restenose (37, 38). Zusätzlich trägt die chronische Inflammation zu den vaskulären Umbauprozessen nach einer mechanischen Verletzung z. B. durch eine Ballonangioplastie (mit oder ohne Stenting) bei (39). Das Ausmaß der Entzündungsreaktion, charakterisiert durch die Infiltration mit Granulozyten und Makrophagen, korreliert mit der Schwere der Gefäßverletzung, insbesondere mit der Verletzung der Media, mit der Neointima, und dem Grad der Restenose (40-42). Stents, die mit einer Mediaverletzung assoziiert sind oder die den Lipidkern eines atherosklerotischen Plaques durchdringen führen zu einer stärkerer Infiltration mit Leukozyten im Vergleich zu Stents die nur Kontakt mit fibrösen Plaques haben (43). Die durch die Gefäßverletzung induzierte Entzündungsreaktion spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Neointimabildung.

### **1.4. Herkunft der neointimalen SMCs**

Die Ansammlung von SMCs in der Intima der verletzten Gefäßwand ist der entscheidende Faktor bei der Entstehung einer Neointima. Bisher nahm man an, dass die neointimalen SMCs, sowohl bei der nativen Atherosklerose als auch bei der akzelebrierten Arteriosklerose, ausschließlich lokal aus der Media der Arterienwand einwandern und in der Intima proliferieren (29). Mittlerweile haben jedoch mehrere Studien sowohl an Tiermodellen als auch am Menschen gezeigt, dass ein Teil der intimalen SMCs aus einem adulten Stammzellpool des Knochenmarks stammt und diese Vorläuferzellen von SMCs (smooth muscle progenitor cells, SPCs) permanent im peri-

peren Blut zirkulieren (44-47). Um den Ursprung der neointimalen SMCs bei der Transplantatvaskulopathie nachzuweisen, wurde Versuchstieren neben Herz- bzw. Aorta auch Knochenmark transplantiert. Die Knochenmarktransplantation wurde mit  $\beta$ -Galactosidase- oder grün fluoreszierenden Protein- (GFP)-exprimierenden Stammzellen durchgeführt (44, 45, 48). Es konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der neointimalen SMCs der Empfängertiere  $\beta$ -Galactosidase bzw. GFP exprimierten und somit aus dem Knochenmark abstammen (44, 48). In einer weiteren Arbeit wurde bei Wildtyp-Mäusen, nach der Transplantation von  $\beta$ -Galactosidase exprimierenden Stammzellen, eine Drahtverletzung an der A. femoralis durchgeführt. Die entstandene Neointima bestand zu 63% und die Media zu 45% aus  $\beta$ -Galactosidase-positiven Zellen. Ein Teil der SMCs exprimierten den Marker für SMCs  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) und ein Teil den Endothelzellmarker CD31 (44). Um diese SPCs genauer zu charakterisieren, wurden spezifisch aus dem heterogenen Knochenmark  $\beta$ -Galactosidase exprimierende hämatopoetische Stammzellen untersucht. Diese Stammzellen exprimieren die Oberflächenmarker c-Kit<sup>+</sup> (c-Kit-Rezeptor für den Stammzellfaktor) und Sca-1<sup>+</sup> (stem cell antigen-1) und weisen aber keine Expression hämatopoetischer Differenzierungsmarker (Lineage-Marker, lin<sup>-</sup>) auf. Diese Stammzellen wurden daraufhin in knochenmarks-depletierte Empfängermäuse transplantiert. Nach Drahtverletzung der A. femoralis bestand die Neointima zu 43% aus  $\beta$ -Galactosidase-positiven Zellen, von denen wiederum 73% auch  $\alpha$ -SMA exprimierten. (44) In vitro differenzierten sich diese c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>/lin<sup>-</sup> Zellen in Ko-Kultur mit vaskulären SMCs ebenfalls zu SMC-ähnlichen Zellen (44). Des Weiteren konnte man zeigen, dass isolierte Sca-1<sup>+</sup>/lin<sup>-</sup> Zellen aus dem peripheren Blut männlicher Mäuse, die unmittelbar nach einer endothelialen Denudation der A. carotis communis (CCA) in Apolipoprotein E defiziente (ApoE<sup>-/-</sup>) weibliche Mäusen injiziert wurden, im Rahmen der Neointimabildung zu SMCs differenzierten (49). Diese SMCs exprimierten die SMC-spezifischen Proteine  $\alpha$ -SMA und smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC) (49). Einen Einfluss auf die Rekrutierung von SPCs aus dem Knochenmark scheint auch die Art der mechanischen Gefäßverletzung zu haben. Offenbar ist die Rekrutierung von SPCs nach Drahtverletzung häufiger als nach periarterieller Cuffanlage oder Gefäßligatur (50, 51). Diese Unterschiede korrelieren mit der Apoptoserate in der verletzten Gefäßwand, so dass die Schwere der Verletzung mit dem Ausmaß der SPC Rekrutierung assoziiert zu sein scheint. Dies könnte darauf

hindeuten, dass bei einer extensiven Verletzung die ortsansässigen VSMCs für eine Reparatur nicht ausreichen und in diesem Fall zirkulierende SPCs ebenfalls zur Neointimabildung beitragen (52).

Von entscheidender Bedeutung bei der SPC-vermittelten vaskulären Wundheilung ist die Frage durch welche Signale die Mobilisierung und Rekrutierung in die verletzte Gefäßwand gesteuert wird. Hier haben das CXC Chemokin stromal cell-derived factor 1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ , CXCL12) und dessen Rezeptor CXC-Rezeptor 4 (CXCR4) eine wichtige Funktion (49, 53).

### **1.5. Stromal cell-derived factor (SDF)- 1 $\alpha$**

#### **1.5.1. Struktur und Physiologie**

SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 (pre-B-cell growth-stimulating factor) gehört zu einer Gruppe von strukturell verwandten Signalproteinen (Zytokine), die eine chemotaktische Aktivität vor allem für hämatopoetische Zellen besitzen. Zytokine, die wie SDF-1 $\alpha$  bei Zellen eine Wanderbewegung (Chemotaxis) auslösen, bezeichnet man auch als chemotaktische Zytokine oder Chemokine (54).

Aus der Anzahl und Position der Cysteinreste am Amino-Terminus leitet sich die systematische Nomenklatur der Chemokine ab. Man unterscheidet vier Unterfamilien. Bei den CC-Chemokinen ( $\beta$ -Chemokin) folgen die ersten beiden Cysteine direkt aufeinander, bei den CXC ( $\alpha$ -Chemokin)- und CX3X ( $\delta$ -)-Chemokinen sind sie durch eine bzw. drei Aminosäuren voneinander getrennt. Im Gegensatz dazu gibt es bei der C-Familie ( $\gamma$ -Chemokin) nur ein konserviertes Cystein am Amino-Terminus und es wird auch nur eine Disulfidbrücke ausgebildet (55). Obwohl man SDF-1 $\alpha$  als CXC-Chemokin bezeichnet, ähnelt die Anordnung seiner Aminosäuresequenz sowohl CC- als auch CXC-Chemokinen (22% vs. 27% Homologie) (56). Des Weiteren fand man eine erstaunliche Ähnlichkeit der Homologie zwischen unterschiedlichen Spezies. Die SDF-1 $\alpha$  Sequenz unterscheidet sich zwischen Menschen und Mäusen sich in nur einer einzelnen Aminosäure: an Position 18 befindet sich beim Menschen Valin und bei der Maus Isoleucin (57). Die N-Terminale Seite des SDF-1 $\alpha$  Proteins ist für die Rezeptorbindung und Aktivierung verantwortlich, wobei insbesondere die ersten zwei N-terminalen Aminosäuren für die Rezeptoraktivierung essentiell sind (58).

Chemokine binden an G-Protein-gekoppelte Membranproteine mit sieben transmembranalen Domänen (55, 59). Lange Zeit war nur CXCR4 als SDF-1 $\alpha$  Rezeptor bekannt, der wiederum als einziger Chemokinrezeptor mit SDF-1 $\alpha$  nur einen Liganden besitzt (56). Inzwischen ist mit CXCR7/RDC1/Cmkor 1 ein weiterer Rezeptor für SDF-1 $\alpha$  beschrieben worden (60, 61), dessen Funktion allerdings noch nicht genau geklärt ist. Durch die Bindung von SDF-1 $\alpha$  an den Rezeptor CXCR4 erfolgt eine Dimerisierung des Rezeptors und die Aktivierung inhibitorischer G-Proteine sowie zur Freisetzung von G $\alpha$  Proteinen (62). Dies bewirkt die Aktivierung verschiedener nachgeschalteter Signaltransduktionewege. Hierbei kommt es zur Stimulation der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-K) und der Proteinkinase C, die über die Phosphorylierung von *focal adhesion* Proteinen die Migration von Zellen induzieren. Die SDF-1 $\alpha$ -vermittelte Chemotaxis, Zellproliferation und Regulation der Integrinaktivität wird über die PI3-K stimulierte Aktivierung der extracellular signal regulated kinase 1 und 2 (ERK-1 und ERK2) reguliert. Darüber hinaus zeigte sich, dass SDF-1 $\alpha$  über die Bindung an den CXCR4-Rezeptor G-Protein-unabhängig den Janus-Kinase/STAT Signalweg und die nukleare Translokation von NF- $\kappa$ B stimulieren kann (62-65). Die Inaktivierung von CXCR4 findet nach Ligandenbindung durch Endozytose und überwiegenden lysosomalen Abbau des Rezeptors statt (66, 67). Die meisten sogenannten inflammatorischen Chemokine werden unter pathologischen Bedingungen lokal von Zellen des Gewebes oder eingewanderten Leukozyten produziert (68, 69) und binden an die spezifischen Chemokinrezeptoren auf den Leukozyten. Die zweite Gruppe, die homeostatischen Chemokine, wie SDF-1 $\alpha$ , werden dagegen konstitutiv exprimiert. Sie kontrollieren die Relokalisation und Rezirkulation der Leukozyten und beeinflussen damit das Homing, die Reifung, die Differenzierung und die Aktivierung der Leukozyten (70). Die SDF-1 $\alpha$ /CXCR4-Achse übernimmt eine essentielle Rolle in der Zellmigration der Leukozyten während der Gewebemöostase, Organentwicklung und Inflammation. Der chemotaktische Effekt auf Leukozyten bewirkt nicht nur eine Veränderung des Zytoskeletts der Leukozyten, sondern induziert auch die Aktivierung von leukozytären Integrinen, wodurch die Adhäsion an das Endothel ermöglicht wird (71). Darüber hinaus spielt SDF-1 $\alpha$  eine entscheidende Rolle als Homing-Faktor von Stammzellen. Das „Homing“ beschreibt einen mehrstufigen Prozess, angefangen von der Mobilisierung der Stammzellen bzw. Progenitorzellen im Knochenmark, über die gezielte Migration vom Knochenmark ins geschädigte Gewebe

bis hin zur dortigen Invasion (72, 73). Durch die Rekrutierung von Progenitorzellen bei Gefäßschädigungen nimmt SDF-1 $\alpha$  eine entscheidende Rolle bei der Neointimabildung ein (74, 75).

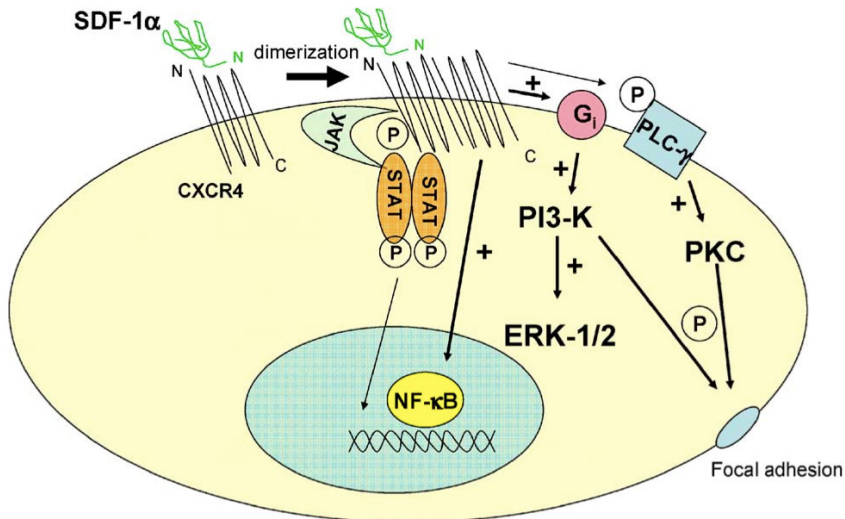


Abb. 2: Mechanismen der Signaltransduktion durch SDF-1 $\alpha$ -CXCR4 Interaktion. Nach der Bindung von SDF-1 $\alpha$  an CXCR4 kommt es zur Rezeptordimerisierung und Aktivierung von inhibitorischer G-Proteinen. Dies führt zur Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege, die eine gesteigerte Phosphorylierung von Komponenten der Focal Adhesions, der ERK-1 und ERK-2, der PLC- $\gamma$ , der PKC sowie der PI3-K zur Folge hat. SDF-1 $\alpha$  induziert die nukleäre Translokation von NF- $\kappa$ B und steigert die DNA-Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B. Ferner binden Janus Kinasen (JAKs) direkt an CXCR4 und werden durch Phosphorylierung aktiviert. Die phosphorylierten JAKs triggern die Aktivierung und die nukleäre Translokation von „signal transducers and activators of transcription“ (STAT) (76)

### 1.5.2. Bedeutung von SDF-1 $\alpha$ und dessen Rezeptor CXCR4 in der Atherosklerose

Während in normalen Arterien SDF-1 $\alpha$  kaum exprimiert wird, ist die SDF-1 $\alpha$  Expression in atherosklerotischen Plaques in SMCs, Endothelzellen und Makrophagen deutlich gesteigert (77). Ferner kommt es auch nach einem Myokardinfarkt zu einer gesteigerten SDF-1 $\alpha$  Expression (78). Interessanterweise zeigte sich bei den Patienten mit instabiler Angina pectoris eine deutliche Reduktion der SDF-1 $\alpha$  Konzentration im Plasma im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris oder gesunden Probanden (79). Dies ging mit einer verminderten Expression von SDF-1 $\alpha$  in Monozyten und CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten einher. Da SDF-1 $\alpha$  die Expression und Sekretion von pro-

inflammatorischen Chemokinen, wie MCP-1 und IL8 aus mononukleären Zellen von Patienten mit instabiler Angina pectoris vermindert, folgerte man, dass SDF-1 $\alpha$  einen antiinflammatorischen Effekt auf koronare Plaques hat (79). Bei ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen führte eine dauerhafte pharmakologische Hemmung des CXCR4 zu einer verstärkten Artherosklerose aufgrund einer gesteigerten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in atherosklerotischen Plaques (80). Entsprechend verhinderte eine Neutrophilendeletion die Exazerbation der Plaques durch die Hemmung von CXCR4. Dies zeigte, dass die CXCR4/SDF-1 $\alpha$ -Achse eine entscheidende Rolle in der Homöostase und Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten und deren Rolle in der Atherogenese spielt (80).

### **1.5.3. Rolle der SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 Achse bei der Neointimabildung**

Verschiedene Arten der Gefäßverletzung führen zu Neointimabildung, restriktiven *Remodelling* und schrittweiser Reduktion des Gefäßlumens. Diese Gefäßwandveränderungen im Rahmen der akzelerierten Arteriosklerose sind durch die Akkumulation neointimaler SMCs gekennzeichnet. Die durch die Gefäßverletzung hervorgerufene Apoptose der medialen SMCs korreliert mit dem Ausmaß der SMC-Rekrutierung. Im Tiermodell wird die SDF-1 $\alpha$  Expression, abhängig vom Schweregrad der Gefäßverletzung, in medialen SMCs gesteigert (49, 50). Darüber hinaus zeigte sich, dass SDF-1 $\alpha$  in atherosklerotischen Plaques und in neointimalen Läsionen nach Gefäßverletzung gesteigert exprimiert wird und dabei eine wichtige Rolle bei der Mobilisierung und lokalen Rekrutierung von SPCs spielt (49, 53, 76). Zusätzlich gibt es Hinweise dafür, dass die gesteigerte Expression von SDF-1 $\alpha$ , monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) und vascular endothelial growth factor (VEGF) in der Gefäßwand mit der SPC Rekrutierung korreliert (50). Bereits einen Tag nach Gefäßverletzung kommt es zu einem vorübergehenden Anstieg der Plasmakonzentration von SDF-1 $\alpha$ . Durch die Veränderung des SDF-1 $\alpha$  Gradienten zwischen dem Knochenmark und der Zirkulation, kommt es zu einer gesteigerten Mobilisation von SPCs in die Zirkulation (49). Zusätzlich bindet SDF-1 $\alpha$  an aktivierte Thrombozyten und verstärkt dadurch die P-Selectin-vermittelte Bindung von SPCs an die verletzte Gefäßwand und somit die Neointimabildung (49, 51). Ähnliche Ergebnisse fand man auch



bei der Transplantatvaskulopathie. Sowohl im Tiermodell als auch in Patienten nach Herztransplantation konnte eine erhöhte SDF-1 $\alpha$  Expression nachgewiesen werden. In experimentellen Restenose- und in Transplantatvaskulopathie-Modellen führte die Hemmung der SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 Achse zu einer Hemmung der SPC Mobilisierung und damit zu einer verringerten Neointimabildung (50, 53, 81). Als wichtigstes Bindeglied zwischen der Gefäßverletzung und der SDF-1 $\alpha$ /CXCR4- vermittelten SPC-Rekrutierung wurde die Apoptose der medialen SMCs unmittelbar nach der Verletzung identifiziert. Man konnte zeigen, dass die SPC-vermittelte Wundheilung von der SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 Achse durch die Apoptose nach Gefäßverletzung induziert wird (53). Des Weiteren geht die Hemmung der Caspaseaktivität mit einer verminderten SDF-1 $\alpha$  Expression einher (53). Die apoptotischen SMCs setzen apoptotische Mikrovesikel („apoptotic bodies“) frei, die die Sekretion von SDF-1 $\alpha$  aus unverletzten medialen Zellen in vitro induzieren (53). Die höchste Apoptoserate und damit SDF-1 $\alpha$  Expression wird im Vergleich mit der Karotidenligatur oder Cuff-Anlage, durch eine mechanische Gefäßverletzung hervorgerufen (50). Im Ischämiemodell wird die SDF-1 $\alpha$  Expression durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  gesteigert und dadurch die Neoangiogenese durch Rekrutierung von EPCs (endothelial progenitor cells) gefördert (82).

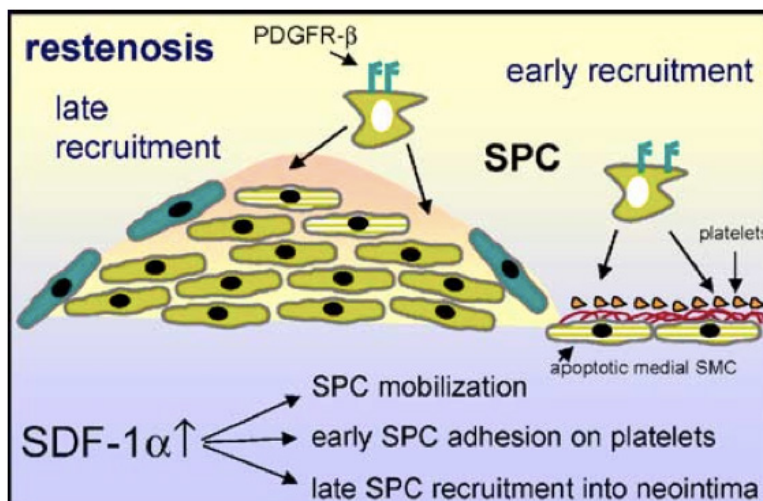


Abb. 3: Schematische Darstellung der SDF-1 $\alpha$ -vermittelten Effekte auf SPCs bei der Entstehung neointimaler Plaques. Neben der Mobilisierung von SPCs in die Zirkulation durch erhöhte SDF-1 $\alpha$  Serumkonzentrationen, führt die gesteigerte neointimale SDF-1 $\alpha$  Expression in der Frühphase der Neointimabildung zur Adhäsion von SPCs über Thrombozyten an der verletzten Gefäßwand und ist während des neointimalen Wachstums wesentlich für die Rekrutierung von SPCs verantwortlich.(76)

## 1.6. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) $\alpha$

### 1.6.1. Struktur und Physiologie

HIF-1 ist ein sauerstoffregulierter Transkriptionsfaktor, der in den meisten kernhaltigen Zellen durch Hypoxie aktiviert wird und eine wichtige Rolle in der Adaptation von Zellen, Geweben und Organismen an hypoxische Bedingungen spielt (83, 84). HIF-1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der sich aus einer konstitutiv exprimierten  $\beta$ - und einer regulierten  $\alpha$ - Untereinheit zusammensetzt. Es sind drei unterschiedliche  $\alpha$ -Untereinheiten bekannt: HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$ . Die  $\beta$ -Untereinheit, die auch als Aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT) bezeichnet wird, gehört zur Klasse der basischen helix-loop-helix (bHLH)/PAS – Proteine. Die bHLH –Domäne kennzeichnet eine Protein-Superfamilie eukaryotischer Transkriptionsfaktoren. Während die HLH-Domäne zur Regulation der Dimerisierung dient, vermittelt die basische Domäne die Bindung an die DNA. Die PAS-Domäne stellt einen zusätzlichen Vermittler der Dimerisierung dar (85, 86) (87). Die Regulation von HIF-1 erfolgt hauptsächlich auf post-translationaler Ebene anhand der  $\alpha$ -Untereinheit. Im Gegensatz zu HIF-1 $\beta$ , das unabhängig von der Sauerstoffversorgung konstitutiv exprimiert wird, ist HIF-1 $\alpha$  unter normoxischen Bedingungen instabil und wird rasch an zwei Prolinresten hydroxyliert und nach Bindung an Ubiquitin durch das Proteasom abgebaut (83, 84, 88-90). Ein weiterer Mechanismus zum Abbau des HIF-1 $\alpha$  ist die sauerstoffabhängige Hydroxylierung von Asparagin an der Position 803, die eine Interaktion zwischen HIF-1 $\alpha$  und dem Ko-aktivator p300 verhindert (91, 92). Da molekularer Sauerstoff für die Aktivität der Prolyl-4-Hydroxylasen und somit für die Hydroxylierung der Prolinreste essentiell ist, kann HIF-1 $\alpha$  unter hypoxischen Bedingungen nicht abgebaut werden (93). Daher akkumuliert HIF-1 $\alpha$  unter hypoxischen Bedingungen, wird phosphoryliert und transloziert aufgrund zweier nuclear localization signals (NLSs) (94) in den Zellkern wo es mit dem konstitutiv exprimierten HIF-1 $\beta$  dimerisiert. Dieser Komplex bindet nun an Hypoxia Response Elements (HREs), die Erkennungssequenz für HIF-1, die sich in den Promoter- oder Enhancerregionen von hypoxieinduzierbaren Genen befinden (92, 95, 96). Über 70 HIF-1 $\alpha$ -regulierte Gene konnten bisher identifiziert werden (97), die eine Schlüsselrolle bei verschiedenen Prozessen, wie Angiogenese, Energiemetabolismus, Erythropoese, Zellproliferation, Apoptosesteuerung, Gefäßremodellierung und vasomotorischer Steuerung, spielen (98).

Bei Normoxämie können vasoaktive Substanzen, Wachstumsfaktoren, Zytokine und O<sub>2</sub>-Radikale zur Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  führen. Hier wird die HIF-Proteinbiosynthese sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationaler Ebene erhöht (93, 99). Die nicht-hypoxischen Stimuli induzieren entweder die HIF-1 $\alpha$  Gentranskription durch Stimulierung des diacylglycerol-sensitive Proteinkinase C (PKC)-Signalweges (93, 99) oder die HIF-1 Translation durch die Aktivierung des Phosphoinositol 3-Kinase (PI3K)/mTOR-Signalweges (93, 99-101). Proinflammatorische Zytokine, wie Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), erhöhen die Expression von HIF-1 $\alpha$  Proteinebene und die DNA-Bindungsaktivität von HIF-1. Dagegen kommt es durch den tumor necrosis faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) nur zu einer vermehrten HIF-1-DNA-Bindung (102). Vasoaktive Peptide, wie Thrombin (103, 104) oder Angiotensin II (99, 103, 104), und Wachstumsfaktoren, wie PDGF-AB (103, 104) oder insulin-like growth factor-1/2 (IGF-1 und IGF-2) (105), führen in VSMCs zu einem Anstieg der HIF-1 Proteinmenge.

