

Aus dem
Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Direktor: Dr. Johannes Fischer

**Isolierung, Charakterisierung, Expansion und
retrovirale Transduktion endothelialer
Progenitorzellen aus dem peripheren Blut**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Vorgelegt von
Olga Janzen
2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Referent: Prof. Dr. med. Marcus Stockschröder

Korreferent: PD Dr. med. Thomas Schroeder

Widmung

Diese Arbeit widme ich meinem Mann Ilja Janzen.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Highly efficient lentiviral transduction of phenotypically and genotypically characterized endothelial progenitor cells from adult peripheral blood.

Stockschlaeder M, **Shardakova O**, Weber K, Stoldt VR, Fehse B, Giers G, Scharf RE.

Blood Coagul Fibrinolysis. 2010 Jul;21(5):464-73.

Zusammenfassung

In der Literatur sind unterschiedliche Verfahren für die Isolierung und Kultivierung endothelialer Progenitorzellen (EPC) beschrieben worden (1,2). Die Ziele der vorgelegten Arbeit waren der Vergleich zweier etablierter Methoden für die Isolierung, Kultivierung und Expansion endothelialer Progenitorzellen aus peripherem Blut, die phänotypische Charakterisierung der Zellen, die Beschreibung der Wachstumskinetik durch Proliferations-Assays, die Etablierung der retroviralen Transduktion der generierten Zellpopulation mit murinen retroviralen und neuartigen lentiviralen Vektoren sowie der Vergleich der Transduktionseffizienz.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass Kolonien (sogenannte *colony forming units-endothelial cells* – CFU-EC), die nach fünftägiger Kultivierung „nicht direkt adhärenter“ mononukleärer Zellen (MNC) entstanden, aus Zellen der monozytären Reihe mit sehr geringem Wachstumspotenzial zusammengesetzt sind. Im Gegensatz hierzu entstanden nach Kultivierung „direkt adhärenter“ MNC nach einer Latenzphase endothelähnliche Zellen mit typischen endothelialen Antigenen und einem hohen Wachstumspotenzial. Für diese Zellen wurde im Weiteren die Bezeichnung EPC verwendet. Auch wenn CFU-EC und EPC sich ganz wesentlich durch ihre Morphologie, die exprimierten Antigene und die Wachstumskinetik unterscheiden, tragen beide Zellpopulationen zur Neovaskularisation bei (3-6). In der vorliegenden Studie konnten EPC in der Phase des exponentiellen Wachstums mit murinen und humanen retroviralen Vektoren hocheffizient transduziert werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen im Einklang mit den Ergebnissen anderer Autoren (7) und zeigen, dass aus peripherem Blut isolierte MNC unter endothelialen Kulturbedingungen zwei Arten von Zellen bilden können: CFU-EC: diese Zellen entstehen bei Kultivierung von „nicht direkt adhärenter“ Zellen in den ersten Tagen nach der Ausplattierung, haben ein geringes Wachstumspotenzial und exprimieren monozytäre-leukozytäre Antigene; EPC: diese Zellen entstehen aus „direkt adhärenter“ Zellen nach 2-4 Wochen, weisen ein gutes Proliferationspotenzial auf und exprimieren endotheliale Marker, jedoch keine leukozytären Antigene. Aufgrund des hohen proliferativen Potenzials sind EPC sehr gut für die retrovirale Transduktion geeignet. Dies konnte durch die hoch effiziente retrovirale Transduktion bestätigt werden.

Abkürzungsverzeichnis

AAV	adeno-assoziierte Viren
Ac-LDL	acetyliertes low density Lipoprotein
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
C/EBT	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CEC	zirkulierende endotheliale Zellen
CFSE	Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidylester
CFU-EC	<i>colony forming units-endothelial cells</i>
CPD	<i>Citrate-Phosphate-Derivative</i>
CPDL	<i>cumulative population-doubling level</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
EBM-2MV	<i>Endothelial Basal Media-2 Microvascular“</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	grün-fluoreszierender Farbstoff
eNOS	Stickoxidsynthetase
EOC	<i>late endothelial outgrowth cells</i>
EPC	endotheliale Progenitorzellen
ET-1	Endothelin-1
EWM	endotheliales Wachstumsmedium
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	fetales Kalbserum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
HUVEC	humane umbilikale venöse endotheliale Zellen
KHK	koronare Herzkrankheit
KM	Knochenmark
LeGO-Vektor	<i>lentiviral gene ontology vector</i>
MCAM	<i>melanoma cell adhesion molecule</i>
MMP	matrix metalloproteinase
MNC	mononukleäre Zellen
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
PAI1	Plasminogenaktivator-Inhibitor1
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDL	<i>population-doubling level</i>
PDT	<i>population-doubling time</i>
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
td-tomato	<i>tandem dimer-tomato</i>
TF	<i>tissue factor</i>
TFPI	<i>tissue factor pathway inhibitor</i>
Tie-1	<i>Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1</i>
t-PA	<i>tissue plasminogen activator</i>
u-PA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
VEGF-R2	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
vWF	von-Willebrand-Faktor
VE-Cadherin	<i>vascular endothelial-Cadherin</i>

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Rolle des Endothels	1
1.2 Neovaskularisation	1
1.3 Definition endothelialer Progenitorzellen	2
1.4 Isolierung und Charakterisierung endothelialer Progenitorzellen	2
1.5 Mögliche therapeutische Anwendung von EPC	6
2 Ziele der Arbeit	8
3 Methoden	10
3.1 Isolierung mononukleärer Zellen	10
3.2 Kultivierung mononukleärer Zellen	11
3.2.1 Kultivierung „nicht direkt adhärenter Zellen“	12
3.2.2 Kultivierung „direkt adhärenter Zellen“	15
3.3 Charakterisierung der kultivierten Zellen	18
3.3.1 Mikroskopische Beurteilung	18
3.3.2 Wachstumskinetik der endothelialen Progenitorzellen.....	18
3.3.3 Durchflusszytometrie	19
3.3.4 Immunfluoreszenz	20
3.3.5 <i>Microarray</i> -Analyse	21
3.4 Genetische Modifikation der endothelialen Progenitorzellen.....	22
3.4.1 Lentivirale Vektoren	22
3.4.2 Generierung viraler Partikel	22
3.4.3 Zellkultivierung, retrovirale Gentransfektion und Bestimmung der Gentransfereffizienz	23
4 Ergebnisse	24
4.1 Isolierung, Charakterisierung und Expansion „nicht direkt adhärenter“ Zellen in Fibronectin-beschichteten Kulturgefäßen.....	24
4.1.1 Mikroskopie	24
4.1.2 Durchflusszytometrie	27
4.1.3 Wachstumspotenzial der CFU-EC.....	30
4.2 Isolierung, Charakterisierung, Expansion und retrovirale Transduktion der „direkt adhärenten Zellen“ in Kollagen-beschichteten Platten.....	31
4.2.1 Mikroskopische Ergebnisse	31
4.2.2 Durchflusszytometrie, Immunzytologie	32
4.2.3 Determination des Wachstumspotenzials der EPC	35
4.2.4 <i>Microarray</i> Analyse	37
4.2.5 Retro- und lentivirale Transduktion der EPC	39
4.3 Isolierung, Charakterisierung und Expansion „direkt adhärenter mononukleärer Zellen“ in Fibronectin-beschichteten Platten.	43

4.3.1	Mikroskopie	43
4.3.2	Durchflusszytometrie	44
5	Diskussion	46
6	Schlussfolgerungen	52
7	Literaturverzeichnis	54

1 Einleitung

1.1 Rolle des Endothels

Der menschliche Organismus enthält ca. 10^{13} Endothelzellen. Die dabei mit dem Blut in Kontakt tretende Oberfläche beträgt ca. 7 m². Das Endothel ist in mehrere physiologische Prozesse eingebunden. Dazu gehören u.a.:

- Regulation des Stoffaustauschs zwischen Gewebe und Blut;
- Produktion angioaktiver Substanzen z. B. Stickstoffmonoxid (NO);
- Regulation inflammatorischer Prozesse;
- Regulation der Hämostase u.a. durch die Produktion gerinnungsaktivierender (z.B. Gewebethromboplastin – Gewebefaktor – *tissue factor* [TF, Faktor III]), Plaminogenaktivator-Inhibitor 1 [PAI-1] oder gerinnungshemmender Substanzen (z.B. Thrombomodulin, *tissue factor pathway inhibitor* [TFPI]);
- Initiierung der Angiogenese (Sprossung neuer Gefäße aus bereits vorhandenen Blutgefäßen);
- Initiierung der Vaskulogenese (Bildung neuer Gefäße aus endothelialen Vorläuferzellen).(8)

Es ist von daher leicht erklärbar, dass eine persistierende Endotheldysfunktion in fast allen Fällen pathologische Folgen hat, wie z. B. die koronare Herzkrankheit (KHK), arterielle Hypertonie und thromboembolische Komplikationen. Erfolge etablierter Behandlungsmethoden von Angiopathien werden u. a. durch Bypass-Thrombose, Stent-Thrombose und medikamentöse Nebenwirkungen eingeschränkt. Auf der Basis neuer Erkenntnisse im Bereich der postnatalen Gefäßneubildung durch Angio- und Vaskulogenese können innovative therapeutische Verfahren entwickelt werden.

1.2 Neovaskularisation

Bis in die 90er-Jahre ging man davon aus, dass neue Blutgefäße beim Erwachsenen durch Sprossung reifer endothelialer Zellen aus einem präformierten Kapillarsystem entstehen, d.h. durch einen als Angiogenese bezeichneten Prozess. In einer richtungsweisenden Arbeit von Asahara et al. (9) konnte jedoch 1997 nachgewiesen werden, dass die postnatale Bildung neuer Gefäße auch aus proliferierenden

endothelialen Vorläuferzellen möglich ist. Dieser als Vaskulogenese bezeichnete Prozess der Gefäßneubildung war bis zu diesem Zeitpunkt als auf die Embryogenese beschränkt angesehen worden.

1.3 Definition endothelialer Progenitorzellen

1997 beschrieben Asahara et al. eine Population von im peripheren Blut des Menschen zirkulierenden CD34⁺-Zellen, welche die Fähigkeit zur *ex vivo* Differenzierung in endothelzell-ähnliche Zellen aufwiesen. Diese Zellen wurden endotheliale Progenitorzellen (EPC) genannt (9). Die Arbeiten von Asahara et al. und anderen Wissenschaftlern veränderten die Theorie über die Mechanismen der postnatalen Neovaskularisation nachhaltig. In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (KM) stammen (3, 4,10-16) und eine wichtige Rolle bei der postnatalen Vaskulogenese (Wundheilung [17], physiologische zyklische Organogenese des Endometriums [18]) und bei regenerativen Prozessen im Rahmen ischämischer Veränderungen, wie z.B. pAVK (periphere arterielle Verschlusskrankheit) (9,19-23) und Myokardinfarkt (24-25) spielen.

1.4 Isolierung und Charakterisierung endothelialer Progenitorzellen

Im peripheren Blut zirkulieren verschiedene Zellen mit der Fähigkeit zur *in vitro* Expression endothelialer Gene:

- hämatopoetische Stammzellen (26),
- Monozyten-Makrophagen (26),
- abgelöste reife endotheliale Zellen (26),
- endotheliale Vorläuferzellen (26).

Eine Kultivierung von mononukleären Zellen (MNC) in definiertem Endothelzell-spezifischem Medium z. B. in mit Fibronectin beschichteten Platten führt zu Expression von mehreren endothelialen Genen (26).

Zwar nehmen die unter solchen Bedingungen kultivierten MNC acetyliertes *low-density* Lipoprotein (Ac-LDL) auf, binden das pflanzliche Lektin *Ulex europaeus*, exprimieren die endotheliale Form der Stickoxidsynthetase (eNOS), den VWF (Von-Willebrand-Faktor), den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (VEGF-R2) und CD144 (*vascular endothelial*-Cadherin [VE-Cadherin]) (27), koexprimieren jedoch in den meisten Experimenten auch typische Antigene leukozytärer Zellen der monozytären Reihe: CD45, CD11b, CD11c, CD14 und CD68 (3,10,11). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass auch kultivierte Monozyten unter spezifischen Bedingungen endothelzell-typische Proteine wie z.B. vWF, CD144 (VE-Cadherin), CD105 (Endoglin) und den Ac-LDL-Rezeptor exprimieren können (28-32). So können sich Monozyten-Makrophagen, die bezüglich ihres Phänotyps und ihrer Funktionalität sehr variabel sind, offensichtlich bei Veränderungen der Milieubedingungen pleiotrop adaptieren (34).

Für die weiteren Untersuchungen zu den aus MNC stammenden endothelialen Vorläuferzellen wurde von Hill et al. (1) eine sogenannte Vorplattierung durchgeführt, um eine Kontamination endothelialer Vorläuferzellen mit Monozyten zu verhindern. Unter der Annahme, dass Monozyten-Makrophagen an das Kulturgefäß adhären, führten Hill et al. eine Vorplattierung („*preplating step*“) der kultivierten Zellen für 24 - 48 Stunden durch. Die „nicht adhären“ Zellen wurden weiter kultiviert. Es entstanden Zellkolonien, die nach fünf Tagen gezählt wurden. Die dabei entstandenen Kolonien bestanden im Zentrum aus rundlichen Zellen, in der Peripherie - aus spindelförmigen Zellen. Diese Kolonien wurden von Hill et al. als *colony forming units - endothelial cells* (CFU-EC) bezeichnet. In weiteren Untersuchungen bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren fanden Hill et al. eine Korrelation zwischen der Zahl von CFU-EC und dem Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen nach der Framingham-Skala. Dabei ging eine verminderte Zahl von CFU-EC mit einem höheren Risiko an kardiovaskulären Erkrankungen einher (1).

In der hier vorliegenden Arbeit werden die nicht-adhären Zellen als CFU-EC bezeichnet. Auch wenn die von Hill et al. beschriebenen Zellkolonien VEGF-R2, CD31 und Tie-2 [Angiopoetin-1-Rezeptor] exprimierten (6), wurden bei diesen Zellen in den meisten Studien zu diesem Thema auch typische leukozytäre Antigene wie CD45 und CD14 (35) nachgewiesen. Interessanterweise nahmen die Zellen auch Ac-LDL auf und konnten durch das Lektin *Ulex europaeus* angefärbt werden. Während die runden Zellen im Zentrum der Kolonien nach ca. ein bis zwei Wochen

verschwanden, verblieben die spindelförmigen Zellen übrig. Diese waren jedoch nicht in der Lage, im Kulturgefäß eine konfluente Zellschicht auszubilden (7).

Eine weitere Zellpopulation, die Bestandteil der MNC im peripheren Blut ist, sind die zirkulierenden endothelialen Zellen (CEC). Diese Zellen exprimieren endothelzell-spezifische Antigene wie z. B. vWF, CD144 (VE-Cadherin), CD105 (Endoglin). Sie sind CD45 negativ und weisen *in vitro* ebenso wie die CFU-EC ein niedriges proliferatives Potenzial auf (17 ± 9 -fache Expansion in 27 ± 4 Tagen [7]).

Werden MNC aus peripherem Blut unter „endothelialen“ Bedingungen ohne einen Vorplattierungsschritt kultiviert, entstehen nach zwei bis vier Wochen proliferierende Zellen. Lin et al. (2) haben diese Zellen als „spät-auswachsende“ endotheliale Zellen („*late endothelial outgrowth cells*“ – EOC) bezeichnet. Seit dieser richtungsweisenden Arbeit von Lin et. al. haben weitere Arbeitsgruppen erfolgreich EOC aus Nabelschnurblut und peripherem Blut isoliert und teilweise ebenfalls als endotheliale Progenitorzellen (EPC) bezeichnet (4,36-41). Im Gegensatz zu CFU-EC oder CEC exprimieren EPCs endotheliale Marker wie CD146 (P1H12), Thrombomodulin, VEGFR-2, CD144 (VE-Cadherin), jedoch keine leukozytären Marker wie CD14 oder CD45. Außerdem können diese Zellen *in vitro* seriell propagiert werden und weisen somit ein hohes proliferatives Potenzial auf (2).

Zusammenfassend können die folgenden Zelltypen, die postnatal eine Rolle für die Neovaskularisation spielen, unterschieden werden (Abb.1):

- (1) Zellen, die hämatopoetische (leukozytäre) und endotheliale Antigene koexprimieren und nur ein begrenztes proliferatives Potenzial aufweisen (CFU-EC).
- (2) Zellen, die endotheliale Antigene, jedoch keine hämatopoetischen Markern exprimieren und ein begrenztes proliferatives Potenzial aufweisen (CEC).
- (3) Zellen, die nur endotheliale Marker aufweisen und ein hohes proliferatives Potenzial besitzen (EPC).