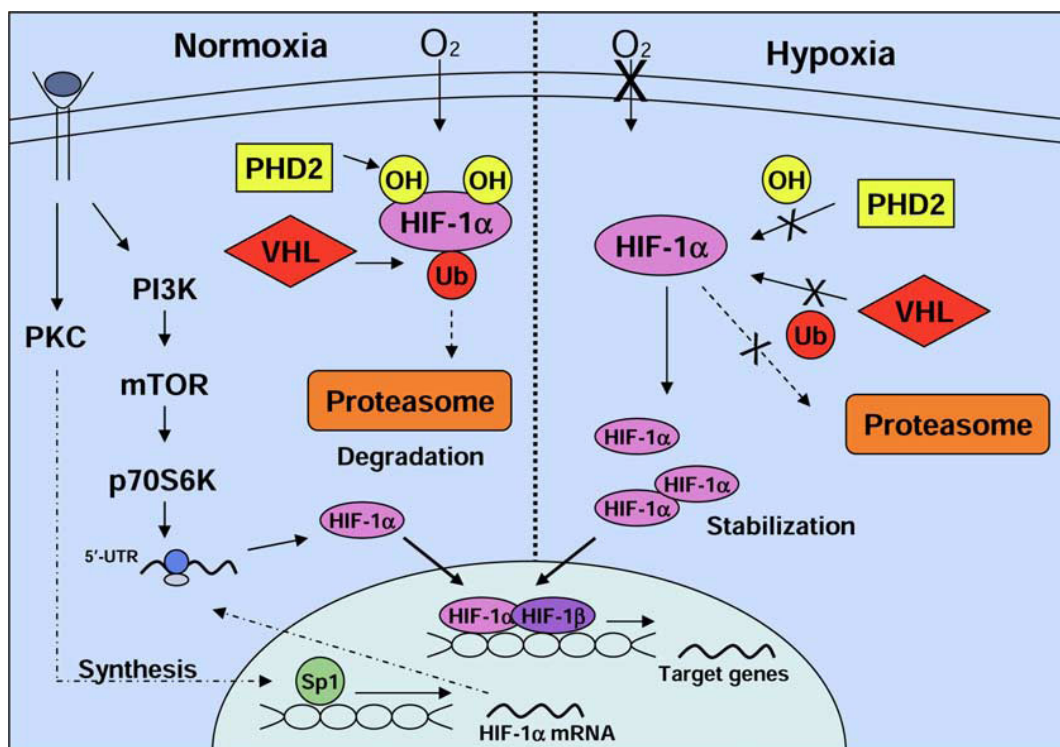


Abb. 4. Sauerstoff-abhängige und -unabhängige Regulation von HIF-1. Unter nicht-hypoxischen Bedingungen wird HIF-1 $\alpha$  durch die PHD2 hydroxyliert, durch pVHL Komplex ubiquitinyliert und über Proteasomen abgebaut. Im Gegensatz dazu wird HIF-1 $\alpha$  unter hypoxischen Bedingungen durch die fehlende Hydroxylierung stabilisiert und vermindert abgebaut. Nach nukleärer Translokation von HIF-1 kommt es zur transkriptionellen Aktivierung der HIF-1 $\alpha$ -Zielgene. Nicht-hypoxische Stimuli induzieren die HIF-1 $\alpha$  Gentranskription durch Stimulierung der PKC, während der HIF-1 Translation durch die Aktivierung des PI3K-Signalwegs bedingt ist. In beiden Fällen erhöht sich die HIF-1 Proteinmenge und dadurch die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 $\alpha$ . (93)

### **1.6.2. Bedeutung von HIF-1 $\alpha$ bei atherosklerotischen Erkrankungen**

HIF-1 $\alpha$  wird in atherosklerotischen Läsionen von Menschen und Mäusen exprimiert (106). In humanen Endarteriektomieproben fand man eine Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  häufig in Makrophagen, aber auch in etwas geringerer Häufigkeit in SMCs (106). Eine Hemmung der HIF-1 $\alpha$  Aktivierung verringert die Bildung lipidbeladener Makrophagen (107). Des Weiteren konnte man zeigen, dass die Deletion von HIF-1 $\alpha$  in myeloischen Zellen von Mäusen einen positiven Effekt auf die Artheroskleroseentstehung hat (108). Der Knock-out von HIF-1 $\alpha$  in myeloischen Zellen von Mäusen führte zu einer verminderten kutanen Inflammation, was auf eine verminderte Monozyteninfiltration zurückzuführen ist (108). HIF-1 $\alpha$  moduliert ebenfalls die Lymphozyten-Zytokin-Zusammensetzung in atherosklerotischen Läsionen. Wird HIF-1 $\alpha$  in T-Lymphozyten übermäßig exprimiert, führt das zu einer verminderten Interferon- $\gamma$  (TH1) und erhöhten IL-10 (Th2) Expression, was zu einer Verringerung der Größe der atherosklerotischen Läsion und ihres Lipidkerns führt (109). Bei einer hypoxischen Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  wird die  $\beta$ 2-Integrinexpression, v.a. CD18, hochreguliert und dadurch zu einer vermehrten Extravasation (110). Sowohl die hypoxie- als auch die durch *reactive oxygen species* (ROS)-vermittelte HIF-1 $\alpha$  Aktivierung, vermittelt in SMCs eine vermehrte Proliferation und Migration. Die dadurch resultierende Zunahme der Dicke der fibrösen Kappe über der atherosklerotischen Läsion trägt möglicherweise zu einer erhöhten Stabilität der Läsion bei (111).

### **1.6.3. Rolle von HIF-1 $\alpha$ bei der Neointimabildung**

Im Bereich des vaskulären Remodellings wurde HIF-1 $\alpha$  als ein entscheidender Mediator bei der Neubildung von Blutgefäßen aus zirkulierenden Progenitorzellen (Vaskulogenese), bei der Ausbreitung bestehender Gefäßsysteme (Angiogenese), bei der Entwicklung von Arterien sowie bei Umbauvorgängen in Arterien, wie man sie bei der pulmonalen Hypertonie findet, beschrieben (112). HIF-1 $\alpha$  induziert eine große Anzahl proangiogenetischer Faktoren, die am vaskulären Remodelling beteiligt sind. Darunter ist VEGF als entscheidender Regulator der physiologischen Angiogenese der Wichtigste (113-117). HIF-1 $\alpha$ -defiziente (Hif1 $\alpha^{-/-}$ ) Mäuse sind nicht überlebensfähig und weisen aufgrund einer verminderten VEGF Expression schwere Defekte der An-

giogenese und der Vaskulogenese auf (118, 119). Darüber hinaus scheint auch eine durch HIF-1 $\alpha$  gesteigerte Expression des VEGF-Rezeptors-1 auf mesenchymalen Zellen aus dem Knochenmark die Vaskulogenese durch eine vermehrte Rekrutierung dieser Zellen zu verstärken (112, 120). In HIF1 $\alpha^{+/-}$  Mäusen mit pulmonaler Hypertonie zeigte sich ferner eine verminderte Verdickung der Gefäßwand, wie sie sonst für diese Form des vaskulären Remodellings charakteristisch ist (121). Entsprechend findet man in Arterien von Ratten mit experimentell-induzierter systemischer arterieller Hypertonie eine transient gesteigerte HIF-1 $\alpha$  Expression, die mit einer Mediahypertrophie und vermehrten Neoangiogenese assoziiert ist (122). Nach einer mechanischen Gefäßverletzung kommt es zu einem frühen Anstieg der HIF-1 $\alpha$  mRNA Expression sowie einem kontinuierlichen Anstieg der HIF-1 $\alpha$  Proteinmenge (123). Man vermutet dass es sich hierbei um eine nicht-hypoxische, transkriptionelle Regulation von HIF-1 $\alpha$  handelt, die möglicherweise auf einer PKC Aktivierung beruht. Es wurde gezeigt, dass nach endothelialer Denudation der intrazelluläre PKC-Signalweg innerhalb von 30 Min. aktiviert wird und die neointimale Hyperplasie beeinflusst (123, 124). Der PI3K Signaltransduktionsweg wird ebenfalls nach einer Gefäßverletzung aktiviert, was den kontinuierlichen Anstieg der HIF-1 $\alpha$  Proteinmenge erklären könnte, der auf eine PI3K- vermittelte translationale Regulation beruhen könnte (84). Man fand ebenfalls eine konstante Erhöhung der HIF-1 $\alpha$  Expression im neointimalen SMCs nach Gefäßverletzung. HIF-1 $\alpha$  war sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern der neointimalen und luminalen Zellen nachweisbar. Diese nukleare Translokation von HIF-1 $\alpha$  ist die Voraussetzung für die Bindung an spezifische Promotersequenzen und der gesteigerten Expression der entsprechenden Zielgene (112), wie z.B. PDGF oder VEGF, die bei der Neointimabildung eine Rolle spielen. Neben den möglichen intrazellulären Regulationsmechanismen der HIF-1 $\alpha$  Expression könnten auf extrazellulärer Ebene Wachstumsfaktoren und Zytokine eine wichtige Rolle spielen. Unmittelbar nach einer endothelialen Denudation kommt es zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems, zur Aggregation von aktivierten Thrombozyten und zur Infiltration mit Leukozyten, wodurch lokal in die Gefäßwand Thrombin, PDGF, TGF, EGF sowie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  freigesetzt wird (28, 125). Die Gegebenheit, dass Thrombin (126) und PDGF-AB (127) bei den Reparaturvorgängen nach Gefäßverletzung eine wichtige Rolle spielen, könnte auf eine zentrale Rolle von HIF-1 $\alpha$  im Rahmen der Wundheilung hinweisen. Darüber hinaus ist bekannt, dass nach Gefäßverletzung im

Rattenmodell eine deutlich erhöhte Expression und Phosphorylierung des PDGF- $\beta$  Rezeptors, assoziiert mit der Aktivierung der PI3-Kinase, auftritt (28, 128). Des Weiteren induziert HIF-1 $\alpha$  nach einer Gefäßverletzung eine Hochregulation von CXCL12 in SMCs, was zu einem vermehrten Rekrutierung von Knochenmarkzellen in das Gebiet der Gefäßverletzung führt und somit ebenfalls zur Neointimabildung beiträgt (123).

## 1.7. Lysophosphatidsäuren (LPAs)

### 1.7.1. Struktur und Physiologie

Die Lysophosphatidsäure (LPA) ist ein relativ einfach strukturiertes Lipid, das aus einem Glycerolgerüst mit einer freien Phosphatgruppe an der C1-Position und einem Fettsäurerest an der C2 oder C3-Position besteht. Der Fettsäurerest kann in der Länge und Zahl der ungesättigten Kohlenstoffbindungen variieren. Diese Variabilität in der Art der Fettsäure und die Form der Bindung an die Glycerolgruppe können einen entscheidenden Einfluss auf die biologische Aktivität und Wirkung haben. LPA ist im Gegensatz zu den meisten anderen Phospholipiden wasserlöslich (129, 130).

#### LPA species

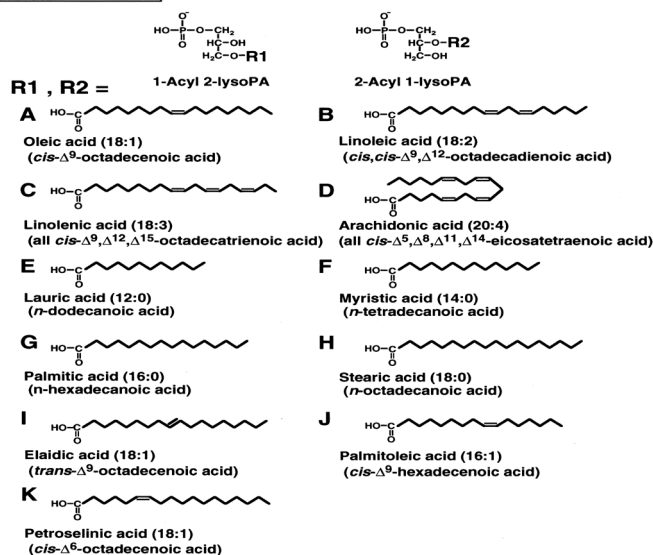


Abb. 5: Strukturformel verschiedener LPA-Derivate und seiner Strukturanaloga. A-K Chemische Struktur der wichtigsten Fettsäuren, die über das C1- oder C2-Atom an LPA gebunden sind. L: Strukturformel der LPA-Analoga Alkyl-Glycerophosphat (GP) und Alkenyl-GP.(131)

LPA wird auf unterschiedlichen Wegen synthetisiert (Abb. 6). Man kann hierbei zwischen Synthesewegen des intrazellulären Fettstoffwechsels und Synthesewegen der LPA-Produktion, die v.a. nach Zellstimulation bedeutsam sind, unterscheiden. Im Rahmen des intrazellulären Fettstoffwechsels ist LPA ein wichtiges Zwischenprodukt bei der Synthese von Phosphatidsäure(PA). LPA entsteht aus Glycerol-3-Phosphat (G3P) und acyl-CoA durch die Glycerophosphat-Acyltransferase sowie aus Monoacylglycerol (MAG) durch die Monoacylglycerolkinase. Diese Schritte laufen v.a. in den Mitochondrien und Mikrosomen ab (132, 133). Nach Zellstimulation lassen sich drei Wege der LPA-Bildung unterscheiden: Die thrombozytäre, membranassoziierte LPA-Synthese, die LPA Synthese aus membranständiger Phosphatidsäure (PA) und die LPA-Synthese mittels in Plasma vorhandener Lysophospholipase D. Aktivierte Thrombozyten setzen Lysophosphatidylcholin (LPC) frei, das durch eine plasmaständige Lysophospholipase D (Lyso-PLD, Autotaxin) zu LPA katalysiert wird (134, 135). Etwa die Hälfte der im Serum vorhandenen LPA-Menge entsteht plättchenabhängig (134). Beim zweiten Syntheseweg hydrolysiert eine nicht-pankreatische, sekretorische Phospholipase A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub> oder Typ II PLA<sub>2</sub>) Phospholipide von Mikrovesikeln, wobei aus oberflächlich angehäufter Phosphatidsäure (PA) LPA entsteht. Solche Mikrovesikel werden u.a. von Blutzellen unter dem Einfluss inflammatorischer Stimuli (»Streßreize«) abgeschnürt (136). Beim dritten Syntheseweg wird aus zirkulierendem Lysophosphatidylcholin (LPC) mit Hilfe von Lysophospholipase D LPA gebildet. LPA bindet an drei *endothelial differentiation gene* (EDG)- G-Protein gekoppelte Rezeptoren, LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub> und LPA<sub>3</sub>.(137), sowie an drei Rezeptoren, LPA<sub>4-6</sub>, die eher verwandt mit purieryen G-Protein gekoppelten Rezeptoren sind (137-139). Zusätzlich zu den GPCRs, scheint besonders in Makrophagen und VSMCs, ein Teil der LPA-Wirkung durch die Aktivierung des nuklearen Rezeptor PPAR $\gamma$  vermittelt zu sein (140, 141). Bezüglich des Abbaus von LPAs sind gegenwärtig drei verschiedene Wege bekannt. Durch die Lipidphosphat Phosphohydrolasen(LPP) werden LPAs und PA dephosphoriliert (142-144). Die LPA-Acetyltransferase wandelt durch die Übertragung einer Acylgruppe, LPA zur Phosphatidsäure um (145). Als dritte Möglichkeit

der LPA-Inaktivierung sind Lysophospholipasen anzusehen, welche durch Abspaltung der Acyl-Gruppe LPA zu Glycerol-3-Phosphat abbauen (146).

Nachdem LPA lange nur als Vorläufer der Phospholipidbiosynthese in eukaryotischen und prokaryotischen Zellen bekannt war, zeigte sich das LPA ein intrazelluläres Signalmolekül ist, das schnell aus aktivierten Zellen, wie zum Beispiel Thrombozyten, freigesetzt wird und die Zielzelle via Rezeptoren auf der Zelloberfläche beeinflusst (147). LPA ist ein wichtiger Mediator für die Wundheilung und Regeneration von Geweben und wirkt als autokriner Stimulator der Thrombozytenaggregation (148). Darüber hinaus scheint es eine wichtige Rolle in der Tumorbilogie (149) sowie bei der Entwicklung und Funktion des Nervensystems zu spielen (150).

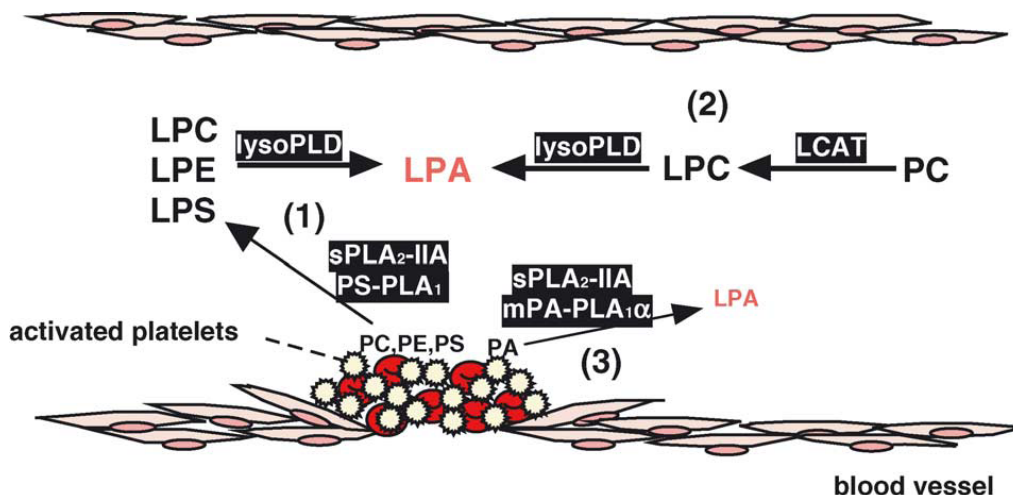


Abb. 6: Verschiedene Stoffwechselwege für die Bildung von extrazellulärem LPA. (1) Etwa die Hälfte des LPA im Serum wird über die Bildung von LPL aus Phospholipiden der Membran von aktivierten Thrombozyten durch lösliche Phospholipasen vermittelt mit der nachfolgenden Umwandlung in LPA durch lysoPLD. (2) Die nicht zellvermittelte LPA-Synthese führt im Serum auch über lysoPLD. (3) LPA kann auch aus Phosphatidsäure (PA) der Zellmembran durch lösliche Phospholipasen gebildet werden. (151)

### 1.7.2. Bedeutung der LPA bei atherosklerotischen Erkrankungen

LPA ist ein aktiver Bestandteil von mildly-oxidized LDL Partikeln und ist in der Lipidkernregion menschlicher Atheroskleroseplaques vermehrt zu finden (5, 8, 152-155). Darüber hinaus regt LPA die Aktivierung von Endothelzellen und Plättchen an (155). In vitro konnte man zeigen dass LPA NF-κB aktiviert und die Adhäsion von Monozyten an die Endothelzellen unter statischen Bedingungen erhöht. Dies ge-



schieht durch die vermehrte Freisetzung von Adhensionsmolekülen und Chemokinen wie intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-Selektin und vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) (156-159). Die LPA induzierte endotheliale ICAM-1 Expression wird durch den LPA<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt. Über die Rezeptoren LPA<sub>1</sub> und LPA<sub>3</sub> kommt es zu einer Freisetzung von monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), durch LPA stimulierte Endothelzellen (158, 160). In Mäuse Karotiden konnte nachgewiesen werden, dass die atherogene Monozytenadhäsion unter Flussbedingungen primär durch das CXC Chemokin CXCL1 vermittelt wird (161, 162). CXCL1 ist in intrazellulären Vesikeln der Endothelzellen gespeichert (163). Diese LDL-induzierte Sekretion von endothelialen CXCL1 wird durch ungesättigte LPA-Arten vermittelt und bedarf die Aktivität von ATX (Autotaxin) (164). Dieser sekretorische Effekt der LPA wird durch die LPA<sub>1/2</sub> induzierte Aktivierung der Rho-assoziierten-Doppelhelix-Proteinkinase vermittelt. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch ungesättigte Fettsäuren induziert jedoch die transkriptionale Hochregulierung von CXCL1 in Endothelzellen, was auf eine biphasische Antwort hinweist (164). Dieser Vorgang von LPA auf CXCL1 ist wesentlich für die Förderung der Rekrutierung atherogener Monozyten und der Entstehung von Atherosklerose in vivo. Die Hyperlipidämie-induzierte Monozyten Adhäsion an der Gefäßwand von Karotiden wird durch die pharmakologische Hemmung von LPA<sub>1/3</sub> fast komplett aufgehoben, was darauf hinweist das LPA ein wichtiger Mediator des pro-atherogenen Effekts von ox-LDL ist (164). Diese reduzierte Monozyten Rekrutierung könnte die Hemmung der Atherogenese erklären die durch die Blockierung von LPA<sub>1/3</sub> Rezeptoren zu sehen ist (164). Humane Monozyten und Makrophagen exprimieren primär LPA<sub>1</sub> und LPA<sub>2</sub>. Man konnte zeigen das LPA die Wirkung von ox-LDL auf die Monozytenaktivierung durch LPA<sub>1</sub> vermittelt. Diese Ergebnisse stimmen auch mit den Resultaten überein, dass LPA die Expression vom proatherogenen Zytokin IL-1 $\beta$  in einer GPCR-abhängigen Weise in einer Mäusemakrophagen Zelllinie auslöst (165). Darüber hinaus, erhöht LPA die Aufnahme von ox-LDL in Monozyten/Makrophagen (165, 166).

SMCs akkumulieren in fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques, und die Apoptose von SMCs ist assoziiert mit der akzelerierten Arteriosklerose. Die exazerbierte Proliferation von SMCs und die Konversion zu einem pro-inflammatorischen SMC-Phenotyp könnte jedoch die Progression der Atherosklerose durch eine gesteigerte Monozyten Rekrutierung fördern (167). LPA stimuliert maßgebend die

Proliferation von angezüchteten SMCs und trägt mit großer Wahrscheinlichkeit zur ox-LDL induzierten SMC Proliferation bei (168-171). LPA vermittelt die MM-LDL induzierte Expression von CCL20 in SMC durch LPA-Rezeptoren, die von atherosklerotischen Plaques ausgeschieden werden und im Kreislauf von Patienten mit Hyperlipidämie erhöht sind (172). Die funktionelle Rolle von LPA induziertem CCL20 muss jedoch noch bestimmt werden. Der *tissue factor* (TF) ist eine entscheidende Determinante der Thrombogenität von atherosklerotischen Plaques. LPA reguliert die TF Expression in SMC durch G<sub>1</sub>-Protein-vermittelte Aktivierung von ERK1/2 nach oben (173). Des Weiteren induziert LPA die proatherogenen Faktoren CCL2 (MCP-1) und IL6 in humanen vaskulären SMCs in vitro (174).

### 1.7.3. Rolle der LPA bei der Neointimabildung

Ein entscheidender Teil der Neointimabildung nach Gefäßverletzung ist die Migration und Proliferation von medialen und vaskulären SMCs (175).

In Vitro konnte man zeigen, dass LPA über die Aktivierung des LPA<sub>1</sub> Rezeptors und G<sub>i/q</sub> Proteinen die Proliferation von SMCs stimuliert. Diese Aktivierung schließt ebenfalls PKC, ERK1/2, den PI3K/PKB (Akt) Signalweg und die MAPK Kaskade mit ein (168, 170, 176, 177). Durch die Aktivierung des p38MAPK Signaltransduktionsweg stimuliert LPA über den G<sub>i/q</sub>-Protein gekoppelten Rezeptor LPA<sub>1</sub> die Migration vaskulärer SMCs (170, 171). In VSMCs aus der Rattenaorta konnte eine spezifische Aktivität von ungesättigten LPAs auf das Differenzierungsverhalten in vitro nachgewiesen werden. Die ungesättigten LPAs (16:1,18:1 und 18:2) induzieren im Gegensatz zu gesättigten LPAs die Dedifferenzierung von VSMCs durch eine Aktivierung der ERK und der p38MAPK, ähnlich wie durch PDGF-BB und EGF. Diese Entdifferenzierung wird als entscheidender Faktor für vaskuläre Wundheilung und Neointimabildung gewertet (178).