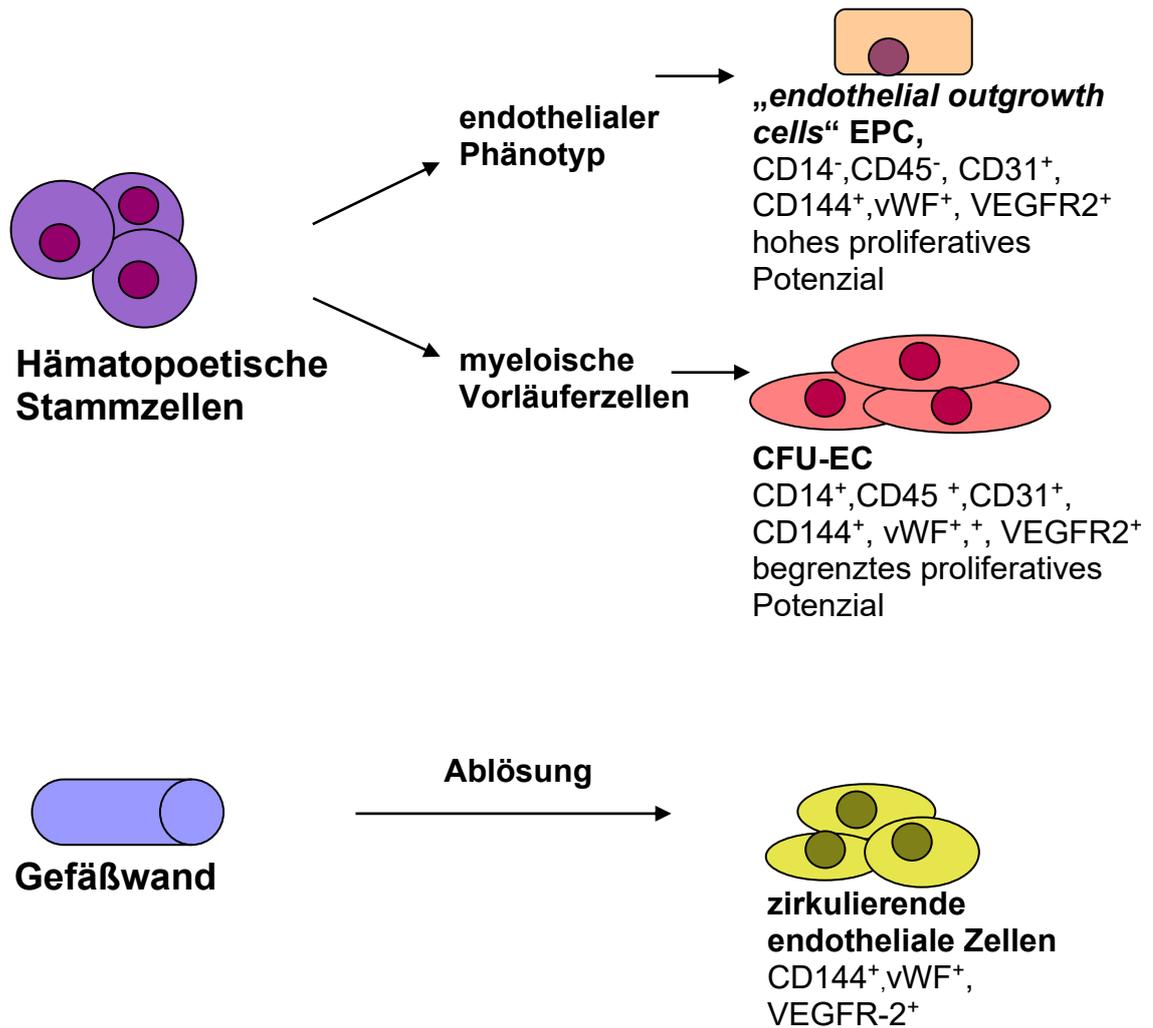


Abb.1: Darstellung der im peripheren Blut zirkulierenden Zellen, die nach entsprechenden *in-vitro* Kultivierungsbedingungen endotheliale Antigene exprimieren können.

Im peripheren Blut zirkulieren drei verschiedene Zellarten, die nach entsprechenden *in vitro* Kultivierungsbedingungen endotheliale Antigene exprimieren können. Zum einen Zellen, die hämatopoetische und endotheliale Antigene koexprimieren und ein begrenztes proliferatives Potenzial aufweisen. Zum anderen EOCs, auch als endotheliale Progenitorzellen (EPC) bezeichnet, die ebenfalls nur endotheliale Antigene exprimieren, jedoch ein hohes proliferatives Potenzial besitzen. Die beiden erstgenannten Zelltypen stammen wahrscheinlich von hämatopoetischen Stammzellen ab. Die dritte Zellart stammt mit hoher Wahrscheinlichkeit von der Gefäßwand abgelösten reifen endothelialen Zellen ab (7,26).

1.5 Mögliche therapeutische Anwendungen von EPC

Da gezeigt werden konnte, dass EPC zur postnatalen Vaskulogenese beitragen (10, 11, 21, 42, 43), bieten sich die folgenden Möglichkeiten für eine potentielle therapeutische Anwendung an:

- autologe Applikation
 - o Neovaskularisation (regenerative Medizin, z.B. bei Ischämien)
 - o Beschichtung von Fremdoberflächen mit EPC (z.B. Gefäßprothesen)
 - o Verwendung genetisch modifizierter EPC (z.B. durch Transduktion mit antithrombotischen Genen wie Thrombomodulin oder TFPI, zur Steigerung der antithrombotischen Eigenschaften von Endothelzellen).

Die oben genannten Möglichkeiten wurden in Publikationen von unterschiedlichen Autoren diskutiert. Tierexperimentell konnte im Mausmodell die Inkorporation transfundierter EPC in neu entstehende Gefäße gezeigt werden (21). Außerdem wurden parakrine Effekte endothelialer Vorläuferzellen bei der Gefäßneubildung diskutiert (10, 11). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass endotheliale Vorläuferzellen in der Lage sind, vaskuläre Grafts (Gefäßprothesen) zu endothelisieren (42, 43) und damit potenziell antithrombotischen zu wirken. Ein Caveat für den therapeutischen Einsatz von EPC ist die mögliche, unerwünschte Förderung von Tumervaskularisationen. In mehreren Arbeiten, die diese Frage näher untersuchten, konnte jedoch nur eine minimale oder keine Beteiligung gefunden werden (44, 45).

Die Ursache für die z.T. widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich der Rolle von EPC bei der postnatalen Vaskulogenese liegt höchst wahrscheinlich an der heterogenen phänotypischen Definition dieser Zellen und an den unterschiedlich angewendeten Isolierungs- und Kultivierungs-Methoden (10, 11, 21, 42-45).

Die Ergebnisse der *in vitro*-Experimente haben eine große Bedeutung für mögliche therapeutische Anwendungen endothelialer Vorläuferzellen. So ist beispielweise der klinische Einsatz künstlicher Gefäßprothesen und Stents durch die Thrombogenität der eingesetzten Materialien eingeschränkt. Da die *in vivo*-Endothelialisierung von Fremdoberflächen nur sehr zögerlich erfolgt, ist es vorstellbar, dass durch eine *ex vivo*-Endothelialisierung die antithrombotischen Eigenschaften der Fremdoberflächen auch kurzfristig gesteigert werden können, und dadurch eine Thrombosierung der Prothesen vermieden wird. So konnte gezeigt werden, dass für zeitlich früh

auftretende Prothesenverschlüsse eine okklusive Thrombosierung verantwortlich ist, wohingegen späte Prothesenverschlüsse am ehesten durch eine neointimale Hyperplasie und progrediente arteriosklerotische Veränderungen verursacht werden. Aufgrund des hohen Proliferationspotenzials stellen EPC möglicherweise eine geeignete Zellpopulation für die Beschichtung von Fremdoberflächen dar (42,43).

Die intrinsische Antithrombogenität endothelialer Vorläuferzellen kann darüber hinaus idealerweise durch genetische Modifikation mit antithrombotisch wirksamen Genen gesteigert werden. Hierfür kommen Gene wie Thrombomodulin oder TFPI in Frage. Thrombomodulin entfaltet seine antithrombotische Wirkung durch die Bindung von Thrombin. Nach der Bindung wird der Thrombomodulin-Thrombin-Komplex endozytotisch aufgenommen, Thrombin abgebaut und Thrombomodulin zur Zelloberfläche zurückgeführt. Darüber hinaus wird durch die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin die Substratspezifität des Thrombins verändert, wodurch es zur Aktivierung von Protein C kommt, welches in Kooperation mit Protein S die aktivierten Faktoren V und VIII inaktiviert. Die gerinnungsaktive Gewebethrombokinase (TF) wird u.a. von aktivierten Endothelzellen synthetisiert. Nach ihrer Aktivierung produzieren Endothelzellen den Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) und reduzieren die Synthese und Oberflächenexpression des antithrombotisch wirksamen Thrombomodulins. TFPI spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der antikoagulatorischen Aktivität an der Endotheloberfläche. Sowohl TF als auch TFPI werden bei stimuliertem Endothel und gleichzeitiger Scherbelastung hoch-reguliert, wobei TFPI überwiegt (46). Insgesamt sind diese beiden Gene (Thrombomodulin und TFPI) geeignete Kandidaten für die genetische Modifikation endothelialer Vorläuferzellen.

EPC stellen perspektivisch sehr interessante Zellen für weitere Untersuchungen inklusive detaillierter phänotypischer Charakterisierung und genetischer Modifikation dar.

2 Ziele der Arbeit

Als endotheliale Vorläuferzellen werden im peripheren Blut zirkulierende, aus dem Knochenmark stammende Zellen bezeichnet, die in der Lage sind, sich zu reifen endothelialen Zellen zu differenzieren. Im Weiteren werden diese Zellen endotheliale Progenitorzellen (EPC) genannt.

Hinweise für die funktionelle Bedeutung der EPC für die adulte Neovaskulogenese fanden sich *in vitro*, z. B. die Bildung gefäßähnlicher Strukturen aus EPC auf einer mit extrazellulären Proteinen angereicherten Matrix (kommerzieller Name - BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix) (5), und tierexperimentell *in vivo*. Tierexperimentell konnte im Maus-Modell die Inkorporation von transfundierten EPC in neu entstehende Gefäße gezeigt werden (21). Außerdem konnte im Schaf-Modell und Hunde-Modell nachgewiesen werden, dass endotheliale Vorläuferzellen in der Lage waren vaskuläre Grafts (Gefäßprothesen) zu endothelialisieren (42,43). Aufgrund des hohen Proliferationspotenzials stellen EPC eine geeignete Zellpopulation für die Beschichtung von Fremdoberflächen dar. Die intrinsische Antithrombogenität endothelialer Vorläuferzellen kann darüber hinaus möglicherweise durch genetische Modifikation mit antithrombotisch wirksamen Genen (z. B. Thrombomodulin- oder das TFPI-Gen) gesteigert werden.

In der Literatur sind eine Reihe von unterschiedlichen Verfahren für die Isolierung und Kultivierung von EPC beschrieben. Die Methoden unterscheiden sich durch die Herkunft der MNC (z.B. peripheres Blut, Knochenmark, Nabelschnurblut), durch mögliche Zellselektions- und Anreicherungsverfahren (Isolierung CD34⁺- oder CD133⁺-Zellen), durch die für die Kultivierung eingesetzten Kulturmedien, durch unterschiedliche Wachstumsfaktor-Cocktails, durch die für die Adhäsion der Zellen verwendeten Extrazellulärmatrix-Proteine (z.B. Fibronectin versus Kollagen) sowie durch die Auswahl der im weiteren verwendeten Zellen (z.B. an die Extrazellulärmatrix adhärente versus nicht adhärente Zellen)(1,2). Wie experimentell gezeigt werden konnte, beeinflussen die oben dargestellten Variablen in nicht unerheblichem Ausmaß die phänotypischen und zellproliferativen Charakteristika der entstandenen Zellen ((10, 11, 21, 42-45).

Die Ziele der vorgelegten Arbeit waren

1. Vergleich von zwei etablierten Methoden für die Isolierung, Kultivierung und Expansion endothelialer Progenitorzellen aus peripherem Blut.

- Phänotypische Charakterisierung der Zellen und Beschreibung der phänotypischen Unterschiede der entstehenden Zellpopulationen durch Mikroskopie, Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz-Mikroskopie.
2. Beschreibung der Wachstumskinetik durch Proliferations-Assays.
 3. Charakterisierung der generierten Zellpopulation mittels „*Microarray- Analyse*“ zur Deskription der Genexpression.
 4. Etablierung der retroviralen Transduktion der generierten Zellpopulation mit murinen retroviralen und neuartigen lentiviralen Vektoren.
 5. Optimierung der Transduktion durch physikalische Methoden (Zentrifugation, Multiplizität der Infektion).
 6. Vergleich der Transduktionseffizienz von murinen retroviralen und humanen lentiviralen Vektoren, durch Nachweis der Transduktionsrate und Höhe der Expression der transduzierten Gene durch fluoreszierende Proteine.

3 Methoden

3.1 Isolierung mononukleärer Zellen

Für die Isolierung und Kultivierung von EPC wurden mononukleäre Zellen (MNC) aus peripherem Blut verwendet. MNC wurden entweder aus dem Blut einer Venenpunktion oder aus dem *Buffy-Coat* gespendeter Vollblutkonserven isoliert.

Für die Isolierung aus peripherem Blut wurden 25-60 ml Blut von gesunden Spendefreiwilligen des Institutes für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin (Uniklinik Düsseldorf) nach Venenpunktion in Heparin-Röhrchen (17 I.U/ml, Becton Dickinson, Oxford, United Kingdom) abgenommen und anschließend innerhalb einer Stunde nach Abnahme mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, Serag-Wiessner, Naila/Bayern, Germany) im Verhältnis von 1:1 verdünnt. Alle Probanden hatten nach ausführlicher Aufklärung durch Unterschrift ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie erklärt.

Für die Isolierung der Zellen aus *Buffy-Coat* erfolgte eine Spende von 500 ml Vollblut in Polyvinylchlorid-Primärbeutel mit CPD (*Citrate-Phosphate-Derivative*)-Stabilisator, der Citrat als Antikoagulans enthält. Das Blut wurde durch Zentrifugation separiert. Durch Überführung von Erythrozyten und Plasma in Satellitenbeutel verblieb der *Buffy-Coat* im Primärbeutel. 10 ml des *Buffy-Coat*-Präparats wurden spätestens sechs Stunden nach Blutentnahme weiterverarbeitet, indem sie 1:4 mit PBS verdünnt wurden. Bei Verwendung des *Buffy-Coats* handelte es sich um ein Abfallprodukt des Vollblutspendebetriebs des Institutes für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Uniklinik Düsseldorf. Die Daten der Spender wurden durch Abtrennen des Barcodes von Primärbeutel anonymisiert. Dadurch war die Zuordnung zu einer Person nicht möglich.

Zur Separation der MNC von den übrigen Blutbestandteilen wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dazu wurden in 50 ml Falkonröhrchen 15 ml Ficoll (Dichte $1,077 \pm 0,001$ g/ml, Amersham Biosciences, Upsala, Sweden) mit 25 - 35 ml Zellsuspension überschichtet und bei Raumtemperatur und 400 g 30 Minuten lang ohne zugeschaltete Bremsfunktion zentrifugiert. Bei der Dichtegradientenzentrifugation sammeln sich die MNC in der Interphase an, während

Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte am Boden des Röhrchens sedimentieren (Abb.2)

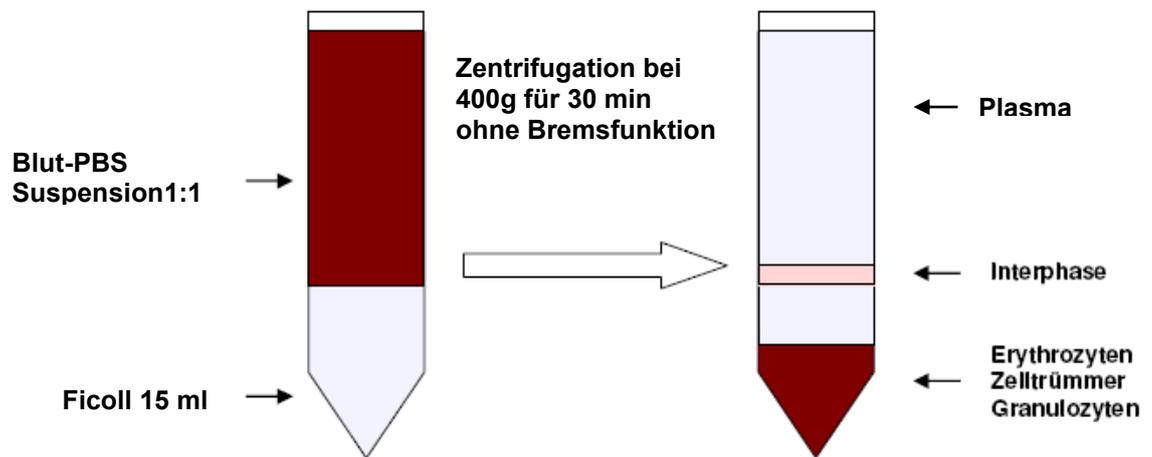


Abb. 2: Dichtegradientenzentrifugation der Blut-PBS Suspension.

Die Blut-PBS-Suspension wurde 1:1 gemischt und bei 400g für 30 Minuten ohne Bremsfunktion zentrifugiert. Die MNC reichern sich in der Interphase an. In der oberen Schicht sammeln sich das Plasma während in der unteren Schicht die Erythrozyten, Granulozyten und Zelltrümmer sedimentieren.

Die MNC wurden mit einer 10 ml Pipette vorsichtig aus der Interphase abgesaugt und in PBS gewaschen. Dazu wurden die Zellen der Interphase in 50 ml PBS aufgeschwemmt und bei 100g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Waschprozess wurde ein zweites Mal wiederholt.

Anschließend wurde die Zellzahl in einem Zellzähler (Sysmex, Norderstedt, Germany) bestimmt.

3.2 Kultivierung mononukleärer Zellen

Es wurden zwei etablierte Methoden für die Isolierung, Kultivierung und Expansion endothelialer Progenitorzellen aus peripherem Blut angewandt.

Im ersten Verfahren wurden „**nicht direkt adhärenente Zellen**“ kultiviert. Diese Methode basiert auf einer Arbeit von Hill JM et al. „*Circulating endothelial progenitor*

cells, vascular function, and cardiovascular risk", N Engl J Med 2003;348:593-600. Bei der zweiten Methode wurden „**direkt adhärenen Zellen**“ kultiviert. Diese Methode basiert auf einer Arbeit von Lin et al. „*Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood*“, J Clin Invest. 2000;105:71-77.

3.2.1 Kultivierung „nicht direkt adhärenen Zellen“

Protokoll 1A entspricht der von Hill et al. (2003) beschriebene Methodik (1). Mit dem Ziel, die Wachstumsbedingungen für EPC weiter zu optimieren, erfolgten die Modifikationen des Wachstumsmediums (Protokoll 1B und 1C).

Protokoll 1A

Aus peripherem Blut isolierte Zellen wurden in mit Fibronectin-beschichtete 6 Well-Platten (9,6 cm²/Well, Becton Dickinson Labware, Two Oak Park, Bedford, USA) in einer Dichte von 5x10⁶ Zellen/Well ausgesät und mit EndoCult-Medium (CellSystems, St. Katharinen, Germany) kultiviert. Der Tag der Ausplattierung wurde als Tag 0 festgelegt. 2 ml EndoCult-Medium wurden in jeden Well gegeben. Nach 48 Stunden wurden die „nicht direkt adhärenen Zellen“ mit dem Überstand des Mediums entfernt, bei 300g zentrifugiert und nach Resuspension in 24 Well-Platten (2cm² / Well, Becton Dickinson Labware, Bedford, USA) in einer Dichte von 1x10⁶ Zellen / Well plattiert. Daraufhin erfolgte der Mediumwechsel (1 ml / Well) drei Mal pro Woche. An Tag 5 wurden die entstehenden Zellkolonien gezählt. Eine Zellkolonie wurde definiert als Insel mit einem dichten Zentrum aus runden Zellen und vom Zentrum in die Peripherie ausstrahlenden spindelförmigen Zellen (1). Während der weiteren Kultivierung erfolgte die langsame Umstellung auf endotheliales Medium EBM-2MV+SingleQuots (Cambrex, BioScience, Walkersville, USA). Auch hier erfolgte der Mediumwechsel drei Mal pro Woche. Dieses Verfahren entspricht der vom Hill et al. (2003) publizierte Methode (1).

Zur weiteren Definition des Einflusses der Zusammensetzung des Wachstumsmediums auf die Generierung von EPC wurden zwei weitere Medien verwendet (Protokoll 1B und 1C).

Protokoll 1B

Alle Schritte der Isolierung und Kultivierung entsprachen Protokoll A mit dem Unterschied, dass statt des kommerziellen EndoCult-Mediums ein Medium auf der Basis von M199 (GIBCO, Paisley, Scotland, UK) mit Hinzugabe von 20 % FCS (GIBCO, USA), 50 ng/ml *human vascular endothelial growth factor* (VEGF, R&D Systems, Wiesbaden, Germany), 25 ng/ml *basic fibroblast growth factor* (bFGF, R&D Systems, Wiesbaden, Germany), Penicillin-Streptomycin 100 U/ml (GIBCO, Karlsruhe, Germany) verwendet wurden. Dieses Medium wird im Rahmen der Arbeit als endotheliales Wachstumsmedium (EWM) bezeichnet. Nach Bestimmung der Zahl der Kolonien an Tag 5 wurden die Zellen entweder weiterhin mit diesem Medium kultiviert oder es erfolgte die langsame Umstellung auf EBM-2MV+SingleQuots Medium.

Protokoll 1C

Alle Schritte der Isolierung und Kultivierung entsprachen Protokoll 1A mit dem Unterschied, dass die Zellen von Anfang an mit dem Medium EBM-2MV+SingleQuots kultiviert wurden.

Diese drei Protokolle zur Kultivierung „**nicht direkt adhärenter Zellen**“ sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Komponenten von Wachstumsmedien (EWM und EBM-2MV+SingleQuots) sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

	Protokoll 1A	Protokoll 1B	Protokoll 1C
Medium	EndoCult (kommerziell erhältlich, Zusammenstzung nicht bekannt)	EWM (Zusammenstellung s. Tabelle 2)	EBM-2MV +SingleQuots (Zusammenstellung s. Tabelle 2)
Initiale Kultur	6 Well-Platte	6 Well-Platte	6 Well-Platte
Umplat- tierung	nach 48 Stunden Umplattierung von nicht adhärenen Zellen in 24 Well-Platten	nach 48 Stunden Umplattierung von nicht adhärenen Zellen in 24 Well-Platten	nach 48 Stunden Umplattierung von nicht adhärenen Zellen in 24 Well-Platten
Plattenbe- schichtung	Fibronektin	Fibronektin	Fibronektin
Medium- wechsel	3 Mal/Woche	3 Mal/Woche	3 Mal/Woche
Zelldichte	6 Well-Platte - 5×10^6 Zellen / Well 24 Well-Platte - 1×10^6 Zellen / Well	in 6 Well-Platte - 5×10^6 Zellen / Well 24 Well-Platte 1×10^6 Zellen / Well	in 6 Well-Platte - 5×10^6 Zellen / Well 24 Well-Platte - 1×10^6 Zellen / Well

Tabelle 1: Zusammenfassung der Modifikationen des Protokolls für die Kultivierung von „nicht direkt adhärenen Zellen“.

Es wurden drei unterschiedliche Medien verwendet. In allen Protokollen erfolgte die Umplattierung von nicht adhärenen Zellen in 24 Well fibronektinbeschichtete Platten nach 48 Std. Der Mediumwechsel erfolgte drei Mal pro Woche.

Komponente und Menge	EWM	EBM-2MV+SingleQuots
Basis	M199	M199
VEGF	50 ng/ml	5-10 ng/ml (laut Angaben des Herstellers)
bFGF	25 ng/ml	5-10 ng/ml (laut Angaben des Herstellers)
FCS	20%	5%
andere Faktoren	Keine	<i>Human epidermal growth factor, insulin growth factor (R³-IGF-1), Ascorbinsäure, Hydrocortison</i>
Antibiotika	Penicillin-streptomycin 100U/ml	Gentamicin, Amphotericin-B

Tabelle 2: Zusammenstellung der EWM und EBM-2MV+SingleQuots-Medium.

Basis, Wachstumsfaktoren und andere Komponenten. Die Daten für EBM-2MV+SingleQuots sind Angaben des Herstellers (GIBCO, Paisley, Scotland, UK).

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*, bFGF: *Basic fibroblast growth factor*, FCS: *Fetal Calf Serum*.

3.2.2 Kultivierung „direkt adhärenter Zellen“

Protokoll 2A

Aus peripherem Blut isolierte Zellen wurden in mit Kollagen Typ1 beschichteten 6-Well-Platten (9,6 cm²/Well, Becton Dickinson Labware, Two Oak Park, Bedford, USA) in einer Dichte von 10x10⁶/Well ausplattiert und mit dem Medium EBM-2MV+SingleQuots kultiviert. Das Medium wurde täglich gewechselt (2 ml Medium/Well) Es erfolgte keine Umplattierung der adhärenter Zellen. Das Protokoll entsprach dem von Lin et al. (2000) publizierten Methode (2).

Protokoll 2B

Aus peripherem Blut isolierte Zellen wurden in mit Fibronectin beschichteten 6-Well-Platten (9,6cm² / Well) mit einer Dichte von 5x10⁶/Well ausplattiert und mit Medium (M199 [GIBCO, Paisley, Scotland, UK], 20 % FCS [GIBCO, Carlsbad, USA], 50

ng/ml *human vascular endothelial growth factor* [VEGF], 25 ng/ml *basic fibroblast growth factor* (bFGF) [beide von R&D Systems, Wiesbaden, Germany], Penicillin-Streptomycin 100 U/ml [GIBCO, Karlsruhe, Germany]) kultiviert. Das Medium wurde täglich gewechselt (2 ml Medium/Well). Es erfolgte keine Umplattierung der adhären Zellen. Das Verfahren unterschied sich von Protokoll 2A einerseits durch die Beschichtung der Wells mit extrazellulären Matrixproteinen (Fibronectin statt Kollagen) und andererseits durch das Medium (Tabelle 2).

Protokoll 2C

Alle Schritte der Isolierung und Kultivierung entsprachen Protokoll 2A mit dem Unterschied, dass die Zellen von Anfang an mit dem Medium EBM-2MV+SingleQuots kultiviert wurden.

Alle Protokolle unter Verwendung „**direkt adhärenter Zellen**“ sind in der Tabelle 3 zusammengestellt.

	Protokoll 2A	Protokoll 2B	Protokoll 2C
Initiale Kultur	6 Well Platte	6 Well Platte	6 Well Platte
Medium	EBM-2MV+SingleQuots (Cambrex)	EWM	EBM-2MV+SingleQuots (Cambrex)
Umplattierung	keine Umplattierung	keine Umplattierung	keine Umplattierung
Beschichtung der Platten	Kollagen Typ 1	Fibronectin	Fibronectin
Mediumwechsel	täglich	täglich	täglich
Zelldichte	10x10 ⁶ /Well	5x10 ⁶ /Well	5-10x10 ⁶ /Well

Tabelle 3: Zusammenfassung der Modifikationen von Protokoll 2A für die Kultivierung „direkt adhärenter Zellen“.

Es wurden zwei unterschiedliche Medien (EBM-2MV+SingleQuots und Standard Medium) und zwei unterschiedliche Proteine für die Beschichtung der Platten (Kollagen und Fibronectin) verwendet. In allen Protokollen erfolgte keine Umplattierung.

Die Protokolle 2A, 2B und 2C wurden mit Zellen wiederholt, die aus Buffy-Coat von Vollblut-Konserven isoliert wurden.

Die Kultivierung aller Zellkulturen erfolgte in einem Inkubator (CO₂-Auto-Zero Heraeus, Thermo Scientific Heraeus, Bonn, Deutschland) bei 37 °C in einer fünfprozentigen CO₂-Atmosphäre.

3.3 Charakterisierung der kultivierten Zellen

3.3.1 Mikroskopische Beurteilung

Die Zellen wurden täglich unter dem Mikroskop (Zeiss, Göttingen, Germany) inspiziert und deren Phänotyp regelmäßig dokumentiert.

3.3.2 Wachstumskinetik der endothelialen Progenitorzellen

- Zellzahl

Am Ende jeder Passage wurde die Zellzahl im Zellzähler (Sysmex, Norderstedt, Germany) analysiert.

- PDT, PDL, CPDL

Darüber hinaus wurde die Zeit der Verdopplung der Zellpopulation (*population-doubling time*, PDT), die Zahl der Verdopplungen der Zellpopulation zwischen zwei Passagen (*population-doubling level*, PDL) und somit die gesamte Zahl der Verdopplungen der Zellpopulation (*cumulative population-doubling levels*, CPDLs) berechnet.

Die Zahl der Verdopplungen von Zellpopulation zwischen zwei Passagen wurde nach der Formel

$$PDL = \log_2(C_H/C_S)$$

berechnet. Dabei ist C_H die Zahl der durch Trypsin abgelösten Zellen und C_S ist die Zahl der zuvor ausplattierten Zellen. Die Summe aller PDL wurde als *cumulative population-doubling levels* (CPDL) definiert. Die Zeit der Verdopplung der Zellpopulation (*population-doubling time*, PDT) wurde durch Division der PDL durch die Zahl der vergangenen Tage zwischen der Plattierung und der Ablösung durch Trypsin in einer Passage berechnet.

- CFSE-Analyse der endothelialen Progenitorzellen

Für die weitere Analyse der Proliferationskinetik der endothelialen Progenitorzellen wurde der CellTrace CFSE CellProliferation Kit (Molecular Probes, Invitrogen,

Eugene, USA) eingesetzt. Durch Inkubation der Zellen in Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFSE) wird die Substanz von den Zellen aufgenommen. Durch Abspaltung der Diacetatgruppe durch intrazelluläre Esterasen entsteht ein intensiv grün emittierender Fluoreszenzfarbstoff (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester), der mit intrazellulären Aminogruppen reagiert und dadurch die Zelle nicht mehr verlassen kann. Durch Zellteilung nimmt die CFSE Konzentration in den Tochterzellen ab. Dies führt in der Durchflusszytometrie (Fluoreszenzintensität versus *Events*) zu einer Linksverschiebung der maximalen Fluoreszenz. Die Zellen wurden mit CFSE in einer Arbeitskonzentration von 10 µM nach Gebrauchsanweisung gefärbt. Die Färbung wurde durch Zugabe von eiskaltem Medium gestoppt. Überschuss an CFSE wurde durch Waschen der Zellen in PBS entfernt. Ein Teil der Zellen wurde unmittelbar im FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) analysiert. Die übrigen Zellen wurden ausplattiert und weiter kultiviert. Die Verdünnung von CFSE in den Zellen durch die Teilung wurde im FACS zwei, vier und sieben Tagen nach der Markierung analysiert.

3.3.3 Durchflusszytometrie

Für die Bestimmung des Immunphänotyps der kultivierten Zellen wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Dafür wurde ein Durchflusszytometer (Bekman Coulter, Heidelberg, Germany) verwendet. Die Zellen wurden mit EDTA/Trypsin (Cambrex, Verviers, Belgium) drei bis fünf Minuten inkubiert und von der Kulturplatte gelöst. Die folgenden monoklonalen Antikörper wurden zur Färbung der Zellen benutzt: CD31-FITC (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA), CD 45-FITC (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA), CD14-PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland), CD105-PE (BioCytex, Marsel, Frankreich), CD146 (BioCytex, Marseille, Frankreich), CD141-FITC (Chemicon, Hampshire, UK), CD34 (Cymbus Biotechnology, Hampshire, UK). Alle Antikörper waren IgG₁Maus-Antikörper. Die konjugierten Antikörper wurden zur Zellsuspension zugegeben. Die Konzentration der Antikörper entsprach den Empfehlungen des Herstellers. Die Proben wurden 20 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Zum Ausschluss toter Zellen erfolgte die Markierung mit Propidiumiodid (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) in einer Arbeitskonzentration von 25µg/ml. Unmittelbar vor der Analyse wurden die Zellen aus jeder Probe in 1 ml von PBS mit 1% FCS resuspendiert. Als Isotypkontrollen dienten murine FITC-konjugierten IgG₁ und murine PE konjugierten IgG₁

(Sigma, Saint Louis, Missouri, USA). Als positive Kontrolle für die FACS-Analyse dienten humane venöse endotheliale Zellen (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) und als negative Kontrolle am Tag der Analyse aus Buffy-Coat von Blut-Konserve isolierte MNC. Die Daten wurden mit der *Software* Lysis II analysiert.

3.3.4 Immunfluoreszenz

Für den Nachweis des von-Willebrand-Antigens wurden die Zellen in den Platten mit 3% Paraformaldehyd (PFA) (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) 20 Minuten fixiert. Danach wurden anti-von-Willebrand-Antikörper (Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:50 hinzu gegeben.

Es folgte eine zwölf-stündige Inkubation im Kühlschrank bei +4°C. Nach Abspülen mit einer 0,1%-igen Saponin-Lösung (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) wurden die Zellen für zwei Stunden mit einem Schaf-anti-Maus FITC-konjugierten Antikörper (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) inkubiert. Die negative Kontrolle wurde über Nacht mit den nicht markierten murinen IgG₁ (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) im Kühlschrank inkubiert und anschließend für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit Schaf-anti-Maus FITC-konjugierten Antikörpern inkubiert.

Die Zellen wurden darüber hinaus mit PE-markiertem anti-VE-Cadherin (CD144) (R&D Systems, Wiesbaden, Germany) und PE-markiertem anti-CD105 (BioCytex, Marseille, Frankreich) gefärbt. Hierfür erfolgte die Fixierung mit 3% PFA. Anschließend wurden die Zellen mit den Antikörpern über Nacht im Kühlschrank in einer Verdünnung von 1:50 inkubiert. Für die Färbung mit dem anti-CD105-Antikörper wurden die Zellen zunächst mit 0,1%-iger Saponin-Lösung permeabilisiert. Für die Färbung mit dem anti-VE-Cadherin-Antikörper war keine Permeabilisierung notwendig. Zur Darstellung der Zellkerne wurde eine Gegenfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark) durchgeführt. Die fixierten Zellen wurden für fünf Minuten bei Raumtemperatur mit 0,5 µg/ml DAPI-Lösung inkubiert und nach dem Waschen mit weiteren Antikörpern (z. B. anti-VE-Cadherin-Antikörper) gefärbt.

Gefärbte Zellen wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Göttingen, Deutschland) mit 100-facher oder 400-facher Vergrößerung untersucht und fotografiert.

3.3.5 *Microarray-Analyse*

Für die nähere Charakterisierung der differentiellen Genexpression in EPC wurde eine *Microarray-Analyse* durchgeführt. Dabei wurde die RNA-Expression ausgewählter Genen in EPC im Vergleich zu Expression in der ursprünglichen MNC-Population quantitativ gemessen. Hierzu erfolgten zwei Experimente. Für Experiment 1 (Spender A) wurden EPC am Tag 37 und 39 und für Experiment 2 (Spender B) am Tag 52 und 56 von der Kulturplatte mit EDTA/Trypsin gelöst. RNA wurde mit dem Standard-Extraktionsprotokoll (NucleoSpin RNA II, Marcherey-Nagel) aus tiefgefrorenem EPC und MNC isoliert. Die als Kontrolle eingesetzten MNC stammten von denselben Spendern wie die korrespondierenden EPC. Die Qualität der gewonnenen RNA wurde mit Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) geprüft und in der Gel-Analyse und im Elektropherogramm visualisiert. 1 µg totaler RNA wurde für die T7-basierte Amplifikation verwendet. Amplifizierte RNA (aRNA) wurde mit Farbstoff markiert: RNA aus EPC mit Cyanine 3 (Cy3) und RNA aus MNC mit Cyanine5 (Cy5). Mithilfe einer a-Hyb Hybridizationsstation wurde die mit Farbstoff markierte RNA auf den Chip PIQOR *Stem Cell Microarrays – Human Antisense* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) aufgetragen. Der Chip PIQOR *Stem Cell Microarrays* besteht aus 942 Genen und eignet sich zur Charakterisierung eines Genexpressionsprofils von frühen undifferenzierten Stammzellen (z. B. EPC) im Vergleich mit dem Genexpressionsprofil einer anderen Zellpopulation (z. B. MNC). Fluoreszenzsignale wurden mit dem Laser *Scanner Scan Array Lite* (Perkin Elmer Life Sciences) abgelesen. Werte der Signalintensität wurden mit der *Software* (Biodiscovery) bearbeitet und berechnet. Eine Cy5/Cy3-Ratio wurde generiert. Gene, die ein weniger als doppelt so starkes Fluoreszenzsignal im Vergleich zum Hintergrund in beiden Kanälen Cy3 und Cy5 hatten, wurden von den Ergebnissen ausgeschlossen. Die Analyse wurde zwei Mal wiederholt.

3.4 Genetische Modifikation endothelialer Progenitorzellen

3.4.1 Lentivirale Vektoren

Die Transduktion der EPC wurde sowohl mit γ -retroviralen als auch mit von HIV-1 abgeleiteten lentiviralen Vektoren unabhängig voneinander in zwei Laboratorien durchgeführt. Die den grün fluoreszierenden Farbstoff (eGFP) -enthaltenden γ -retroviralen Vektoren SF α 11GFP α und RSF91.GFP.pre (47) wurden für die retrovirale Transduktion verwendet. Für die lentivirale Transduktion wurden LeGO-Vektoren (*Lentiviral Gene Ontology Vector*) eingesetzt: zum einen der LeGO-T2 Vektor, der den „*tandem dimer (td) tomato*“ enthält, andererseits der LeGO-G2 Vektor, der den grün fluoreszierenden Farbstoff (eGFP) enthält. Für die Auswahl der Fluoreszenzproteine wurden die folgenden Kriterien berücksichtigt: gute Helligkeit für die Bilddarstellung, Fotostabilität und fehlende Toxizität für die transduzierten Zellen. Diese Kriterien wurden von beiden verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen erfüllt.