Um die Rolle von LPAs beim *vascular remodelling* in vivo zu untersuchen, wurden unverletzte Karotiden (CCA) von Ratten kurzzeitig mit gesättigten und ungesättigten LPAs inkubiert (141, 179). Nur nach Inkubation von ungesättigten LPA-Derivaten wie LPA 20:4 und LPA 1-AGP fand man bereits nach wenigen Wochen eine neointimale Hyperplasie (141). Dagegen hatten gesättigte LPA-Derivate, wie LPA 18:0, keinen Effekt auf die Gefäßwand (179). Durch die Gabe eines Gi-Protein-Inhibitors Pertus-

sistoxin und eines kombinierten LPA<sub>1</sub>- und LPA<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten kam es zu einer ca. 50%-igen Reduktion der LPA 20:4-induzierten Neointima. Durch die Hemmung der LPA 18:1 (ungesättigte LPA) induzierten ERK und p38MAPK Aktivierung konnte man die Neointimabildung unterbinden (179). Sowohl im Tiermodell mit Mäusen mit einem PPAR<sub>γ</sub>- Mangel in den vaskulären Zellen, als auch durch die Behandlung mit einem PPAR<sub>γ</sub>- Antagonisten konnte die durch LPA 20:4 und 1-AGP vermittelte Neointimabildung vermindert werden (141). Allerdings wurde nach einer mechanischen Gefäßverletzung sowohl im Tiermodell als auch im Menschen eine Reduktion der Neointima durch PPAR- $\gamma$  Agonisten beschrieben (180-182), so dass unklar bleibt ob der PPAR- $\gamma$  Signaltransduktionsweg tatsächlich die Effekte von ungesättigten LPAs nach Gefäßverletzung vermittelt. Nachdem man bei LPA<sub>1</sub> und LPA<sub>2</sub> – defizienten Mäusen nach Ligatur der Karotis keine Neointima fand, zeigte sich bei LPA<sup>-/-</sup> Mäusen eine gesteigerte Bildung einer neointimalen Hyperplasie. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die LPA Rezeptoren aus der edge-Familie eine wichtige Rolle bei der Gefäßreparatur spielen (183). In vitro fand man, dass ungesättigte LPAs die Expression von SDF-1 induzieren. Blockierte man die Rezeptoren LPA<sub>1</sub> und LPA<sub>2</sub> durch den Rezeptorantagonist Ki16425 wurde die Expression von SDF-1 gehemmt (83). Es konnten nun auch Derivate der Lysophosphatidsäure identifiziert werden, die eine gesteigerte HIF-1 $\alpha$  Expression hervorrufen (184). Ungesättigte LPA induziert die Expression von HIF-1 $\alpha$  in verschiedenen Tumorzelllinien durch Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR Signaltransduktionsweges (184) und von SDF-1 $\alpha$  in mesenchymalen Stammzellen (83, 184). In vivo konnte bereits gezeigt werden, dass LPA durch eine vermehrte HIF-1 $\alpha$  Expression die Metastasierung von Ovarialkarzinomzellen fördert (170).

### 1.8. Fragestellung

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die SDF-1 $\alpha$ /CXCR4-Achse die Neointimabildung nach mechanischer Gefäßverletzung reguliert. Dies geschieht über die Mobilisation und die Rekrutierung von Vorläuferzellen glatter Muskelzellen (smooth muscle progenitor cells/ SPCs). Es ist bekannt, dass die Apoptose der SMCs nach Gefäßverletzung wesentlich für die gesteigerte SDF-1 $\alpha$  Expression in der Gefäßwand verantwortlich ist. Die apoptotischen medialen SMCs setzen Mikovesikel

(„apoptotic bodies“) frei, die nicht nur die SDF-1 $\alpha$  Expression induzieren sondern auch als Quelle für Vorstufen von LPA dienen könnten. In mehreren Studien konnte man zeigen, dass die Inkubation von Rattenkarotiden mit ungesättigten LPA Derivaten zu einer neointimalen Hyperplasie führt. Obwohl man *in vitro* zeigen konnte, dass LPA als ein mitogener Wachstumsfaktor für SMCs fungieren kann, ist der exakte Prozess der LPA induzierten Neointimabildung noch nicht geklärt. Da man *in vitro* zeigen konnte, dass LPA die Expression von SDF-1 $\alpha$  induzieren kann und bestimmte LPA Derivate eine gesteigerte HIF-1 Expression hervorrufen könnte die LPA induzierte Neointimabildung mit einer SDF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\alpha$  Expression zusammenhängen. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht ob gesättigte und ungesättigte Lyso-phosphatidsäuren nach Inkubation eine neointimale Hyperplasie im Mausmodell induzieren können. Des Weiteren wurde geprüft, ob diese Neointimabildung mit der Expression von SDF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\alpha$  assoziiert ist und mit einer verstärkten Mobilisation von SPCs im peripheren Blut einhergeht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Antikörper, Reagenzien und Materialien

#### 2.1.1. Antikörper

Anti- $\alpha$ -*smooth-muscle* Aktin, monoklonaler AK, Klon 1A4, Klasse IgG2a Kappa, hergestellt in Maus, Fa. Dako, Hamburg, Deutschland

Anti-Maus-Mac-2, monoklonaler AK, Klon M3/38, Klasse IgG2a, Spezies Ratte, Fa. Cedarlane, Burlington, Ontario, Kanada

Monoklonaler Antikörper Human/Maus anti-CXCL 12/SDF-1 $\alpha$ , R&D

Polyklonaler Antikörper Kaninchen anti-HIF-1 $\alpha$ , Novus Biologicals

Biotinylierter Anti-Ratte-IgG (H+L), Klasse IgG, hergestellt in Hase, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A

Biotinylierter Anti-Ziege-IgG, Klasse IgG, hergestellt in Hase, Fa. Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.

Biotinylierter Anti-Kaninchen-IgG, Klasse IgG, hergestellt in Schaf, Fa. Serotec, NC, U.S.A

Normal Kaninchen-IgG AK, Klasse IgG, negative Kontrolle, Fa. Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.

Anti-Maus/anti- Kaninchen Ig, Peroxidase Mikropolymergekoppelt (ImmPRESS™), Vector Laboratories

Anti-Kaninchen IgG-biotingekoppelt, hergestellt in Schaf, Serotec GmbH

Biotin-konjugierter Maus *Lineage Panel*, Klasse IgG, Fa. BD Pharmingen, Cat. 559971

R-Phycoerythrin-konjugierter Ratte-anti-Maus Ly-6A/E (Sca-1) monoklonaler AK, Klasse IgG<sub>2a</sub>, Spezies Ratte, Fa. BD-Pharmingen

#### 2.1.2. Reagenzien

Alcian blau 8 GX, Sigma A5628

Alkohol 70%, 96%, 100%, Apotheke Innenstadt Universität München

Antisedan®-Injektionslösung, Pfizer GmbH

Augensalbe (Bepanthen®- Augen- und Nasensalbe), Roche Consumer Health GmbH

BD-FACSFlow™, BD-Biosciencis

BD FACS-Lysing Solution 10x, BD-Biosciencis

Bovine Serum Albumine, Fraktion V>96%, Sigma

Brilliant-Crocein Scarlet Fluka, 27970,C.I. 27290

Cutasept F

DAB *Substrate Kit Peroxidase* SK 4100, Vector® Labs

Di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat, Roth

Dormitor®-Injektionslösung, Pfizer GmbH

Eisen(III)-Chlorid Merck, 8.03945.0500

Essigsäure 100%, Merk GmbH

Ethanol 100%, 96%, 70%, Apotheke Innenstadt Uni-München

FITC-Streptavidin (Vector Labs)

Impress Universal Reagent Peroxidase MP 7500

Iod, Sigma

Hämalaunlösung

Hämatoxylin Sigma, H3136

Hämolysepuffer (BD FACS™Lysing Solution), Becton Dickinson GmbH

Heparin-Natrium 25000 I.E. Fa. Braun

Kaliumcarbonat, Merck

Kaliumhydrogenphosphat, Roth GmbH

Kaliumiodid, Sigma

Ketavet®-Injektionslösung, Pharmacia & Upjohn

LPA Derivat 20:4 (1-Arachidonoyl-2-Hydroxy-sn-Glycero-3-Phosphate), Avanti Polar Lipids

LPA-Derivat 18:0 (1-Acyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphate), Avanti, Polar Lipids,

LPA-Derivat 1-AGP(D(+))sn-1-O-oleyl-glyceryl-3-posphate (1AGP),Echelon

NaCl-Lösung 0,9% 100 ml, Fa. Braun

Natriumchlorid, Merck

Natrium-Hydrogencarbonat, Merck

Natriumhydroid, Sigma

Paraformaldehyd, reinst, Roth GmbH  
Pferdeserum, Vector Laboratories  
Phosphorwolframsäure Hydrat, Sigma  
Proteinase K, Sigma  
Rabbitserum C12SA, Serotec  
Saffron du Gatinais, Sigma S8381, C.I. 75100  
Salzsäure, Sigma  
Säurefuchsin Merck, 105231  
Säure-Hämalaunlösung, nach P.Mayer, Apotheke Innenstadt Uni-München  
Schafsserum, Serotec GmbH  
Tri-natriumcitrat, Roth GmbH  
TRIS-HCl, Sigma  
Tween® 20, P-7949, Sigma  
Vectashield®-Einschlusslösung, Vector® Labs  
Vecta Mount®-Einschlusslösung  
Wasserstoffperoxid, reinst, Apotheke Innenstadt Uni-München  
Xylol, Apotheke Innenstadt Uni-München

### **2.1.3. Lösungen**

#### **10 mM PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung) (pH=7,0-7,6):**

7,4 g Dinatriumhydrogenphosphat  
36 g Natriumchlorid  
2,1 g Kaliumhydrogenphosphat  
5000 ml Aqua dest.

#### **4% Paraformaldehyd-Lösung (pH=7,4 - 8,0):**

16 g Paraformaldehyd  
200 ml Aqua dest.

Leicht aufwärmen und ca. 6 ml Natriumhydroxid zum Auflösen dazugeben,

pH=7,4-8,0 Wert Einstellung mit Salzsäure

200 ml zweifach PBS

Filtrieren

**10 mM Citratpuffer 0,05% Tween 20 (pH=6):**

2,94 g Tri-natriumcitrat

2000 ml Aqua dest.

pH=6 Wert Einstellung mit Salzsäure

0,5 ml Tween 20

**0,1% Proteinase K Aufschlusspuffer:**

0,1 g Proteinase K

100 ml Aqua dest.

**3%-ige Essigsäure:**

97 ml Aqua dest.

3 ml Essigsäure100%

**1%-ige Essigsäure:**

99 ml Aqua dest.

1 ml Essigsäure100%

**Waschpuffer - 0,5% BSA:**

0,5 g BSA

99,5 ml PBS



#### **2.1.4. Geräte**

Brutschrank (Regler RD2), WTB Binder

CCD-Kamera, (KY-F75U, C-Mount), JVC

Dissektionsmikroskop, (KL 1500 LCD), Carl Zeiss

Durchlicht-Mikroskop (Leica DMRBE), Leica

Einbettautomat (Shandon Pathcentre®), Thermo Electron GmbH

FACScalibur®-Gerät, Becton Dickinson GmbH

Paraffinspendeautomat (Microm EC 350 Paraffin Embedding Center), Microm International GmbH

Rotationsmikrotom, Microm HM 360, Microm International GmbH

Thermoplatte (Tempcontrol 37 analog), Carl Zeiss

Thermoschüttler (Thermomixer comfort), Eppendorf

Thermostat WTB Binder

Vortex-Genie Bender & Hobein AG

Waage Adventurer™, Ohaus GmbH

Watt-Mikrowelle (Severin 700), Severin

Zentrifuge Rotina 48 R, Hettich

#### **2.1.5. Verbrauchsmaterialien**

Augenschere (Nachstarschere Vannas, 85mm), Aesculap

Chirurgischer Faden (Seraflex EP2, (3/0), Serag Wiessner

Deckgläschen 18x18mm, Fa. Menzel-Gläser

Einbettkassetten, Sanowa Laborprodukte GmbH

Falcon Rundboden-Röhrchen 5 ml, BD Biosciences

Filter (110mm), Sartorius Biotech GmbH

Filterpapier, Schleicher & Schnell BioScience

Heparinisierte Einmal-Kapillarpipetten, Hirschmann Laborgeräte GmbH

Katheter (rat intrathecal Katheter), Alzet

Mikropinzette (Uhrmacher Typ, 0,2 mm, gebogen), Aesculap

Pipetenspitzen ep T.I.P.S. Standard 0,1-10 $\mu$ l, 20-300 $\mu$ l, 50-1000 $\mu$ l, Eppendorf

Polyethylenschlauch (0,28 x 0,16mm), VWR

Reagiergefäß Easycap 1,5ml, Sarstedt

Reagiergefäß Safe-lock Tube 0,5 ml, Eppendorf

Rotilabo<sup>®</sup>-Universal-Indikatorpapier Typ Eco, Roth

SuperFrost plus<sup>®</sup> Gold Objektträger, Fa. Menzel-Gläser

Tesa-Film, Tesa AG

Wundklammern (Michel Wundklammern 7,5 x 1,75 mm), Aesculap

## 2.2. Versuchsablauf

Der Versuchsablauf wird in Abbildung 7 zusammengefasst. Die Methodik der einzelnen Untersuchungen wird in den nachfolgenden Kapiteln im Detail erläutert.

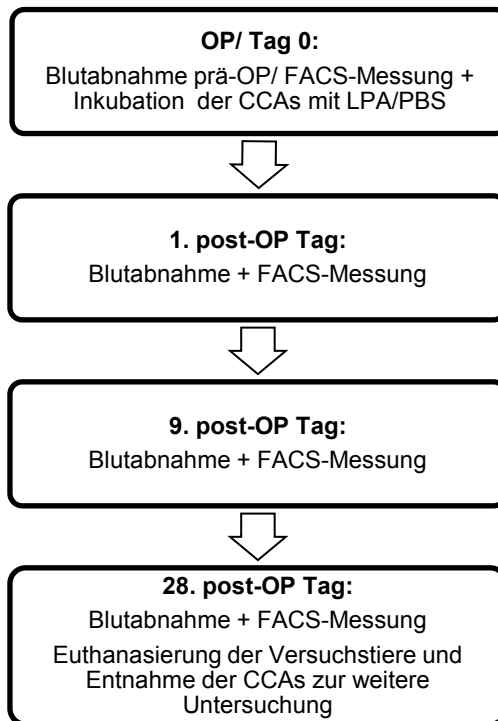


Abb. 7: Versuchsablauf

### **2.3. Mäusestämme und Tierhaltung**

In der vorliegenden Arbeit wurden C57BL/6 Wildtypmäuse (Charles River, Sulzfeld) im Alter von 8-10 Wochen mit einem Gewicht von 18-21g verwendet. Die Aufstallung der Mäuse sowie die Operationen und Organentnahmen erfolgten in der Zentralen Versuchstierhaltung (ZVH) der LMU München (Standort Innenstadt, Nußbaumstr. 20, 80336 München). Die Mäuse wurden in isoliert ventilierten Käfigen (IVC Typ 2 long, max 5 Mäuse) mit einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Temperatur betrug 20-22° bei einer Luftfeuchtigkeit von 50-60%. Es erfolgten tägliche Kontrollen der Wasser und Futtermittellieferung. Der Zustand der Tiere und die Sauberkeit der Käfige wurden ebenfalls alle 24h überprüft. Die Käfige wurden darüber hinaus mindestens zweimal pro Woche autoklaviert und die Streu gewechselt. Vor dem Experimentbeginn waren die Mäuse zur Akklimatisierung mindestens 10 Tage im Tierstall. Ab Versuchsbeginn wurde das jeweilige Tier bis zum Versuchsende in Einzelkäfigen gehalten. Das Tierversuchsvorhaben wurde bei der Regierung von Oberbayern angemeldet und gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes genehmigt. Zur Gesundheitskontrolle wurden gemäß den FELASA-Guidelines regelmäßige serologische, bakteriologische und parasitologische Untersuchungen durchgeführt.

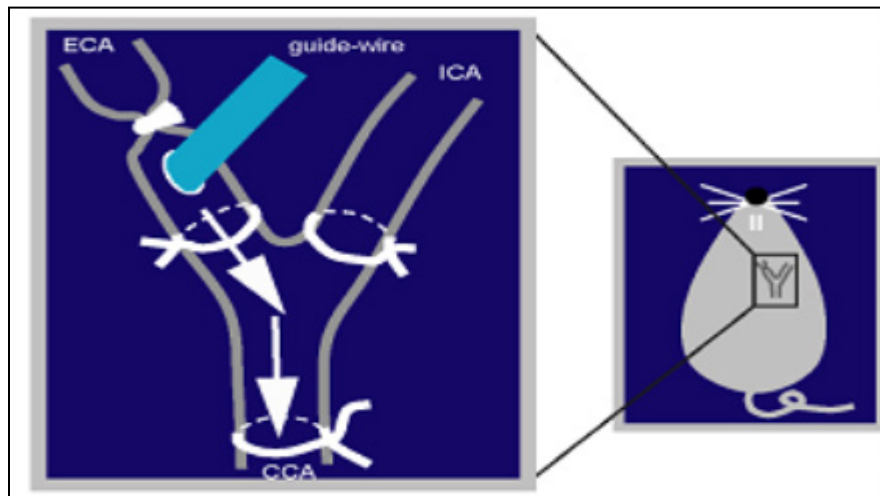
### **2.4. Anästhesie der Versuchstiere**

Die Anästhesie der Versuchstiere erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion von 0,3mg/kg Medetomidin Hydrochlorid (Dormitor®) und 0,6mg/kg Ketamin Hydrochlorid (Ketavet®). Nach dem Eingriff erhielten die Mäuse ggf. 0,2mg/kg Atipamezol Hydrochlorid (Antisedan®) zur Antagonisierung der Anästhetika.

### **2.5. Intraluminale Applikation von Lysophosphatidsäure (LPA)**

Nach der Narkotisierung wurden die Augen mit Bepanthen® Augensalbe vor dem Austrocknen geschützt und die Tiere auf einer Thermoplatte mittels Fixierung der vier Ext-

remitäten durch Klebestreifen positioniert. Das Operationsgebiet wurde daraufhin rasiert und desinfiziert. Nach der Hautinzision am Hals in der Medianlinie wurde die linke Karotisbifurkation freipräpariert und ein dünner Faden um die A. carotis interna (ICA) und die A. carotis communis (CCA) gelegt, um eine vorübergehende Unterbrechung der Perfusion zu ermöglichen. Die linke A. carotis externa (ECA) wurde distal mit einem Faden abgebunden. Etwas weiter kaudal erfolgte eine Arteriotomie über die ein Polyethylenkatheter in die ECA eingeführt und fixiert wurde (Abb. 8). Dabei wurde darauf geachtet dass der Katheter keinerlei Berührungspunkte mit der CCA hat. Während die Perfusion der CCA weiter unterbunden war, wurde 100µl LPA 20:4 (40µM), 1-AGP (40µM), LPA18:0 (40µM) oder PBS Lösung über den gelegten Katheter intraluminal injiziert und das Gefäß 30 min. damit inkubiert. Nach dem Absaugen der Lösung und der Entfernung des Katheters wurde die Arteriotomie durch Ligatur der ECA verschlossen und der Blutfluss in der CCA wiederhergestellt. Der Wunde wurde durch Wundklammern verschlossen (141). Die gesamte Operation erfolgte unter einem Auflichtmikroskop.



*Abb. 8: Darstellung der intraluminalen Inkubation der A. carotis communis (CCA) durch einen PE-Katheter (0.16mm). Zunächst wurde die A. carotis externa (ECA) ligiert und anschließend die CCA und die A. carotis interna (ICA) mittels eines Fadens vorübergehend abgebunden. Durch eine kleine Arteriotomie kaudal der ECA-Ligatur wurde der PE-Katheter in die A. carotis externa eingeführt und die A. carotis communis mit LPA/PBS inkubiert. Nach Entfernung der In-*

*kubationslösung und des PE-Katheters wurde die ECA durch eine kaudale zweite Ligatur verschlossen und der Blutfluss über die CCA in die ICA wiederhergestellt (141).*

## **2.6. Messung der SPCs im Vollblut**

Der Nachweis der SPC-Mobilisierung nach LPA Inkubation erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

### **2.6.1. Durchflusszytometrie (Fluorescence- Activated Cell Sorting, FACS®)**

Bei der Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie werden suspensierte Einzelzellen an einem fokussierten Lichtstrahl (Laser) vorbeigeführt. Dabei senden die Zellen in Abhängigkeit ihrer Größe, morphologische Eigenschaften oder spezifischen Anfärbung charakteristische Lichtsignale aus, die mittels geeigneter Detektoren gemessen werden. Das Untersuchungsmaterial wird mit fluoreszierenden Antikörpern angefärbt (185). Die Zellsuspension wird vom Durchflusszytometer angesaugt. Die Zellen werden durch hydrodynamische Fokussierung linear angeordnet und einzeln nacheinander an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Das optische Detektionssystem und die Elektronik quantifizieren dabei die Streulicht- und Fluoreszenzemission jeder einzelnen Zelle (185). Die Lichtstreuung (light scattering) ist ein physikalischer Prozess, bei dem ein Partikel (eine Zelle) mit Licht interagiert. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, forward light scatter) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel (0-10°) und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC, side light scatter) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel (ca.90°), die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in der Zelle beeinflusst wird (185). Die Charakterisierung der Zellpopulation in der vorliegenden Arbeit erfolgte mit Hilfe von Antikörpern, die mit unterschiedlichen fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind. Die gemessene Lichtemission/Fluoreszenz verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Während einer FACS®-Messung können verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gemessen werden, da sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei

einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff, charakteristische Emissionsspektren verfügen (185). Hierbei können die Lichtstreuungsparameter oder verschiedene Fluoreszenzeigenschaften gegeneinander aufgetragen werden (185). Die in dieser Arbeit gewonnenen Datensätze wurden mit dem WinMDI-Programm ausgewertet und in Form von dot-plots dargestellt. In einem dot-plot werden auf der x- und y-Achse jeweils die Intensitätsverteilungen von zwei Messparametern aufgetragen. Jede gemessene Zelle entspricht einem Punkt (dot). In der Regel werden zur Differenzierung der Zellpopulationen zunächst FSC gegen SSC in einem dot-plot aufgetragen. Weitergehende Analysen von Zellen, die über mehr als zwei Parameter definiert werden sind über das Auswählen bestimmter Regionen und Zellgruppen im dot-plot (sogenanntes „gating“) , wurden durchgeführt, wodurch die selektierten Zellen gesondert betrachtet oder auch exkludiert werden können (185).

### **2.6.2. Blutabnahme über die Schwanzvene**

Zur Probengewinnung für die FACS-Analyse wurde den Versuchstieren ca. 50µl Blut zu vier verschiedenen Zeitpunkten über die Schwanzvene mittels heparinisierten Einmal-Kapillarpipetten abgenommen

1. Am OP Tag vor der Inkubation der CCA mit LPA oder PBS
2. 24 h nach der Inkubation der CCA mit LPA oder PBS
3. 9 Tage nach der Inkubation der CCA mit LPA oder PBS
4. 28 Tage nach der Inkubation der CCA mit LPA oder PBS

Die Proben wurden innerhalb von einer Stunde nach Entnahme mit den Antikörpern angefärbt und gemessen.

### 2.6.3. Vorbereitung der Proben für die Messung

Zur Quantifizierung des Anteils der Progenitorzellen (Vorläuferzellen) wurde der Anteil von Sca-1-positiven und Linreage-negativen Zellen (Sca-1<sup>+</sup>/Lin<sup>-</sup>) im peripheren Blut der Mäuse gemessen wurde. Das entnommene periphere Blut wurde mit Sca-1-PE-gekoppelten-AK (BD Pharmingen PE anti-mouse Ly-6A/E (Sca-1), Cat: 553336) und biotinyliertem Mouse Lineage Panel-AK (CD3, CD11b, CD45, Gr-1, TER-119, BD Pharmingen Cat: 559971) nach folgendem Protokoll markiert (49).

#### Protokoll für die Anfärbung der Sca-1<sup>+</sup>/Lin<sup>-</sup> Zellen im peripheren Blut:

Lyse der Erythrozyten mit BD FACS-Lysing Solution 10x (BD Pharmingen Cat:349202), 3ml/Probe für 15 min. auf Raumtemperatur

Zentrifugation der Probe bei 350xg ohne Bremse für 5 min.

Entnahme des Probegefäßes aus der Zentrifuge und Dekantierung des Überstandes

Waschen der Probe mit 1ml PBS + 0,5% BSA (Blockierlösung)

Zentrifugation der Probe bei 350xg ohne Bremse für 5 min.

Entnahme des Probengefäßes aus der Zentrifuge und erneute Dekantierung des Überstandes

Negativ Kontrolle: Resuspension in 1ml PBS + 0,5% BSA (ohne Inkubation mit dem primären Antikörper)

Zugabe von Sca-1-PE- und Lineage AK

Inkubation der Probe auf Eis für 30 min

Konjugation der Lineage-AK mit Streptavidin-FITC (Vector Labs) mit 100µl FITC-

Lösung (FITC-Lösung 1:100 im Bicarbonatpuffer, pH: 8,5) für 20min

Waschen der Probe mit 1ml PBS + 0,5% BSA

Zentrifugation der Probe bei 350xg ohne Bremse für 5 min.

Entnahme des Probengefäße aus der Zentrifuge und Dekantierung des Überstandes

Resuspension in 1ml PBS + 0,5% BSA

#### 2.6.4. Messung und Auswertung der Proben

Für die Messung der vorbereiteten Proben (2.6.3.) wurde ein FACScalibur®-Gerät der Firma BD verwendet. Die gewonnenen Datensätze wurde mit dem WinMDI-Programm (<http://facs.scripps.edu/software.html>) ausgewertet und Form eines dot-plots dargestellt. Bei jeder Messung wurden mindestens 10.000 Zellen untersucht. Die Daten der Analyse der positiven und negativen Proben wurden jeweils in ein dot-plot aufgetragen. Die x-Achse zeigte das FSC (*forward light scatter*) und die y-Achse SSC (*side light scatter*). Anhand dieser dot-plots konnten die mononukleären Zellen identifiziert werden (Abb. 4A). Mit Hilfe des gating wurden die mononukleären Zellen selektiert und bezüglich ihrer Sca-1PE- und Lin (FITC)- Intensitäten untersucht. Zusätzlich wurden diese dot-plots in vier Quadranten unterteilt.

Quadrant 1 (oben links): sca-1<sup>+</sup> / lin<sup>-</sup> Zellen

Quadrant 2 (oben rechts): sca-1<sup>+</sup>/lin<sup>+</sup>-Zellen

Quadrant 3 (untern links): sca-1<sup>-</sup> /lin<sup>-</sup> Zellen

Quadrant 4 (unten rechts): sca-1<sup>-</sup> /lin<sup>+</sup> -Zellen

Als negative Kontrolle wurden Zellen (Vollblut) gemessen, die ohne primären Antikörper inkubiert wurden. Bezogen auf die negative Kontrolle wurden sowohl die FITC- als auch die PE-Kanal-Grenzen so eingestellt, dass sich 95% der Zellen im unteren linken Quadrant befinden. Mit denselben Einstellungen wurden die positiven Proben gemessen und den Prozentanteil der Sca-1<sup>+</sup>/Lin<sup>-</sup> Zellen als Prozent der mononukleären Zellen definiert.



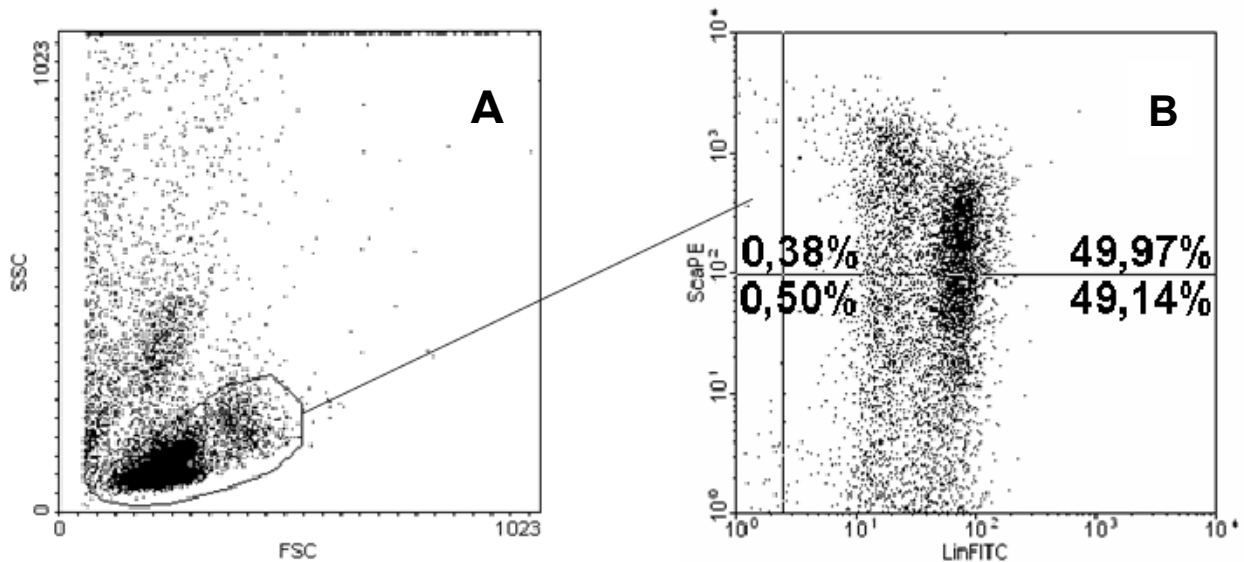


Abb. 9: Darstellung der Bestimmung der  $Sca-1^+/lin^-$  Zellen mittels Durchflußzytometrie. (A) Dot-plot-Darstellung der gemessenen Zellen mit einem Gate das die mononukleäre Zellpopulation definiert. (B) Dot-plot Grafik der Ergebnisse der Fluoreszenzmessung. Die FITC-Fluoreszenz („lineage“, hämatopoetischer Marker) ist auf der X-Achse, die Phycoerythrin-Fluoreszenz ( $Sca-1$ , Stammzellenmarker) auf der Y-Achse aufgetragen. Die  $Sca-1^+/lin^-$  Zell-Subpopulation befindet sich im oberen linken Quadrant.

## 2.7. Gewinnung und Vorbereitung der histologischen Präparate

### 2.7.1. Entnahme der CCA

Für die Entnahme der CAA wurden die Versuchstiere 28 Tage nach der Inkubation mit LPA/PBS erneut mit Dormitor® und Ketavet® narkotisiert und auf der Thermoplatte mit Klebestreifen positioniert. Zunächst wurden über eine Hautinzision am Hals in der Medianlinie die rechte und linke CCA inklusive Bifurkation präpariert. Anschließend erfolgte eine Sternotomie um das Herz freizulegen. Über eine Inzision am linken Ventrikel wurde ein Polyethylenkatheter über den linken Ventrikel bis in die Aorta ascendens vorgeschoben und mit einem Faden fixiert. Nach der Eröffnung des rechten Herzhohls wurde das Versuchstier 15min mit 4% Paraformaldehyd perfundiert. Direkt nach der Perfusion wurde die rechte und linke CAA einschließlich der Bifurkation und der ICA und CCA entnommen und in Einbettkassetten überführt. Nach der Entnahme der CCA wurde eine zervikale Dislokation durchgeführt (49).

## **2.7.2. Paraffineinbettung und Herstellung der seriellen CCA-Schnitte**

Zur Herstellung serieller histologischer Schnitte erfolgte nach der Fixierung die Einbettung in Paraffin. Hierfür verblieben die entnommenen Organe zunächst 2-4h in einer 70%-igen Alkohollösung und wurden anschließend über Nacht (18h) in einem Einbettautomat weiter verarbeitet.

### Protokoll für die Paraffinierung im Einbettautomaten:

1. Stufenweise Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70%-igem Ethanol (5h), 2x 96%-igem Ethanol (2x1h), 3x100%-igem Ethanol (2x1h, 1x1.5h)
2. Verdrängung des Alkohols mit Xylol (2x2h);
3. Vorparaffinierung in Paraffinbädern (2x2h)

Die Organe wurden mit Hilfe eines Paraffinspendeautomaten in flüssiges Paraffin (ca. 60°) eingebettet und anschließend zu Paraffinblöcken ausgehärtet. Es wurde dabei darauf geachtet, dass die Karotiden streng senkrecht und gerade mit der Bifurkation nach unten eingebettet werden. Mit dem Rotationsmikrotom wurden pro Karotide ca. 120-150 4-5µm dicke Paraffinschnitte pro Versuchstier in Serie angefertigt. Als Beginn der Schnittserie wurde der erste Schnitt nach der Bifurkation kranial der CAA gewählt. Die Schnitte wurden auf silanisierten Objektträger (SuperFrost plus® Gold; Fa. Menzel-Gläser) aufgetragen und zum Trocknen für 5-6h bei ca.37° in den Brutschank gelegt.

## **2.8. Histologische Färbungen**

### **2.8.1. Modifizierte Movat-Pentachrom-Färbung**

Mit der modifizierten Movat-Pentachrom-Färbung (186) können alle Komponenten des Bindegewebes eines histologischen Schnitts in einer einzigen Färbung dargestellt werden. Diese Färbung eignet sich gut als Übersichtsfärbung und zur computergestützten

morphometrischen Bildanalyse. Aufgrund der deutlichen Anfärbung elastische Faser, lassen sich die unterschiedlichen Gefäßwände (Intima, Media und Adventitia) detektieren und morphometrisch auswerten (187).

Die verschiedenen Zellkomponenten bzw. Bindegewebstypen werden wie folgt angefärbt:

Zellkerne: blau-schwarz

Zytoplasma: gelb-rosa

Muskelzellen: rot

Kollagen: gelb

Knorpel: gelb bis rötlich

Grundsubstanz (Matrix): blau

Elastische Fasern: violett-schwarz

Knochenanlage: dunkelrot

### 2.8.1.1. Reagenzien

Alcian blau 1%	1g Alcian blau 8 GX Sigma A5628 99 ml Aqua destilata 1ml Essigsäure 100%
Brilliant-Crocein-Säurefuchsin	<u>Stammlösung A Brilliant-Crocein:</u> 0,1g Brilliant-Crocein Scarlet Fluka, 27970,C.I. 27290, 0,5 ml 100% Essigsäure 99,5 ml Aqua destilata
	<u>Stammlösung B Säurefuchsin:</u> 0,1g Säurefuchsin Merck, 105231 0,5 ml 100% Essigsäure 99,5 ml Aqua destilata
Voerhoff-Vorratslösungen	<u>Stammlösung A:</u> 2g Hämatoxylin Sigma, H3136

	100ml Ethanol
	<u>Stammlösung B:</u> 2g Eisen(III)-Chlorid Merck, 8.03945.0500 100ml Aqua destilata
	<u>Stammlösung C Lugol-Lösung:</u> 4g Kaliumiodid, 2g Iod 100 ml Aqua destilata
	<u>Verhoeff-Gebrauchslösung-:</u> Stammlösungen A : B : C = 3 : 2 : 1 (immer frisch zubereiten)
Saffron du Gatinais 6%	6g Saffron du Gatinais, Sigma S8381, C.I. 75100 100 ml 100% Ethanol 48h bei 50° - 60°C extrahieren, Luftdicht verschließen.
Phosphorwolframsäure 2%	2,4g Phosphorwolframsäure 100 ml Aqua destilata

### 2.8.1.2. Durchführung

<p><u>Die Färbung der histologischen Schnitte wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:</u></p> <p>2x 10 min: Entparaffinieren in Xylol</p> <p>2x 5 min: Rehydrieren in 100%-igem Ethanol</p> <p>1x 5 min: Rehydrieren in 96%-igem Ethanol</p> <p>1x 5 min: Rehydrieren in 70%-igem Ethanol</p> <p>5 min: Wässern in Leitungswasser</p> <p>30 sek: Beizen in 3% Essigsäure</p>
---

Färben der Grundsubstanz: 30 min: Färben im Alcianblau (2.8.1.1.)

1 min: Wässern in Leitungswasser

6 min: Fixieren in der Verhoef-Gebrauchslösung (2.8.1.1)

10 min: Wässern in Leitungswasser

Färben der Muskeln und Zellen: 3 min: Brilliant-Crocein-Gebrauchslösung (2.8.1.1.)

Spülen in 1% Essigsäure zur Fixierung

Beizen und Differenzieren: 15 min: 2% Phosphorwolframsäure

Dieffferenzieren: 1 min: 1% Essigsäure

3x 1 min: 100% Ethanol

3 Min: 6% Saffron du Gatinais

Dehydrieren: 2 x 3min 100% Ethanol, kurz ins Xylol

Eindeckeln mit 18x18 mm Deckgläschen und Entellan®-Einschlussharz

## **2.8.2. Immunhistochemie**

Die Immunhistochemie ist eine Methode mit der bestimmte Zell- oder Gewebestrukturen mit Hilfe spezifischer Antikörper im Gewebe markiert werden. Diese können dann mit Hilfe entsprechender antikörpergekoppelte Farbstoffe sichtbar gemacht und bestimmten Strukturen im Gewebe zugeordnet werden. In dieser Arbeit wurde die indirekte Methode der Immunhistochemie verwendet. Jeweils 3-5 Schnitte pro Versuchstier wurden aus dem Bereich proximal der Bifurkation (0-100 µm) angefärbt und ausgewertet.

### 2.8.2.1. Immunhistochemische Färbung für $\alpha$ -SMA

Um die glatten Muskelzellen in der Neointima darzustellen wurde eine immunhistochemische Färbung für smooth-muscle actin- $\alpha$  ( $\alpha$ -SMA) durchgeführt. Der Primärantikörper ( $\alpha$ -SMA clone 1A4, Fa. Dako®) (188) wurde mit dem HRP (Meerretischperoxidase)-gekoppelten Sekundärantikörper (*Impress Universal Reagent Peroxidase MP 7500*, Vector® Labs) und immunhistochemisch durch Peroxidase-Substrat DAB als Färbereaktion sichtbar gemacht (*DAB Substrate Kit Peroxidase SK 4100*, Vector® Labs). Um eine unspezifische Bindung der Antikörper auszuschließen wurden negative Kontrollen bei denen der Primärantikörper weggelassen wurde verwendet.

Die immunhistochemische Färbung gegen  $\alpha$ -SMA erfolgte nach diesem Protokoll:

Entparaffinieren und Rehydrieren:

2x 10 min. Xylol, folgend von 2x 5 min. 100%-igem Ethanol, 1 x 5 min. 96%-igem Ethanol, 1 x 5 min 70%-igem Ethanol

5 min: Waschen in PBS

Hemmung der endogenen Peroxidaseaktivität: 5min: 3% Wasserstoffperoxid-Lösung ( $H_2O_2$ )

5 min: Waschen in PBS

Blockierung der unspezifischen AK-Bindungsstellen: 20 min: Pferdeserum (Kit)

Abklopfen ohne zu Waschen

1h Inkubation: Primärantikörper 1:100 in PBS-Puffer bei Raumtemperatur

5 min : PBS

30 min: Impress Reagent Peroxidase, Sekundärantikörper (Kit)

5 min: PBS

5 min.: DAB (Diaminobenzin) Substrate Kit

5 min.: Wasser

3 sec.: saure Hämalaunlösung

5 min.: Wässern

kurzes Ziehen der Schnitte durch die aufsteigende Alkoholreihe (70%-, 96%- und 100%-iger Alkohol) und 1x2 min Xylol

Eindeckeln mit 18x18 mm Deckgläschen und Vecta Mount<sup>®</sup>-Einschlusslösung

### **2.8.3. Immunfluoreszenz**

Die Immunfluoreszenz ist eine Methode mit der bestimmte Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper im Gewebe markiert werden können. Diese können dann mit entsprechenden antikörpergekoppelten, fluoreszierenden Farbstoffen sichtbar gemacht und bestimmten Strukturen im Gewebe zugeordnet werden. In dieser Arbeit wurde die indirekte Methode der Immunfluoreszenz verwendet. Jeweils 3-5 Schnitte pro Versuchstier wurden aus dem Bereich proximal der Bifurkation (0-100 µm) angefärbt und ausgewertet.

#### **2.8.3.1. Immunfluoreszenzfärbung für MAC2**

Für den Nachweis von Makrophagen in der Neointima wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem spezifischen Maus-Makrophagen-antigen 2 (Mac-2, *clone* M3/38, Cedarlane<sup>®</sup>) durchgeführt (189). Der biotinylierte sekundäre AK (biotinylated anti-rat IgG (H+L), Vector<sup>®</sup> Labs, cat. BA-4001) wurde mit Streptavidin-FITC (Vector<sup>®</sup> Labs) angefärbt. Für die negative Kontrolle wurde eine Ratte- IgG-AK benützt.

Die Färbung gegen MAC-2 erfolgte nach diesem Protokoll:

Entparaffinieren und Rehydrieren:

2x 10 min. Xylol, folgend von 2x 5 min. 100%-igem Ethanol, 1x 5 min. 96%-igem Ethanol, 1x 5 min 70%-igem Ethanol

Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen: 10 min.: 10% Kaninchenserum (KS) (C12SA Serotec®)

1h: Primärantikörper in 0,5% KS 1:400

1h: Negative Kontrolle: Ratte-IgG-AK in 0,5% KS 1:400

5 min.: Waschen in PBS

1h: Sekundärantikörper biotinylierter anti-Ratten IgG (H+L) in 0,5% KS 1:100

5 min.: Waschen in PBS

30 min.: Streptavidin-FITC in Natriumbicarbonat-Puffer pH 8,5 1:100

Abklopfen

5 min.: Waschen in PBS

Eindeckeln mit 18x18mm Deckgläschen und Vectashield®-Einschlusslösung

### **2.8.3.2. Immunfluoreszenzfärbung für SDF-1 $\alpha$**

Um die Expression von SDF-1 $\alpha$  in der Neointima zu detektieren wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem Primärantikörper gegen CXCL/SDF-1 $\alpha$  (Monokl. AK Human/Maus anti CXCL12/SDF1- $\alpha$ , R&D) durchgeführt. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte mittels eines biotinylierten Sekundärantikörpers und eines Streptavidin-Fluorescein-Konjugates. Für die negative Kontrolle wurde Maus-IgG verwendet.



Die Immunfluoreszenzfärbung gegen SDF-1 $\alpha$  wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Entparaffinieren und Rehydrieren:

2x 10 min. Xylol, folgend von 2x 5 min. 100%-igem Ethanol, 1x 5 min. 96%-igem Ethanol, 1x 5 min 70%-igem Ethanol

Antigendemaskierung: 10min: Inkubation in Citratpuffer + Tween 20 bei 100° in der Mikrowelle

5 min: Waschen in PBS

Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen: 10min 10%iges Kaninchenserum

1h: Primärantikörper: monoklonaler Antikörper Human/Maus anti CXCL12/SDF-1 $\alpha$  1:62, bei Raumtemperatur

1h: Negativ Kontrolle: Maus-IgG AK

5 min.: Wasche mit PBS

30 min: Sekundärantikörper: Anti-Maus-biotin gekoppelt

5 min: Waschen in PBS

30 Min.: Streptavidin-FITC in Natriumbicarbonat-Puffer pH 8,5 1:100

Abklopfen

5 min: Waschen in PBS

Eindeckeln mit 18x18mm Deckgläschen und Vectashield®-Einschlusslösung

### 2.8.3.3. Immunfluoreszenzfärbung für HIF-1 $\alpha$

Für den Nachweis einer HIF-1 $\alpha$  Expression in der Neointima wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem Primärantikörper gegen anti -HIF-1 $\alpha$  (Poliklonaler Antikörper Kaninchen anti-HIF-1 $\alpha$ , Novus Biologicals). Der Primärantikörper wurde mit dem Sekundärantikörper (Schaf anti-Kaninchen IgG-biotingekoppelt, Serotec, GmbH) gekoppelt und mit dem Fluorochrome Fluorescein-Streptavidin sichtbar gemacht. Die Negativkontrolle wurde mit Kaninchen-IgG AK mit dem zweiten Schnitt auf einem Objektträger durchgeführt.

Die Immunfluoreszenzfärbung für HIF-1 $\alpha$  wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Entparaffinieren und Rehydrieren:

2 x 10 min. Xylol, folgend von 2 x 5 min. 100%-igem Ethanol, 1 x 5 min. 96%-igem Ethanol, 1 x 5 min 70%-igem Ethanol

Antigendemaskierung: 3 min: Inkubation mit 0,1%-ige Proteinase K bei 37°

10 min: Inkubation in Citratpuffer bei 100° in der Mikrowelle

5 min: Wasche mit PBS

Blockierung unspezifische Antikörperbindungsstellen: 10 min 10%iges Schafserum

1h: Primärantikörper: polyklonaler Antikörper Kaninchen anti-HIF-1 $\alpha$ , 1:200

1h: Negativ Kontrolle: Kaninchen-IgG AK

5 min.: Waschen in PBS

1h: Sekundärantikörper: Schaf anti-Kaninchen IgG-biotingekoppelt 1:200

5 min.: Waschen in PBS

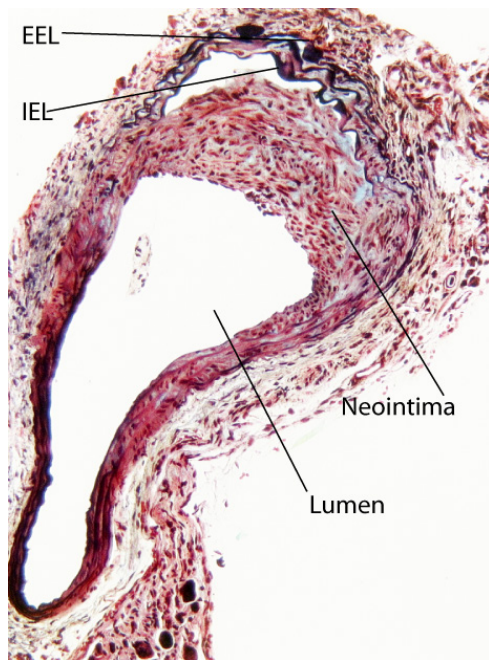
30 min.: Streptavidin-FITC in Natriumbicarbonat-Puffer pH 8,5 1:100

Abklopfen

5 min.: Waschen in PBS

Eindeckeln mit 18x18mm Deckgläschen und Vectashield®-Einschlusslösung

## 2.9. Mikroskopie und Morphometrische Analyse



*Abb. 10: Morphometrische Ausmessungen der CCA 28d nach LPA Inkubation. EEL-Umfang der Lamina elastica externa; IEL-Umfang der lamina elastica interna.*

Mit Hilfe eines kombinierten Fluoreszenz- und Lichtmikroskop (Leica DMRBE), das an eine CCD-Kamera angeschlossen war, wurden die histologischen Präparate für die morphometrische Messung digitalisiert. Die histomorphometrische Auswertung erfolgte mittels eines Bildauswertungsprogramms (*Diskus Software*, Firma Hilgers, Bonn). Zu-

nächst wurde die luminale Fläche (LF), die durch die *Elastica interna* (EIF) und die *Elastica externa* (EEF) begrenzt ist, berechnet. Zur Berechnung der neointimalen Fläche wurde die Fläche des Lumens von der durch die *Elastica interna* begrenzten Fläche subtrahiert.

$$\text{Neointimale Fläche (mm}^2\text{)} = \text{IEL (mm}^2\text{)} - \text{LF (mm}^2\text{)}$$

Zur Quantifizierung der medialen Fläche wurde die von der *Elastica interna* begrenzten Fläche von der Fläche, die die *Elastica externa* begrenzt abgezogen.

$$\text{Mediafläche: EEF (mm}^2\text{)} - \text{EIF (mm}^2\text{)}$$

Für die histomorphologische Auswertung der Neointima- und Mediafläche wurden 10 Schnitte pro Maus verwendet.

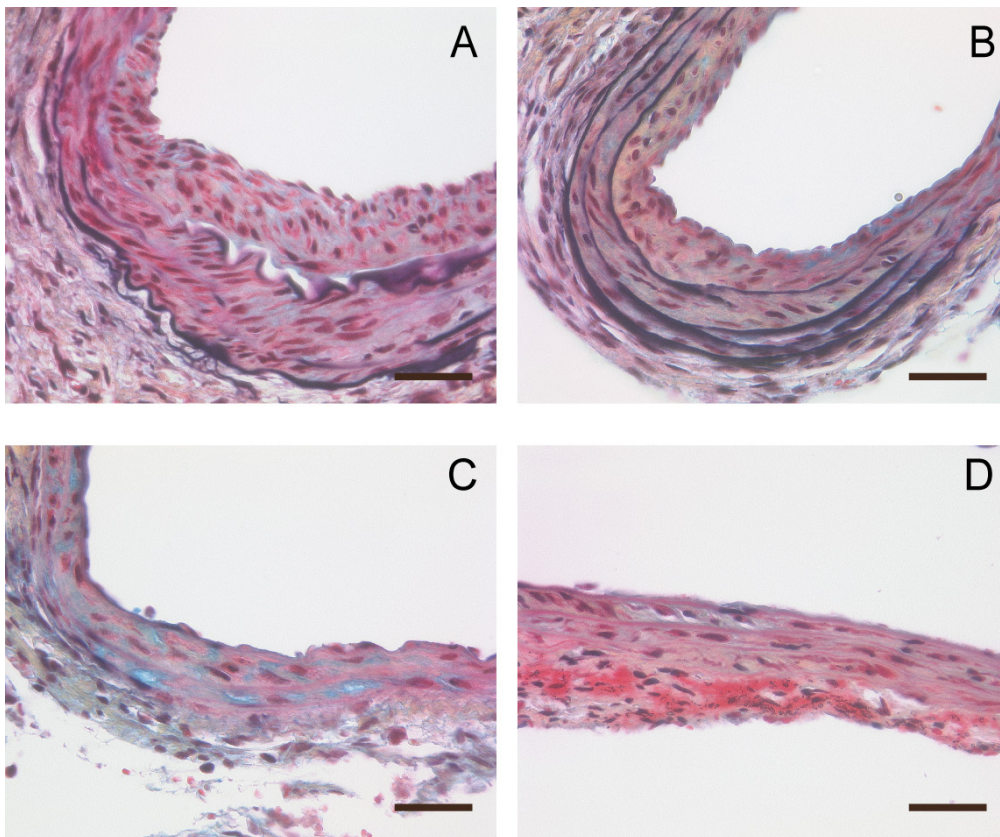
## **2.10. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm *GraphPad Prism 4.0*. Die Gruppen wurden mittels eines ungepaarten, zweiseitigen *Student's t test* verglichen. Der statistische Vergleich von mehr als zwei Gruppen erfolgte mit dem *1-way ANOVA-Test* gefolgt von dem *Newman-Keuls-Postest* falls erforderlich. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde ab einem p-Wert kleiner 0,05 definiert (49).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. LPA20:4 und 1-AGP induzieren die Bildung einer Neointima

Zunächst wurde die Neointimabildung in den unverletzten CCAs von Wildtyp-Mäusen 28 Tage nach der Inkubation mit verschiedenen LPA Derivaten untersucht. In den mit LPA 20:4 (0.03 mm<sup>2</sup>, p< 0.05, n=5) oder 1-AGP (0.016mm<sup>2</sup>) inkubierten CCAs zeigte sich eine signifikante Neointimabildung (Abb. 11A, B), im Vergleich zu den mit PBS- oder LPA 18:0-behandelten CCAs, in denen keine Neointima gefunden wurde (Abb. 11 C, D). Die histomorphologische Quantifizierung ergab ferner eine signifikant erhöhte Intima/Media-Ratio für LPA 20:4 (p<0,001) und 1-AGP (p<0,01) im Vergleich zur Behandlung mit LPA 18:1 oder PBS.