3.4.2 Generierung viraler Partikel

Die Vektoren wurden wie folgt generiert:

- SF α 11GFP α : der zellfreie Überstand, der pseudotypisierte (GALV: „*gibbon ape leukemia virus*“) retrovirale Partikel aus der PG13-Zelllinie enthält, wurde wie zuvor beschrieben generiert (48). Der auf TE6711 Zellen determinierte Titer betrug ca. $1,5 \times 10^6$ virale Partikel pro ml (47).
- RSF91.GFP.pre*: GALV-pseudotypisierte Partikel wurden durch transiente Transfektion der PhoenixGP-Zellen wie beschrieben generiert (49). Der Titer betrug ca. 20×10^6 pro ml.
- LeGO-T2: der zellfreie, lentivirale Partikel enthaltener Überstand wurde bei der transienten Transfektion der PhoenixGP wie beschrieben generiert (47). Lentivirale Partikel wurden mit dem roten Farbstoff „*tandem dimer (td) tomato*“ markiert. Der Titer betrug ca. $1,6 \times 10^7$ virale Partikel pro ml für LeGO-T2.
- LeGO-G2: Zell-freier, lentivirale Partikel enthaltener Überstand wurde bei der transienten Transfektion der 293T-Zellen wie beschrieben generiert (50). Lentivirale Partikel wurden mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff

(GFP) markiert. Der Titer betrug ca. 20×10^6 virale Partikel pro ml für LeGO-G2. Alle Überstände wurden auf PhoenixGP für LeGO-T2- bzw. 293T-Zellen für LeGO-G2 titriert.

3.4.3 Zellkultivierung, retrovirale Gentransfektion und Bestimmung der Gentransfereffizienz

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte mit entsprechenden Medien bei 37°C in einer fünfprozentigen CO₂-Atmosphäre. Für die Transduktion wurden die Zellen in einer Dichte von 2×10^5 /Well (6 Well-Platte) oder 8×10^4 /Well (12 Well-Platte) in Gegenwart von 0,4 µg/ml Protaminsulfat (Sigma München, Deutschland) oder Polybrene (Sigma) inkubiert. Verschiedene Volumina (0,025 µl und 25 µl) der viralen Überständen, die unterschiedliche „*multiplicity of infection*“ (MOI) darstellen, wurden zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 1.000 x G für eine Stunde bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach 48 Stunden wurde die Gentransfektionsrate durch FACS-Analyse mit dem Gerät FACSCanto und der Software CellQues oder FACSDiVa (Becton Dickinson) bestimmt. Bilder von transduzierten Zellen wurden mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop IX71 (Olympus, Hamburg, Deutschland) aufgenommen. Dieses Mikroskop war mit einem FITC und TexasRed-Filterset ausgerüstet.

4 Ergebnisse

4.1 Isolierung, Charakterisierung und Expansion **„nicht direkt adhärenter“ Zellen in Fibronektin-** **beschichteten Kulturgefäßen**

Nachfolgend werden die mikroskopischen und durchflusszytometrischen Ergebnisse nach Wachstum „nicht direkt adhärenter“ Zellen, die gemäß der Protokolle 1A, 1B und 1C (vgl. Kapitel 3) angezüchtet wurden, vorgestellt.

4.1.1 Mikroskopie

In den 24 Well-Kulturgefäßen, in welche die „nicht direkt adhärenenten“ mononukleären Zellen (MNC) 48 Stunden nach der Isolierung in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ Well überführt wurden, entstanden bis zum Tag 5 mehrere sogenannte *colony forming units-endothelial cells* (CFU-EC) [Zellinseln mit einem dichten Zentrum aus runden Zellen und vom Zentrum ausgehenden spindelförmigen Zellen] (Abb. 3 und 4). Diese nach dem Präplattierungsschritt entstehenden Zellen werden als CFU-EC (31) bezeichnet. Außerdem waren in den Kulturplatten mehrere nicht mit den Inseln verbundene einzelne spindelförmige Zellen nachweisbar. Ein Vergleich zwischen dem Endocult-Medium und dem EWM ergab keine deutlichen Unterschiede zwischen der Anzahl und der Morphologie der Kolonien (Tabelle 4). In den Kulturgefäßen, in denen Zellen mit EBM-2MV+SingleQuotes kultiviert wurden, entstanden vereinzelt liegende spindelförmige Zellen. Das EBM-2MV+SingleQuotes-Medium enthält im Vergleich zum EWM nur einen geringen Anteil an FCS (5% gegenüber 20% in Standard-Medium), eine geringere Konzentration VEGF-2 (5-10 ng/ml gegenüber 50 ng/ml in Standard-Medium) und weniger bFGF (5-10 ng/ml gegenüber 25 ng/ml in Standard-Medium). Es ist von daher anzunehmen, dass höhere Konzentrationen an essentiellen Wachstumsfaktoren für die Bildung von CFU-EC notwendig sind.

Zwischen Tag 7 und 10 lösten sich die koloniebildenden Zellen ab und die verbleibenden spindelförmigen Zellen stellten das Wachstum ein.

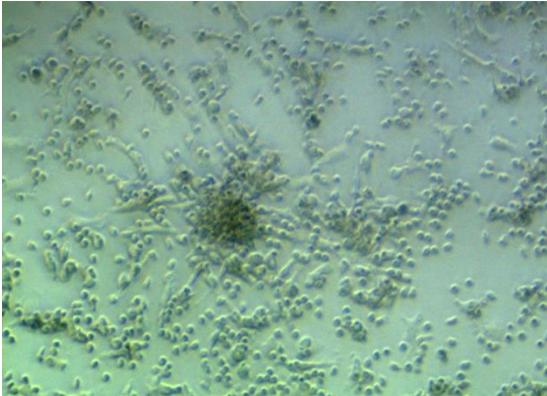


Abbildung 3.a

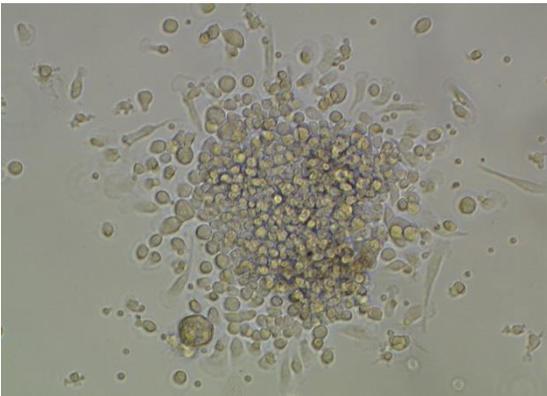


Abbildung 3.b

Abb. 3 (a und b): Typische Kolonien (CFU-EC) am Tag 5 in Kulturgefäßen, in denen die Zellen mit Endocult-Medium kultiviert worden waren.

Deutlich sichtbar sind die Kolonien (CFU-EC), die aus einem dichten Zentrum aus runden Zellen und vom Zentrum ausgehenden spindelförmigen Zellen bestehen [(a) 100fache und (b) 400x-fache Vergrößerung].

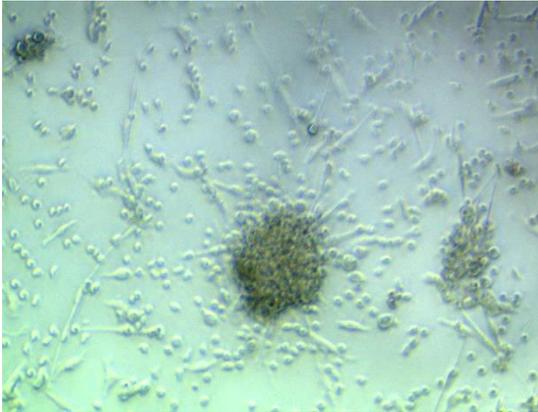


Abb. 4: Typische Kolonien (CFU-EC) am Tag 5 in Kulturgefäßen, in denen die Zellen mit EWM kultiviert worden waren.

Deutlich sichtbar sind die Kolonien (CFU-EC), die aus einem dichten Zentrum aus runden Zellen und vom Zentrum ausgehenden spindelförmigen Zellen bestehen (100x-fache Vergrößerung). Die Phänotypisierung ergab keine wesentlichen Unterschiede zu den Kolonien, die nach Kultivierung mit Endocult Medium (Abb. 3.a und 3.b s. o.) entstanden waren.

Medium	CFU-EC/ Well , mean±SD
Endocult-Medium (N=4)	28±5
EWM (N=4)	26±6
EBM-2MV+Single QuotsMedium(N=4)	0

Tabelle 4: Anzahl der Kolonien aus CFU-EC.

Die Kolonien mit einem dichten Zentrum aus runden Zellen und vom Zentrum ausgehenden spindelförmigen Zellen (CFU-EC) entstanden bis zum Tag 5 in den 24 Well-Platten, in welche die nichtadhärenten MNC 48 Stunden nach der Isolierung in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ Well umplattiert worden waren. Der Tag der Isolierung und Ausplattierung der Zellen wurde als Tag 0 bezeichnet. Am Tag 5 wurden die Kolonien gezählt (Mittelwert ± Standardabweichung)

4.1.2 Durchflusszytometrie

Um die in 24-Well-Platten entstandenen CFU-EC näher zu charakterisieren wurden die Zellen mit fluoreszierenden Maus-Antikörpern gegen unterschiedliche humane Zellantigene angefärbt und an Tag 5, 12 und 21 mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 zusammengestellt.

CD-Antigen/Tag der Analyse	Tag 5	Tag 12	Tag 21
CD45	+++	+++	+++
CD31	(+)	-	-
CD14	(+)	+	++
CD 105 (Endoglin)	NB	-	-
vWF	-	-	-

Tabelle 5: Ergebnisse der FACS-Analyse der CFU-EC.

Die in 24 Well-Platten im Endocult-Medium (Kultivierung nach Protokoll1A) entstandenen CFU-EC wurden am Tag 5,12 und 21 mittels Durchflusszytometrie analysiert. Tag 0: Tag der Zellisolierung und Ausplattierung; NB: nicht bestimmt; +++: sehr stark positiv; ++: stark positiv; +: positiv; (+): schwach positiv; - : negativ.

Die untersuchten Zellen wiesen die für Leukozyten typische Marker wie z.B CD45 und CD14 auf, exprimierten jedoch keine für endotheliale Zellen typische Marker wie z.B CD31, von-Willebrand-Faktor-Antigen und CD105 (Endoglin) (Abb. 5).

CFU-EPC, Tag 12

positive Kontrolle

negative Kontrolle

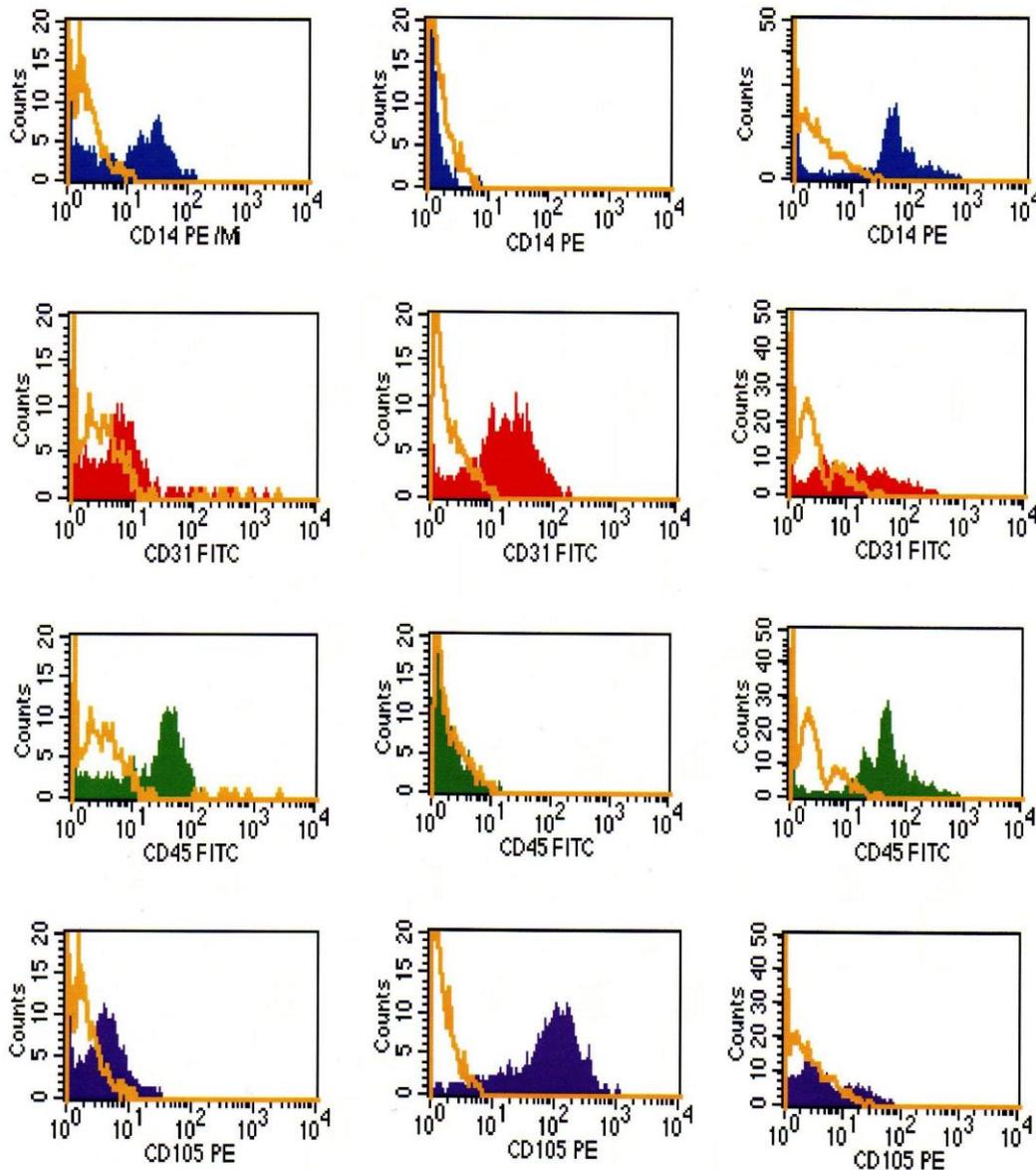


Abb. 5: FACS-Analyse der CFU-EC (Kultivierung nach Protokoll 1A) an Tag 12.

Linke Spalte: Ergebnisse der Durchflusszytometrie der CFU-EC an Tag 12. Mittlere Spalte: Ergebnisse der Durchflusszytometrie humaner endothelialer venöser Zellen (positive Kontrolle). Rechte Spalte: Ergebnisse der Durchflusszytometrie humaner aus peripherem Blut isolierter MNC (negative Kontrolle).

CFU-EC sind CD45- und CD14 - positiv, CD31- und CD105 - negativ.

Die Ergebnisse belegen eine leukozytäre Differenzierung der kultivierten Zellen am ehesten in Richtung der Monozyten-Makrophagen Reihe. Die Kulturen wurden bis Tag 30 propagiert, zeigten jedoch keine morphologischen Änderungen. Auch die Expression der untersuchten Antigene blieb unverändert.

Um einen potentiellen Einfluss verschiedener Medien zu untersuchen wurden die Zellen, die mit drei verschiedenen Medien (EndoCult, EWM und EBM-2MV+SingleQuots) kultiviert worden waren, parallel durchflusszytometrisch untersucht (Tabelle 6).

CD Antigen/ Medium	Endocult (Protokoll1A) Tag 12	EWM (Protokoll 1B) Tag 12	EBM-2MV+SingleQuots (Protokoll 1C) Tag 12
CD45	+++	+++	+++
CD31	-	-	-
CD14	+	-	++
CD105	-	-	-
vWF	-	-	-

Tabelle 6: Der Einfluss des Kulturmediums auf die Expression verschiedener oberflächlicher Antigene der kultivierten Zellen.

Unterschiedliche oberflächliche Antigene wurden auf Zellen, die mit drei verschiedenen Medien kultiviert worden waren, am Tag 12 analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Zellen unter allen Kulturbedingungen CD45 sehr stark exprimieren. Hingegen scheint die Expression von CD14 abhängig vom eingesetzten Medium zu sein.

+++ : sehr stark positiv; ++ : stark positiv; + : positiv; (+) : schwach positiv; - : negativ.

Der Vergleich ergab, dass scheinbar nur die Expression von CD14 in Abhängigkeit von verschiedenen Medien erfolgte.

Im Gegensatz zu MNC aus peripherem Blut, konnten bei MNC aus Buffy-Coat von Blutkonserven keine Unterschiede in den FACS-Ergebnissen nachgewiesen werden.

4.1.3 Wachstumspotenzial der CFU-EC.

Wie bereits erwähnt, lösten sich die Kolonien zwischen Tag 7 und 10 ab. Die verbleibenden spindelförmigen Zellen stellten das Wachstum ein und konnten nicht umplattiert oder propagiert werden.

Die Ergebnisse der Kultivierung von „nicht direkt adhärenen Zellen“ sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

	Protokoll 1 A	Protokoll 1B	Protokoll 1C
Morphologie			
Tag 5	Kolonien aus CFU-EC	Kolonien aus CFU-EC	Keine typische Kolonien, einzelne spindelförmige Zellen
Tag 7-10	Ablösen der zentralen Zellen der Kolonie Verbleiben spindelförmiger Zellen		
Wachstumspotenzial	gering	gering	sehr eingeschränkt
CD 45	+++	+++	+++
CD 14	+	-	++
CD 31	-	-	-
CD 105	-	-	-
vWF	-	-	-

Tabelle 7: Zusammenfassung der mikroskopischen und durchflußzytometrischen Ergebnissen nach Kultivierung „nicht direkt adhärenen“ Zellen.

Im Protokoll 1A und 1B entstanden die Kolonien (CFU-EC), die sich nach 7-10 Tagen ablösten und zurückblieben spindelförmige Zellen mit einem sehr eingeschränkten Wachstumspotenzial.

Im Protokoll 1C wurden keine typischen Kolonien beobachtet, nur die spindelförmigen Zellen. Die FACS-Analyse der Zellen entsprach einem leukozytären Phänotyp der Zellen.

+++ : sehr stark positiv; ++ : stark positiv; + : positiv; (+) : schwach positiv; - : negativ.