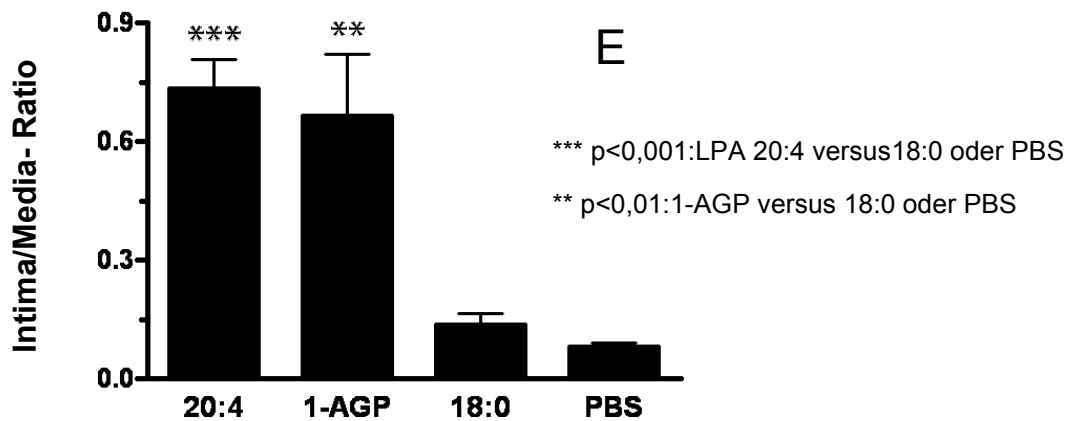


Abb. 11: Die ungesättigten LPA-Derivate LPA 20:4 und 1-AGP induzieren eine Neointimabildung. Gezeigt sind repräsentative mit Movat's Pentachrome angefärbte Schnitte der CCA von Wildtyp-Mäusen 28d nach Inkubation mit LPA 20:4 (A), 1-AGP (B), LPA 18:0 (C) oder PBS. (D), Maßstab 50 $\mu$ m, (E) Quantifizierung der Die Intima/Media-Ratio (n=5 Mäuse pro Gruppe).

### 3.2. Aufbau der LPA induzierten Neointima

Um zu untersuchen, ob die LPA-induzierte neointimale Hyperplasie, wie die durch eine Gefäßverletzung verursachte Neointimabildung, aus SMCs und Makrophagen besteht, wurden immunhistochemische Färbungen für SMC-spezifisches  $\alpha$ -Actin (smooth muscle actin, SMA) und für Makrophagen-spezifisches MAC2 durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass das neointimale Gewebe in den mit LPA 20:4- oder 1-AGP-behandelten CAAs überwiegend aus SMCs bestehen. MAC2-positive Zellen wurden in der Neointima nur vereinzelt gefunden.

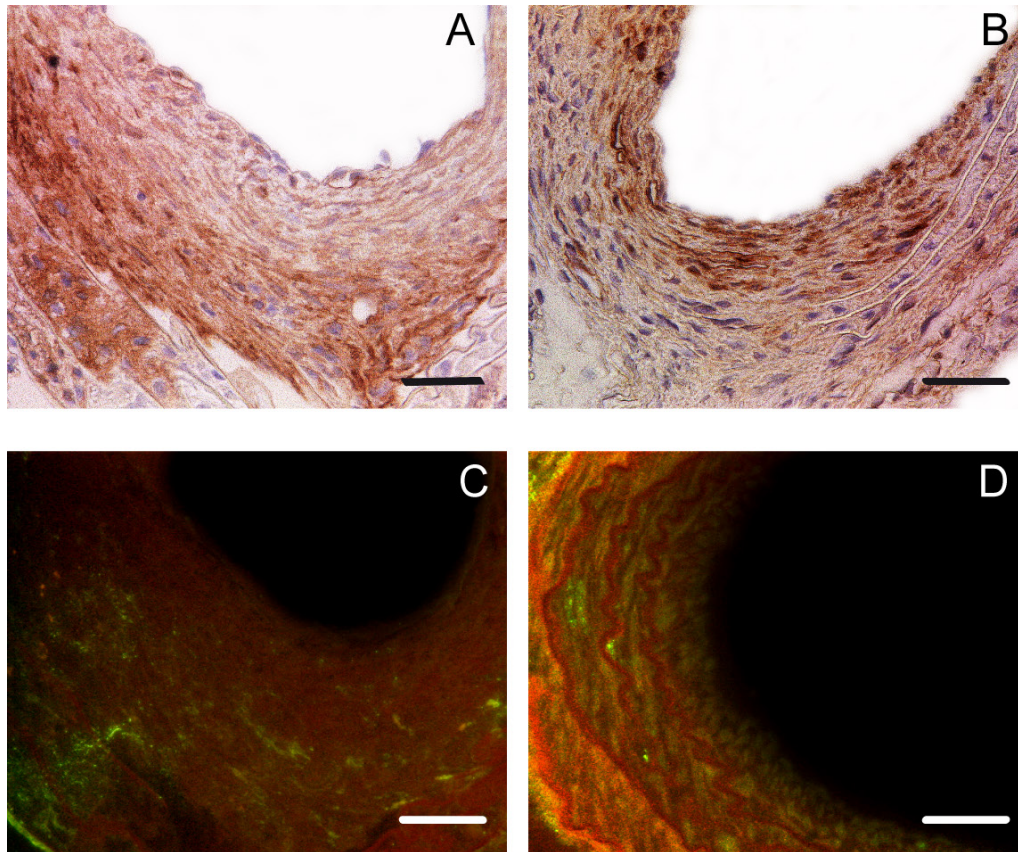


Abb. 12: LPA induziert eine Neointima durch SMC Akkumulation. Immunhistochemische Färbung (braun) für  $\alpha$ -Aktin in der CCA 28d nach LPA 20:4 (A) oder 1-AGP (B) Inkubation. Immunfluoreszenzfärbung für MAC2 (grün) in der Neointima nach LPA 20:4 (C) oder 1-AGP (D) Inkubation, Maßstab 50 $\mu$ m

### 3.3 Ungesättigte LPAs induzieren die Expression von SDF 1 $\alpha$

Um zu untersuchen, ob die durch LPA hervorgerufene Neointimabildung mit einer erhöhten SDF-1 $\alpha$  Expression assoziiert ist, wurden Immunfluoreszenzfärbungen für SDF-1 $\alpha$  in allen vier Gruppen 28 Tage nach der Behandlung durchgeführt. In der Neointima von mit LPA20:4- oder 1-AGP-behandelten Mäusen zeigte sich eine größere SDF-1 $\alpha$  positive Fläche als in den LPA18:0- oder PBS-behandelten Mäusen ( $p < 0,001$ ,  $n=5$ ) (Abb. 13 A-E). In der Media von LPA18:0-behandelten Mäusen war lediglich eine schwache Anfärbung in der Media nachweisbar (Abb. 13 C) und in der PBS Gruppe



fehlte die SDF-1 $\alpha$  Färbung völlig (Abb. 13 D). Die Ergebnisse zeigen, dass die neointimale SDF-1 $\alpha$  Expression mit der LPA-induzierten Neointimabildung positiv korreliert.

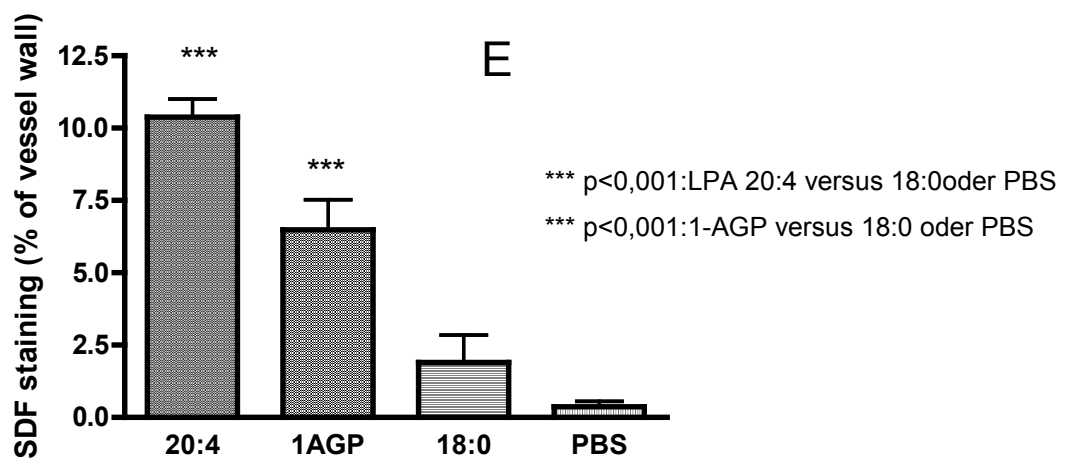
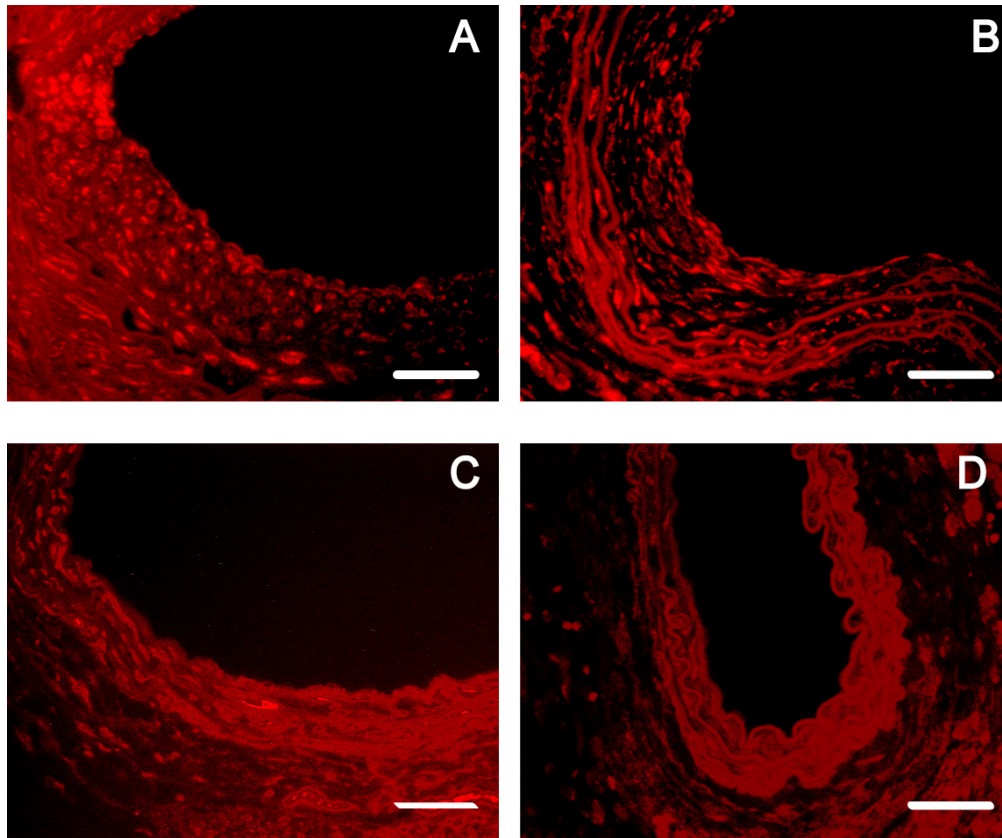


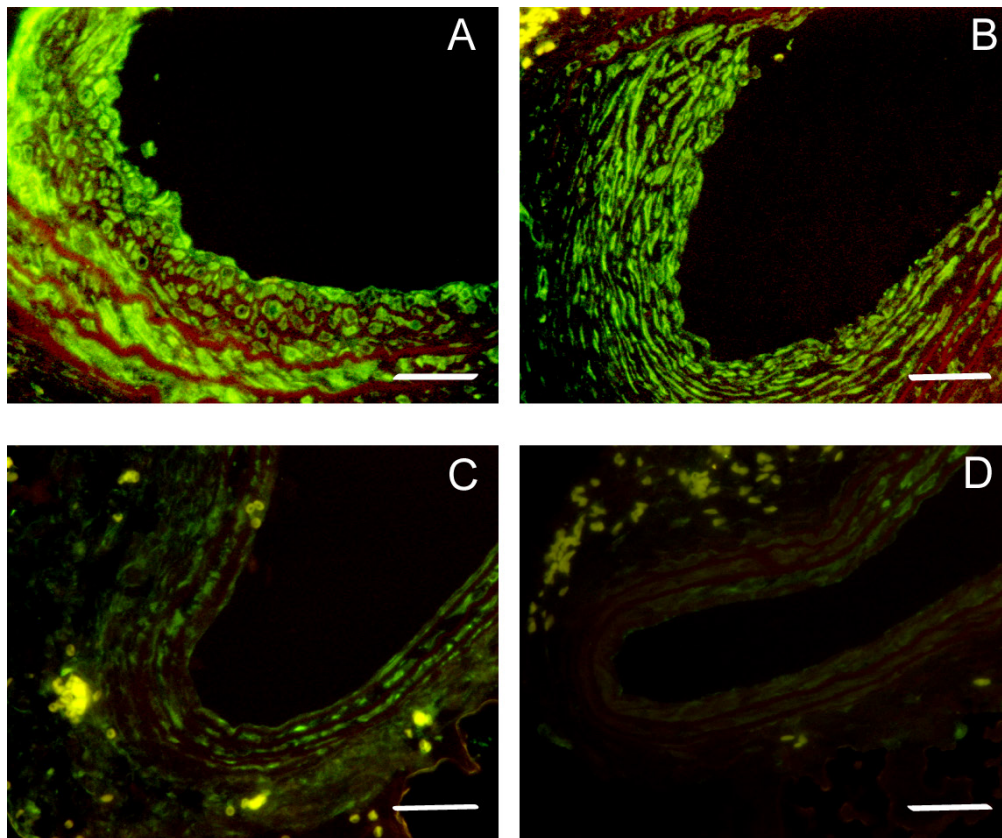
Abb. 13: Die Neointimabildung durch ungesättigte LPAs ist mit einer SDF-1 $\alpha$  Expression assoziiert. Immunfluoreszenzfärbung für SDF-1 $\alpha$  (rot) der CCA 28d nach Behandlung mit LPA 20:4 (A),



1-AGP (B), LPA 18:0 (C) oder PBS (D), Die Planimetrie zeigt eine signifikant erhöhte SDF-1 $\alpha$  Expression nach LPA 20:4 und LPA 1-AGP Behandlung im Vergleich zur Behandlung mit LPA 18:0 oder PBS. Maßstab 50 $\mu$ m. (E) Die neointimale Fläche der SDF-1 $\alpha$  Färbung wurde quantifiziert (n=5 Mäuse pro Gruppe).

### 3.4. Ungesättigte LPAs induzieren die Expression von HIF-1 $\alpha$

Nachdem Studien gezeigt haben, dass LPA die HIF-1 $\alpha$  Bildung hochreguliert, wurde untersucht, ob HIF1- $\alpha$  auch in der LPA-induzierten neointimalen Hyperplasie exprimiert wird (28d nach Inkubation). In der Neointima der mit LPA20:4- (A) oder 1-AGP- (B) behandelten Karotiden fand sich im Vergleich zu LPA18:0- (C) oder PBS- (D) behandelten Karotiden eine signifikant erhöhte Fläche die für HIF-1 $\alpha$  durch Immunfluoreszenz angefärbt werden konnte ( $p < 0,001$ , n=5) (Abb. 14 A-E). Die Karotiden, die mit LPA 18:0 inkubiert wurden, wiesen nur eine geringe Anfärbung für HIF-1 $\alpha$  in der Media auf (Abb. 14 C), während in der PBS Gruppe keine HIF-1 $\alpha$  Färbung nachweisbar war (Abb. 14 D).



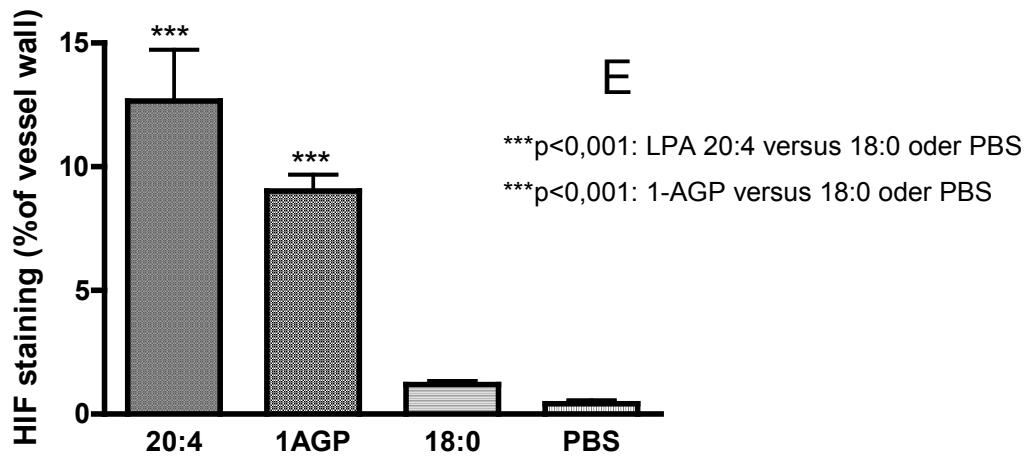
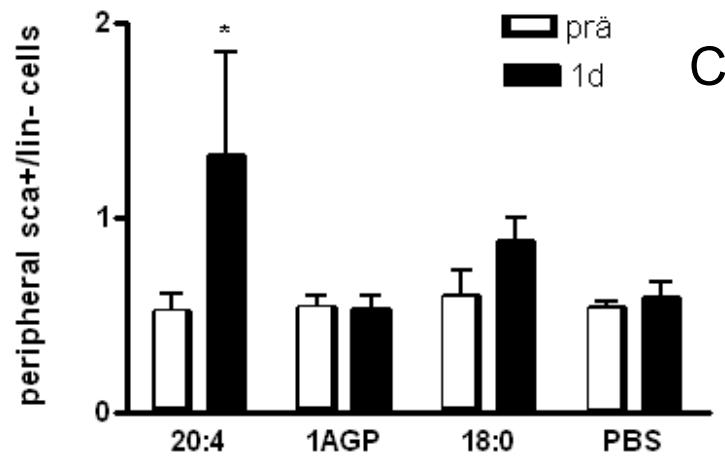
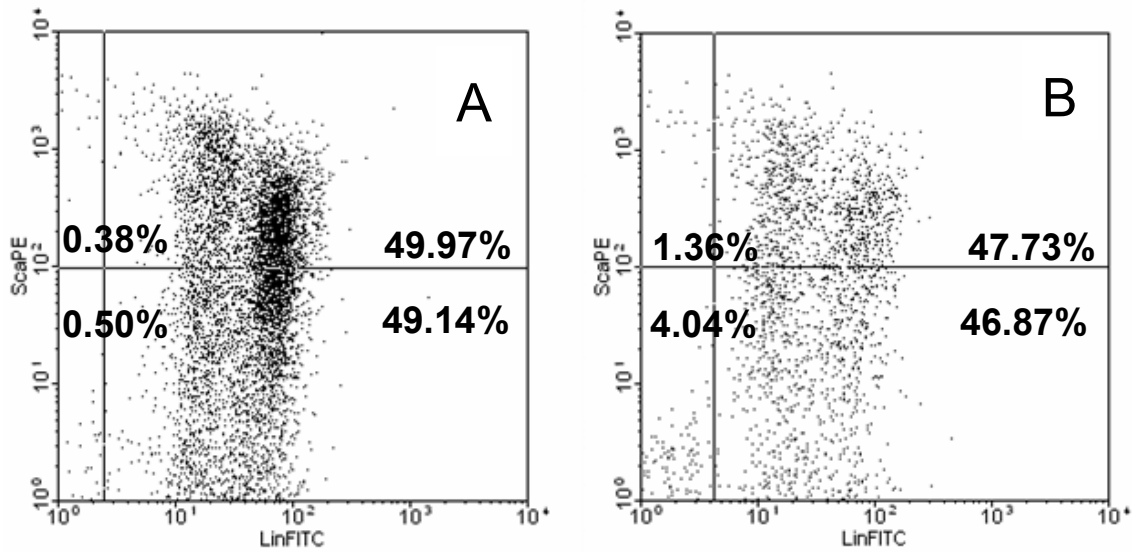


Abb. 14: Die Neointimabildung durch ungesättigte LPA ist mit einer HIF-1 $\alpha$  Expression assoziiert. Immunfluoreszenzfärbung für HIF-1 $\alpha$  (grün) der CAA 28d nach Behandlung mit LPA20:4 (A), 1-AGP (B), LPA18:0 (C) oder PBS (D). (E) Die Planimetrie zeigt eine signifikant erhöhte neointimale Fläche mit positiver Färbung für HIF-1 $\alpha$  in der LPA 20:4 und 1-AGP Gruppe im Gegensatz zu den LPA 18:0 und PBS Gruppen. Maßstab 50 $\mu$ m. n=5 Mäuse pro Gruppe.

### 3.5. Ungesättigte LPAs induzieren die Mobilisation glatter Muskelvorläuferzellen (SPCs)

Da die die Neointimabildung nach Gefäßverletzung mit einer erhöhten Expression von SDF-1 $\alpha$  assoziiert ist und es somit zu einer Mobilisierung und Rekrutierung von SPCs kommt, haben wir die Mobilisierung der SPCs während des Versuchs untersucht. Vor der Inkubation (prä) sowie 1d, 9d und 28 d nach der Inkubation mit den jeweiligen LPA-Derivaten oder PBS wurden den Versuchstieren Blutabgenommen und die SPCs quantifiziert. Die Ergebnisse zeigten einen signifikanten Anstieg der SPCs 1d nach der Behandlung mit LPA 20:4 ( $p<0,05$ ,  $n=5$ ) im Vergleich zu dem SPC Anteil vor der Inkubation (Abb.15 A-C). In den anderen Versuchsgruppen wurde keine Veränderung der zirkulierenden SPCs einen Tag nach der Inkubation beobachtet (Abb. 15 A-C). In den 1-AGP Mäusen kam es am Tag 9 nach der Inkubation zum Anstieg der SPCs im Vergleich zu unbehandelten Mäusen ( $p<0,001$ ,  $n=5$ ) (Abb. 15 D-F). In den Mäusen, die mit LPA 18:0

oder PBS behandelt wurden, kam es zu keiner Mobilisierung von SPCs ins periphere Blut.



\*p<0,05: LPA 20:4 prä versus 1d

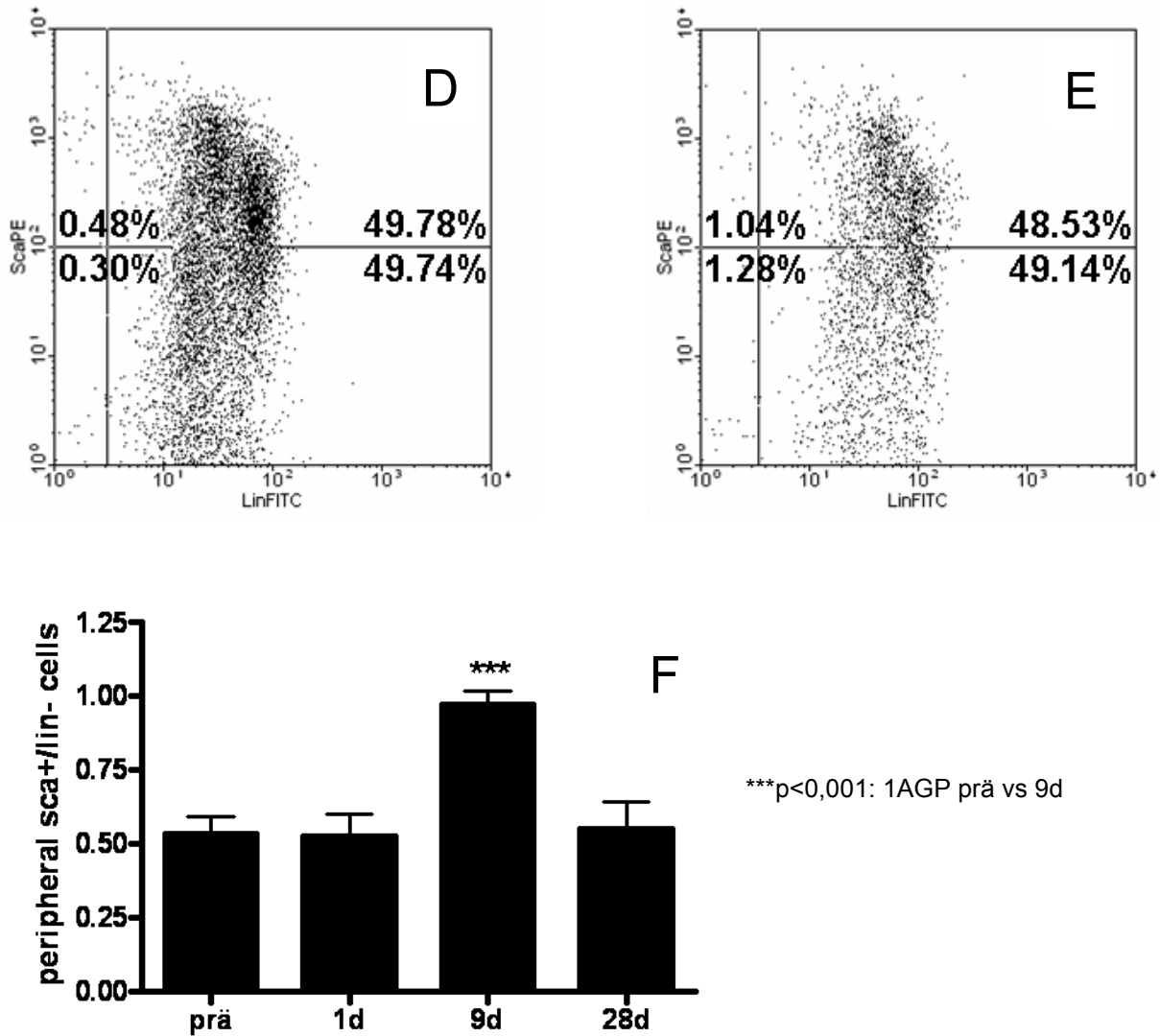


Abb.15: Ungesättigte LPAs induzieren eine SPC Mobilisation. FACS Messung der zirkulierenden SPCs präoperativ (prä) (A) und einen Tag nach der Inkubation mit LPA 20:4 (B). (C) Quantifizierung der SPC Mobilisation 1d nach der Behandlung mit LPAs oder PBS im Vergleich zu unbehandelten Mäusen (prä). FACS-Messung SPCs präoperativ (D) und neun Tage nach der Inkubation mit 1-AGP (E). (F) Quantifizierung der SPC nach der Inkubation mit LPA 1-AGP (n=5 Mäuse pro Gruppe).