4.2 Isolierung, Charakterisierung, Expansion und retrovirale Transduktion der „direkt adhärenen Zellen“ in Kollagen-beschichteten Platten

Im Folgenden werden die mikroskopischen und durchflusszytometrischen Ergebnisse sowie die Analyse des Wachstumspotenzials und der *Microarray*-Befunde der „direkt adhärenen“ Zellen nach Protokoll 2A vorgestellt (s. Material und Methoden).

4.2.1 Mikroskopische Ergebnisse

Nach fünf Tagen konnten keine Kolonien beobachtet werden (Abb. 6). Stattdessen entstanden zwischen Tag 9 und 30 (Tag 20 ± 5 , N = 12) nach Kulturbeginn endothelähnliche Zellen, die bis zur Konfluenz proliferierten und ein Pflastersteinmuster aufwiesen (Abb. 7). Da diese Zellen nach einer gewissen Latenz („*lag phase*“) entstehen, werden sie in Literatur als „*late-EPC*“, oder „*endothelial outgrowth cells*“ (EOC) bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit wird im Weiteren für diese Zellen die Abkürzung EPC benutzen. Diese EPC konnten häufiger erfolgreich aus MNC des peripheren Bluts (in 72 % der angesetzten Kulturen, N = 14) als aus MNC aus *Buffy-Coat* generiert werden (in 50 % der angesetzten Kulturen, N=4).

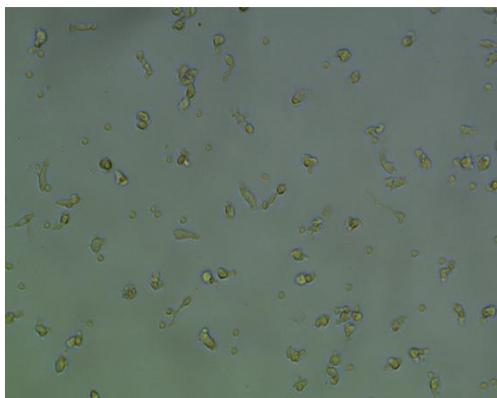


Abb. 6: Mikroskopisches Bild einer Kultur direkt adhärenen Zellen an Tag 5.

Es konnten keine Kolonien (CFU-EC) sondern nur einzeln liegende Zellen beobachtet werden (100-fache Vergrößerung).

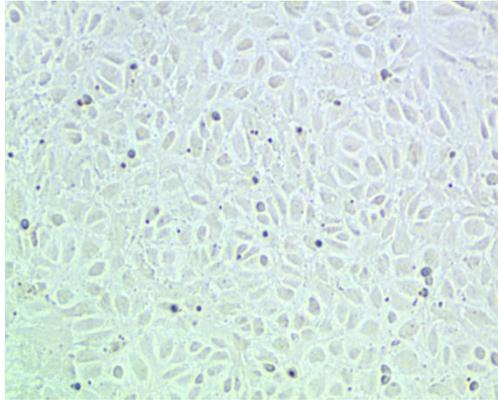


Abb. 7: mikroskopisches Bild einer Kultur direkt adhärenter Zellen an Tag 26.

Die endothelähnlichen Zellen, die bis zur Konfluenz proliferierten, wiesen ein Pflastersteinmuster auf (100-fache Vergrößerung).

4.2.2 Durchflusszytometrie, Immunzytologie

Um die entstandenen Zellen zu charakterisieren, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Antikörpern markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Zellen waren CD31 (PECAM-1), CD105 (Endoglin), CD146 (P1H12), CD141 (Thrombomodulin) und CD34-positiv. Sie waren reproduzierbar negativ für die leukozytären Marker CD45 und CD14 (Abb. 8). Immunzytologisch konnten von-Willebrand-Faktor-Antigen und VE-Cadherin bei den Zellen nachgewiesen werden (Abb. 9 a und b).

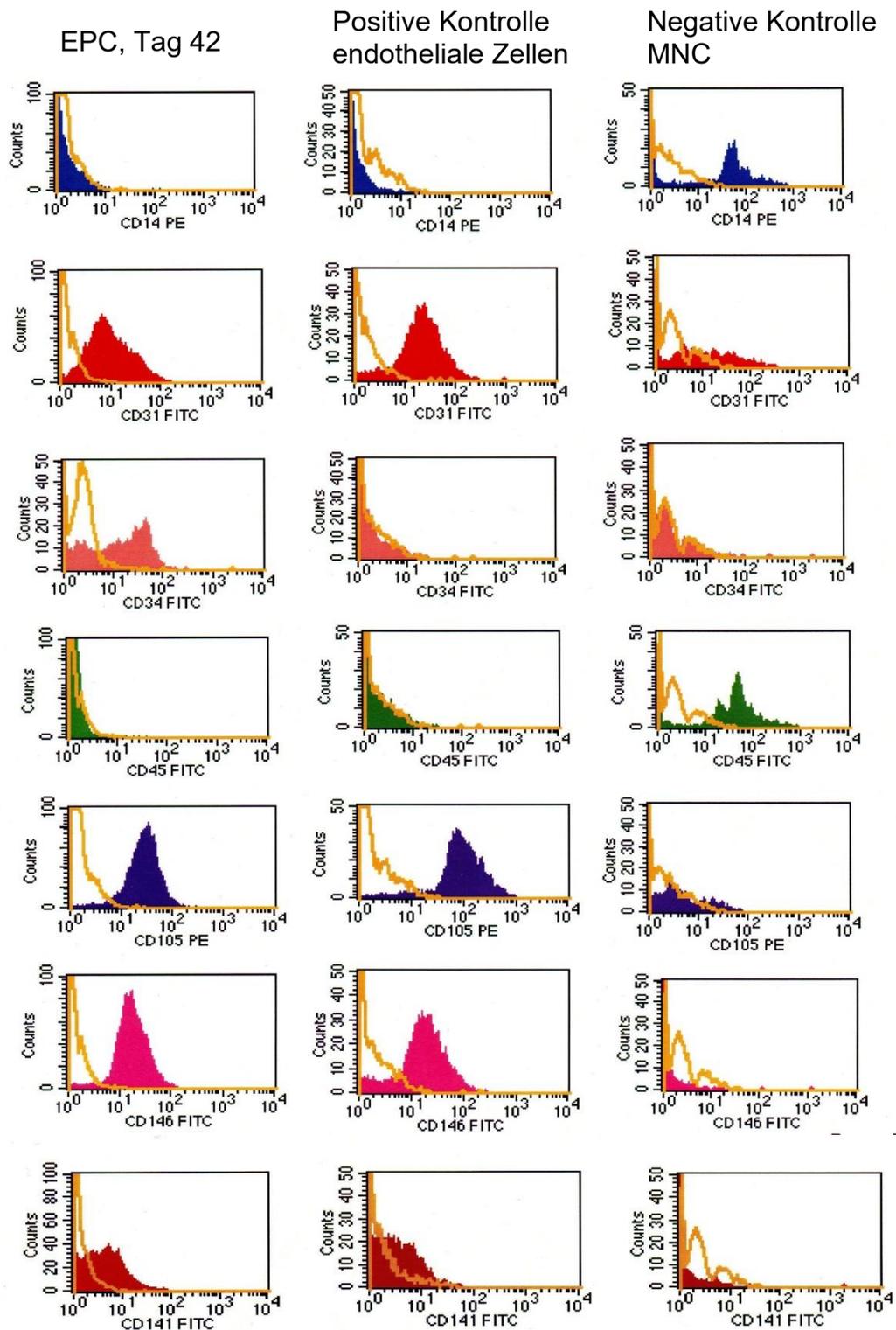
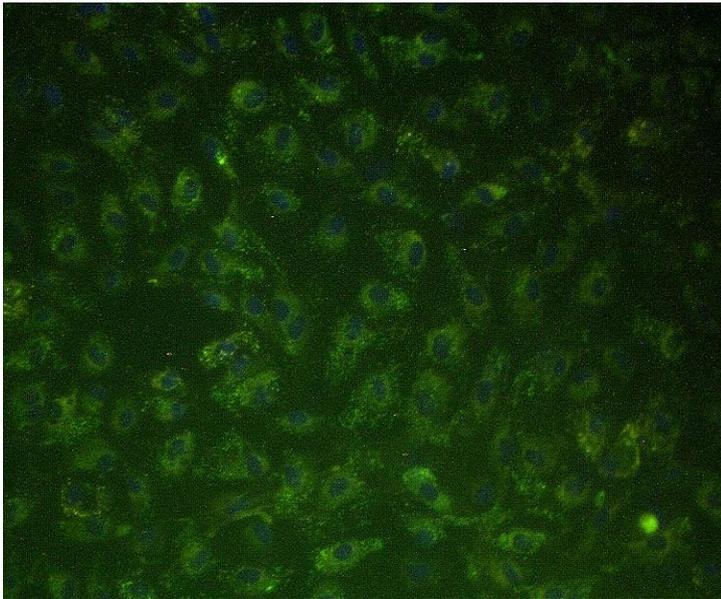
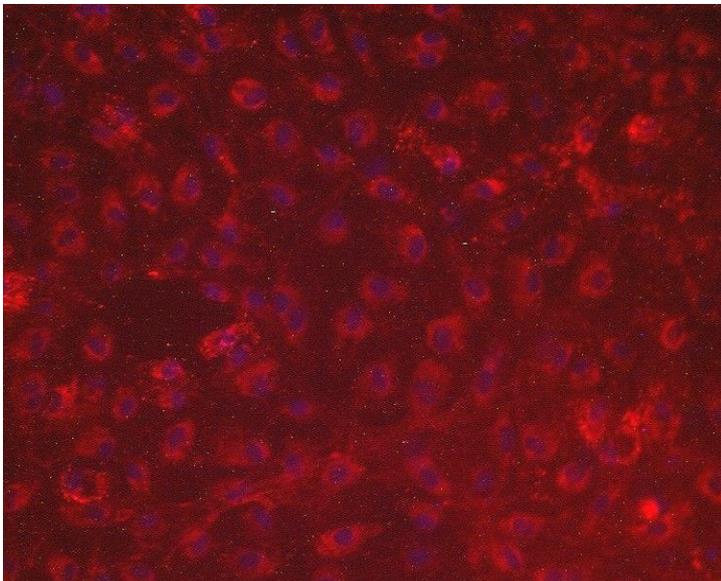


Abb. 8: FACS-Analyse der EPC an Tag 42.

Linke Spalte: Ergebnisse der Durchflusszytometrie der EPC an Tag 42, EPC sind positiv für CD31, CD105 (Endoglin), CD146 (P1H12), CD141 (Thrombomodulin) und CD34. Sie sind negativ für CD45 und CD14. Mittlere Spalte: Ergebnisse der Durchflusszytometrie humaner venöser endothelialer Zellen als positive Kontrolle. Rechte Spalte: Ergebnisse der Durchflusszytometrie humaner MNC als negative Kontrolle.



(a)



(b)

Abb. 9 a und b: Immunzytologische Untersuchung der EPC an Tag 44.

Die EPC wurden mit anti-von-Willebrand-Faktor-Antikörpern (a) und anti-VE-Cadherin (CD 144)-Antikörpern (b) markiert; die Zellkerne wurden mit DAPI gegen gefärbt (100-fache Vergrößerung). Das punktförmige Muster im Zytoplasma der Zellen nach Markierung mit PE-anti-von-Willebrand-Antikörpern deutet auf die positive Färbung von „*Weibel Pallade bodies*“ hin.

4.2.3 Determination des Wachstumspotenzials der EPC

Die Zellen konnten während der *in-vitro*-Kultivierung innerhalb von 55-60 Tagen bis zu sieben Mal umplattiert werden. Anschließend wurden die Zellen größer und zeigten ein verlangsamtes Wachstum. Unter der Annahme einer Frequenz EPC von 0,0001% (7), zeigten die Zellen eine 1,2-millionenfache Expansion (Abbildung 10) in 30 Tagen. Die Zahl der Verdopplungen der Zellpopulation beträgt damit $19 \pm 1,2$ (N = 4). Das Zellwachstum konnte darüber hinaus durch die Markierung der Zellen mit dem Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFSE) bestätigt werden. Durch Verdünnung des Farbstoffes in Tochterzellen nach der Zellteilung nahm die Fluoreszenzintensivität der Zellen progredient ab und bildete in der FACS-Analyse im Histogramm neu auftretende, nach links verschobene „*peaks*“ (Abbildung 10.a). Auch die Größenzunahme der Zellen konnte in der FACS-Analyse durch die Veränderungen im „*forward scatter*“ nachvollzogen werden (Abb. 10).

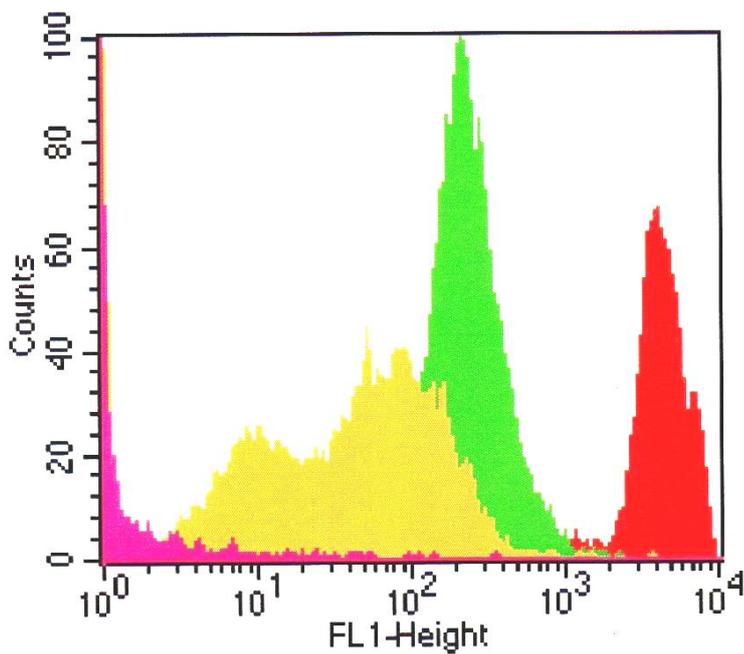


Abbildung 10.a

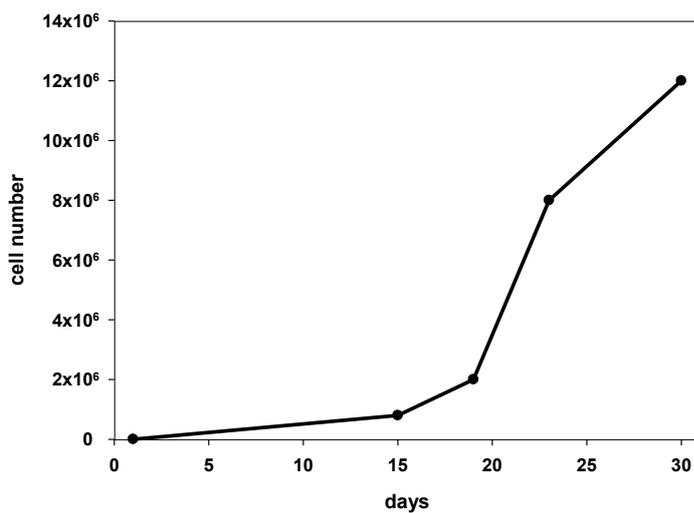


Abbildung 10.b

Abb. 10 a und b: Wachstumskinetik der EPC.

EPC wurden auf Kollagen beschichteten Platten kultiviert. Unter der Annahme einer Frequenz der EPC von 0,0001% (7), zeigten die Zellen eine 1,2-millionenfache Expansion (Abb. b) in 30 Tagen. Nach einer „lag-phase“ von ca. 15 Tagen zeigen die Zellen exponentielles Wachstum und eine $1,2 \times 10^6$ -Expansion in 30 Tagen.

Für den CFSE-Proliferations-Assay wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie an Tag der Markierung sowie 2, 4 und 7 Tagen später analysiert. Die Zellteilung und die Entstehung weiterer EPC Populationen wurden durch Abnahme der intrazellulären Farbstoffkonzentration gemessen. Die Abbildung a zeigt eine kontinuierliche Linksverschiebung der „peaks“ durch Verminderung der Fluoreszenzintensität der entstandenen Zellpopulationen (rot: Zellpopulation am Tag der Markierung; grün: 2 Tagen später; gelb: 4 Tagen später, rosa: 7 Tagen später).

Die Fluoreszenzintensivität der Zellen nahm progredient ab und bildete in der FACS-Analyse im Histogramm neu auftretende, nach links verschobene „peaks“ (Abb.11). Auch die Größenzunahme der Zellen konnte in der FACS-Analyse durch die Veränderungen im „forward scatter“ nachvollzogen werden (Abb. 11).

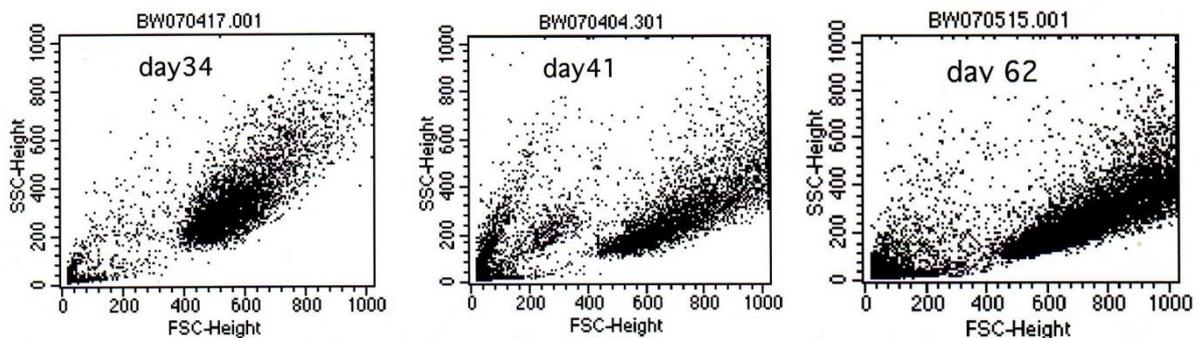


Abb. 11: Zunahme an der Größe von EPC.

Die Größenzunahme der Zellen kann in der FACS-Analyse durch die Veränderungen in „forward scatter“ dargestellt werden. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden am Tag 34, 41 und 62 durchgeführt.

4.2.4 Microarray Analyse

Für die weitere Charakterisierung der EPC wurde eine *Microarray*-Analyse durchgeführt. Sie dient der Erfassung der quantitativen RNA-Expression bestimmter Gene in EPC im Vergleich zur ursprünglichen Population der MNC. Hoch regulierte Gene mit einer „Cy5/Cy3-ratio“ ≥ 10 sind in Tabelle 8 und Gene mit einer reduzierten Expression und „Cy5/Cy3“-ratio $\leq 0,01$ in Tabelle 9 aufgelistet. Es zeigte sich, dass die Expression von Genen, die für die Produktion von folgenden Proteinen verantwortlich sind, hoch reguliert waren:

- (1) Adhäsionsproteine wie *melanoma cell adhesion molecule* (MCAM), endothelial-spezifische Rezeptor-Aktivatoren wie Endoglin, Tie-1 und Ephrin;
- (2) Gerinnungsfaktoren wie von-Willebrand-Faktor;
- (3) Fibrinolyseproteine wie PAI-1, Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) und *tissue plasminogen activator* (tPA);
- (4) Extrazellulärmatrixproteine wie Fibronectin, Kollagen, Laminin, Vitronectin und Entactin; und
- (5) Remodulierungsproteine wie uPA, Matrixmetallopeptidase-2 (MMP-2) und MMP-14.

Demgegenüber war die Expression folgender Gene reduziert:

- (1) leukozytäre Antigene wie L-Selectin, CD37, CD33, *Lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1), CD7 und CD24;
- (2) Transkriptionsfaktoren wie „*CCAAT/enhancer binding protein*“ (C/EBP) und *octamer binding transcription factor 2* (Oct-2).

Funktion	Hoch regulierte Gene (Cy5/Cy3-Signal Ratio [EPC/MNC] ≥ 10)
Koagulation	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i> (PAI-1)(540), Multimerin (67), Urokinase typ plasminogen Aktivator (uPA)(52), von-Willebrand-Faktor (vWF)(20), <i>Tissue plasminogen activator</i> (tPA)(13)
Extrazelluläre Matrix	Fibronektin (338), Kollagen $\alpha 1$ (IV)(79), Laminin $\beta 3$ (54), Kollagen $\alpha 2$ (V)(54), Kollagen $\alpha 1$ (VIII)(41), Laminin $\gamma 1$ (29), Laminin $\alpha 4$ (17), Vitronektin (16), Laminin $\alpha 5$ (16), Laminin $\beta 1$ (15), Nidogen (Entactin) (49; 11); Thrombospondin (10)
Enzyme	Metallopeptidase MMP-2 (209) und MMP-14 (21), Nucleotidase-5 (NT5)(19), Gamma-Glutamyl-Transferase-5 (GGT5)(17), <i>Mitogen activated protein kinase-12</i> (MAPK12)(44; 13), Thymidine kinase (12)
Wachstumsfaktoren	<i>Connective tissue growth factor</i> (CTGF)(205), <i>Bone morphogenetic protein-6</i> (BMP6)(19), Inhibin (17); Neuropilin (11)
Adhäsion	MCAM (CD146)(100), Hermes (CD44)(35), Agrin (heparan sulfate proteoglycan)(32)
Transkription	ID1(89), Sox18 (56), TBX1 (27), Snail (11)
Strukturproteine	Nestin (40), Keratin 18 (33)
Vasokonstriktion	Endothelin-1 (ET-1)(38)
Zellzyklus-Proteine	Cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKN-1A)(33)
Rezeptoren	Endoglin (CD105)(31), TIE-1 (27), Roundabout homologue 4 (robo4)(21), Ephrin B (11)
Integrine	Integrin $\alpha 3$ (27), Integrin $\alpha 5$ (12), Integrin $\beta 5$ (11)
Signalmoleküle	Semaphorin (16)
Andere	CD9 (16), CD34 (11), <i>Fatty acid binding protein</i> (10), Calumenin (10)

Tabelle 8: Genfunktion der hoch regulierten Gene.

Funktionale Gruppierung der hoch regulierten Gene (EPC versus MNC; PIQOR Stem Cell Microarray) mit einer Cy5/Cy3-Ratio ≥ 10 . In Klammern: Cy5/Cy3-Ratio.

Funktion	Gene mit reduzierter Expression (Cy5/Cy3-Signalratio [EPC/MNC] ≤ 0,01)
Enzyme	<i>Protein kinase C</i> (0,006), Tyrosine 3-Monooxygenase (0,07)
Wachstumsfaktoren	Interleukin 7 (0,03)
Adhäsion	L-Selectin (0,0005), CD37 (0,002), CD33 (0,01), glycoprotein 150/95 (0,01), LFA-1 (0,04)
Transkription	<i>Oligodendrocyte transcription factor 1</i> (0,01), <i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)α</i> und <i>β</i> (0,01), <i>Octamer binding transcription factor 2</i> (0,05), Id-2 (0,09)
Zell Zyklus Proteine	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor D</i> (0,05)
Receptore	<i>Stromal cell derived factor 1-receptor</i> (0,08), CXCR4 (0,08), PDGF-R- <i>β</i> (0,08)
Integrine	Integrin <i>β</i> 7 (0,001), Integrin <i>β</i> 2 (0,001)
Signal Moleküle	<i>MAP kinase docking protein (ARHGAP-9)</i> (,001), WNT10B (0,05)
Andere	<i>Immunglobulin heavy chain α1/2</i> (0,009), <i>Allograft inflammatory factor-1 (AIF-1)</i> (0,01), PF4 (0,02), CD7 (0,03), CD24 (0,07)

Tabelle 9: Genfunktion der Gene mit reduzierter Expression.

Funktionale Gruppierung der Gene mit reduzierter Expression (EPC versus MNC; PIQOR *Stem Cell Microarray*) mit einer Cy5/Cy3-Ratio ≤ 0,01. In Klammern: Cy5/Cy3-Ratio.

4.2.5 Retro- und lentivirale Transduktion der EPC

Die virale Transduktion ist ein Verfahren zur Transfektion, d.h. das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Die vielfältigen Möglichkeiten, ein Gen in eine Zielzelle einzuschleusen, lassen sich in virale und nicht-virale Methoden gliedern. Ein nicht-viraler Gentransfer kann physikalisch (Elektroporation, Mikroinjektion, Lipofektion, Partikelbombardierung, Applikation nackter DNA), chemisch (Calcium-Phosphat-Kopräzipitation) oder rezeptorvermittelt (DNA+Protein- oder Virushüllenkomplexe) erfolgen. Diese Methoden besitzen den Vorteil, dass sie wiederholt, teilweise ohne toxische Nebenwirkung, angewandt werden können und

dass mit ihnen teilweise große DNA-Mengen übertragen werden können. Außerdem bieten sie die Sicherheit, primär nicht infektiös zu sein. Als großen Nachteil besitzen diese Methoden nur eine geringe Effizienz ($< 0,001 \%$) oder führen nur zu einer vorübergehenden Genexpression, da die transferierte Nukleinsäuresequenz wegen ihrer zum Teil nur episomalen Lokalisierung durch Zellteilungen allmählich verdünnt wird und damit letztendlich verloren geht (51).

Die virale Transduktion stellt eine der effizientesten Methoden zum Transfer von Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen dar. Im Gegensatz zur nicht-viralen Transfektion bedient sich die virale Transduktion der für Viren typischen Eigenschaft, über Rezeptoren gezielt in Wirtszellen einzudringen. Hierdurch können auch langsam wachsende oder ansonsten transfektionsresistente Zellen erreicht werden. Je nach Zielsetzung werden u. a. adeno-assoziierte Viren (AAV), Adenoviren, Herpesviren und Retroviren (inkl. Lentiviren) zum Nukleinsäuretransfer eingesetzt.

Retroviren sind die am häufigsten verwendeten Vektoren. Zur Familie der Retroviren gehören die Spuma-, Oncoretro- und Lentiviren. Spumavirinae („foamy“-Viren) vakuolisieren eukaryotische Zellen in Kultur, sind aber weder für den Menschen noch für Tiere pathogen. Oncoretroviren dagegen können verschiedene Tumore, darunter Sarkome (Rous Sarcoma Virus), Leukämien und maligne Lymphome (murines Leukämievirus, humanes T-Zell Leukämievirus) hervorrufen. Lentiviren werden als komplexe Viren bezeichnet, da sie über akzessorische Gene verfügen, die einen aktiven Transport in den Zellkern ermöglichen (51).

In der vorliegenden Arbeit wurden die endothelialen Progenitorzellen enthaltenden Markergene eGFP mit vier unterschiedlichen retroviralen Vektoren transduziert. Die eGFP-enthaltenden γ -retroviralen Vektoren SF α 11GFP pre und RSF91.GFP pre wurden verwendet. Für die lentivirale Transduktion wurden LeGO-Vektoren eingesetzt. Einerseits der LeGO-T2 Vektor, der den roten Farbstoff „*tandem dimer*“ (td) *tomato*“ enthält, andererseits der LeGO-G2 Vektor, der den eGFP enthält.

Die Transduktionsrate lag für die γ -retroviralen Vektoren bei $79,1 \pm 14,0 \%$ (N = 3) und für die lentiviralen Vektoren bei $87,9 \pm 10,7 \%$ (N = 3). Für die Experimente wurden EPC-Kulturen von drei unterschiedlichen Spendern verwendet. Zum Zeitpunkt der Transduktion waren die Kulturen 33, 37 und 47 Tagen alt.

Für beide Vektorsysteme war die Transduktionseffizienz (TE) von der *multiplicity of infection* (MOI), d. h. dem Verhältnis von Viruspartikeln zu Zellen, abhängig. Für den eGFP -enthaltenden γ -retroviralen Vektor RSF91.GFP pre^* betrug bei einer MOI von

0,0125 die TE 5,6 %, bei einer MOI von 0,125 die TE 29 %, bei einer MOI von 1,25 die TE 66 % und bei einer MOI von 12,5 die TE 73 %. Für den lentiviralen LeGO-T2 Vektor betrug bei einer MOI von 0,2 die TE 16,1 %, bei einer MOI von 2 die TE 60,4 %, bei einer MOI von 20 die TE 95,8 %. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 und Abbildung 12 dargestellt. Die Daten belegen die exzellente Transduzierbarkeit der EPC mit retroviralen Vektoren.

Experiment/ Kultur	Tag der Kultur	Transduktion (in %)	
		eGFP-enhaltenden γ -retrovirale Vektor RSF91.GFP.pre*	tandem dimer (td) tomato enthaltener lentiviraler Vektor LeGO-T2
1	33	98,9	79,9
2	30	91,4	61,6
3	47	73,4	95,8
	MW	87,9	79,1
	SD	$\pm 10,7$	$\pm 14,0$

Tabelle 10: Transduktion der EPC mit der γ -retroviralen und lentiviralen Vektoren.

In der Tabelle sind die Ergebnisse der Transduktion der EPC dargestellt. Für die Transduktion wurden Zellkulturen von unterschiedlichen Spendern verwendet. Zur Zeit der Transduktion waren die Kulturen 33, 37 und 47 Tagen alt. Für die Transduktion wurden zwei Vektorsysteme verwendet: Zum einem der eGFP-enhaltene γ -retrovirale Vektor RSF91.GFP.pre*Vektor, zum anderen der td-tomato enthaltenden lentiviraler Vektor LeGO-T2-Vektor. Der jeweilige Mittelwert der Transduktionseffizienz lag für den eGFP-enhaltenden γ -retroviralen Vektor bei 87,9 %, für den *td-tomato* enthaltenden lentiviralen Vektor LeGO-T2-bei 79,1 %.

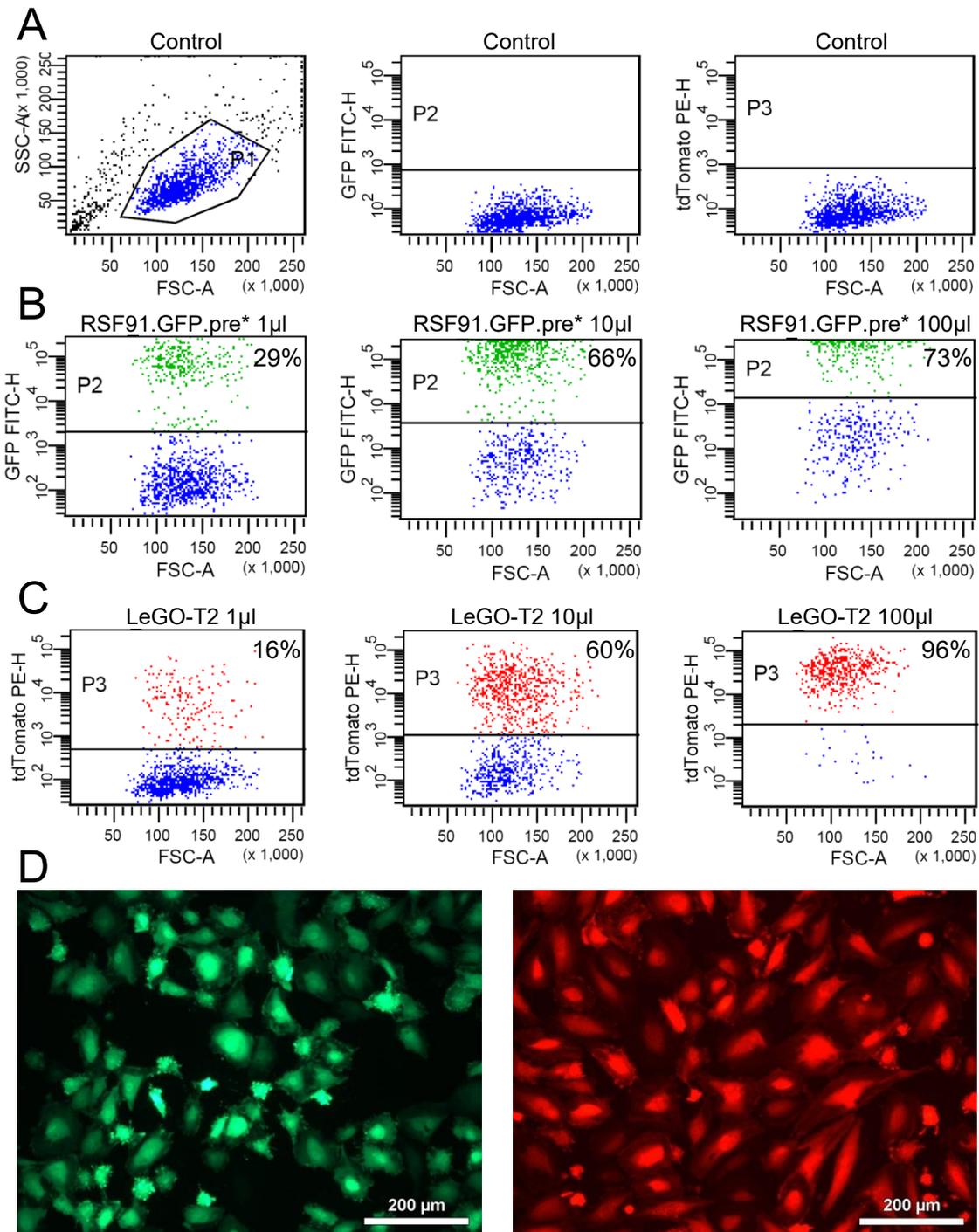


Abb. 12: Transduktion der EPC mit den GFP enthaltenen murinen retroviralen (D.1) und den *td-tomato* enthaltenden (D.2) humanen lentiviralen Vektoren.

EPC wurden an Tag 47 der Kultur mit zellfreiem, retrovirale Partikel enthaltendem Überstand in ansteigender MOI transduziert. Die Gentransfereffizienz wurde zwei Tage später mit einem FACSCanto-Durchflusszytometer bestimmt. (A) Die Kontrolle zeigt das Signal einer nicht transduzierten EPC-Kultur. (B) EPC, transduziert mit dem γ -retroviralen Vektor RSF91.GFP.pre*. Für die Transduktion wurden folgende MOI verwendet: 0,25 (= 1 μ l Überstand), 2,5 (= 10 μ l Überstand), und 25 (= 100 μ l Überstand). Die Transduktionseffizienz korrelierte mit der MOI. (C) EPC transduziert mit *td-tomato* enthaltendem lentiviralem Vektor

LeGO-T2. Folgende MOI wurden eingesetzt: 0,20 (= 1 µl Überstand), 2,0 (= 10 µl Überstand), und 20 (= 100 µl Überstand). Auch hier wurde eine direkte Korrelation zwischen MOI und Transduktionsrate gefunden. (D) Die Fluoreszenzphotographien der transduzierten Zellen (grün: RSF91.GFP.pre*, MOI 25; rot: LeGO-T2, MOI 20) zeigen eine starke Expression der transduzierten Gene in nahezu allen Zellen.

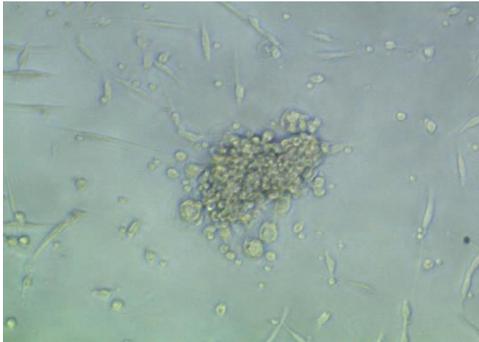
4.3 Isolierung, Charakterisierung und Expansion „direkt adhärenter mononukleärer Zellen“ in Fibronektin-beschichteten Platten.

Nachfolgend werden die mikroskopischen, durchflusszytometrischen Ergebnisse der „direkt adhärenter mononukleärer Zellen“ nach Protokoll 2B und 2C vorgestellt. Im Vergleich zum im vorigen Teil verwendeten Protokoll 2A wurde in den Protokollen 2B und 2C andere Beschichtung verwendet (Fibronektin versus Kollagen) und in Protokoll 2B auch ein anderes Medium (endotheliales Wachstumsmedium [EWM] versus 2MV+SingleQuots). Eine Kultivierung der Zellen nach Protokoll 2B und 2C wurde durchgeführt, um den Einfluss von Plattenbeschichtung und Kultivierungsmedium auf das Entstehen von EPC zu beurteilen.

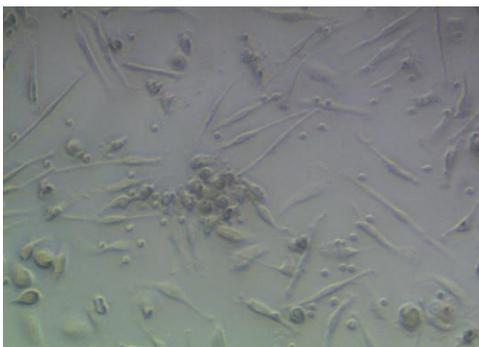
4.3.1 Mikroskopie

In den 6 Well-Platten mit dem EWM entstanden an Tag 5 mehrere schon zuvor (bei Kultivieren der nicht direkt adherenten Zellen) erwähnte *colony forming units* (CFUs) (Abb. 13). Danach (zwischen Tag 7-10) lösten sich die Kolonien ab und es verblieben die spindelförmigen Zellen mit sehr geringem Wachstumspotenzial.

In den 6 Well-Platten mit EBM-2MV+SingleQuots entstanden keine CFUs und später keine auch keine endotheliumähnlichen Zellen.



a



b

Abb. 13 a und b: Kolonien aus CFU-EC an Tag 5 in Platten mit EWM (a) und die Kolonienreste an Tag 7-10 (b).

Es wurden Kolonien mit einem dichten Zentrum aus runden Zellen und vom Zentrum ausgehenden spindelförmigen Zellen (CFU-EC) beobachtet (100x-fache Vergrößerung). Die Kolonien aus CFU-EC lösten sich zwischen Tag 7 - 10 ab und es verblieben spindelförmige Zellen mit geringem Wachstumspotenzial (b).

In den 6 Well Platten mit den EBM-2MV+SingleQuotes entstanden keine spindelförmige Zellen und später auch keine endotheliumähnlichen Zellen.

4.3.2 Durchflusszytometrie

Die in den Platten mit dem EWM entstandenen Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie an Tag 6, 14, 20 und 31 analysiert. Die Zellen wiesen die leukozytären Marker CD45 und CD14 auf und exprimierten kein vWF-Antigen, CD31 war an Tag 6 und 14 schwach positiv und danach an Tag 20 und 31 negativ. Die

Zellen aus Platten mit dem EBM-2MV+SingleQuotes konnten wegen einer zu geringen Zellzahl nicht analysiert werden.

Die Ergebnisse der Kultivierung von „direkt adhärenen Zellen“ sind in Tabelle 11 zusammen gefasst. Es gibt Hinweise dafür, dass die Beschichtung und das Kulturmedium für die Bildung und das weitere Wachstum von EPC eine entscheidende Rolle spielen.

Medium	Protokoll 2A (nach Lin et al. [34]) EBM- 2MV+SingleQuotes (Cambrex)	Protokoll 2B EWM	Protokoll 2C EBM- 2MV+SingleQuotes (Cambrex)
Beschichtung der Platten	Kollagen Typ 1	Fibronektin	Fibronektin
Morphologie	EPC ab Tag 14-25 konfluentes Wachstum	Tag 5-CFU-EC ab Tag 7-10 - spindelförmige Zellen	keine CFU-EC, keine Endothelium ähnliche Zellen
Wachstumspotenzial	gut	schlecht	schlecht
CD 14	-	+++	konnte wegen geringer Zellzahl nicht durchgeführt werden.
CD 31	++	(+)	
CD 45	-	+++	
vWF	+	-	

Tabelle 11: Ergebnisse der Kultivierung von direkt adherenten Zellen.

Kultivierung von direkt adhärenen Zellen nach Protokoll 2A führte zur Ausbildung gut wachsender Zellenpopulation aus EPC, die endothelialen Marker wie CD31 und Von-Willebrand-Faktor-Antigen aufwiesen und für leukozytäre Marker wie CD14 und CD45 negativ waren. Im Gegensatz zu Protokoll 3 zeigte die Kultivierung von direkt adhärenen Zellen nach Protokoll 2B die Bildung von CFU-EC, die für typische leukozytäre Marker wie CD14 und CD45 positiv waren, sowie schwach positiv für CD31 und negativ für Von-Willebrand-Faktor-Antigen waren. Bei Kultivierung nach Protokoll 2C entstanden weder EPC noch CFU-EC.

5 Diskussion

Funktionsstörungen des Endothels spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen. Die Bedeutung dieser Funktionsstörungen des Endothels wurde in letzten Jahren intensiv erforscht. Neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der postnatalen Vaskulogenese könnten richtungsweisend sein für die Entwicklung von neuen Behandlungsmethoden ischämischer Erkrankungen sein.

Bis in die 90-er Jahre wurde postuliert, dass postnatal nur ein als Angiogenese bezeichneter Prozess zur Neovaskularisation beiträgt. Angiogenese beinhaltet die Bildung neuer Blutgefäße durch Sprossung reifer endothelialer Zellen aus einem präformierten Kapillarsystem. 1997 konnte jedoch gezeigt werden, dass ein als Vaskulogenese bezeichneter Prozess zur Neovaskularisation beiträgt (9). Unter Vaskulogenese wird dabei die Gefäßneubildung durch endotheliale Vorläuferzellen verstanden. Diese endothelialen Vorläuferzellen stammen aus dem Knochenmark und zirkulieren im peripheren Blut (3, 4, 10-16). Aufgrund der geringen Zahl und der besonderen Ansprüche an die *in vitro* Kulturbedingungen, ist es nicht einfach, diese Zellen zu isolieren und zu kultivieren. Die bis heute veröffentlichten Methoden unterscheiden sich durch die Herkunft der mononukleären Zellen (z.B. peripheres Blut, Knochenmark oder Nabelschnurblut), die eingesetzten Zellselektions- und Anreicherungsverfahren (z.B. Isolierung CD34⁺- oder CD133⁺-Zellen), die für die Kultivierung eingesetzten Medien, unterschiedliche Wachstumsfaktor-Cocktails, die für die Adhäsion der Zellen verwendeten Extrazellulärmatrix-Proteine (z. B. Fibronectin und Kollagen) sowie durch die Auswahl der propagierten Zellen (z. B. Zellen, die initial an die Extrazellulärmatrix-Proteine adhären, versus Zellen, die initial nicht adhären sind).

In der vorgelegten Arbeit wurden zwei publizierte Methoden eingesetzt:

- (1) die Kultivierung „nicht-direkt adhärenter“ Zellen und
- (2) die Kultivierung „direkt adhärenter“ Zellen.

Dabei basiert die erste Methode auf einer Arbeit von Hill JM et al. („*Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk*“), publiziert im New England Journal of Medicine (2003; 348: 593-600). Die zweite Methode basiert auf einer Arbeit von Lin et al. („*Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood*“) publiziert im *Journal of Clinical Investigation* (2000; 105: 71-

77). Die durch beiden Methoden isolierten und kultivierten Zellen wurden expandiert, charakterisiert und für die weiteren genetischen Modifikationen verwendet.

Zur Kultivierung „nicht direkt adhärenter“ Zellen (Hill JM et al., [1]) wurden mononukleäre Zellen aus peripherem Blut isoliert. Diese Zellen wurden vergleichend mit verschiedenen Medien kultiviert (EndoCult, EWM, EBM-2MV). Es konnte gezeigt werden, dass nach einem Präplattierungsschritt in Fibronectin-beschichteten Platten Zellkolonien entstanden, die im Koloniezentrum runde Zellen enthielten und in der Peripherie aus spindelförmigen Zellen bestanden. Diese Zellen wurden als *colony forming units-endothelial cells* (CFU-EC) bezeichnet. Bei der Kultivierung in den Medien EndoCult und EWM war die Morphologie der Kolonien sowie die Anzahl der entstandenen Kolonien in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Hill et al. (1). Nach Kultivierung im EBM-2MV+SingleQuots-Medium entstanden jedoch keine Kolonien. Wie in den Tabellen 1 und 2 (s. Teil Material und Methoden, Kapitel 3) dargestellt, war in diesem Medium der Gehalt an Wachstumsfaktoren wie VEGF, bFGF und sowie der Gehalt an FCS deutlich niedriger als in EWM. Es ist anzunehmen, dass ein zu niedriger Gehalt an Wachstumsfaktoren und FCS das Entstehen von CFU-EC verhindert. Die durchflusszytometrische Untersuchung der CFU-EC nach Kultivierung in EndoCult und EWM bezüglich endothelialer Marker wie CD31, CD105 (Endoglin) und vWF zeigten eine fehlende Anfärbbarkeit. Andererseits konnten leukozytäre Marker wie CD14 und CD45 nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen berichteten Hill et al. (1), dass CFU-EC die Antigene CD31, TIE-2 und den VEGF-2 Rezeptor exprimierten. Leukozytäre Marker wurden von den Autoren nicht untersucht. Ergebnisse anderer publizierten Arbeiten (7) bestätigen jedoch die positive Anfärbbarkeit der CFU-EC-Zellen mit farbstoffmarkierten CD45-Antikörpern. In diesem Zusammenhang ist es interessant zu erwähnen, dass unter spezifischen Bedingungen kultivierte Monozyten endothelzelltypische Proteine wie z. B. CD105, CD144, VEGFR-2 und vWF exprimieren können (28-33, 52). Das Wachstumspotenzial der CFU-EC war in der vorliegenden Untersuchung nur sehr gering. Auch dieses Ergebnis steht in Einklang mit Untersuchungen anderer Autoren (17, 53-55), in denen die CFU-EC nicht zu einer konfluenten Zellschicht proliferierten und nach Umplattierung nicht weiter propagiert werden konnten (33). Untersuchungen anderer Autoren haben bestätigt, dass CFU-EC von hämatopoetischen Vorläuferzellen stammen (8). Obwohl CFU-EC an der Regulation und Stimulation der Angiogenese beteiligt sind, sind sie nicht in der Lage, zu endothelialen Zellen *in vivo* zu differenzieren (8, 56, 28).

Die zweite Kultivierungsmethode basierte auf einer Arbeit von Lin et al. („*Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood.*“; J Clin Invest. 2000; 105: 71-77). In der vorliegenden Arbeit wurde für die Isolierung mononukleärer Zellen peripheres Blut verwendet. Lin et al. (2) verwendeten sowohl peripheres Blut als auch Knochenmark. Zum einen erfolgte in der vorliegenden Studie die Kultivierung entsprechend den Methoden, wie sie von Lin et al. (2) beschrieben wurden (Kultivierung von „direkt adhären“ Zellen in mit Kollagen Typ 1 beschichteten Platten und Verwendung als Wachstumsmedium EBM-2MV+SingleQuots), zum anderen wurde eine andere Beschichtung (Fibronektin statt Kollagen Typ 1) und/oder ein anderes Medium (EWM statt EBM-2MV+SingleQuots) verwendet.

In Zellkulturen, die nach Protokoll 2A (Kultivierung von „direkt adhären“ Zellen in mit Kollagen Typ 1 beschichteten Platten und Verwendung als Wachstumsmedium EBM-2MV+SingleQuots) propagiert wurden, entstanden zwischen Tag 9 und 30 (Tag 20 ± 5) endothelzellähnliche Zellen, die bis zur Konfluenz proliferierten. Diese Ergebnisse korrespondieren mit den Ergebnissen von Lin et al. (2), in denen die Bildung gut proliferierender Zellen zwischen Tag 14 und 21 beschrieben wurde. Lin et al. (2) bezeichneten diese Zellen als „EOC“ (*endothelial outgrowth cells*). Aufgrund des guten Wachstumspotenzials wurde in der vorliegenden Studie für diese Zellen die Bezeichnung „EPC“ (*endothelial progenitor cells*) gewählt, welche andere Autoren (5,8) auch verwendet haben. Hur et al. (5) (Kultivierungsprotokoll: Gelatine für die Beschichtung statt Kollagen und Mediumwechsel alle drei Tage statt täglicher Mediumwechsel) konnten zeigen, dass in den Kulturgefäßen zunächst CFU-EC-ähnliche Strukturen entstanden und nach dem Verschwinden der CFU-EC EPC nachgewiesen wurden (als „late EPC“ bezeichnet). In unseren Experimenten konnte in keinem Fall die Entstehung typischer CFU-EC beobachtet werden. In den Gefäßen, in denen EPC entstanden, waren zu keinem Zeitpunkt CFU-EC nachweisbar und umgekehrt waren in den Gefäßen, in denen CFU-EC entstanden, bei weiterer Kultivierung keine gut proliferierenden endothelzellähnlichen Zellen nachweisbar. Auch Modifikationen in den Kultivierungsbedingungen, wie die Beschichtung der Gefäße mit Fibronektin, statt Kollagen oder die Erhöhung der Konzentration an FCS, VEGF-2 und bFGF im Zellkulturmedium (Einsatz von Wachstumsmedium EWM statt EBM-2MV+SingleQuots) führten nicht dazu, dass in den Kulturgefäßen EPC entstanden; im Gegensatz zu parallelen Experimenten, in

denen kollagenbeschichtete Kulturgefäße und EBM-2MV+SingleQuots-Medium eingesetzt wurden.

Die entstandenen EPC exprimierten CD31, CD105 (Endoglin), CD146 (P1H12), CD141 (Thrombomodulin), CD34, vWF und VE-Cadherin. CD45 und CD14 waren auf den Zellen nicht nachweisbar. Lin et al. (2) berichteten über die Expression derselben Antigene auf den Zellen. Außerdem konnte diese Arbeitsgruppe die Expression des VEGF2-Rezeptors, des humanen FVIII und CD36 nachweisen. Darüber hinaus nahmen die Zellen ac-LDL auf.

Für die Erfassung der quantitativen RNA-Expression bestimmter Gene in EPC im Vergleich zur ursprünglichen Population der MNC wurde eine *Microarray*-Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten für EPC im Vergleich zur Ausgangspopulation (MNC) eine höhere Expression endothelzellspezifischer Gene wie PAI-1, tPA, uPA, vWF-Antigen, Endoglin, MCAM, Endothelin-1 (ET-1), Ephrin und TIE-1. Gleichzeitig konnte eine reduzierte Expression leukozytenspezifischer Gene wie CD7, CD33 und CD37 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass EPC, die unter Kulturbedingungen typische endothelzell-spezifische Marker exprimieren (52), nicht zu der monozytäre Zellreihe gehören. Außerdem zeigten EPC ein Wachstumspotential von bis zu 20 Populationsverdopplungen während kontinuierlicher Zellpassage. Die Proliferationsrate zeigte in den vorliegenden Experimenten eine ca. $1,2 \times 10^6$ -fache Expansion in 30 Tagen. Damit war sie geringer als von Lin et al. (2) beschrieben (10^{19} -fache Expansion in 60 Tagen). Eine Ursache hierfür könnte das unterschiedliche Ursprungsmaterial der isolierten Population sein. Beispielweise haben Lin et al. (2) in ihren Experimenten überwiegend MNC aus KM verwendet, welche möglicherweise ein höheres Proliferationspotential aufweisen als MNC aus peripherem Blut.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass Kolonien, die nach fünf-tägiger Kultivierung „nicht direkt adhärenter“ MNC entstanden, aus Zellen der monozytären Reihe mit sehr geringem Wachstumspotenzial zusammengesetzt sind. Im Gegensatz hierzu entstanden nach Kultivierung „direkt adhärenter“ MNC nach einer Verzögerungsphase (*lag*-phase) endothelähnliche Zellen mit typischen endothelialen Antigenen sowie einem exzellenten Wachstumspotenzial. Auch wenn CFU-EC und EPC sich ganz wesentlich durch ihre Morphologie, die exprimierten Antigene und die Wachstumskinetik unterscheiden, tragen beide Zellpopulationen zu Neovaskularisation bei. So konnte für beide Zelltypen gezeigt werden, dass sie in der

Lage waren, *in vitro* gefäßartige Strukturen in Matrigel zu bilden. EPC wiesen jedoch im Vergleich zu CFU-EC ein höheres Potenzial auf (3). Es wurde von anderen Autoren beschrieben, dass sich CFU-EC nur in Gegenwart von humanen umbilikalen venösen endothelialen Zellen (HUVEC) in die von ihnen präformierten gefäßartigen Strukturen in Matrigel integrieren, aber nicht in der Lage sind, bei der Aussaat in Abwesenheit von HUVEC solche Strukturen in Matrigel zu bilden. EPC konnten sich sowohl in die von HUVEC präformierten gefäßartige Strukturen integrieren als auch selbst solche bilden (5, 8). Es wird vermutet, dass CFU-EC durch die Sekretion angiogener Faktoren aktiv zur Neovaskularisation beitragen (4). *In vivo* wurde demonstriert, dass CFU-EC und EPC vergleichbar zu Gefäßneubildung beitragen (5).

Durch das höhere Wachstumspotenzial stellen EPC eine möglicherweise geeignete Zellpopulation für das autologe „*tissue engineering*“ und Ansätze der regenerativen Medizin dar. Da die Endothelzellen in multiple physiologische Prozesse wie Stoffwechsel, Hämostase, Angio- und Vaskulogenese eingebunden sind, können EPC auch potenziell zur Generierung einer antithrombotischen Neointima oder zur Angiogenese in Gefäßprothesen beitragen. Eine potenzielle Applikation von EPC in gentherapeutischen Ansätzen ist ebenfalls beschrieben worden (58-68). Potenzielle klinische Indikationen für die antithrombotische Gentherapie unter Einsatz genetisch modifizierter EPC sind die koronare arterielle *Bypass*-Operation, die perkutane transluminale koronare Angioplastie, die periphere arterielle Angioplastie, das intravaskuläre Stenting und vaskuläre Prothesen (58-68). Eine lokal gesteigerte Expression antithrombotischer Gene z. B. des Thrombomodulin-Gens oder des TFPI-Gens in den Zielzellen vermeidet idealerweise die Thrombogenese oder führt nach Entstehung von thromboembolischen Komplikationen zur Lyse, ohne eine systemische antithrombotische Therapie mit ihren potentiellen Blutungskomplikationen einsetzen zu müssen (69-72).

In der vorliegenden Arbeit konnten EPC in der Phase des exponentiellen Wachstums mit murinen retroviralen und humanen retroviralen Vektoren hocheffizient transduziert werden. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Ergebnissen einer Arbeit von Herder et al. (71), in denen EPC erfolgreich mit lentiviralen Vektoren, die das (humane) FVIII-Gen enthielten, transduziert werden konnten. Die Arbeit von Herder et al. (71) unterscheidet sich von der vorliegenden Arbeit durch die Kultivierungsbedingungen der EPC:

- (1) MNC wurden aus Nabelschnurblut gewonnen

- (2) isolierte MNC wurden zuerst mit CD34-Antikörper angereichert
- (3) die Zellen wurden in einem ersten Schritt mit einem anderen Medium kultiviert als im darauf folgenden (nach Erreichen der Konfluenz wurde dasselbe Medium verwendet wie in der vorliegenden Arbeit)

Für die Transduktion wurden die nach 2 - 3 Wochen entstandenen, gut proliferierenden Zellen eingesetzt. Die Autoren fanden bei durchflusszytometrischen Untersuchungen ähnliche Antigene wie in der vorliegenden Studie (CD31, CD34, CD146 und VE-Cadherin). Auch in ihrer Arbeit waren die Zellen CD14- und CD45-negativ. Zusätzlich bestimmten Herder et al. (71) andere Marker: Die Zellen waren Ac-LDL- positiv, jedoch VEGF2-Rezeptor- und *human leukocyte antigen*-DR (HLA-DR)-negativ. Für den Gentransfer verwendeten Herder et al. (69) zwei HIV-1-abgeleitete lentivirale Vektoren (eGFP enthaltenden Vektoren pHR`SIN.cPPT-SEW und cPPT-C(FVIIIΔB)IGWS). Die Transduktionseffizienz war bei diesen Autoren 90,4 % ± 9,5 % und 90,6 % ± 9,7 % (MOI 10) und damit vergleichbar mit unseren Ergebnissen (79,1% ± 14,0% (MOI 20)). Eine so hohe Transduktionseffizienz macht eine anschließende Selektion der Zellen nicht mehr notwendig.

Da der Einsatz genetisch modifizierter endothelialer Zellen immer häufiger im Kontext therapeutischer Ansätzen zur Neovaskularisation bei kardiovaskulären Erkrankungen diskutiert wird, sind EPC attraktive Zellen für die Zelltherapie. Eine genetische Modifikation der Zellen zur gezielten Verstärkung spezifischer Eigenschaften, wie zum Beispiel die Erhöhung des antithrombotischen Potenzials durch Thrombomodulin oder TFPI, ist darüber hinaus ein weiterer Ansatz zur Verbesserung des therapeutischen Erfolgs.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen im Einklang mit den Ergebnissen anderer Autoren (7) und zeigen, dass aus peripherem Blut isolierte MNC bei Kultivierung unter endothelialer Bedingungen zwei Arten von Zellen bilden können. Zum einen CFU-EC, die bei Kultivierung von „nicht direkt adhären“ Zellen in den ersten Tagen nach Plattierung entstehen. Sie haben ein geringes Wachstumspotenzial und exprimieren monozytäre-leukozytäre Merkmale. Zum anderen EPC, die aus „direkt adhären“ Zellen nach 2 - 4 Wochen entstehen. Sie weisen ein gutes Proliferationspotenzial auf, exprimieren endotheliale Marker, jedoch keine leukozytären Antigene. Aufgrund des guten proliferativen Potenzials sind EPC gut für die Transduktion geeignet. Dies konnte durch die hoch effiziente retrovirale Transduktion bestätigt werden.

6 Schlussfolgerungen

In der Literatur sind unterschiedliche Verfahren für die Isolierung und Kultivierung endothelialer Progenitorzellen (EPC) beschrieben. Die Methoden unterscheiden sich durch die Herkunft der mononukleären Zellen, durch mögliche Zellselektions- und anreicherungsverfahren, durch die für die Kultivierung eingesetzten Kulturmedien, die Wachstumsfaktor-Cocktails, durch die für die Adhäsion der Zellen verwendeten Extrazellulärmatrix-Proteine sowie durch die Auswahl der im Weiteren verwendeten Zellen.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren:

- Vergleich zwei etablierter Methoden für die Isolierung, Kultivierung und Expansion endothelialer Progenitorzellen aus peripherem Blut;
- die phänotypische Charakterisierung der Zellen;
- die Beschreibung der Wachstumskinetik durch Proliferations-Assays;
- die Etablierung der retroviralen Transduktion der generierten Zellpopulation mit murinen retroviralen und neuartigen lentiviralen Vektoren und der Vergleich der Transduktionseffizienz.

Die Ergebnisse unserer Arbeit sprechen dafür, dass Kolonien, die nach fünf-tägiger Kultivierung „nicht direkt adhärenter“ MNC entstanden, aus Zellen der monozytären Reihe mit sehr geringem Wachstumspotenzial zusammengesetzt sind. Im Gegensatz hierzu entstanden nach Kultivierung „direkt adhärenter“ MNC nach einer Latenzphase (*lag phase*) endothelähnliche Zellen mit typischen endothelialen Antigenen sowie einem exzellenten Wachstumspotenzial. Auch wenn CFU-EC und EPC sich ganz wesentlich durch ihre Morphologie, die exprimierten Antigene und die Wachstumskinetik unterscheiden, tragen beide Zellpopulationen zur Neovaskularisation bei (3-5, 8).

Durch das höhere Wachstumspotenzial stellen EPC eine möglicherweise geeignete Zellpopulation für das autologe „*tissue engineering*“ und Ansätze der regenerativen Medizin dar. In der vorliegenden Arbeit konnten EPC in der Phase des exponentiellen Wachstums mit murinen und humanen retroviralen Vektoren hocheffizient transduziert werden. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Ergebnissen einer Arbeit von Herder et al. (71), in denen EPC erfolgreich mit lentiviralen Vektoren, die das (humane) FVIII-Gen enthielten, transduziert werden konnten. Da der Einsatz genetisch modifizierter endothelialer Zellen immer häufiger im Kontext therapeutischer Ansätzen zur Neovaskularisation bei kardiovaskulären

Erkrankungen diskutiert wird, sind EPC attraktive Zellen für die Zelltherapie. Eine genetische Modifikation der Zellen zur gezielten Verstärkung spezifischer Eigenschaften, wie zum Beispiel die Erhöhung des antithrombotischen Potenzials durch Thrombomodulin oder TFPI ist darüber hinaus ein weiterer Ansatz zur Verbesserung des therapeutischen Erfolgs.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Ergebnissen anderer Autoren (7) und zeigen, dass aus peripherem Blut isolierte MNC unter endothelialen Kulturbedingungen zwei Arten von Zellen bilden können. Zum einen CFU-EC, welche bei Kultivierung von „nicht direkt adhären“ Zellen in den ersten Tagen nach der Plattierung entstehen. Diese haben ein geringes Wachstumspotenzial und exprimieren monozytäre-leukozytäre Antigene. Zum anderen EPC, die aus „direkt adhären“ Zellen nach 2 - 4 Wochen entstehen. Diese weisen ein gutes Proliferationspotenzial und endotheliale Antigene auf, exprimieren jedoch keine leukozytären Antigene. Aufgrund des guten proliferativen Potenzials sind EPC gut für die Transduktion geeignet. Dies konnte durch die hoch effiziente retrovirale Transduktion bestätigt werden.

7 Literaturverzeichnis

1 Hill JM, Zalos G, Halcox JP et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003;348:593-600.

2 Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest.* 2000;105:71-77.

3 Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE et al. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res.* 2003;93:1023-1025.

4 Fernandez Pujol B, Lucibello FC, Gehling UM et al. Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation.* 2000;65:287-300.

5 Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH et al., Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contribution to neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Feb;24(2):288-93.

6 Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Ingram DA et al.. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood.* 2007 Mar 1;109(5):1801-9.

7 Ingram D., Caplice N., Yoder M. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* 2005;106(5):1521-31.

8 DFP-Allgemeinmedizin: Blutgerinnung. Paul Knöbl; *Ärztemagazin* Ausgabe 41/2006.

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

- 10 Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2003;108:2511-2516.
- 11 Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*. 2003;107:1164-1169.
- 12 Khakoo AY, Finkel T. Endothelial progenitor cells. *Annu Rev Med*. 2005;56:79-101.
- 13 Schatteman GC. Adult bone marrow-derived hemangioblasts, endothelial cell progenitors and EPCs. *Curr Top Dev Biol*. 2004;64:141-180.
- 14 Iwami Y, Masuda H, Asahara T. Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future. *J Cell Mol Med*. 2004;8: 488-497.
- 15 Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med*. 2004;8:498-508.
- 16 Murasawa S, Asahara T. Endothelial progenitor cells for vasculogenesis. *Physiology (Bethesda)*. 2005; 20:36-42.
- 17 Gill M, Dias S, Hattori M.L, Hicklin Det al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)/CD133(+)/endothelial precursor cells. *Circ. Res.*, 88:167-174,2001.
- 18 Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization.. *Circ Res*. 1999 Aug 6;85(3):221-8.
- 19 Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells, *EMBO J.*, 18:3964-3972, 1999

20 Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda et al. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration.

Circulation, 105:732-738,2002

21 Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97:3422-3427.

22 Schatteman GC, Hanlon HD, Jiao C, Dodds SG, Christy BA., Blood-derived angioblast accelerated flow restoration in diabetics mice, J. Clin Invest.,106:571-578, 2000

23 Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M. et al. Ischemia and cytokine-induced mobilization of bone marrow derived endothelial progenitor cells for neovascularisation, Nat. Med., 5:434-438, 1999.

24 Edelberg JM, Tang L, Hattori K, et al., Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore engine-impaired cardiac angiogenic function, Circ Res., 90:E89-E93, 2002.

25 Shinati S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T et. al., Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. Circulation, 103: 2776-2779, 2001.

26 Schatteman GC, Awad O. Hemangioblasts, angioblasts, and adult endothelial cell progenitors. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 2004; 276:13-21.

27 Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. Circ Res. 2001;89:E1-7.

28 Critser PJ, Yoder MC. Endothelial colony-forming cell role in neoangiogenesis and tissue repair. Curr Opin Organ Transplant. 2010 Feb;15(1):68-72.

- 29 Schmeisser A, Garlich CD, Zhang H et al. Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res.* 2001;49:671-680.
- 30 Fernandez Pujol B, Lucibello FC, Zuzarte M, Lutjens P, Muller R, Havemann K. Dendritic cells derived from peripheral monocytes express endothelial markers and in the presence of angiogenic growth factors differentiate into endothelial-like cells. *Eur J Cell Biol.* 2001;80:99-110.
- 31 Harraz M, Jiao C, Hanlon HD, Hartley RS, Schatteman GC. CD34- blood-derived human endothelial cell progenitors. *Stem Cells.* 2001;19:304-312.
- 32 Schmeisser A, Strasser RH. Phenotypic overlap between hematopoietic cells with suggested angioblastic potential and vascular endothelial cells. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002;11:69-79.
- 33 Hausser G, Ludewig B, Gelderblom HR, Tsunetsugu-Yokota Y, Akagawa K, Meyerhans A. Monocyte-derived dendritic cells represent a transient stage of differentiation in the myeloid lineage. *Immunobiology.* 1997;197: 534-542.
- 34 Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol.* 2004;76:509-513.
- 35 Li Z, Dullmann J, Schiedlmeier B et al. Murine leukaemia induced by retroviral gene marking. *Science.* 2002; 296:497.
- 36 Boyer M, Townsend LE, Vogel LM, et al. Isolation of endothelial cells and their progenitor cells from human peripheral blood. *J Vasc Surg.* 2000;31:181-189.
- 37 Yoo ES, Lee KE, Seo JW, et al. Adherent cells generated during long-term culture of human umbilical cord blood CD34+ cells have characteristics of endothelial cells and beneficial effect on cord blood ex vivo expansion. *Stem Cells.* 2003;21:228-235.

- 38 Eggermann J, Kliche S, Jarmy G, et al. Endothelial progenitor cell culture and differentiation in-vitro: a methodological comparison using human umbilical cord blood. *Cardiovasc Res.*2003;58:478-486.
- 39 Bompais H, Chagraoui J, Canron X, et al. Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood.* 2004;103:2577-2584.
- 40 Murga M, Yao L, Tosato G. Derivation of endothelial cells from CD34- umbilical cord blood. *Stem Cells.* 2004;22:385-395.
- 41 Hildbrand P, Cirulli V, Prinsen RC, et al. The role of angiopoietins in the development of endothelial cells from cord blood CD34+ progenitors. *Blood.* 2004;104:2010-2019.
- 42 Bhattacharya V.,McSweeney PA.,Shi Q.,Bruno B.,Ishida A et.al., Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD 34(+) bone marrow cells, *Blood*, 95:581-585;2000
- 43 Kaushal S., Amiel GE., Guleserian K.J.,Shapira O.M.,Perry T., et. al.,Functional small-diameter neovessel created using endothelial progenitor cells expanded in vitro, *Nat Med.* 2001 Sep;7(9):1035-40.
- 44 Joachim R. Göthert, Sonja E. Gustin, J. Anke M. van Eekelen et al. Genetically tagging endothelial cells in vivo: bone marrow-derived cells do not contribute to tumor endothelium. *Blood.* 2004;104: 1769-1777.
- 45 Voswinckel R, Ziegelhoeffer T, Heil M, Kostin S, Breier G, Mehling T, Haberberger R, Clauss M, Gaumann A, Schaper W, Seeger W. Circulating vascular progenitor cells do not contribute to compensatory lung growth. *Circ Res.* 2003 Aug 22; 93 (4):372-9.
- 46 Bruhn HD. Hämostaseologie für die Praxis: Sicher durch den klinischen Alltag; mit 107 Tabellen. Schattauer Verlag, 2011:1-3.

- 47 Schambach, A, Galla, M, Modlich, U, Will, E, Chandra, S, Reeves, L et al. (2006). Lentiviral vectors pseudotyped with murine ecotropic envelope: increased biosafety and convenience in preclinical research. *Exp Hematol* 34: 588–592.
- 48 Miller AD, Garcia JV, von Suhr N et al. Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J Virol.* 1991;65: 2220-2224.
- 49 Wahlers A, Schwieger M, Li Z et al. Influence of multiplicity of infection and protein stability on retroviral vector-mediated gene expression in hematopoietic cells. *Gene Ther.* 2001; 8:477-486.
- 50 Weber K, Bartsch U, Stocking C, Fehse B (2008) A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol Ther.* 2008 Apr;16(4):698-706. Epub 2008 Feb 12.
- 51 Mülhardt C.: *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics.* Siebte Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2013: 240-247.
- 52 Rohde E, Malischnik C, Thaler D, et al. Blood monocytes mimic endothelial progenitor cells. *Stem Cells.* 2006;24:357-367.
- 53 Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000;95 :952-958.
- 54 Rumpold H, Wolf D, Koeck R, Gunsilius E. Endothelial progenitor cells: a source for therapeutic vasculogenesis? *J Cell Mol Med.* 2004;8:509-518.
- 55 Ito H, Rovira, II, Bloom ML, et al. Endothelial progenitor cells as putative targets for angiostatin. *Cancer Res.* 1999; 59:5875-5877.
- 56 Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Ingram DA et al.. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood.* 2007 Mar 1;109(5):1801-9.

57 Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Sep; 28(9):1584-95.

58 Buchschacher GL, Jr., Wong-Staal F. Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood.* 2000;95 :2499-2504.

59 Numaguchi Y, Naruse K, Harada M et al. Prostacyclin synthase gene transfer accelerates reendothelialization and inhibits neointimal formation in rat carotid arteries after balloon injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19 :727-733.

60 Janssens S, Flaherty D, Nong Z et al. Human endothelial nitric oxide synthase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after balloon injury in rats. *Circulation.* 1998;97:1274-1281.

61 Dichek DA, Anderson J, Kelly AB, Hanson SR, Harker LA. Enhanced in vivo antithrombotic effects of endothelial cells expressing recombinant plasminogen activators transduced with retroviral vectors. *Circulation.* 1996; 93:301-309.

62 Nabel EG, Plautz G, Boyce FM, Stanley JC, Nabel GJ. Recombinant gene expression in vivo within endothelial cells of arterial wall. *Science.* 1989; 244: 1342-1344.

63 Conte MS, Birinyi LK, Miyata T et al. Efficient repopulation of denuded rabbit arteries with autologous genetically modified endothelial cells. *Circulation.* 1994;89 :2161-2169.

64 Tabuchi N, Shichiri M, Shibamiya et al. Non-viral in vivo thrombomodulin gene transfer prevents early loss of thromboresistance of grafted veins. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004;26:995-1001.

65 Rade JJ, Schulick AH, Virmani R, Dichek DA. Local adenoviral-mediated expression of recombinant hirudin reduces neointima formation after arterial injury. *Nat Med.* 1996;2 :293-298.

66 Riesbeck K, Dorling A, Kemball-Cook G et al. Human tissue factor pathway inhibitor fused to CD4 binds both Fxa and TF7FVIIa at the cell surface. *Thromb Haemost.* 1997; 78:1488-1494.

67 Podrazik RM, Whitehill TA, Ekhterae D et al. High-level expression of recombinant human tPA in cultivated canine endothelial cells under varying conditions of retroviral gene transfer. *Ann Surg.* 1992;216: 446-452.

68 Dichek DA, Nussbaum O, Gegen SJ, Anderson WF. Enhancement of the fibrinolytic activity of sheep endothelial cells by retroviral vector-mediated gene transfer. *Blood.* 1991; 77:533-541.

69 Dichek DA, Lee SW, Nguyen NH. Characterization of recombinant plasminogen activator production by primate endothelial cells transduced with retroviral vectors. *Blood.* 1994; 84:504-516.

70 Riesbeck K, Chen D, Kemball-Cook G et al. Expression of hirudin fusion proteins in mammalian cells: a strategy for prevention of intravascular thrombosis. *Circulation.* 1998;98: 2744-2752.

71 Herder C, Tonn T, Oostendorp R et al. Sustained expansion and transgene expression of coagulation factor VIII-transduced cord blood-derived endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 2266-2272.

72 Li Z, Dullmann J, Schiedlmeier B et al. Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science.* 2002; 296:497.

73 Modlich U, Kustikova OS, Schmidt M et al. Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis. *Blood.* 2005;105:4235-4246.

Danksagung.

Meinem Doktorvater Herrn apl. Prof. Dr. med. habil. Marcus Stockschläder danke ich für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung.

Bei Herrn Prof. Dr. Rüdiger E. Scharf bedanke ich mich für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten in seiner Abteilung.

Außerdem gilt mein Dank den Mitgliedern des Forschungslabors im Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin für das sehr angenehme Arbeitsklima.

Des Weiteren sei Herrn Dr. Stoldt und Frau Maasen-Weingart sehr gedankt für die große Unterstützung und vertrauensvolle Zusammenarbeit.

Mein ganz großer Dank ist an meine Familie und besonders an meinem Mann Ilja Janzen gerichtet, die stets Anteilnahme während der Doktorarbeit hatten.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.