#### 4. Diskussion

In mehrere Studien konnte man zeigen, dass die Inkubation von Rattenkarotiden mit ungesättigten LPA-Derivaten zu einer neointimalen Hyperplasie führt (141, 179). Die molekularen Mechanismen dieser Neointimaentstehung sind jedoch nicht exakt geklärt. Bei der Neointimabildung nach Gefäßverletzung spielt das Chemokin SDF-1 $\alpha$  und sein Rezeptor CXCR4 durch die Mobilisierung und Rekrutierung von SMC-Vorläuferzellen (SPCs) eine entscheidende Rolle (49). Als wichtiges Bindeglied zwischen der Gefäßverletzung und der SDF-1 $\alpha$  vermittelten SPC-Rekrutierung fungiert die Apoptose medialer SMCs unmittelbar nach der Verletzung. Apoptotische mediale SMCs setzen Mikrovesikel frei, die sowohl die SDF-1 $\alpha$  Expression induzieren können als auch als wichtige Quelle für Vorstufen für Lysophosphatidsäuren (LPAs) dienen (136). Ein weiterer Faktor bei der Bildung einer neointimalen Hyperplasie ist der Transkriptionsfaktor hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ . Im Ischämiemodell induziert HIF-1 $\alpha$  die Expression von SDF-1 $\alpha$  (82). Desweiteren konnte man zeigen, dass eine mechanischen Gefäßverletzung ebenfalls zu einer gesteigerten HIF-1 $\alpha$  Expression führt. Hier fand man nach 6h einen frühen Anstieg der HIF-1 $\alpha$  mRNA Expression (116, 190). Es konnten auch LPA-Derivate identifiziert werden, die eine gesteigerte HIF-1 $\alpha$  Expression hervorrufen (184). Ungesättigte LPA induzieren die Expression von HIF-1 $\alpha$  in verschiedenen Tumorzelllinien durch Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR Signaltransduktionsweges (184) und von SDF-1 $\alpha$  in mesenchymalen Stammzellen (83, 184). In vivo konnte bereits gezeigt werden, dass LPA durch eine vermehrte HIF-1 $\alpha$  Expression die Metastasierung von Ovarialkarzinomzellen fördert (170).

In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob die LPA-induzierte neointimale Hyperplasie mit der Expression von SDF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\alpha$  assoziiert ist. Darüber hinaus wurde geprüft, ob die LPA-vermittelte Neointimabildung mit einer Mobilisierung von SPCs einhergeht. Die Untersuchungen zeigten, dass ungesättigte LPAs eine neointimale Hyperplasie in Mäusekarotiden induzieren. Darüber hinaus ließ sich eine gesteigerte neointimale SDF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\alpha$  Expression, die mit einer gesteigerten SPCs Mobilisierung im peripheren Blut der Versuchstiere einherging, nach lokaler Behandlung mit ungesättigten LPA 20:4 oder 1-AGP, aber nicht mit dem gesättigten LPA 18:0, nachweisen.

#### **4.1. Ungesättigte LPAs induzieren eine neointimale Hyperplasie**

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass die ungesättigten LPAs LPA 20:4 und 1-AGP eine neointimale Hyperplasie in Mäusekarotiden induzieren können. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Studien, in denen gezeigt wurde, dass die Inkubation von Rattenkarotiden mit ungesättigten LPA-Derivaten zu einer neointimalen Hyperplasie führt (141, 179). Durch die Hemmung der durch LPA 18:1 (ungesättigte LPA) induzierten ERK und p38MAPK Aktivierung konnte man die Neointimabildung unterbinden (179). Ferner ist die durch LPA 20:4 und 1-AGP-vermittelte Neointimabildung in Mäusen mit einem PPAR $\gamma$ -Mangel in den vaskulären Zellen oder durch die Behandlung mit einem PPAR $\gamma$ -Antagonisten vermindert (141). Allerdings wurde nach einer mechanischen Gefäßverletzung sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen eine Reduktion der Neointima durch PPAR- $\gamma$  -Agonisten beschrieben (180-182), so dass unklar bleibt ob der PPAR- $\gamma$  Signaltransduktionsweg tatsächlich die Effekte von ungesättigten LPAs nach Gefäßverletzung vermittelt. In Folgestudien unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass die Rezeptoren LPA $_1$  und LPA $_3$  eine entscheidende Rolle bei der Neointimabildung nach Gefäßverletzung in Mäusen spielen. Durch die Behandlung mit dem LPA $_1$ - und LPA $_3$  -Rezeptorantagonisten Ki16425 kam es in der A. carotis von hyperlipidämischen Apoe $^{-/-}$  Mäusen nach Draht-induzierten Gefäßverletzung zu einem deutlichen Rückgang der Neointimabildung (191). Dies war auf eine verminderte Akkumulation von SMCs und Makrophagen zurückzuführen (191). Ferner konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass die LPA 20:4-induzierte Neointimabildung sowohl durch den LPA $_1$  als auch LPA $_3$  Rezeptor in der Gefäßwand vermittelt wird (191). Diese Befunde sprechen dafür, dass die Effekte von ungesättigten LPA-Derivaten auf die Neointimabildung auf die Aktivierung von LPA Rezeptoren zurückzuführen sind. Der Mechanismus der LPA-induzierten neointimalen SMCs Akkumulation ist jedoch unklar.

Im Unterschied zur Neointimabildung nach Draht-induzierter Gefäßverletzung in hyperlipidämischen Apoe $^{-/-}$  Mäusen (191), kam es im Modell der LPA-Inkubation der A. carotis von normolipidämischen Wildtyp-Mäusen in der vorliegenden Arbeit nur zu einer neointimalen Akkumulation von SMCs und nicht von Makrophagen. Dieser Unterschied dürfte auf die in Wildtyp-Mäusen fehlende inflammatorische Aktivierung der Endothelzellen, die

in Apoe<sup>-/-</sup> Mäusen durch die Hyperlipidämie hervorgerufen wird, zurückzuführen sein. Die kontinuierliche Bildung von LPA während der oxidativen Modifikation von LDL in der Gefäßwand von Apoe<sup>-/-</sup> Mäusen führt dabei zu einer NF-κB-vermittelten Hochregulation von CXCL1 (bzw. von IL8 im Menschen), das die LPA-induzierte Monozytenadhäsion an Endothelzellen fördert (156, 159, 164, 192).

#### **4.2. Die LPA induzierte Neointimabildung ist mit der Expression von SDF-1α assoziiert**

Die neointimale Akkumulation von SMCs kann auf zwei unterschiedlichen Mechanismen beruhen. Einerseits kann es zu einer Veränderung des Phänotyps der medialen SMCs kommen, die dann in von der Media in die Intima einwandern und dort proliferieren. Ist die Schädigung allerdings zu ausgeprägt und der Großteil der medialen SMCs in der verletzten Gefäßwand abgestorben, wird durch die gesteigerte Expression des Chemokins SDF-1α in der Gefäßwand Vorläuferzellen vom SMCs aus dem Knochenmark mobilisiert und anschließend in das verletzte Gefäß rekrutiert. Dort differenzieren diese SPCs in SMCs und tragen zur Neointimabildung bei. Die Apoptose von medialen SMCs wenige Minuten nach der mechanischen Gefäßverletzung spielt eine wichtige Rolle bei der Neointimabildung (193). Durch Behandlung mit einem Pan-Caspase-Inhibitor konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Apoptose der medialen SMCs mit einer geringeren Neointimabildung assoziiert ist (194). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die Transplantatvaskulopathie beschrieben (195). Ein möglicher Mechanismus durch den apoptotische SMCs die Neointimabildung beeinflussen, ist die Induktion der SDF-1α Expression. So konnte in verschiedenen Modellen der Neointimabildung, wie Drahtverletzung, Ligatur oder Anlage einer periarteriellen Manschette, eine Korrelation zwischen dem Grad an Apoptose der medialen SMCs und der SDF-1α Expression gefunden werden (50). In einer weiteren Studie wurde einen Tag nach Gefäßverletzung neben den apoptotischen Zellen eine erhöhte SDF-1α Expression in den medialen SMCs nachgewiesen (53). Ein direkter Hinweis auf die ursächliche Rolle der Apoptose medialer SMCs bei der SDF-1α Expression wurde dadurch gewonnen, dass die Hemmung der Apopto-

se durch einen Pan-Caspase-Inhibitor zu einer deutlich verminderten SDF-1 $\alpha$  Expression sowohl in vivo als auch in vitro führte (53). Einen wesentlichen Faktor für die Induktion von SDF-1 $\alpha$  spielen dabei Mikrovesikel („apoptotic bodies“), die aus apoptotischen SMCs freigesetzt werden, da diese in vitro ausreichen um die SDF-1 $\alpha$  Expression in vitalen SMCs zu erhöhen (53). Es ist bekannt, dass aus Mikrovesikeln aktivierter Blutzellen, wie Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten, LPA durch eine sPLA2-vermittelte Hydrolyse von Phosphatidsäure (PA) gebildet werden kann (136). Ferner führt eine Veränderung der asymmetrischen Aufteilung der Phospholipiden in der Zellmembrane der apoptotischen Zellen zu einer Exposition von LPA Vorstufen auf der Zellaußenseite (196), wodurch die LPA Bildung gesteigert werden kann. Es ist also denkbar, dass LPA ein wichtiges Signalmolekül darstellt, dass durch Thrombozytenaktivierung und im Rahmen der Apoptose medialer SMCs generiert wird und durch eine Induktion der SDF-1 $\alpha$  Expression zur vaskulären Wundheilung und Neointimabildung durch SPCs beiträgt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die durch LPA-induzierte Neointimabildung mit einer gesteigerten SDF-1 $\alpha$  Expression einhergeht. Es konnte gezeigt werden, dass, im Gegensatz zu LPA 18:0, die LPA-Derivate LPA 20:4 und 1-AGP zu einer vermehrten SDF-1 $\alpha$  Expression in der Neointima 4 Wochen nach der Inkubation führen. Dieser Befund ist vereinbar mit einer wichtigen Rolle von SDF-1 $\alpha$  in der LPA-induzierten Neointimabildung. Zusätzliche Experimente unserer Arbeitsgruppe haben ergeben, dass die LPA 20:4 Behandlung bereits nach einem Tag zu einer gesteigerten SDF-1 $\alpha$  Expression führt und die LPA 20:4-induzierte Neointimabildung durch systemische Blockade des SDF-1 $\alpha$ -Rezeptors CXCR4 oder durch einen Knockdown von SDF-1 $\alpha$  in der Gefäßwand verringert werden kann (191). Zusammengefasst sprechen diese Ergebnisse dafür, dass ungesättigte LPA-Derivate durch eine Hochregulation von SDF-1 $\alpha$  die Neointimabildung fördern. Da SDF-1 $\alpha$  der entscheidende Mediator der Mobilisierung und Rekrutierung von SPCs nach Gefäßverletzung ist, scheint ein Zusammenhang zwischen der LPA-induzierten Neointimabildung und der Rekrutierung von SPCs naheliegend (49, 53).



#### **4.3. Die LPA induzierte Neointimabildung ist mit der Expression von HIF-1 $\alpha$ assoziiert**

Es ist bekannt, dass nach einer Gefäßverletzung die gesteigerte Expression von HIF-1 $\alpha$  zu einer Hochregulation der SDF-1 $\alpha$  Expression führt und die Neointimabildung steigert (123). Da frühere Studien gezeigt haben, dass LPA das aus Tumorzellen freigesetzt wird die HIF-1 $\alpha$  Expression in mesenchymalen Stammzellen hochreguliert (83), wurde in dieser Arbeit untersucht, ob HIF-1 $\alpha$  auch im Rahmen der LPA induzierten neointimalen Hyperplasie hochreguliert wird. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit LPA 20:4 und 1-AGP, aber nicht mit LPA 18:0 oder Kontroll-Puffer, zu einer gesteigerten HIF-1 $\alpha$  Expression in neointimalen Zellen führt. Ähnlich wie für die SDF-1 $\alpha$  Expression, zeigte sich auch hier im Vergleich zur Behandlung mit 1-AGP eine tendenziell höhere HIF-1 $\alpha$  Expression in den neointimalen Zellen nach LPA 20:4 Behandlung. Darüber hinaus induziert LPA 20:4 bereits 1d nach Inkubation eine HIF-1 $\alpha$  Expression in der Gefäßwand (191). Damit regulieren LPA 20:4 und 1AGP sowohl die Expression von SDF-1 $\alpha$  als auch von HIF-1 $\alpha$  während der Neointimabildung. Dieser Befund ist vereinbar mit der Hypothese, dass ungesättigte LPAs über die Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  zu einer vermehrten SDF-1 $\alpha$  Expression führen. In diesem Zusammenhang ist auch von Bedeutung, dass eine pharmakologische Hemmung der LPA Rezeptoren LPA<sub>1</sub> und LPA<sub>3</sub> nach einer Drahtverletzung der A. carotis nicht nur die Neointimabildung und die SDF-1 $\alpha$  Expression, sondern auch die HIF-1 $\alpha$  Expression in der Neointima reduzierte (191). Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass auch im Rahmen einer Gefäßverletzung die durch ungesättigte LPAs induzierte SDF-1 $\alpha$  Expression durch HIF-1 $\alpha$  vermittelt ist.

#### **4.4. Die Neointimabildung durch ungesättigte LPAs ist mit der Mobilisation glatter Muskelvorläuferzellen (SPCs) assoziiert**

In vitro konnte man zeigen, dass LPA die Proliferation von SMCs induziert. Dies erfolgt durch die Aktivierung der LPA<sub>1</sub>- und G<sub>i/q</sub>-Protein gekoppelten Rezeptoren und involviert den PKC, ERK1/2, und den PI3K/PKB Signaltransduktionsweg sowie die MAPK Kaska-

de (168, 176, 177). Des Weiteren steigert LPA die migratorische Aktivität von VSMCs durch die  $G_{i/q}$  protein-gekoppelte  $LPA_1$  rezeptorvermittelte Aktivierung des p38MAPK Signaltransduktionsweg (170, 171). Über die Rolle der LPAs bei der Mobilisierung und Rekrutierung von SPCs ist bisher noch wenig bekannt. Da die Neointimabildung nach Gefäßverletzung mit einer SDF-1 $\alpha$ -vermittelten Mobilisierung und Rekrutierung von SPCs assoziiert ist, wurde in dieser Arbeit das Verhalten hämatopoetischer Stammzellen nach LPA Inkubation untersucht. Im Gegensatz zur Behandlung mit LPA 18:0, 1-AGP und Kontroll-Puffer, die keine Mobilisierung von SPCs nach einem Tag zur Folge hatte, konnte in den mit LPA 20:4-behandelten Mäusen ein signifikanter Anstieg der SPCs einen Tag nach der Behandlung gezeigt werden. In den mit 1-AGP behandelten Mäusen kam es dagegen erst 9 Tage nach der Inkubation zum Anstieg zirkulierender SPCs. Die verzögerte Mobilisierung der SPC nach Inkubation mit 1-AGP könnte auf eine, im Vergleich zu LPA 20:4, verlangsamte Hochregulation von SDF-1a in der Gefäßwand zurückzuführen sein. Diese Befunde sind vereinbar mit der Schlussfolgerung, dass ungesättigte LPA-Derivate durch die SDF-1 $\alpha$ -vermittelte Mobilisierung von SPCs zur Neointimabildung führen. Weitere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass sowohl die schnelle SPC Mobilisierung durch LPA 20:4 nach einem Tag als auch die verzögerte Mobilisierung durch 1-AGP nach 9 Tagen durch die Aktivierung der LPA Rezeptoren verursacht wurde, da in beiden Fällen die SPC Mobilisierung durch den LPA-Rezeptorantagonisten gehemmt werden konnte (191). Ferner konnte gezeigt werden, dass ein Knockdown von entweder  $LPA_1$ ,  $LPA_3$  oder SDF-1a in der Gefäßwand die LPA 20:4- induzierte SPC Mobilisierung reduziert (191). Diese SPC Mobilisierung dürfte ursächlich für die LPA-induzierte Neointimabildung sein, da die neointimale Akkumulation von SPCs aus dem Knochenmark nach LPA 20:4 Behandlung gesteigert ist (191). Diese zusätzlichen Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe bestätigten die Hypothese, dass ungesättigte LPAs durch die LPA-Rezeptor-vermittelte Hochregulation von SDF-1 $\alpha$  SPCs in die Zirkulation mobilisieren und diese nach Rekrutierung in die Gefäßwand zur Neointimabildung beitragen.

#### 4.5. Klinischer Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ungesättigte LPAs eine neointimale Hyperplasie im Mausmodell induzieren und dass diese Neointimabildung mit einer erhöhten Expression von SDF-1 $\alpha$  und HIF1- $\alpha$  assoziiert ist. Das Chemokin SDF-1 $\alpha$  konnte man in atherosklerotischen Plaques und in neointimale Läsionen nach Gefäßverletzungen nachweisen. Es wurde als ein wesentliches Signalmolekül bei der Neointimalbildung nach einer Gefäßverletzung durch die Mobilisierung und lokale Rekrutierung von SPCs identifiziert. Jedoch führte die systemische Hemmung des SDF-1 $\alpha$  Rezeptors CXCR4, bei Mäusen mit Diät-induzierter Atherosklerose zu einer vermehrten Plaquebildung durch die Mobilisation neutrophiler Granulozyten (80). Dementsprechend käme ausschließlich eine lokale Hemmung der verletzungsinduzierten SDF-1 $\alpha$  Expression in Frage um eine Neointimabildung zu verhindern. Da wir jedoch in dieser Arbeit zeigen konnten dass die Neointimabildung durch ungesättigte LPAs mit einer SDF-1 $\alpha$  Expression assoziiert ist und die SDF-1 $\alpha$  Expression in vitro und in vivo über die Blockade von LPA<sub>1</sub> und LPA<sub>3</sub> gehemmt werden konnte (83), könnten die LPA-Rezeptoren ein wichtiger therapeutischer Ansatzpunkt für die Verhinderung der Neointimabildung sein. Da zirkulierende LPAs einen proatherogenen Effekt haben, könnte die Hemmung der LPA-Synthese ein weiterer Schlüssel zur Reduktion der Entstehung von Neointima sein. Hier scheint Autotaxin (ATX) eine entscheidende Rolle zu spielen. LPA wird aus Lysophospholipiden durch extrazelluläres Autotaxin gebildet (197). Arterielle Endothelzellen sezernieren ATX (183). Darüber hinaus konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass ATX in der arteriellen Gefäßwand nach einer Verletzung hochreguliert wird (164). In Mäusen führte die Applikation eines auf Boronsäure basierenden Autotaxininhibitors innerhalb von Minuten zu einer rapiden Reduktion des LPA-Plasmaspiegels, die orale Gabe des Autotaxin-Anatgonisten PF-8380 reduzierte die LPA-Plasmakonzentration um 70% innerhalb von 3 Stunden(198, 199). Die exakte Rolle von ATX bei der Entstehung von Atherosklerose und Atherothrombosen ist noch nicht geklärt und bedarf noch weiterer Forschung, es könnte jedoch eine weitere Möglichkeit sein die Neointimabildung zu unterbinden.

## 5. Zusammenfassung

In Deutschland geht fast jeder zweite Todesfall auf eine Erkrankung des Herz-Kreislauf-Systems zurück. Auch weltweit stellen kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache dar, häufiger als maligne Erkrankungen. Der häufigste Grund für Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sind atherosklerotische Gefäßveränderungen in der Koronar-, Zerebral-, und peripheren Zirkulation. Es bilden sich atherosklerotische Plaques die im Verlauf zu einer Stenosierung, Ruptur oder thrombotischen Verschlüssen des betroffenen Gefäßes führen können. In den meisten Fällen wird mit Hilfe einer PTCA das stenosierte Gefäß wieder geöffnet. Hier wird mit Hilfe eines Ballons durch intraluminalen Druck das Gefäß aufgedehnt. Wenn eine dauerhafte Aufdehnung des stenosierten Gefäßes durch die PTCA nicht gewährleistet werden kann, wird ein Stent eingesetzt. Eine wesentliche Limitation des Langzeiterfolges dieser Therapie ist die Bildung einer intimalen Hyperplasie, der sogenannten Neointima, die zu einer Restenose und somit zu einer erneuten Verengung einer stenosierten, atherosklerotischen Arterie in den ersten Monaten nach Intervention führen kann. Während nach PTCA das *negative Remodelling* und die neointimale Hyperplasie zum erneuten Volumenverlust beitragen, ist die Restenose nach Stentimplantation zu 90% auf die Neointimabildung zurückzuführen. Man weiß heute, dass die Neointima zu 50% aus SMCs besteht. Ursprünglich nahm man an, dass die neointimalen SMCs sowohl bei der nativen Atherosklerose als auch bei der akzelerierten Arteriosklerose lokal aus der Media der Arterienwand einwandern und in der Intima proliferieren. Mittlerweile konnte man zeigen, dass ein Hauptteil der neointimalen SMCs nach einer Gefäßverletzung aus einem adulten Stammzellenpool des Knochenmarks stammt und diese permanent als Vorläuferzellen von SMCs im peripheren Blut zirkulieren. In den letzten Jahren konnte das Chemokin stromal cell derived factor (SDF)-1  $\alpha$  als ein wesentliches Signalmolekül identifiziert werden, das die Mobilisierung der Stammzellen vermittelt. Die Apoptose der medialen SMCs unmittelbar nach der Verletzung schein hier ein wichtiges Bindeglied zwischen der Gefäßverletzung und der SDF-1 $\alpha$  vermittelten SPC-Rekrutierung zu sein. Man konnte zeigen, dass die apoptotischen SMCs Mikrovesikel freisetzen, die die SDF-1 $\alpha$  Expression induzieren können und als eine wichtige Quelle für Vorstufen für LPAs dienen. Die im Rahmen der Verletzung aktivierten Thrombozyten setzten ebenfalls LPA –Vorstufen frei. Ein weiterer

Faktor der bei der Bildung einer neointimalen Hyperplasie eine wichtige Rolle zu spielen scheint ist der Transkriptionsfaktor hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ . Im Ischämiemodell induziert HIF-1 $\alpha$  die Regulation von SDF-1 $\alpha$ . Desweiteren konnte man zeigen dass eine mechanischen Gefäßverletzung ebenfalls zu einer HIF-1 $\alpha$  Expression führt. Es konnten nun auch Derivate der LPA identifiziert werden, die eine gesteigerte HIF-1 $\alpha$  Expression hervorrufen. Ungesättigte LPA induziert die Expression von HIF-1 $\alpha$  in verschiedenen Tumorzelllinien durch Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR Signaltransduktionsweges und von SDF-1 $\alpha$  in mesenchymalen Stammzellen. In vivo konnte bereits gezeigt werden, dass LPA durch eine vermehrte HIF-1 $\alpha$  Expression die Metastasierung von Ovarialkarzinomzellen fördert.

Daher haben wir in dieser Studie die Wirkung gesättigter und ungesättigter LPA-Derivate auf Mäusekarotiden untersucht. Des Weiteren wurde überprüft ob die Neointimabildung der ungesättigten LPAs mit der Expression von SDF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\alpha$  assoziiert ist. Als Tiermodell wurden in dieser Arbeit Wildtypmäuse verwendet. Die rechte A. carotis externa der Mäuse wurde operativ eröffnet und über einen retrograd eingeführten Schlauch die CCA für 30 min mit verschiedenen LPA Derivaten (gesättigt und ungesättigt) sowie PBS-Puffer als Kontrollgruppe inkubiert. Nach vier Wochen erfolgte die Euthanasierung der Tiere und die Präparate wurden entnommen. Die neointimalen und medialen Flächen wurden in Movat's Pentachrom-angefärbten CCAs ausgemessen und die zelluläre Zusammensetzung durch quantitative Immunhistologie und Immunfluoreszenz für SMCs und Makrophagen ausgewertet. Die Expression von SDF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\alpha$  wurde mittels Immunfluoreszenzmiroskopie analysiert. Um die Mobilisierung der zirkulierenden Sca-1<sup>+</sup>/lin<sup>-</sup> SPCs in das periphere Blut nach Gefäßverletzung zu untersuchen, wurden diese Zellen im peripheren Blut vor und 24 h, 9 Tage und 28 Tage nach dem Eingriff durchflusszytometrisch quantifiziert.

Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass ungesättigtes LPA 20:4 und das LPA Analogon 1-AGP18:1 in C57/Bl6 Mäusen nach 28 Tagen eine signifikante neointimale Hyperplasie induzieren. In der PBS-Kontrollgruppe und in der Gruppe mit LPA 18:0 Behandlung kam es dagegen zu keiner Neointimabildung. Die quantitative Immunhistochemie für SMC zeigte, dass die LPA-induzierte Neointima ausschließlich aus SMCs besteht. Mit der MAC2-Immunfluoreszenzfärbung konnten keine Makrophagen in der LPA 20:4

und 1-AGP induzierten Neointima nachgewiesen werden. Sowohl in der LPA 20:4- als auch der 1-AGP induzierten Neointima konnten wir anhand der Immunfluoreszenzfärbung eine erhöhte SDF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\alpha$  Expression im Vergleich zu den PBS- und LPA 18:0-behandelten Karotiden nachweisen. Ferner wiesen die mit LPA 20:4-behandelten Karotiden eine tendenziell höhere SDF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\alpha$  Expression im Vergleich zu den 1-AGP-behandelten Mäusen auf, obwohl der Unterschied nicht statistisch signifikant war. Unmittelbar vor dem Eingriff und 24h, 9 Tage und 28 Tage nach der Inkubation mit den LPA-Derivaten oder PBS wurden Blutproben aus der Schwanzvene entnommen und darin die SPCs in der Zirkulation quantifiziert. Die Ergebnisse zeigten einen signifikanten Anstieg der SPCs 1 Tag nach der Behandlung mit LPA 20:4, während in den 1-AGP-behandelten Mäusen erst 9 Tage nach der Inkubation ein Anstieg der SPCs nachweisbar war. In der LPA 18:0- und der PBS-Kontrollgruppe zeigte sich kein Anstieg der Sca+/Lin+ Zellen. In den 1-AGP behandelten Mäusen ging der Anteil der zirkulierenden Sca+/Lin- Zellen nach 28 Tagen wieder auf ihre Ausgangswerte zurück. Die verzögerte SPC Mobilisierung nach 1-AGP Behandlung könnte auf die im Vergleich zu LPA 20:4 geringere SDF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\alpha$  Expression zurückzuführen sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ungesättigte LPAs eine intimale SMC Akkumulation initiieren, die zur Bildung einer neointimalen Hyperplasie führt. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass LPA20:4 eine signifikante HIF-1 $\alpha$  und SDF-1 $\alpha$  Expression in der Gefäßwand induziert, die für die CXCR4-abhängige Mobilisation von vaskulären Vorläuferzellen nach LPA-Inkubation verantwortlich sein könnte. Ungesättigte LPAs scheinen eine wichtige Rolle bei der Bildung einer neointimalen Hyperplasie durch eine HIF-1 $\alpha$ -vermittelte Aktivierung der SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 Achse zu spielen.

## 6. Referenzen

1. Bundesamt, S. 2012. Gesundheit - Todesursachen.
2. Forschung, B.f.B.u. 2014. Herz-Kreislaufferkrankungen. B.f.B.u. Forschung, editor.
3. Mckay J, M.G. 2004. The Atlas of Heart Disease and Stroke. W.H. Organization, editor. Geneva.
4. Ross, R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for teh 1990s. *Nature* 362:801-9.
5. Lusis, A. 2000. Atherosclerosis. *Nature* 407:233-41.
6. Libby, P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420:868-74.
7. Glass, C.K. 2001. Atherosclerosis-the road ahead. *Cell* 104(4):p503-16.
8. Ross, R. 1999. Atherosclerosis- an iflammatory disease. *N Engl J Med* 340(2):p.115-26.
9. Orford, J.L. 2000. The comparative pathobiology of atherosclerosis and restenosis. *American Journal of Cardiology* 86(4B):6H-11H.
10. Austin, G.E. 1985. Intimal proliferation of smooth muscle cells as an explanation for recurrent coronary artery stenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiology* 6(2):369-375.
11. Libby, P. 2005. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 111(25):3481-3488.
12. Hurlimann, D. 2005. (HIV infection, antiretroviral therapiy, and endothelium). *Herz* 30(6):472-480.
13. Libby, P. 2006. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *American Journal of Clinical Nutrition* 83(2):456s-460s.
14. Stary, H.C., Chandler, A.B., Glagov, S., Guyton, J.R., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M.E., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., and Wissler, R.W. 1994. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 89:2462-2478.
15. Ip, J.H., et al. 1990. Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular i njury and smooth muscle cell proliferation. *J Am Coll Cardiol* 15(7):p.1667-87.

16. Serruys, P.W.e.a. 1988. Incidence of Restenosis after successful coronary angioplasty. A time-related phenomenon. *Circulation* 77:361-371.
17. Serruys, P.W.e.a., editor. Restenosis following coronary angioplasty. Toronto: Hogrefe & Huber. 79-115 pp.
18. Sobel, B., et al. 2001. Acceleration of restenosis by diabetes. *Circulation* 103:1185.
19. Van Belle, E., et al. 2001. Patency of percutaneous transluminal coronary angioplasty aites at 6 month angiographic follow up. *Circulation* 103:1218.
20. Al Suwaidi, J., et al. 2000. Coronary artery stents. *JAMA* 284:1828-36.
21. Carrozza, J.P., Jr., Schatz, R.A., George, C.J., Leon, M.B., King, S.B., 3rd, Hirshfeld, J.W., Curry, R.C., Jr., Ivanhoe, R.J., Buchbinder, M., Cleman, M.W., et al. 1997. Acute and long-term outcome after Palmaz-Schatz stenting: analysis from the New Approaches to Coronary Intervention (NACI) registry. *Am J Cardiol* 80:78K-88K.
22. Nunes, G. 1996. Coronary stent implantation in vessels smaller then 3 mm is associated with higher restenosis rates. *Eur Heart J* 17:173.
23. Heidland, U.E., et al. 1998. Re-Stenose nach PTCA: Pathophysiologische Grundlagen und Möglichkeiten der pharmakologische und atheterinterventionellen Prävention. *Dtsch med Wsch* 123:p.840-856.
24. Schiele, F. 2001. The "angioplastically correct" follow up strategy after stent implantation. *Heart* 85(4):p.363-4.
25. Scheller, B., Hennen, B., Pohl, A., Schieffer, H., and Markwirth, T. 2001. Acute and subacute stent occlusion; risk-reduction by ionic contrast media. *Eur Heart J* 22:385-391.
26. Libby, P., Schwartz, D., Brogi, E., Tanaka, H., and Clinton, S.K. 1992. A cascade model for restenosis. A special case of atherosclerosis progression. *Circulation* 86:III47-52.
27. Forrester, J.S., et al. 1991. A paradigm for restenosis based on cell biology clues for the development of new preventive therapies. *J Am Coll Cardiol* 17(3):p.738-69.



28. Ferns, G.A.e.a. 2000. The mechanisms of coronary restenosis: insights from experimental models. *Int J Exp Pathol* 81(2):p.63-88.
29. Schwartz, S.M. 1999. The intima : A new soil. *Circ Res* 85:877-879.
30. Poon, M., Badimon, J.J., and Fuster, V. 2002. Overcoming restenosis with sirolimus: from alphabet soup to clinical reality. *Lancet* 359:619-622.
31. Fishman, J.A., Ryan, G.B., and Karnovsky, M.J. 1975. Endothelial regeneration in the rat carotid artery and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening. *Lab Invest* 32:339-351.
32. Komatsu, R., Ueda, M., Naruko, T., Kojima, A., and Becker, A.E. 1998. Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses. *Circulation* 98:224-233.
33. Liu, M.W., Hearn, J.A., Luo, J.F., Anderson, P.G., Roubin, G.S., Iyer, S., and Bilodou, L. 1996. Reduction of thrombus formation without inhibiting coagulation factors does not inhibit intimal hyperplasia after balloon injury in pig coronary arteries. *Coron Artery Dis* 7:667-671.
34. Perlman, H., Maillard, L., Krasinski, K., and Walsh, K. 1997. Evidence for the rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells after balloon injury. *Circulation* 95:981-987.
35. Cirillo, P., Golino, P., Ragni, M., Battaglia, C., Pacifico, F., Formisano, S., Buono, C., Condorelli, M., and Chiariello, M. 1999. Activated platelets and leucocytes cooperatively stimulate smooth muscle cell proliferation and proto-oncogene expression via release of soluble growth factors. *Cardiovasc Res* 43:210-218.
36. Chong, H., Vodovotz, Y., Cox, G.W., and Barcellos-Hoff, M.H. 1999. Immunocytochemical localization of latent transforming growth factor-beta1 activation by stimulated macrophages. *J Cell Physiol* 178:275-283.
37. Fishbein, I., Waltenberger, J., Banai, S., Rabinovich, L., Chorny, M., Levitzki, A., Gazit, A., Huber, R., Mayr, U., Gertz, S.D., et al. 2000. Local delivery of platelet-derived growth factor receptor-specific tyrphostin inhibits neointimal formation in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:667-676.
38. Leppanen, O., Janjic, N., Carlsson, M.A., Pietras, K., Levin, M., Vargeese, C., Green, L.S., Bergqvist, D., Ostman, A., and Heldin, C.H. 2000. Intimal hyper-

- plasia recurs after removal of PDGF-AB and -BB inhibition in the rat carotid artery injury model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:E89-95.
39. Chironi, G., Escaut, L., Gariépy, J., Cogny, A., Teicher, E., Monsuez, J.J., Levenson, J., Simon, A., and Vittecoq, D. 2003. Brief report: carotid intima-media thickness in heavily pretreated HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 32:490-493.
  40. Schober, A., Hoffmann, R., Oprea, N., Knarren, S., Iofina, E., Hutschenreuter, G., Hanrath, P., and Weber, C. 2005. Peripheral CD34+ cells and the risk of in-stent restenosis in patients with coronary heart disease. *Am J Cardiol* 96:1116-1122.
  41. Schober, A., and Weber, C. 2005. Mechanisms of monocyte recruitment in vascular repair after injury. *Antioxid Redox Signal* 7:1249-1257.
  42. Farb, A., Weber, D.K., Kolodgie, F.D., Burke, A.P., and Virmani, R. 2002. Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans. *Circulation* 105:2974-2980.
  43. Virmani, R., and Farb, A. 1999. Pathology of in-stent restenosis. *Curr Opin Lipidol* 10:499-506.
  44. Sata, M., Saiura, A., Kunisato, A., Tojo, A., Okada, S., Tokuhisa, T., Hirai, H., Makuuchi, M., Hirata, Y., and Nagai, R. 2002. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 8:403-409.
  45. Simper, D., Stalboerger, P.G., Panetta, C.J., Wang, S., and Caplice, N.M. 2002. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation* 106:1199-1204.
  46. Caplice, N.M., Bunch, T.J., Stalboerger, P.G., Wang, S., Simper, D., Miller, D.V., Russell, S.J., Litzow, M.R., and Edwards, W.D. 2003. Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4754-4759.
  47. Han, C.I., Campbell, G.R., and Campbell, J.H. 2001. Circulating bone marrow cells can contribute to neointimal formation. *J Vasc Res* 38:113-119.
  48. Shimizu, K., Sugiyama, S., Aikawa, M., Fukumoto, Y., Rabkin, E., Libby, P., and Mitchell, R.N. 2001. Host bone-marrow cells are a source of donor intimal

- smooth- muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy. *Nat Med* 7:738-741.
49. Schober, A., Knarren, S., Lietz, M., Lin, E.A., and Weber, C. 2003. Crucial role of stromal cell-derived factor-1alpha in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 108:2491-2497.
50. Tanaka, K., Sata, M., Hirata, Y., and Nagai, R. 2003. Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries. *Circ Res* 93:783-790.
51. Xu, Y., Arai, H., Zhuge, X., Sano, H., Murayama, T., Yoshimoto, M., Heike, T., Nakahata, T., Nishikawa, S., Kita, T., et al. 2004. Role of bone marrow-derived progenitor cells in cuff-induced vascular injury in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:477-482.
52. Schober, A., and Zerneck, A. 2007. Chemokines in vascular remodeling. *Thromb Haemost* 97:730-737.
53. Zerneck, A., Schober, A., Bot, I., von Hundelshausen, P., Liehn, E.A., Mopps, B., Mericskay, M., Gierschik, P., Biessen, E.A., and Weber, C. 2005. SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circ Res* 96:784-791.
54. Baggiolini, M., Dewald, B., and Moser, B. 1997. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 15:675-705.
55. Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hebert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., and Power, C.A. 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 52:145-176.
56. Bleul, C.C., Fuhlbrigge, R.C., Casasnovas, J.M., Aiuti, A., and Springer, T.A. 1996. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 184:1101-1109.
57. Shirozu, M., Nakano, T., Inazawa, J., Tashiro, K., Tada, H., Shinohara, T., and Honjo, T. 1995. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 28:495-500.

58. Crump, M.P., Gong, J.H., Loetscher, P., Rajarathnam, K., Amara, A., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J.L., Baggiolini, M., Sykes, B.D., and Clark-Lewis, I. 1997. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J* 16:6996-7007.
59. Murphy, P.M. 2000. Chemokine receptor cloning. *Methods Mol Biol* 138:89-98.
60. Balabanian, K., Lagane, B., Infantino, S., Chow, K.Y., Harriague, J., Moepps, B., Arenzana-Seisdedos, F., Thelen, M., and Bachelierie, F. 2005. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 280:35760-35766.
61. Burns, J.M., Summers, B.C., Wang, Y., Melikian, A., Berahovich, R., Miao, Z., Penfold, M.E., Sunshine, M.J., Littman, D.R., Kuo, C.J., et al. 2006. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* 203:2201-2213.
62. Ganju, R.K., Brubaker, S.A., Meyer, J., Dutt, P., Yang, Y., Qin, S., Newman, W., and Gropman, J.E. 1998. The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem* 273:23169-23175.
63. Wang, J.F., Park, I.W., and Gropman, J.E. 2000. Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C. *Blood* 95:2505-2513.
64. Tilton, B., Ho, L., Oberlin, E., Loetscher, P., Baleux, F., Clark-Lewis, I., and Thelen, M. 2000. Signal transduction by CXC chemokine receptor 4. Stromal cell-derived factor 1 stimulates prolonged protein kinase B and extracellular signal-regulated kinase 2 activation in T lymphocytes. *J Exp Med* 192:313-324.
65. Sotsios, Y., Whittaker, G.C., Westwick, J., and Ward, S.G. 1999. The CXC chemokine stromal cell-derived factor activates a Gi-coupled phosphoinositide 3-kinase in T lymphocytes. *J Immunol* 163:5954-5963.
66. Signoret, N., Oldridge, J., Pelchen-Matthews, A., Klasse, P.J., Tran, T., Brass, L.F., Rosenkilde, M.M., Schwartz, T.W., Holmes, W., Dallas, W., et al. 1997.

- Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. *J Cell Biol* 139:651-664.
67. Tarasova, N.I., Stauber, R.H., and Michejda, C.J. 1998. Spontaneous and ligand-induced trafficking of CXC-chemokine receptor 4. *J Biol Chem* 273:15883-15886.
68. Baggiolini, M., Dewald, B., and Moser, B. 1994. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 55:97-179.
69. Furie, M.B., and Randolph, G.J. 1995. Chemokines and tissue injury. *Am J Pathol* 146:1287-1301.
70. Baggiolini, M. 2001. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 250:91-104.
71. Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., and Berger, E.A. 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272:872-877.
72. Lapidot, T., and Petit, I. 2002. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol* 30:973-981.
73. Dimmeler, S., Zeiher, A.M., and Schneider, M.D. 2005. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest* 115:572-583.
74. Gerard, C., and Rollins, B.J. 2001. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2:108-115.
75. Charo, I.F., and Ransohoff, R.M. 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 354:610-621.
76. Schober, A., Karshovska, E., Zernecke, A., and Weber, C. 2006. SDF-1alpha-mediated tissue repair by stem cells: a promising tool in cardiovascular medicine? *Trends Cardiovasc Med* 16:103-108.
77. Abi-Younes, S., Sauty, A., Mach, F., Sukhova, G.K., Libby, P., and Luster, A.D. 2000. The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. *Circ Res* 86:131-138.
78. Kaminski, A.e.a. 2005. Bedeutung von stromal cell derived factor-1(SDF-1) für das "homig" von Stammzellen. *Chirurgisches Forum*:p. 383-384.

79. Damas, J.K., Waehre, T., Yndestad, A., Ueland, T., Muller, F., Eiken, H.G., Holm, A.M., Halvorsen, B., Froland, S.S., Gullestad, L., et al. 2002. Stromal cell-derived factor-1alpha in unstable angina: potential antiinflammatory and matrix-stabilizing effects. *Circulation* 106:36-42.
80. Zernecke, A., Bot, I., Djalali-Talab, Y., Shagdarsuren, E., Bidzhekov, K., Meiler, S., Krohn, R., Schober, A., Sperandio, M., Soehnlein, O., et al. 2008. Protective role of CXC receptor 4/CXC ligand 12 unveils the importance of neutrophils in atherosclerosis. *Circ Res* 102:209-217.
81. Sakihama, H., Masunaga, T., Yamashita, K., Hashimoto, T., Inobe, M., Todo, S., and Uede, T. 2004. Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 interaction is critical for development of transplant arteriosclerosis. *Circulation* 110:2924-2930.
82. Ceradini, D.J., Kulkarni, A.R., Callaghan, M.J., Tepper, O.M., Bastidas, N., Kleinman, M.E., Capla, J.M., Galiano, R.D., Levine, J.P., and Gurtner, G.C. 2004. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 10:858-864.
83. Jeon, E.S., Moon, H.J., Lee, M.J., Song, H.Y., Kim, Y.M., Cho, M., Suh, D.S., Yoon, M.S., Chang, C.L., Jung, J.S., et al. 2008. Cancer-derived lysophosphatidic acid stimulates differentiation of human mesenchymal stem cells to myofibroblast-like cells. *Stem Cells* 26:789-797.
84. Semenza, G. 2002. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol* 64:993-998.
85. Semenza, G.L. 1999. Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:551-578.
86. Semenza, G.L., Agani, F., Iyer, N., Kotch, L., Laughner, E., Leung, S., and Yu, A. 1999. Regulation of cardiovascular development and physiology by hypoxia-inducible factor 1. *Ann N Y Acad Sci* 874:262-268.
87. Taylor, B.L., and Zhulin, I.B. 1999. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:479-506.
88. Huang, L.E., Gu, J., Schau, M., and Bunn, H.F. 1998. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7987-7992.

89. Wang, G.L., and Semenza, G.L. 1993. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* 82:3610-3615.
90. Yu, A.Y., Frid, M.G., Shimoda, L.A., Wiener, C.M., Stenmark, K., and Semenza, G.L. 1998. Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am J Physiol* 275:L818-826.
91. Semenza, G.L. 2001. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med* 7:345-350.
92. Semenza, G.L. 2002. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* 8:S62-67.
93. Dery, M.A., Michaud, M.D., and Richard, D.E. 2005. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol* 37:535-540.
94. Maynard, M.A., and Ohh, M. 2004. Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia-inducible factor in kidney cancer. *Am J Nephrol* 24:1-13.
95. Hu, C.J., Wang, L.Y., Chodosh, L.A., Keith, B., and Simon, M.C. 2003. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* 23:9361-9374.
96. Camenisch, G., Stroka, D.M., Gassmann, M., and Wenger, R.H. 2001. Attenuation of HIF-1 DNA-binding activity limits hypoxia-inducible endothelin-1 expression. *Pflugers Arch* 443:240-249.
97. Kaufman, B., Scharf, O., Arbeit, J., Ashcroft, M., Brown, J.M., Bruick, R.K., Chapman, J.D., Evans, S.M., Giaccia, A.J., Harris, A.L., et al. 2004. Proceedings of the Oxygen Homeostasis/Hypoxia Meeting. *Cancer Res* 64:3350-3356.
98. Semenza, G.L. 2000. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* (1985) 88:1474-1480.
99. Page, E.L., Robitaille, G.A., Pouyssegur, J., and Richard, D.E. 2002. Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem* 277:48403-48409.
100. Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P.C., and Semenza, G.L. 2001. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-

- 1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* 21:3995-4004.
101. Park, J.W., Chun, Y.S., and Kim, M.S. 2004. Hypoxia-inducible factor 1-related diseases and prospective therapeutic tools. *J Pharmacol Sci* 94:221-232.
  102. Hellwig-Burgel, T., Rutkowski, K., Metzen, E., Fandrey, J., and Jelkmann, W. 1999. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 94:1561-1567.
  103. Gorlach, A., Diebold, I., Schini-Kerth, V.B., Berchner-Pfannschmidt, U., Roth, U., Brandes, R.P., Kietzmann, T., and Busse, R. 2001. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res* 89:47-54.
  104. Richard, D.E., Berra, E., and Pouyssegur, J. 2000. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 275:26765-26771.
  105. Feldser, D., Agani, F., Iyer, N.V., Pak, B., Ferreira, G., and Semenza, G.L. 1999. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* 59:3915-3918.
  106. Vink, A., Schoneveld, A.H., Lamers, D., Houben, A.J., van der Groep, P., van Diest, P.J., and Pasterkamp, G. 2007. HIF-1 alpha expression is associated with an atheromatous inflammatory plaque phenotype and upregulated in activated macrophages. *Atherosclerosis* 195:e69-75.
  107. Jiang, G., Li, T., Qiu, Y., Rui, Y., Chen, W., and Lou, Y. 2007. RNA interference for HIF-1alpha inhibits foam cells formation in vitro. *Eur J Pharmacol* 562:183-190.
  108. Cramer, T., Yamanishi, Y., Clausen, B.E., Forster, I., Pawlinski, R., Mackman, N., Haase, V.H., Jaenisch, R., Corr, M., Nizet, V., et al. 2003. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 112:645-657.
  109. Ben-Shoshan, J., Afek, A., Maysel-Auslender, S., Barzelay, A., Rubinstein, A., Keren, G., and George, J. 2009. HIF-1alpha overexpression and experimental murine atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:665-670.



110. Kong, T., Eltzschig, H.K., Karhausen, J., Colgan, S.P., and Shelley, C.S. 2004. Leukocyte adhesion during hypoxia is mediated by HIF-1-dependent induction of beta2 integrin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10440-10445.
111. Osada-Oka, M., Ikeda, T., Akiba, S., and Sato, T. 2008. Hypoxia stimulates the autocrine regulation of migration of vascular smooth muscle cells via HIF-1alpha-dependent expression of thrombospondin-1. *J Cell Biochem* 104:1918-1926.
112. Hanze, J., Weissmann, N., Grimminger, F., Seeger, W., and Rose, F. 2007. Cellular and molecular mechanisms of hypoxia-inducible factor driven vascular remodeling. *Thromb Haemost* 97:774-787.
113. Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, A., Harpal, K., Eberhardt, C., et al. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380:435-439.
114. Ferrara, N., and Henzel, W.J. 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161:851-858.
115. Ferrara, N. 1999. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 237:1-30.
116. Szabo, I.L., Kawanaka, H., Jones, M.K., Pai, R., Soreghan, B.A., Baatar, D., Husain, S.S., and Tarnawski, A.S. 2001. Activation of hypoxia inducible factor-1alpha in gastric mucosa in response to ethanol injury: a trigger for angiogenesis? *Life Sci* 69:3035-3044.
117. Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., and Semenza, G.L. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16:4604-4613.
118. Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y., et al. 1998. Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 12:149-162.
119. Tang, N., Wang, L., Esko, J., Giordano, F.J., Huang, Y., Gerber, H.P., Ferrara, N., and Johnson, R.S. 2004. Loss of HIF-1alpha in endothelial cells disrupts a

- hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell* 6:485-495.
120. Okuyama, H., Krishnamachary, B., Zhou, Y.F., Nagasawa, H., Bosch-Marce, M., and Semenza, G.L. 2006. Expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 in bone marrow-derived mesenchymal cells is dependent on hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 281:15554-15563.
  121. Yu, A.Y., Shimoda, L.A., Iyer, N.V., Huso, D.L., Sun, X., McWilliams, R., Beaty, T., Sham, J.S., Wiener, C.M., Sylvester, J.T., et al. 1999. Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Clin Invest* 103:691-696.
  122. Kuwahara, F., Kai, H., Tokuda, K., Shibata, R., Kusaba, K., Tahara, N., Niiyama, H., Nagata, T., and Imaizumi, T. 2002. Hypoxia-inducible factor-1alpha/vascular endothelial growth factor pathway for adventitial vasa vasorum formation in hypertensive rat aorta. *Hypertension* 39:46-50.
  123. Karshovska, E., Zerneck, A., Sevilmis, G., Millet, A., Hristov, M., Cohen, C.D., Schmid, H., Krotz, F., Sohn, H.Y., Klauss, V., et al. 2007. Expression of HIF-1alpha in injured arteries controls SDF-1alpha mediated neointima formation in apolipoprotein E deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:2540-2547.
  124. Andrassy, M., Belov, D., Harja, E., Zou, Y.S., Leitges, M., Katus, H.A., Nawroth, P.P., Yan, S.D., Schmidt, A.M., and Yan, S.F. 2005. Central role of PKCbeta in neointimal expansion triggered by acute arterial injury. *Circ Res* 96:476-483.
  125. Assoian, R.K., Grotendorst, G.R., Miller, D.M., and Sporn, M.B. 1984. Cellular transformation by coordinated action of three peptide growth factors from human platelets. *Nature* 309:804-806.
  126. Groves, H.M., Kinlough-Rathbone, R.L., Richardson, M., Jorgensen, L., Moore, S., and Mustard, J.F. 1982. Thrombin generation and fibrin formation following injury to rabbit neointima. Studies of vessel wall reactivity and platelet survival. *Lab Invest* 46:605-612.
  127. Ferns, G.A., Raines, E.W., Sprugel, K.H., Motani, A.S., Reidy, M.A., and Ross, R. 1991. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science* 253:1129-1132.

128. Panek, R.L., Dahring, T.K., Olszewski, B.J., and Keiser, J.A. 1997. PDGF receptor protein tyrosine kinase expression in the balloon-injured rat carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1283-1288.
129. Mills, G.B., and Moolenaar, W.H. 2003. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer* 3:582-591.
130. Saba, J.D. 2004. Lysophospholipids in development: Miles apart and edging in. *J Cell Biochem* 92:967-992.
131. Bandoh, K., Aoki, J., Taira, A., Tsujimoto, M., Arai, H., and Inoue, K. 2000. Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species. Structure-activity relationship of cloned LPA receptors. *FEBS Lett* 478:159-165.
132. Simpson, C.M., Itabe, H., Reynolds, C.N., King, W.C., and Glomset, J.A. 1991. Swiss 3T3 cells preferentially incorporate sn-2-arachidonoyl monoacylglycerol into sn-1-stearoyl-2-arachidonoyl phosphatidylinositol. *J Biol Chem* 266:15902-15909.
133. Vancura, A., Carroll, M.A., and Haldar, D. 1991. A lysophosphatidic acid-binding cytosolic protein stimulates mitochondrial glycerophosphate acyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* 175:339-343.
134. Aoki, J., Taira, A., Takanezawa, Y., Kishi, Y., Hama, K., Kishimoto, T., Mizuno, K., Saku, K., Taguchi, R., and Arai, H. 2002. Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *J Biol Chem* 277:48737-48744.
135. Moolenaar, W.H. 2002. Lysophospholipids in the limelight: autotaxin takes center stage. *J Cell Biol* 158:197-199.
136. Fourcade, O., Simon, M.F., Viode, C., Rugani, N., Leballe, F., Ragab, A., Fournie, B., Sarda, L., and Chap, H. 1995. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* 80:919-927.
137. Chun, J., Goetzl, E.J., Hla, T., Igarashi, Y., Lynch, K.R., Moolenaar, W., Pyne, S., and Tigyi, G. 2002. International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 54:265-269.

138. Tigyi, G. Aiming drug discovery at lysophosphatidic acid targets. *Br J Pharmacol* 161:241-270.
139. Choi, J.W., Herr, D.R., Noguchi, K., Yung, Y.C., Lee, C.W., Mutoh, T., Lin, M.E., Teo, S.T., Park, K.E., Mosley, A.N., et al. LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:157-186.
140. McIntyre, T.M., Pontsler, A.V., Silva, A.R., St Hilaire, A., Xu, Y., Hinshaw, J.C., Zimmerman, G.A., Hama, K., Aoki, J., Arai, H., et al. 2003. Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPAR-gamma agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:131-136.
141. Zhang, C., Baker, D.L., Yasuda, S., Makarova, N., Balazs, L., Johnson, L.R., Marathe, G.K., McIntyre, T.M., Xu, Y., Prestwich, G.D., et al. 2004. Lysophosphatidic acid induces neointima formation through PPARgamma activation. *J Exp Med* 199:763-774.
142. Kai, M., Wada, I., Imai, S., Sakane, F., and Kanoh, H. 1997. Cloning and characterization of two human isozymes of Mg<sup>2+</sup>-independent phosphatidic acid phosphatase. *J Biol Chem* 272:24572-24578.
143. Leung, D.W., Tompkins, C.K., and White, T. 1998. Molecular cloning of two alternatively spliced forms of human phosphatidic acid phosphatase cDNAs that are differentially expressed in normal and tumor cells. *DNA Cell Biol* 17:377-385.
144. Waggoner, D.W., Gomez-Munoz, A., Dewald, J., and Brindley, D.N. 1996. Phosphatidate phosphohydrolase catalyzes the hydrolysis of ceramide 1-phosphate, lysophosphatidate, and sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem* 271:16506-16509.
145. Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikov, A.V., Witke, W., Huttner, W.B., and Soling, H.D. 1999. Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature* 401:133-141.
146. Thompson, F.J., and Clark, M.A. 1994. Purification of a lysophosphatidic acid-hydrolysing lysophospholipase from rat brain. *Biochem J* 300 ( Pt 2):457-461.
147. Moolenaar, W.H. 1995. Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *J Biol Chem* 270:12949-12952.

148. Gerrard, J.M., and Robinson, P. 1989. Identification of the molecular species of lysophosphatidic acid produced when platelets are stimulated by thrombin. *Biochim Biophys Acta* 1001:282-285.
149. Murph, M., Tanaka, T., Liu, S., and Mills, G.B. 2006. Of spiders and crabs: the emergence of lysophospholipids and their metabolic pathways as targets for therapy in cancer. *Clin Cancer Res* 12:6598-6602.
150. Herr, D.R., and Chun, J. 2007. Effects of LPA and S1P on the nervous system and implications for their involvement in disease. *Curr Drug Targets* 8:155-167.
151. Aoki, J. 2004. Mechanisms of lysophosphatidic acid production. *Semin Cell Dev Biol* 15:477-489.
152. Rother, E., Brandl, R., Baker, D.L., Goyal, P., Gebhard, H., Tigyi, G., and Siess, W. 2003. Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic Acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques. *Circulation* 108:741-747.
153. Bot, M., Bot, I., Lopez-Vales, R., van de Lest, C.H., Saulnier-Blache, J.S., Helms, J.B., David, S., van Berkel, T.J., and Biessen, E.A. Atherosclerotic lesion progression changes lysophosphatidic acid homeostasis to favor its accumulation. *Am J Pathol* 176:3073-3084.
154. Lusis, A.J. 2000. Atherosclerosis. *Nature* 407:233-241.
155. Siess, W., Zangl, K.J., Essler, M., Bauer, M., Brandl, R., Corrinth, C., Bittman, R., Tigyi, G., and Aepfelbacher, M. 1999. Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6931-6936.
156. Palmethofer, A., Robson, S.C., and Nehls, V. 1999. Lysophosphatidic acid activates nuclear factor kappa B and induces proinflammatory gene expression in endothelial cells. *Thromb Haemost* 82:1532-1537.
157. Rizza, C., Leitinger, N., Yue, J., Fischer, D.J., Wang, D.A., Shih, P.T., Lee, H., Tigyi, G., and Berliner, J.A. 1999. Lysophosphatidic acid as a regulator of endothelial/leukocyte interaction. *Lab Invest* 79:1227-1235.

158. Lee, H., Lin, C.I., Liao, J.J., Lee, Y.W., Yang, H.Y., Lee, C.Y., Hsu, H.Y., and Wu, H.L. 2004. Lysophospholipids increase ICAM-1 expression in HUVEC through a Gi- and NF-kappaB-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C1657-1666.
159. Lin, C.I., Chen, C.N., Lin, P.W., Chang, K.J., Hsieh, F.J., and Lee, H. 2007. Lysophosphatidic acid regulates inflammation-related genes in human endothelial cells through LPA1 and LPA3. *Biochem Biophys Res Commun* 363:1001-1008.
160. Gustin, C., Delaive, E., Dieu, M., Calay, D., and Raes, M. 2008. Upregulation of pentraxin-3 in human endothelial cells after lysophosphatidic acid exposure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:491-497.
161. Weber, K.S., von Hundelshausen, P., Clark-Lewis, I., Weber, P.C., and Weber, C. 1999. Differential immobilization and hierarchical involvement of chemokines in monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow. *Eur J Immunol* 29:700-712.
162. Huo, Y., Weber, C., Forlow, S.B., Sperandio, M., Thatte, J., Mack, M., Jung, S., Littman, D.R., and Ley, K. 2001. The chemokine KC, but not monocyte chemoattractant protein-1, triggers monocyte arrest on early atherosclerotic endothelium. *J Clin Invest* 108:1307-1314.
163. Oynebraten, I., Bakke, O., Brandtzaeg, P., Johansen, F.E., and Haraldsen, G. 2004. Rapid chemokine secretion from endothelial cells originates from 2 distinct compartments. *Blood* 104:314-320.
164. Zhou, Z., Subramanian, P., Sevilmis, G., Globke, B., Soehnlein, O., Karshovska, E., Megens, R., Heyll, K., Chun, J., Saulnier-Blache, J.S., et al. Lipoprotein-derived lysophosphatidic acid promotes atherosclerosis by releasing CXCL1 from the endothelium. *Cell Metab* 13:592-600.
165. Chang, C.L., Lin, M.E., Hsu, H.Y., Yao, C.L., Hwang, S.M., Pan, C.Y., Hsu, C.Y., and Lee, H. 2008. Lysophosphatidic acid-induced interleukin-1 beta expression is mediated through Gi/Rho and the generation of reactive oxygen species in macrophages. *J Biomed Sci* 15:357-363.
166. Llodra, J., Angeli, V., Liu, J., Trogan, E., Fisher, E.A., and Randolph, G.J. 2004. Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes

- regressive, but not progressive, plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11779-11784.
167. Zeiffer, U., Schober, A., Lietz, M., Liehn, E.A., Erl, W., Emans, N., Yan, Z.Q., and Weber, C. 2004. Neointimal smooth muscle cells display a proinflammatory phenotype resulting in increased leukocyte recruitment mediated by P-selectin and chemokines. *Circ Res* 94:776-784.
168. Tokumura, A., Imori, M., Nishioka, Y., Kitahara, M., Sakashita, M., and Tanaka, S. 1994. Lysophosphatidic acids induce proliferation of cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta. *Am J Physiol* 267:C204-210.
169. Natarajan, V., Scribner, W.M., Hart, C.M., and Parthasarathy, S. 1995. Oxidized low density lipoprotein-mediated activation of phospholipase D in smooth muscle cells: a possible role in cell proliferation and atherogenesis. *J Lipid Res* 36:2005-2016.
170. Kim, J., Keys, J.R., and Eckhart, A.D. 2006. Vascular smooth muscle migration and proliferation in response to lysophosphatidic acid (LPA) is mediated by LPA receptors coupling to Gq. *Cell Signal* 18:1695-1701.
171. Damirin, A., Tomura, H., Komachi, M., Liu, J.P., Mogi, C., Tobo, M., Wang, J.Q., Kimura, T., Kuwabara, A., Yamazaki, Y., et al. 2007. Role of lipoprotein-associated lysophospholipids in migratory activity of coronary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H2513-2522.
172. Calvayrac, O., Rodriguez-Calvo, R., Alonso, J., Orbe, J., Martin-Ventura, J.L., Guadall, A., Gentile, M., Juan-Babot, O., Egido, J., Beloqui, O., et al. CCL20 is increased in hypercholesterolemic subjects and is upregulated by LDL in vascular smooth muscle cells: role of NF-kappaB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:2733-2741.
173. Cui, M.Z., Zhao, G., Winokur, A.L., Laag, E., Bydash, J.R., Penn, M.S., Chisolm, G.M., and Xu, X. 2003. Lysophosphatidic acid induction of tissue factor expression in aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:224-230.
174. Kaneyuki, U., Ueda, S., Yamagishi, S., Kato, S., Fujimura, T., Shibata, R., Hayashida, A., Yoshimura, J., Kojiro, M., Oshima, K., et al. 2007. Pitavastatin inhibits lysophosphatidic acid-induced proliferation and monocyte chemoattractant

- protein-1 expression in aortic smooth muscle cells by suppressing Rac-1-mediated reactive oxygen species generation. *Vascul Pharmacol* 46:286-292.
175. Schwartz, S.M., deBlois, D., and O'Brien, E.R. 1995. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 77:445-465.
176. Seewald, S., Sachinidis, A., Dusing, R., Ko, Y., Seul, C., Epping, P., and Vetter, H. 1997. Lysophosphatidic acid and intracellular signalling in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 130:121-131.
177. Seewald, S., Schmitz, U., Seul, C., Ko, Y., Sachinidis, A., and Vetter, H. 1999. Lysophosphatidic acid stimulates protein kinase C isoforms alpha, beta, epsilon, and zeta in a pertussis toxin sensitive pathway in vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens* 12:532-537.
178. Hayashi, K., Takahashi, M., Nishida, W., Yoshida, K., Ohkawa, Y., Kitabatake, A., Aoki, J., Arai, H., and Sobue, K. 2001. Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells induced by unsaturated lysophosphatidic acids. *Circ Res* 89:251-258.
179. Yoshida, K., Nishida, W., Hayashi, K., Ohkawa, Y., Ogawa, A., Aoki, J., Arai, H., and Sobue, K. 2003. Vascular remodeling induced by naturally occurring unsaturated lysophosphatidic acid in vivo. *Circulation* 108:1746-1752.
180. Lim, S., Jin, C.J., Kim, M., Chung, S.S., Park, H.S., Lee, I.K., Lee, C.T., Cho, Y.M., Lee, H.K., and Park, K.S. 2006. PPARgamma gene transfer sustains apoptosis, inhibits vascular smooth muscle cell proliferation, and reduces neointima formation after balloon injury in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:808-813.
181. Marx, N., Wohrle, J., Nusser, T., Walcher, D., Rinker, A., Hombach, V., Koenig, W., and Hoher, M. 2005. Pioglitazone reduces neointima volume after coronary stent implantation: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial in nondiabetic patients. *Circulation* 112:2792-2798.
182. Phillips, J.W., Barringhaus, K.G., Sanders, J.M., Yang, Z., Chen, M., Hesselbacher, S., Czarnik, A.C., Ley, K., Nadler, J., and Sarembock, I.J. 2003. Rosiglitazone reduces the accelerated neointima formation after arterial injury in a mouse injury model of type 2 diabetes. *Circulation* 108:1994-1999.



183. Panchatcharam, M., Miriyala, S., Yang, F., Rojas, M., End, C., Vallant, C., Dong, A., Lynch, K., Chun, J., Morris, A.J., et al. 2008. Lysophosphatidic acid receptors 1 and 2 play roles in regulation of vascular injury responses but not blood pressure. *Circ Res* 103:662-670.
184. Lee, J., Park, S.Y., Lee, E.K., Park, C.G., Chung, H.C., Rha, S.Y., Kim, Y.K., Bae, G.U., Kim, B.K., Han, J.W., et al. 2006. Activation of hypoxia-inducible factor-1alpha is necessary for lysophosphatidic acid-induced vascular endothelial growth factor expression. *Clin Cancer Res* 12:6351-6358.
185. Ormerod, M. 2008. *Flow Cytometry A Basic Introduction*.
186. Movat, H.Z. 1955. Demonstration of all connective tissue elements in a single section; pentachrome stains. *AMA Arch Pathol* 60:289-295.
187. Olah, A.J., Simon, A., Gaudy, M., Herrmann, W., and Schenk, R.K. 1977. Differential staining of calcified tissues in plastic embedded microtome sections by a modification of Movat's pentachrome stain. *Stain Technol* 52:331-337.
188. Skalli, O., Ropraz, P., Trzeciak, A., Benzonana, G., Gillessen, D., and Gabbiani, G. 1986. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 103:2787-2796.
189. Ho, M.K., and Springer, T.A. 1982. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol* 128:1221-1228.
190. Albina, J.E., Mastrofrancesco, B., Vessella, J.A., Louis, C.A., Henry, W.L., Jr., and Reichner, J.S. 2001. HIF-1 expression in healing wounds: HIF-1alpha induction in primary inflammatory cells by TNF-alpha. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C1971-1977.
191. Subramanian, P., Karshovska, E., Reinhard, P., Megens, R.T., Zhou, Z., Akhtar, S., Schumann, U., Li, X., van Zandvoort, M., Ludin, C., et al. Lysophosphatidic acid receptors LPA1 and LPA3 promote CXCL12-mediated smooth muscle progenitor cell recruitment in neointima formation. *Circ Res* 107:96-105.
192. Lin, C.I., Chen, C.N., Chen, J.H., and Lee, H. 2006. Lysophospholipids increase IL-8 and MCP-1 expressions in human umbilical cord vein endothelial cells through an IL-1-dependent mechanism. *J Cell Biochem* 99:1216-1232.

193. Walsh, K., Smith, R.C., and Kim, H.S. 2000. Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture. *Circ Res* 87:184-188.
194. Beohar, N., Flaherty, J.D., Davidson, C.J., Maynard, R.C., Robbins, J.D., Shah, A.P., Choi, J.W., MacDonald, L.A., Jorgensen, J.P., Pinto, J.V., et al. 2004. Anti-restenotic effects of a locally delivered caspase inhibitor in a balloon injury model. *Circulation* 109:108-113.
195. Balsam, L.B., Mokhtari, G.K., Jones, S., Peterson, S., Hoyt, E.G., Kofidis, T., Tanaka, M., Cooke, D.T., and Robbins, R.C. 2005. Early inhibition of caspase-3 activity lessens the development of graft coronary artery disease. *J Heart Lung Transplant* 24:827-832.
196. Williamson, P., and Schlegel, R.A. 2002. Transbilayer phospholipid movement and the clearance of apoptotic cells. *Biochim Biophys Acta* 1585:53-63.
197. Tokumura, A., Majima, E., Kariya, Y., Tominaga, K., Kogure, K., Yasuda, K., and Fukuzawa, K. 2002. Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J Biol Chem* 277:39436-39442.
198. Albers, H.M., Dong, A., van Meeteren, L.A., Egan, D.A., Sunkara, M., van Tilburg, E.W., Schuurman, K., van Tellingen, O., Morris, A.J., Smyth, S.S., et al. Boronic acid-based inhibitor of autotaxin reveals rapid turnover of LPA in the circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7257-7262.
199. Gierse, J., Thorarensen, A., Beltey, K., Bradshaw-Pierce, E., Cortes-Burgos, L., Hall, T., Johnston, A., Murphy, M., Nemirovskiy, O., Ogawa, S., et al. A novel autotaxin inhibitor reduces lysophosphatidic acid levels in plasma and the site of inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 334:310-317.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

1-AGP	Alkyl-Glycerophospholipid
A	Arteria
Akt	Akt Kinase
AP-1/2	activator protein-1/2
ApoE <sup>-/-</sup>	Apolipoprotein E defizient
Aqua dest	destilliertes Wasser
ATX	Autotaxin
bHLH	basisches helix-loop-helix Motiv
BSA	bovine serum albumin (Albumin aus Rinderserum)
CCA	Arteria carotis communis, Halsschlagader
CD	cluster of differentiation
c-Kit	Rezeptor für Stammzellfaktor
CXCR4/7	CXC Chemokinrezeptor 4/7
DAB	Diaminobenzidin
DES	drug eluting stents
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECA	Arteria carotis externa
Edg	endothelial differentiation gene
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EE	Lamina elastica externa
EGF	epidermal growth factor
EPCs	endothelial progenitor cells
ERK-1/2	extracellular signal regulated kinase-1/2
FACS	fluorescence activated cell sorting
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FGF	fibroblast growth factor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	forward light scatter, Vorwärtsstreulicht
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GP	Alkyl-Glycerophosphat
GRO- $\alpha$	growth-related oncogene- $\alpha$
HIF-1 $\alpha$	hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HRE	hypoxia-responsive element
HRP	horseradish peroxidase, (Peroxidase aus dem Meerrettich)

ICA	Arteria carotis interna
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IEL	Lamina elastica interna
IF	Immunofluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IGF-1/2	insulin like growth factor-1/2
IH	Immunohistochemie
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-6, IL-8	Interleukin 6 bzw. 8
IP	intraperitoneal
IVC	einzelventilisiertes Käfigsystem
JAK	Janus Kinase
KHK	Koronare Herzkrankheit
KS	Kaninchenserum
LacZ	Laktose Z Gen
LDL	low-densitylipoprotein
Lin	lineage
LPA	Lysophosphatidsäure
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPE	Lysophosphatidylethanolamin
LPL	Lysophospholipide
LPP	Lipidphosphat Phosphatasen
LPS	Lysophosphatidylserin
lysoPLD	Lysophospholipase D
Mac-2	macrophage antigen-1
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF	macrophage-colony stimulation factor
MMPs	Matrix Metalloproteinasen
moxLDL	mildly oxidized LDL
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger RNA
MZG	mononukleares Zellengate
NF-IL6	nuclear factor-interleukin 6
NK- $\kappa$ B	nuclear factor- $\kappa$ B
ODD	oxygen-dependent degradation
OH	Hydroxy-
PA	Phosphatidsäure
PBS	phosphate buffered saline
PBSF	preB-cell growth-stimulating factor

PDGF	platelet-derived growth factor
PDGFR- $\beta$	platelet-derived growth factor receptor $\beta$
PE	Phosphatidylethanolamin
PHD	Prolyl-4-Hydroxylasen
PI3K	Phosphoinositol 3-kinase
PKC	Proteinkinase C
PLA 1/2	Phospholipase 1/2
PLC- $\gamma$	Phospholipase C- $\gamma$
PPAR- $\gamma$	peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$
PS	Phosphatidylserin
PS-PLA	Phosphatidylserin-spezifische Phospholipase A1
PTCA	percutane transluminale koronare Angioplastie
pVHL	von Hippel-Lindau Protein
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
rRNA	ribosomale RNA
Sca-1	stem cell antigen-1
SDF-1 $\alpha$	stromal cell-derived factor-1 $\alpha$
SMCs	smooth muscle cells
SMMHC	smooth muscle myosin heavy chain
Sp1	Transkriptionsfaktor specificity protein-1
SPCs	smooth muscle progenitor cells
sPLA2	lösliche Phospholipase A2
SSC	side scatter, Seitwärtsstreulicht
STAT	signal transducers and activation of transcription
TBST	Tris bufferes saline with Tween 20
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
VCAM-1.	cell adhesion molecule 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VSMCs	vascular smooth muscle cells
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -smooth muscle actin

## **8. Danksagung**

Für die ausgezeichnete und kompetente Betreuung, Motivation, Unterstützung, möchte ich mich, im besonderen Maße, bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Andreas Schöber bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe, Ela Karshovska, Davor Zagorac, Brigitta Globke und Andrea Millet für die Unterstützung, Hilfe und den guten Rat bedanken.

Für die fachliche Unterstützung bedanke ich bei den Kollegen des Instituts für Molekulare Herz-Kreislaufforschung Aachen unter der Leitung von Prof. Dr. med. C.Weber.

Ein besonderer Dank geht an meinen Freund Doro und meine Familie für die unglaubliche Geduld, Motivation und Rücksichtnahme.

## 9. Publikationen und Vorträge

Subramaniam, P.\* Karshovska, E.\*, Reinhard, P. et al., Lysophosphatic Acid Receptors LPA<sub>1</sub> and LPA<sub>3</sub> Promote CXCL12-Mediated Smooth Muscle Progenitor Cell Recruitment in Neointima Formation. Circ. Res. 2010;107;96-105

European Society of Cardiology Congress 2007, Vienna 01.09. –05.09.2007, Vortrag: Neointima Formation by Unsaturated Lysophosphatic Acid is Associated With Smooth Muscle Progenitor Cell (SPC) Mobilization and SDF-1 $\alpha$  Expression, P. Reinhard et al.

73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie in Mannheim von 12.04. - 14.04.2007, Vortrag: Neointima Formation by Unsaturated Lysophosphatic Acid is Associated With Smooth Muscle Progenitor Cell (SPC) Mobilization and SDF-1 $\alpha$  Expression, P. Reinhard et al.

# Eidesstattliche Versicherung

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand