

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl**

**Korrektur der altersbedingten Reduktion von  
Zahl und Funktion endothelialer Progenitorzellen  
durch Wachstumshormonbehandlung: Rolle des  
Insulin-like growth factor-1**

**Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von  
Sarah Höber  
aus München**

**Würzburg, Februar 2008**

# Referentenblatt

Referent:

Prof. Dr. Johann Bauersachs

Koreferent:

Prof. Dr. R. Leyh

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:  
07.10.2008

Die Promovendin ist Ärztin

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Arteriosklerose .....	1
1.1.1 Pathogenese der Arteriosklerose .....	1
1.1.2 Klinische Syndrome .....	2
1.1.3 Risikofaktoren .....	3
1.1.4 Arteriosklerose und Altern .....	4
1.2 Endothel und endotheliale Progenitorzellen (EPC) .....	4
1.2.1 Identifizierung und Charakterisierung von EPC .....	5
1.2.2 Homing und Mobilisierung.....	6
1.2.3 Rolle der EPC im Alter und bei ischämischer Herzerkrankung .....	9
1.2.4 Therapeutische Aussichten.....	9
1.3 Insulin-like growth factor (IGF-1).....	10
1.3.1 Physiologie .....	11
1.3.2 Wirkung und Funktion von IGF-1 .....	12
1.3.3 IGF-1 und koronare Herzerkrankung.....	13
1.3.4 IGF-1 und kardiovaskuläre Risikofaktoren.....	13
1.4 IGF-1 und endotheliale NO-Synthase (eNOS).....	14
1.5 Fragen und Ziele dieser Doktorarbeit .....	17
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
2.1 Klinische Studie.....	18
2.2 Messung von IGF-1 in Plasmaproben .....	18
2.3 Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen und CD34 <sup>+</sup> , CD117 <sup>+</sup> und CD133 <sup>+</sup> Vorläuferzellen .....	19
2.4 Charakterisierung der Vorläuferzellen .....	19
2.4.1 Zellkultur-Assay für EPC .....	19
2.4.2 Bestimmung von CD133 <sup>+</sup> / VEGF-2 <sup>+</sup> -Zellen .....	20
2.4.3 Kolonieformende Einheiten (Colony forming units: CFU) .....	20
2.4.4 Inkorporation in gefäßähnliche Strukturen (Matrigel-Assay) .....	21
2.4.5 Zellmigrationsassay .....	21
2.4.6 IGF-1-Rezeptorexpression auf EPC.....	22
2.4.7 Western Blot-Analyse.....	22
2.4.8 eNOS-Aktivität .....	22

2.4.9	Telomeraseaktivität .....	23
2.4.10	Statistische Analysen .....	23
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>24</b>
3.1	Altersabhängige IGF-1-Spiegel, Anzahl und Funktion der EPC .....	24
3.2	Behandlung von Patienten mit rekombinanten humanem Wachstumshormon (rhGH) .....	24
3.3	EPC und IGF-1-Rezeptor .....	26
3.4	IGF-1 verbessert die Funktion kultivierter EPC .....	26
3.5	Erhöhte PI3Kinase-/Akt-vermittelte Expression und Phosphorylierung der eNOS in EPC durch IGF-1 .....	29
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>37</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Reparatur geschädigter Gefäße durch EPC.....	5
Abbildung 2: Mobilisierung, Rekrutierung und Differenzierung humaner, aus dem Knochenmark stammender, angiogenetischer Progenitorzellen .....	8
Abbildung 3: Das GH-IGF-1-System .....	11
Abbildung 4: Signalkaskade der NO-Synthese .....	15
Abbildung 5: Einflüsse auf das Akt / eNOS-System.....	16
Abbildung 6: Anzahl und Funktion der zirkulierenden EPC der jungen und älteren Studienteilnehmer vor und nach der Behandlung mit rekombinanten Wachstumshormon. ....	25
Abbildung 7: Expression des Insulin-like-growth-factor-1-Rezeptors auf humanen endothelialen Progenitorzellen .....	26
Abbildung 8: Effekte von IGF-1 und rhGH auf die Funktion endothelialer Progenitorzellen .....	28
Abbildung 9: Telomeraseaktivität in kultivierten EPC nach Behandlung mit IGF-1 oder rhGH.....	29
Abbildung 10: eNOS-Expression, -Phosphorylierung und -Funktion in humanen EPC .....	30

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 : Faktoren, welche die Anzahl und die Funktion humaner endothelialer Progenitorzellen beeinflussen .....	7
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---

## Abkürzungsverzeichnis

ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
CEC	zirkulierende Endothelzellen
EC	Endothelzellen
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPC	endotheliale Progenitorzellen
GH	Wachstumshormon
HDL	High-Density-Lipoprotein
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IGF-1R	Insulin-like growth factor-1-Rezeptor
IGFBP	Insulin-like growth factor-1-Bindungsprotein
IL-1	Interleukin-1
IRS	Insulinrezeptoren
KHK	Koronare Herzerkrankung
LDL	Low-Density-Lipoprotein
MAPK	Mitogen-activated-Proteinkinase
MI	Myokardinfarkt
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase-9
NO	Stickstoffmonoxid
oxLDL	Oxidiertes Low-Density-Lipoprotein
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
rhGH	rekombinantes Wachstumshormon
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SDF-1	stem cell-derived factor-1
SS	Somatostatin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

# 1 Einleitung

## 1.1 Arteriosklerose

### 1.1.1 Pathogenese der Arteriosklerose

Arteriosklerose ist eine systemische, degenerative Erkrankung der Blutgefäße, die sich über Jahre und Jahrzehnte entwickelt<sup>1</sup>. Es kommt zu Verhärtung, Verdickung, Elastizitätsverlust und Stenosierung der Arterien<sup>2</sup>.

In der westlichen Welt ist die Arteriosklerose maßgeblich für Mortalität und Morbidität der Einwohner verantwortlich<sup>3</sup>. Sie manifestiert sich individuell unterschiedlich. Bei manchen Menschen bleibt sie asymptomatisch, bei anderen wiederum offenbart sie sich akut, z.B. als Myokardinfarkt oder Apoplex, oder sie verläuft chronisch, wie z.B. bei der Claudicatio intermittens oder der stabilen Angina pectoris<sup>3,4</sup>. Prädilektionsstellen der Arteriosklerose sind vor allem arterielle Aufzweigungsstellen. Die Arteriosklerose beginnt zunächst mit der Bildung sogenannter Fettstreifen („fatty steaks“). Verantwortlich dafür ist ein fokaler Anstieg des Lipoproteingehaltes innerhalb eines bestimmten Gebietes der Intima. Neben der Anreicherung kommt es zusätzlich zu Verbindungen der Lipoproteine mit extrazellulären Proteoglykanen, was eine längere Verweildauer an der Gefäßwand zur Folge hat, und damit die Akkumulation weiter erhöht<sup>3,4</sup>. Eine wichtige Rolle spielen hierbei die oxidierten LDL-Partikel (oxLDL), weil sie die Endothelwand gut infiltrieren können und zu einer verstärkten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies führen<sup>5</sup>. Durch diese Prozesse wird die Leukozytenaktivierung in Gang gesetzt und damit eine Entzündung der Intimaschicht hervorgerufen. Es handelt sich vor allem um Mono- und Lymphozyten, die durch Rezeptoren an der Endotheloberfläche, aber auch von oxidativ veränderten Lipoproteinen rekrutiert werden. Normalerweise bewirken laminare Scherkräfte an der Endotheloberfläche eine Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO). Dadurch kommt es zu einem vasodilatativen und antiinflammatorischen Effekt. An Gefäßbifurkationen sind die laminaren Scherkräfte jedoch erniedrigt, was die Arterio-



skleroseentstehung an diesen Stellen fördert. Adhärente Lipoproteine führen zu einer Aktivierung von Zytokinen wie Interleukin-1 (IL-1) oder dem Tumornekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Dies stimuliert zusätzlich die Leukozytenaktivierung<sup>3</sup>. Die Leukozyten dringen in die Intima ein, breiten sich dort aus und differenzieren zu Makrophagen, die durch Endozytose Lipoproteinpartikel aufnehmen und sich dann in sogenannte Schaumzellen umwandeln<sup>3</sup>. Makrophagen versuchen nun, die Lipoproteine aus der Läsion abzutransportieren. Wenn jedoch die Lipidmenge die Anzahl der phagozytären Zellen überschreitet, bilden sich die Fettstreifen nicht wieder zurück, sondern fördern die Atherombildung. Dies geschieht durch die Einlagerung glatter Muskulatur und der von dieser gebildeten extrazellulären Matrix in die Intimaschicht. Zytokine und Wachstumsfaktoren, die durch die Läsion und die Leukozyten aktiviert werden, verstärken diese Bildung. Sogenannte Plaques können aufbrechen und ein akutes koronares Ereignis, wie einen Myokardinfarkt, auslösen<sup>3</sup>. Zusätzlich kann es durch die Endothelschädigung zur Ausbildung von Thromben, und damit zu einem Gefäßverschluß, kommen<sup>6,7</sup>.

### **1.1.2 Klinische Syndrome**

Da zunächst eine extraluminale Vergrößerung stattfindet, bleiben die meisten arteriosklerotischen Veränderungen asymptomatisch. Gefäße, deren Lumen durch das Plaquewachstum eingeschränkt werden, zeigen eine „kompensatorische Vergrößerung“<sup>8</sup>, d.h. sie erweitern ihren Durchmesser, um eine ausreichende Durchblutung zu gewährleisten. Da sich die Entwicklung einer symptomatischen Arteriosklerose über einen langen Zeitraum, z. T. mehrere Dekaden, hinzieht, kommt es oft erst im fortgeschrittenen Alter zu Beschwerden. Diese machen sich in chronischen, vor allem belastungsabhängigen Syndromen wie einer stabilen Angina pectoris oder einer Claudicatio intermittens bemerkbar. Etwa ein Drittel der arteriosklerotisch veränderten Herzkranzgefäße manifestiert sich im Rahmen eines Myokardinfarktes<sup>3</sup>. Durch die Ruptur einer Plaque werden thrombogene Substanzen aktiviert, so daß es zur Thrombenbildung kommt. Bei großen, okklusiven Thromben können klinisch relevante Krankheitsbilder wie eine instabile Angina pectoris oder ein Myokardinfarkt entstehen. Dies pas-

siert, wenn der an der Läsion entstandene Thrombus das Gefäßlumen verschließt, so daß es zu einer Minderperfusion des Herzmuskels kommt<sup>3</sup>. Interessanter Weise neigen nicht alle Atherome zur Ruptur. Vor allem solche, die nur eine dünne Fibrinhülle, große Lipidkerne, wenige Muskelzellen und viele Makrophagen enthalten, stellen eine Gefahr dar<sup>3,7</sup>.

### **1.1.3 Risikofaktoren**

Die Arteriosklerose wird durch vielfältige Faktoren gefördert. So zählen eine positive Familienanamnese, Hypertonus, Hyperlipidämie und Diabetes mellitus zu den Hauptrisikofaktoren<sup>9</sup>. Der in der industrialisierten Welt weit verbreitete Tabakkonsum spielt ebenfalls eine wichtige Rolle. Es wird vermutet, daß die Bestandteile der Zigaretten die Gerinnung erhöhen, die Läsionenbildung fördern und die Plaquestabilität mindern<sup>3</sup>. Männer sind gefährdeter als prämenopausale Frauen, die über einen höheren Spiegel des östrogengeförderten protektiven High-Density-Lipoprotein (HDL) verfügen<sup>10</sup>. Mit dem Eintritt in die Menopause gleicht sich das Risiko an<sup>3</sup>. Eine wichtige Rolle für die Prognose spielt in der Klinik das Low-Density-Lipoprotein (LDL) sowie das HDL<sup>11</sup>. LDL transportiert Cholesterin in der Peripherie. Die Zellen können das Cholesterin nach Bedarf über ihre LDL-Rezeptoren aufnehmen. Je mehr Lipide sich im Blutkreislauf befinden, umso eher können diese oxidiert werden, und durch das Endothel in die Intimaschicht dringen. Je größer die Menge an Lipiden, desto schlechter können diese von den Abwehrzellen abtransportiert werden<sup>3</sup>. Hyperlipidämie fördert außerdem die endogene Bildung von asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA), welches die endotheliale NO-Synthase (eNOS) inhibiert, und damit zur Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion beiträgt<sup>12,13,14</sup>. Auch das metabolische Syndrom und der Diabetes mellitus fördern die Atherogenese<sup>15</sup>. Diese Glukosestoffwechselstörungen verändern den Lipidstoffwechsel. Das LDL ist kleiner und dichter, was die Akkumulation und damit die Arterioskleroseentstehung beschleunigt<sup>15</sup>. Zusätzlich ist das schützende HDL erniedrigt. Durch die verlängerte Hyperglykämie tritt bei Diabetikern ferner eine nicht enzymatische Glykosilierung von Lipoproteinen im Endothel auf. Dies verstärkt die Arteriosklerosebildung<sup>3</sup>.

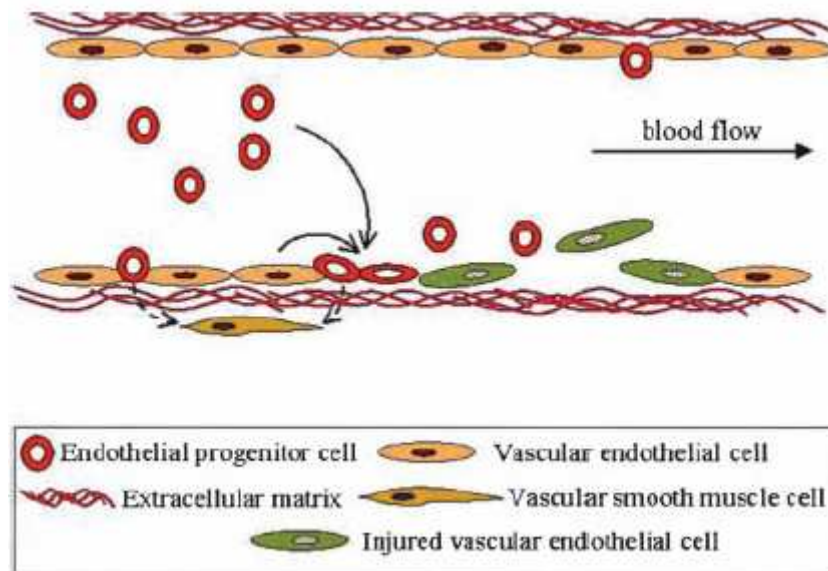
#### **1.1.4 Arteriosklerose und Altern**

Das Altern bewirkt komplexe und verschiedene Veränderungen der kardiovaskulären Struktur und Funktion. Das Herz hypertrophiert und reagiert weniger auf sympathische Stimuli<sup>16</sup>. Dies hat zur Folge, daß Herzfrequenz und myokardiale Kontraktilität abnehmen. Die Aorta sowie die großen Arterien werden steifer, die Pulswellengeschwindigkeit - ein Hinweis auf endotheliale Dysfunktion - erhöht sich<sup>16</sup>. Die gesteigerte Pulswellengeschwindigkeit sowie die verlängerte Ejektionsfraktion bewirken einen Blutdruckanstieg. Dies fördert wiederum die Entstehung und Progression von Arteriosklerose<sup>16,17</sup>. Neben dem Alter ist das Ausmaß der arteriosklerotischen Veränderung der Gefäße auch von den persönlichen Risikofaktoren und der genetischen Disposition abhängig<sup>17,18</sup>. Ferner wird vermutet, daß die vor allem mit zunehmendem Alter assoziierte Abnahme vasoprotektiver Faktoren, z. B. EPC und Stickstoffmonoxid (NO), zusätzliche Gefäßmodifikationen hervorruft<sup>17</sup>.

#### **1.2 Endothel und endotheliale Progenitorzellen (EPC)**

Das Gefäßendothel bildet eine Schranke zwischen dem Blut und dem das Gefäß umgebendem Gewebe. Es produziert außerdem wichtige Regulationsfaktoren wie Prostaglandine und NO, die durch physikalische oder chemische Stimuli freigesetzt werden<sup>19</sup>. Daher ist eine Wiederherstellung von Endotheldefekten für das Überleben des betroffenen Gebietes oder sogar des gesamten Organismus essentiell<sup>20,21</sup>. Wie sich in den letzten Jahren herausgestellt hat, besitzen die ausdifferenzierten Endothelzellen jedoch nur ein geringes Proliferationspotential, und sind damit in ihrer Fähigkeit, neue Gefäße zu bilden bzw. Schäden zu beheben, eingeschränkt<sup>22</sup>. Dagegen sind vor allem die aus dem Knochenmark stammenden Zellen, deren Eigenschaften denen embryonaler Angioblasten ähneln, für die postnatale Vaskulogenese von großer Bedeutung<sup>22,23,24</sup>. Es handelt sich hierbei um endotheliale Progenitorzellen (EPC), die im Knochenmark gebildet werden, und durch verschiedene Mechanismen aktiviert, in die Blutbahn übertreten, dort zu adulten Zellen differenzieren, um dann zur Reparatur verletzter, ischämischer und arteriosklerotischer Gebiete beizutragen<sup>25,26</sup>. Durch

ihre besondere Fähigkeit zur Gefäßregeneration tragen EPC zur Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase bei<sup>24,25</sup>.



**Abbildung 1: Reparatur geschädigter Gefäße durch EPC**

(aus Hristov, M., Erl, W., Weber, P. 2003. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, S. 1187)

### 1.2.1 Identifizierung und Charakterisierung von EPC

Bestimmte Vorläuferzellen können zu Endothelzellen differenzieren, wobei es jedoch Kontroversen über die genaue phänotypische Bestimmung gibt. In der Blutbahn finden sich außerdem zirkulierende Endothelzellen (CEC), die vom ausgereiften vaskulären Endothel abstammen<sup>25</sup>. Sie besitzen allerdings im Vergleich zu den aus dem Knochenmark stammenden Endothelzellen (EC) eine geringere Fähigkeit, zur postnatalen Angiogenese beizutragen<sup>25,27</sup>.

Aus dem Knochenmark stammende EPC sind wahrscheinlich hämatopoetischer Herkunft<sup>23</sup>. Frühe Progenitorzellen, die die Oberflächenantigene CD133+/CD34+/VEGFR-2+/CD14- exprimieren, stellen eine kleine Gruppe von EPC mit proliferativem Potential dar. EPC myeloischer Herkunft (CD14+) können ebenso angiogenetische Faktoren produzieren, jedoch ist ihr proliferatives Potential limitiert. Auch mesenchymale Progenitorzellen (CD34-) können zu EPC differenzieren. In vivo zeigen sie jedoch eine reduzierte funktionelle Aktivität und Inkorporationsbereitschaft in neue Gefäße<sup>22</sup>.

Obwohl offenbar verschiedene Typen von EPC existieren, die sich von unterschiedlichen Zelltypen ableiten, exprimieren sie alle gemeinsame endotheliale Marker wie den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor Rezeptor-2 (VEGFR-2), den von-Willebrand-Faktor und die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS)<sup>23</sup>. Die Vorläuferzellen können von adulten Endothelzellen durch die Oberflächenproteine differenziert werden. So sind für unausgereifte Zellen Oberflächenproteine, die von Zellen der hämatopoetischen Zelllinien exprimiert werden, wie CD133, CD34 und der VEGFR-2, kennzeichnend. Ein typischer Phänotyp ist CD133<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, VEGFR-2<sup>+</sup>, VE-Cadherin<sup>-</sup>. Nach dem Eintreten ins periphere Blut verlieren diese Zellen das CD133-Protein und wachsen zu adulten Endothelzellen heran<sup>20,22</sup> (Abbildung 2).

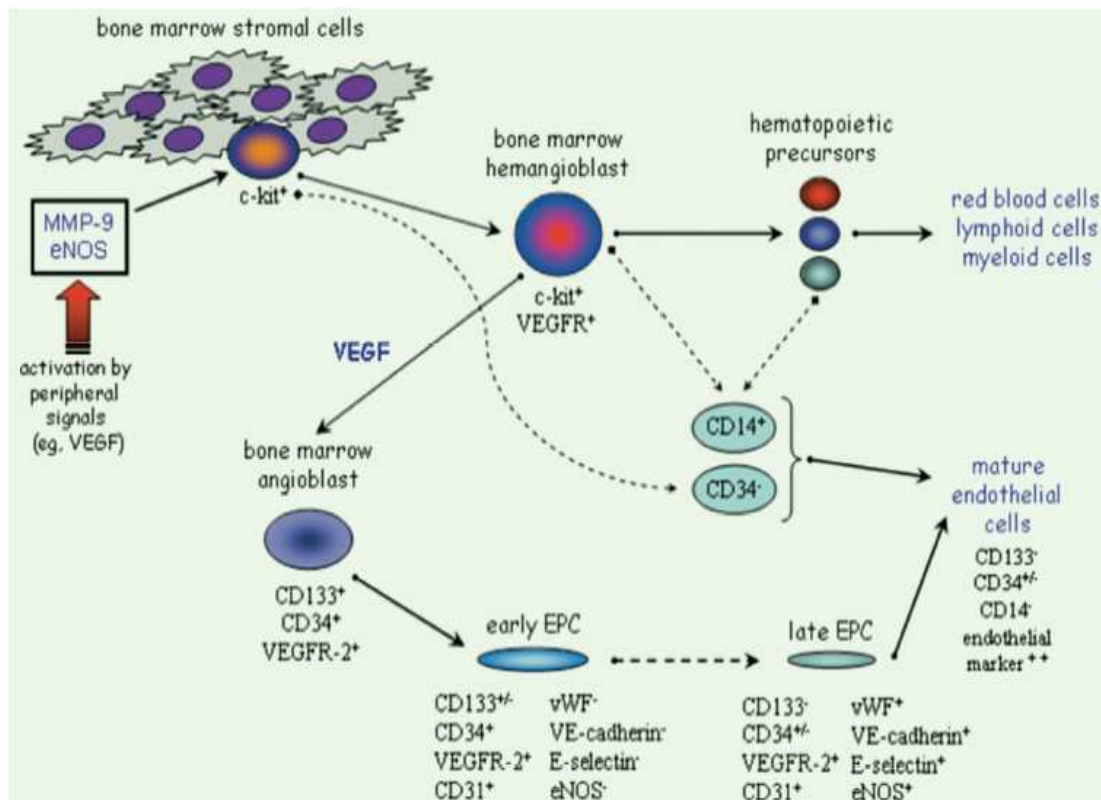
### 1.2.2 Homing und Mobilisierung

Um zu der postnatalen Vaskulogenese oder der Reparatur endothelialer Läsionen beitragen zu können, müssen die EPC erst aus dem Knochenmark mobilisiert, in den Blutkreislauf geschleust, zu dem benötigten Gebiet wandern, und dann zu adulten Endothelzellen differenzieren. Dies ist ein komplexer Prozeß, der von einer Vielzahl von Enzymen, Wachstumsfaktoren und Oberflächenrezeptoren gesteuert wird<sup>28</sup>. VEGF, das in Ischämiegebieten in großen Mengen produziert wird, ist ein wichtiger Mediator zur Mobilisierung der EPC. VEGF induziert eine gesteigerte vaskuläre Permeabilität und fördert die Proliferation, Migration sowie die Rekrutierung der EPC aus dem Knochenmark<sup>29</sup>. Dies geschieht sehr schnell; bereits 24 Stunden nach Freisetzung von VEGF steigt der EPC-Spiegel im Blut<sup>25</sup>. So können Zytokine sowohl EPC als auch hämatopoetische Stammzellen mobilisieren. Auch Erythropoetin (Epo) ist ein wichtiger Aktivator der EPC<sup>30,31</sup>. Zusätzlich senkt es die Apoptoserate der ischämisch geschädigten Myozyten und begrenzt so die Ausdehnung des infarzierten Gewebes<sup>23</sup>. Ferner erhöhen körperliche Bewegung sowie Östrogene die EPC-Spiegel, und sind damit vasoprotektiv<sup>10,25,32</sup>. Darüber hinaus gibt es noch eine Vielzahl von physiologischen und pathologischen Faktoren sowie Medikamente, die sich auf die EPC auswirken. Dies ist nachfolgend in Tabelle 1 genauer aufgeführt.

**Tabelle 1 : Faktoren, welche die Anzahl und die Funktion humaner endothelialer Progenitorzellen beeinflussen**

Faktoren	Anzahl-/Funktionsänderung der EPC bzw. CD34+-Zellen	Publikationen
<b>Physiologische Faktoren:</b>		
Geschlecht (Östrogene)	↑ CD34+/VEGFR2+-Zellen	Strehlow et al., Circulation (2003)
Bewegung	↑ EPC	Adams et al. ATVB (2004)
<b>Pathologische Faktoren:</b>		
Koronare Herzerkrankung/ Risikofaktoren	↓ EPC Zahl und Migrationskapazität ↓ CD34+/KDR+ Zellen	Vasa et al., Circ Res (2001)
Rauchen	↓ EPC oder CD34+/KDR+-Zellen	
Familiäre Belastung	↓ EPC oder CD34+/KDR+-Zellen	
Hypertonus	↓ EPC Migrationskapazität	
Kumulative kardiovaskuläre Risikofaktoren	↓ EPC CFU	Hill et al., N Engl J Med (2003)
Myokardinfarkt	↑ CD34+-Zellen ↑ CD34+/AC133+/VEGFR2+-Zellen	Shintani et al., Circulation (2001)
Gefäßschädigung	↑ AC133+/VEGFR2+-Zellen	Gill et al., Circ Res (2001)
<b>Medikamente:</b>		
HMG-CoA- Reduktaseinhibitoren	↑ EPC	Dimmeler et al., J Clin Invest (2001)
Erythropoetin	↑ CD34+/CD45+ Zellen	Bahlmann et al., Blood (2004)

(modifiziert nach Hristov M., Weber Chr. 2004. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. J Cell Mol Med 8, S. 502)



**Abbildung 2: Mobilisierung, Rekrutierung und Differenzierung humaner, aus dem Knochenmark stammender, angiogenetischer Progenitorzellen**

(aus: Hristov M., Weber Chr. 2004. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. J Cell Mol Med 8, S. 500)

Im Knochenmark befinden sich sogenannte Stammzellnischen, die neben Vorläuferzellen Fibroblasten, Osteoblasten und Endothelzellen enthalten. Die Mobilisierung beginnt mit der Aktivierung der Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9)<sup>22,23</sup>. Von ihr gesteuert transformiert der an die Membran gebundene hämatopoetische Stammzellmarker Kit-Ligand<sup>33</sup> in das gelöste Kit-Ligand (KitL; auch Stammzellfaktor genannt). Dadurch können sich die Stammzellen aus dem Knochenmark herauslösen und durch das sinusoidale Endothel in die Blutbahn eintreten<sup>22</sup>. Auch Zytokine unterstützen die Mobilisierung, indem sie in die Interaktion zwischen Stammzellen und Stromazellen eingreifen. Die Stammzellaktivierung wird neben der MMP-9 auch von anderen Mediatoren wie den Proteinasen Elastase und Cathepsin G gesteuert<sup>23</sup>. Desweiteren scheint NO eine wesentliche Rolle bei der Freisetzung von EPC aus dem Knochenmark zu spielen<sup>34</sup>. Die genaue Differenzierung zu Endothelzellen in der Blutbahn in vivo ist noch nicht geklärt. Bewiesen aber scheint, daß die EPC dort ihre Oberflächen-

proteine CD133 und CD14 verlieren und anfangen, die bereits erwähnten endothelialen Marker zu exprimieren<sup>22,35</sup> (Abbildung 2).

### **1.2.3 Rolle der EPC im Alter und bei ischämischer Herzerkrankung**

Eine endotheliale Schädigung entsteht durch ein Ungleichgewicht zwischen dem Ausmaß der Schädigung und der Reparaturkapazität<sup>26</sup>. Die Störung der vaskulären Homöostase der Gefäßwand prädispositioniert für Vasokonstriktion, Leuko- und Thrombozytenadhärenz, Thrombosen, vaskuläre Entzündungen und schließlich arteriosklerotische Veränderungen. Diverse Risikofaktoren begünstigen diesen Umbau. Ein wesentliches „Risiko“ stellt das Alter dar. Ältere Menschen erkranken öfter und mit einer schlechteren Prognose an Arteriosklerose als jüngere<sup>16</sup>. Dies läßt sich zum einen auf endogene Veränderungen der Gefäßwand, die Arteriosklerose und vaskuläre Dysfunktion fördern, zurückführen. Zum anderen konnte gezeigt werden, daß die für die Gefäßregeneration so wichtigen EPC in ihrer Proliferations-, Migrations- und Überlebensfähigkeit eingeschränkt sind<sup>16,36</sup>. Auch andere kardiovaskuläre Risikofaktoren greifen in dieses labile System der Gefäßhomöostase ein. Es wird vermutet, daß diese das Niveau von oxidativem Streß, NO-Aktivität und anderer physiologischer Prozesse modulieren und damit direkt die Mobilisierung und die Funktion der EPC beeinflussen<sup>37</sup>. Dies führt zu einer Verminderung der Anzahl und zu einer Dysfunktion der zirkulierenden EPC<sup>38</sup>, und trägt damit zur Progression der Arteriosklerose und der koronaren Herzerkrankung (KHK) bei.

### **1.2.4 Therapeutische Aussichten**

Von klinischer Bedeutung sind EPC sowohl als diagnostischer als auch prognostischer Parameter, da die Anzahl und die Merkmale der Zellen Hinweise auf kardiovaskuläre Risiken geben könnten<sup>37,39</sup>.

Zusätzlich kommt auch eine therapeutische Anwendung in Betracht. Zum einen können die Progenitorzellen zur Neovaskularisierung ischämischen Gewebes nach einem Myokardinfarkt beitragen, zum anderen die Endothelialisierung nach Angioplastien oder Gefäßoperationen fördern<sup>22</sup>. Da die zirkulierenden Endothelzellen limitiert und bei Patienten mit kardialer Erkrankung zudem zusätz-



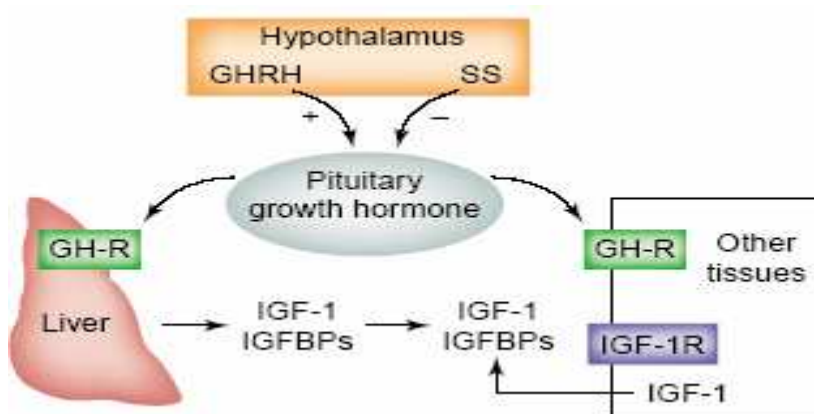
lich reduziert sind, ist die therapeutische Verwendung autologer Endothelzellen beschränkt. Um dieses Problem zu beheben, gibt es inzwischen verschiedene Ansätze, die EPC-Zahl zu steigern. Erstens ist es möglich, mittels einer ex vivo Transfektion mit Adenoviren, die VEGF enthalten, einen signifikanten Anstieg von EPC zu bewirken. Dies konnte auch mittels eines Gentransfers von VEGF in das infarzierte Gewebe erreicht werden<sup>22</sup>. Im Tierversuch kam es drei bis sieben Tage nach einer Transplantation von humanen EPC zu einer bemerkenswerten Neovaskularisierung und Erhöhung der Kapillarendichte sowie zu einer Verbesserung der Wandbewegung des Herzens<sup>40</sup>. Auch das Ausmaß der Vernarbung des infarzierten Gewebes war gegenüber den Kontrollen signifikant vermindert. Sowohl kultivierte als auch frisch isolierte EPC haben also ein therapeutisches Potential bei kardiovaskulären Erkrankungen<sup>40</sup>. Alternativ - und in der Praxis bereits häufig verwendet - steht die medikamentöse Gabe von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoEnzym A (HMG-CoA)-Reduktase-Inhibitoren (Statine) zur Verfügung<sup>22,28,41</sup>. Sie induzieren die Mobilisierung von EPC<sup>42</sup>. Zusätzlich wirken sie antiinflammatorisch, senken die Plättchenaggregation - und damit das Thromboserisiko<sup>43,44,45</sup> - und fördern die NO-Produktion des Endothels. Diese protektiven Eigenschaften reduzieren ebenfalls das Infarktrisiko bzw. die Infarktgröße<sup>22,28,41</sup>. Die EPC-freisetzende Wirkung der Statine ist allerdings eNOS-abhängig<sup>42</sup>. Die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase trägt im peripheren System zur Vasodilatation bei. Im Knochenmark mobilisiert das von der eNOS produzierte NO sowohl die endothelialen als auch die hämatopoetischen Vorläuferzellen. Es hat sich gezeigt, daß eine eNOS-Defizienz im Knochenmark die Mobilisierung der Zellen herabsetzt<sup>22,41</sup>.

### **1.3 Insulin-like growth factor (IGF-1)**

Das Insulin-like growth factor (IGF-1)-System besteht aus dem Wachstumsfaktor IGF-1, dessen Rezeptor (IGF-1R) und den IGF-Bindungsproteinen (IGFBP). Es beeinflusst das Gefäßsystem durch endokrine sowie auto- und parakrine Mechanismen.

### 1.3.1 Physiologie

Das Wachstumshormon (GH = Growth Hormone) wird in der Hypophyse produziert. Der Thalamus reguliert seine Freisetzung durch das Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH) und das hemmende Somatostatin (SS) (s. Abbildung 3). Der stärkste Stimulus des GH ist eine Hypoglykämie. GH fördert sowohl Zellwachstum und -vermehrung, als auch Steigerung der Glukoneogenese und der Glukagonsekretion<sup>46</sup>.



**Abbildung 3: Das GH-IGF-1-System**

(aus Carter C. et al. 2002. A critical analysis of the role of growth hormone and IGF-1 in aging and lifespan. Trends In Genetics 18, S. 296). (GHRH=Growth Hormone Releasing Hormone; SS=Somatostatin; GH-R=Growth Hormone Receptor)

Die Insulin-like growth factors gehören zu der Familie der Insulinpeptide<sup>47</sup> und werden in fast allen Geweben des Organismus synthetisiert. Sie stellen wichtige Mediatoren für Zellwachstum und -differenzierung dar<sup>48</sup>.

IGF-1 spielt sowohl in der prä- als auch in der postnatalen Entwicklung eine grundlegende Rolle. Es wird vor allem in der Leber unter der Steuerung von GH gebildet<sup>18,49</sup>. Die Bindung von Wachstumshormon an seine hepatischen Rezeptoren bewirkt die Expression und die Freisetzung der IGF-1-Peptide in den Kreislauf<sup>48,50</sup>. Das in der Leber synthetisierte IGF-1 stellt die endokrine Form des Enzymes dar. Ungefähr 80% des im Blut zirkulierenden IGF-1 stammt aus der Leber<sup>51</sup>. Es besitzt außerdem eine hohe Affinität für die IGF-1-Bindungsproteine<sup>18,52</sup>. IGF-1 bindet an seine Rezeptoren, die ubiquitär im Organismus exprimiert werden<sup>52</sup>. Sein Rezeptor ist ein Tetramer, das aus zwei extrazellulären  $\alpha$ -Ketten und zwei intrazellulären  $\beta$ -Ketten besteht. Die  $\beta$ -Ketten

beinhalten einen intrazellulären Tyrosinkinasebereich, von dem angenommen wird, daß er essentiell für die biologische Wirkung des Rezeptors ist<sup>48</sup>. Die Signalkaskade des IGF-1R verfügen über eine Autophosphorylierung mit nachfolgender Tyrosinphosphorylierung der Insulinrezeptoren (IRS) 1-4. Die IRS dienen als Andockproteine und können viele weitere Signalkaskaden, wie z. B. die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K), Akt und die mitogen-activated-Proteinkinase (MAPK), aktivieren, was dann zu einer Induktion IGF-1-gesteuerter Mechanismen wie Zellwachstum, Differenzierung und Migration führt<sup>47,48</sup>. Im Blut zirkulieren 99% des IGF-1 in Komplexen mit seinen verschiedenen Bindungsproteinen (IGFBP 1-6) und 1% in seiner freien, ungebundenen Form<sup>50</sup>. Die IGFBP dienen aber nicht nur als Transporterproteine, sondern auch als IGF-1-Speicher. Ihre Expression ist gewebe- und entwicklungspezifisch. Die Konzentrationen der IGFBP variieren in den verschiedenen Körperkompartimenten<sup>48</sup>. Der Großteil des IGF-1 ist im Serum an das IGFBP-3 gebunden<sup>50</sup>. Die Bindungsproteine können die IGF-1-Aktivität sowohl steigern als auch vermindern, und manche von ihnen wirken auch unabhängig von IGF-1. Ferner ist ihre Wirkung stark von ihrer Proteasenaktivität abhängig. Proteolyse von IGFBP, z. B. durch Plasmin oder durch Thrombin, senkt die Bioaktivität des IGF-1<sup>50</sup>.

### **1.3.2 Wirkung und Funktion von IGF-1**

Alle Endothelzellen exprimieren den IGF-1R, wobei dies durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Bedingungen beeinflusst wird<sup>48</sup>. Hauptsächlich spielen Zelldichte, Hypoxie, VEGF und IGF-1 selbst eine wichtige Rolle<sup>48</sup>. IGF-1 reguliert Migration und Angiogenese und fördert außerdem die vasodilatativen Reaktionen in den Endothelzellen. Diese Effekte werden hauptsächlich über die Aktivierung von PI3K, eNOS und VEGF gesteuert<sup>48</sup>. IGF-1 beeinflusst das vaskuläre System. Es fördert u. a. die NO-Synthese, induziert Vasodilatation, erhält die koronare Durchblutung und wirkt antiapoptotisch sowie antiinflammatorisch. Dadurch hemmt IGF-1 die endotheliale Dysfunktion, die als Grundstein für die Entwicklung der Arteriosklerose gilt<sup>53</sup>.

### **1.3.3 IGF-1 und koronare Herzerkrankung**

Mit zunehmendem Alter sinken sowohl die GH- und die IGF-1-Spiegel als auch ihre Bioaktivität, wodurch das Risiko steigt, eine KHK auszubilden oder einen Myokardinfarkt zu erleiden<sup>54</sup>. Hierbei sticht vor allem ein niedriger IGF-1-Spiegel in Kombination mit erhöhten IGFBP-3 hervor<sup>51</sup>. Desweiteren zeigte sich bei GH-defizienten Menschen mit sehr niedrigen IGF-1-Spiegeln vermehrt Bildung atheromatöser Plaques und verdickte Intimawände. Sie haben außerdem ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse<sup>46,55</sup>. IGF-1 fördert die Gefäßdilata-tion durch die Aktivierung von Na<sup>+</sup>-Kanälen<sup>56</sup> und die Induktion der NO-Synthese durch das Endothel<sup>57,58</sup>. Ferner erhöht es die myokardiale Kontraktilität<sup>59,60</sup> und reduziert die Infarktgröße<sup>59,61</sup>. Physiologisch stimulieren Insulin und GH die IGF-1-Freisetzung, während Interleukin-1 (IL-1), Kortisol und der TNF- $\alpha$  die Sekretion von IGF-1 inhibieren<sup>62</sup>. Nach Myokardinfarkt (MI) steigen die oben genannten inhibitorischen Substanzen stark an, was die IGF-1-Freisetzung behindert<sup>62</sup>. Gleichzeitig kommt es zu einer Reduktion der IGFBP<sup>63</sup>, die normalerweise die Halbwertszeit des IGF-1 verlängern können<sup>62</sup>, nun aber die IGF-1-Konzentration zusätzlich senken. Außerdem entsteht eine vorübergehende Resistenz des Wachstumsfaktors gegenüber seinen Stimuli Insulin und GH<sup>62</sup>, so daß er dadurch noch mehr vermindert wird. Daraus resultieren in der Frühphase nach einem MI signifikant erniedrigte IGF-1-Konzentrationen im Vergleich zu stabilen bzw. gesunden Kontrollen. Es dauert ungefähr ein Jahr, bis die Spiegel sich wieder normalisiert haben<sup>62</sup>. Es hat sich außerdem gezeigt, daß niedrige IGF-1-Spiegel mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko in Zusammenhang stehen<sup>62</sup>.

### **1.3.4 IGF-1 und kardiovaskuläre Risikofaktoren**

Traditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Adipositas, Hypertonus und Nikotinabusus fördern die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion. Zum Teil scheinen diese Reaktionen durch eine Reduktion des IGF-1 begleitet zu sein<sup>53</sup>. Zusätzlich vermindert oxidiertes LDL sowohl IGF-1 als auch die IGF-1R und die IGFBP-Expression<sup>53</sup>, was die Arterioskleroseentstehung begünstigt. Es steht durch diese Ergebnisse zur Diskussion, ob niedriges IGF-1 als ein unabhängi-

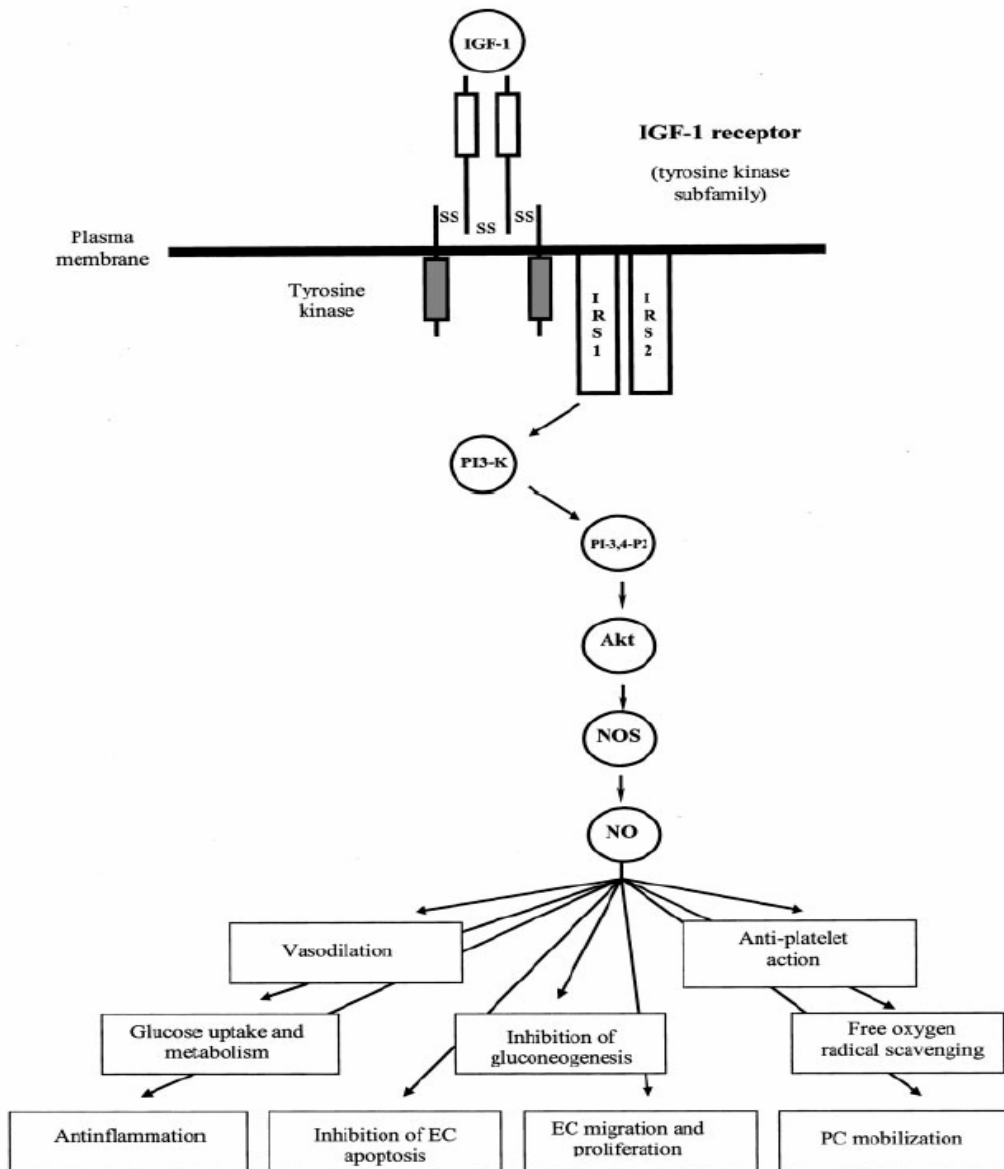
ger, zusätzlicher Risikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen eingestuft werden könnte<sup>53</sup>.

#### **1.4 IGF-1 und endotheliale NO-Synthase (eNOS)**

Stickstoffmonoxid ist ein kurzlebiges, freies Radikal, das von verschiedenen Isoformen der NO-Synthasen (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin gebildet wird. Die neuronale NO-Synthase (nNOS) ist vor allem im Nervensystem vertreten, während die induzierbare NOS (iNOS) maßgeblich im Immunsystem eine Rolle spielt.

Im Endothel vorrangig ist die endotheliale NO-Synthase (eNOS)<sup>64,65</sup>. NO hat eine maßgebliche Bedeutung bei der Regulierung der funktionellen Endothelintegrität. Es steuert den vaskulären Tonus, wirkt antithrombotisch sowie antiinflammatorisch und inhibiert die Apoptose von Endothelzellen<sup>64,66</sup>. Die eNOS ist an der Plasmamembran von Endothelzellen lokalisiert und wird auch dort aktiviert. Das geschieht beispielsweise durch die Induktion der PI3K-Signalkaskade durch IGF-1 oder VEGF. Die Proteinkinase Akt ist ein wichtiger Teil dieser Kaskade. Sie induziert die Phosphorylierung von eNOS und damit deren Aktivierung<sup>67</sup> (Abbildung 4).

Im Knochenmark bewirkt die eNOS-Expression den Übertritt der Stamm- und Progenitorzellen. Hypoxie induziert die Hochregulierung von VEGF, welches dann eNOS über den VEGF-Rezeptor-2 (Flk-1) und Akt aktiviert. Die eNOS ist also für Angiogenese und Neovaskularisierung essentiell<sup>30</sup>. Bei Mangel kommt es zu einer gestörten Progenitorzellmobilisierung<sup>30,68</sup>. Doch auch die eNOS-Aktivität nimmt mit zunehmendem Alter ab, was die Entstehung eines Hypertonus, eine eingeschränkte GH-abhängige Angiogenese und eine beschleunigte Arteriosklerosebildung begünstigt. Es kommt außerdem zu einer vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche u.a. die Apoptose von Endothelzellen fördern<sup>65,69,70</sup>.



**Abbildung 4: Signalkaskade der NO-Synthese**

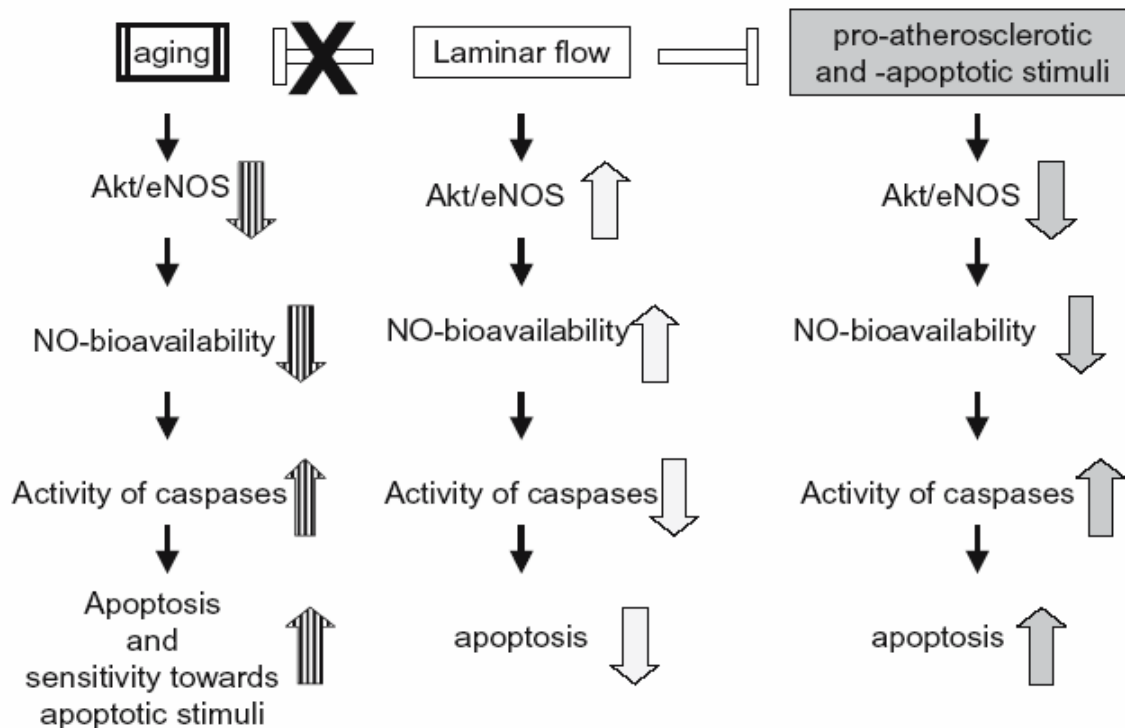
Die Interaktion zwischen IGF-1 und seinen Rezeptoren (IRS 1 und 2) löst die PI3K-/ Akt-Signalkaskade aus. Über Phosphorylierung der NOS wird NO gebildet. NO beeinflusst wichtige Signalwege.

(aus: Conti E. et al. 2004. Insulin-like growth factor-1 as a vascular protective factor. Circulation 110, S. 2261)

Das Absterben der Endothelzellen wird ferner durch Caspasen verstärkt, die physiologisch von NO durch eine S-Nitrosylierung essentieller Cysteine inhibiert werden<sup>71</sup>, bei reduzierter NO-Verfügbarkeit aber ihre Aktivität steigern<sup>65</sup>. Auch die Telomeraseaktivität, welche bei der Zellalterung von grundlegender Bedeu-

tung ist und unter anderem Akt-abhängig gesteuert wird, sinkt. Dies führt zusätzlich dazu, daß die Zellapoptose weniger verhindert werden kann<sup>72,73</sup>.

In Abbildung 5 werden die Einflüsse auf das Akt/eNOS-System genauer dargestellt.



**Abbildung 5: Einflüsse auf das Akt / eNOS-System**

Die laminaren Scherkräfte sind der potenteste Inhibitor apoptosestimulierender Reize. Sie schützen jedoch nicht vor Apoptose durch Zellalterung.  
(aus: Haendeler J. 2005. Nitric oxide and endothelial cell aging. Eur J Clin Pharmacol 62, S. 138)

Endogene NOS-Inhibitoren wie asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA), das die endotheliale Dysfunktion fördert und Angiogenese inhibiert, wurden bei Patienten mit KHK in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen<sup>12</sup>.

Die aufgeführten Prozesse führen zu einer Verminderung der eNOS. So hat sich gezeigt, daß in arteriosklerotisch veränderten Koronararterien die Bioverfügbarkeit von NO eingeschränkt und bei Patienten mit Risiko, eine KHK auszubilden, eNOS systemisch reduziert ist<sup>67,68</sup>. Da hierbei auch das Knochenmark betroffen ist, kommt es zu einer geringeren EPC-Mobilisierung<sup>30</sup>. Das ist u.a.

der Grund, warum Patienten, die kardiovaskuläre Risikofaktoren oder eine KHK haben, eine signifikant erniedrigte Anzahl zirkulierender EPC haben<sup>30,65</sup>. Dies beeinträchtigt die endogenen, vaskulären Reparaturmechanismen und trägt somit wahrscheinlich zu einer beschleunigten Gefäßalterung, einer reduzierten Neovaskularisierung und einer verminderten kardialen Regeneration bei KHK-Patienten bei<sup>30</sup>.

## **1.5 Fragen und Ziele dieser Doktorarbeit**

Zur Erweiterung der bereits beschriebenen Kenntnisse wurden in dieser Arbeit die Effekte von IGF-1 auf die Funktion humaner EPC sowohl in vitro als auch in vivo in einer klinischen Studie untersucht. Zusätzlich forschten wir an der Wirkung von IGF-1 auf das eNOS-System der EPC. In der klinischen Studie prüften wir die Hypothese, daß eine GH-gesteuerte IGF-1-Erhöhung die Zahl und Funktion der zirkulierenden EPC in vivo moduliert.



## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Klinische Studie**

Die Studie wurde von den Ethikkommissionen der Universitäten Hannover und Würzburg genehmigt. Die Probanden willigten mit einer schriftlichen Einverständniserklärung ein, an der Studie teilzunehmen.

Die Studiengruppe bestand aus sechzehn gesunden männlichen Teilnehmern zwischen 50 und 69 Jahren (Durchschnittsalter  $57,4 \pm 1,4$  Jahre) und zehn gesunden jungen Teilnehmern zwischen 23 und 31 Jahren (Durchschnittsalter  $27,5 \pm 0,9$  Jahre). Keiner der Probanden rauchte oder nahm Medikamente ein. Erkrankungen der Leber oder der Nieren sowie kardiale, endokrine oder metabolische Störungen und maligne Prozesse waren bei den Teilnehmern vor der Studie ausgeschlossen worden.

Alle Teilnehmer der älteren Gruppe erhielten täglich 0,4 mg rekombinantes humanens Wachstumshormon (rhGH; Pharmacia, Deutschland) über einen Zeitraum von 10 Tagen. Alle Messungen wurden direkt vor und nach der zehntägigen Behandlung durchgeführt.

### **2.2 Messung von IGF-1 in Plasmaproben**

10ml Blut wurde aus den antekubialen Venen der Patienten entnommen. Es wurden Kanülen verwendet, die mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA) versetzt waren, und die Proben nach Entnahme sofort auf Eis gekühlt. Die Blutproben wurden bei 1500 g und 4°C 15 Minuten lang zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde im Anschluß sofort verwendet oder bei -80°C bis zu weiteren Untersuchungen aufbewahrt. Die IGF-1-Spiegel wurden mit kommerziell erhältlichem IGF-1-Bestimmungs-Kit (Nichols Institute Diagnostics, San Clemente, USA) bestimmt.

## **2.3 Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen und CD34<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup> und CD133<sup>+</sup> Vorläuferzellen**

PBMC wurden mittels Ficoll®-Dichtezentrifugation isoliert. Für die in-vitro Assays wurden die PBMC der gesunden Teilnehmer (n=5) im Rahmen einer Leukapherese gewonnen (Cobe spectra device, Gombro, Deutschland). Ein Teil der PBMC wurde mit anti-CD34, anti-CD117 oder anti-CD133-Antikörpern, die mit magnetischen Mikrobeads (Miltenyi, Deutschland) konjugiert worden waren, inkubiert und anschließend mittels Magnetic Affinity Cell Sorting (MACS) nach Angaben des Herstellers (Miltenyi, Deutschland) isoliert. Bei dieser Methode werden zuvor mittels Antikörpern magnetisch markierte Zellen in einem magnetischen Feld von den unmarkierten Zellen getrennt<sup>74</sup>.

## **2.4 Charakterisierung der Vorläuferzellen**

Zur Bestimmung der Anzahl, der Differenzierung und der Funktion der EPC wurden verschiedene Assays - wie im Folgenden aufgeführt - verwendet.

### **2.4.1 Zellkultur-Assay für EPC**

Diese Versuche wurden nach zuvor beschriebenen Verfahren durchgeführt<sup>12,75</sup>.  $2 \times 10^5$  PBMC wurden auf fibronectinbeschichtete 8-well Chamber Slides (Lab-Tek, Deutschland) in EBM-2 Kulturmedium, das mit EGM SingleQuots ohne IGF-1 (Cambrex, Belgien) supplementiert wurde, vier Tage lang kultiviert. IGF-1 wurde in aufsteigenden Konzentrationen hinzugefügt (10-100 ng/ml). Um Kontamination mit adulten zirkulierenden Endothelzellen zu verhindern, wurde die Kultur acht Stunden nach dem Aussäen in frische fibronectinbeschichtete Chamber Slides übertragen. Die Zellen wurden mit 1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-Tetramethyl-Indocarbocyanin-Perchlorat markiertem, acetyliertem LDL (dil-acLDL; Sigma, Deutschland) und FITC-konjugiertem Lectin von *Ulex europaeus* (UEA-1; Sigma, Deutschland) in serumfreien EBM2-Medium verdünnt. Dann wurden die Zellen zweimal gewaschen und im Anschluß für vier Stunden bei 37°C in EBM2-Medium, dem 10 µg/ml dil-acLDL und 10 µg/ml UEA-1 zugesetzt worden war, inkubiert. Darauf folgte ein erneuter Waschvorgang und im An-

schluß wurden die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Doppelt positive (dil-acLDL und UEA-1) Zellen wurden in mindestens vier randomisiert ausgesuchten mikroskopischen Blickfeldern gezählt.

#### **2.4.2 Bestimmung von CD133<sup>+</sup>/ VEGF-2<sup>+</sup>-Zellen**

PBMC wurden wie beschrieben<sup>12</sup> durch Ficoll®-Dichtezentrifugation isoliert. Anschließend wurden 60 µl (circa  $2 \times 10^5$  PBMC) mit Allophycocyanin (APC)-markiertem, monoklonalem, antihumanem CD133-Antikörper (Miltenyi Biotec, Deutschland) und Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markiertem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktorrezeptor-2 (VEGFR-2; Reliatech, Braunschweig, Deutschland) 15 Minuten bei 6°C inkubiert. In parallelen Experimenten wurden zusätzlich isotypische Kontrollen (APC-konjugierte Maus-IgG2b und FITC-konjugierte Maus-IgG monoklonale Ig) durchgeführt. Mindestens 20.000 Zellen wurden mittels FACSCalibur Zytometer (Becton Dickinson) analysiert. Die Anzahl der Vorläuferzellen wurde als Prozentsatz aller PBMC dargestellt. Zwei Untersucher ermittelten verblindet die Anzahl der Progenitorzellen.

#### **2.4.3 Kolonieformende Einheiten (Colony forming units: CFU)**

Die PBMC wurden über Ficoll®-Dichtegradientenzentrifugation isoliert und  $5 \times 10^6$  Zellen auf fibronectinbeschichteten 6-well Platten in EndoCult™ Medium (StemCell Technologies, USA) inkubiert<sup>12</sup>. Nicht-adhärierte Zellen wurden nach 48 Stunden abgenommen und auf fibronectinbeschichtete 24-well Platten übertragen. Gebildete Zellkolonien wurden nach weiteren drei Tagen ausgewertet und gezählt. Als Kolonie wurde ein zentraler Kern von runden Zellen mit am Rande der Kolonie aussprossenden, länglichen Zellen definiert. Diese werden als frühe kolonieformende Einheiten von endothelartigen Zellen gesehen. Die endotheliale Linie dieser Zellen wurde durch den immunozytochemischen Nachweis des von Willebrand-Faktors, des VEGF-Rezeptors-2 und CD31 bestätigt<sup>37</sup>.

#### **2.4.4 Inkorporation in gefäßähnliche Strukturen (Matrigel-Assay)**

Der Inkorporationsassay wurde, wie in der von Thum et al. veröffentlichten Studie beschrieben, durchgeführt<sup>12</sup>.

Bei diesem Assay werden EPC mit reifen Endothelzellen - wie unten genauer beschrieben - kokultiviert. Die EPC bauen sich dann während der Gefäßsprossung der reifen Endothelzellen mit ein. Hierzu wurden dil-acLDL-vormarkierte EPC ( $2 \times 10^4$  Zellen) mit humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) ( $4 \times 10^4$  Zellen) auf einem 8-well Glass Slide gemischt, das mit 200  $\mu$ l Matrigel (BD Bioscience, Deutschland) in 500  $\mu$ l EBM-2 Medium mit Supplementen (ohne IGF-1 und FCS, Cambrex, Belgien) und dem Zusatz von 0-100 ng/ml IGF-1 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) oder 10-100 ng/ml rhGH (Pharmacia, Erlangen, Deutschland) vorbehandelt worden war. Dann wurde die 100 ng/ml IGF-1-Gruppe nach 30 Minuten entweder mit 10  $\mu$ g/ml IGF-1-inhibierenden Rezeptorantikörper oder dem Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-Inhibitor Wortmannin 100nM (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) ko-inkubiert. Nach 24-stündiger Inkubation in 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C wurden die Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops untersucht. Die Anzahl der dil-acLDL-markierten Zellen, die sich in die endothelialen Gefäßsprossungen eingebaut hatten, wurde damit bestimmt. Zwei Untersucher ermittelten verblindet mindestens vier randomisierte, selektierte mikroskopische Blickfelder. Pro Studiengruppe wurden mindestens n=5 Experimente durchgeführt.

#### **2.4.5 Zellmigrationsassay**

Die Migrationsfähigkeit der EPC wurde mittels der modifizierten Boyden-Kammer, wie von Vasa et al. beschrieben, untersucht<sup>76</sup>.  $1 \times 10^5$  Zellen wurden mit entweder 10-100 ng/ml IGF-1 oder 10-100 ng/ml rhGH vorbehandelt und anschließend in speziellen Einsätzen (Falcon HTS Fluoro Blok insert, 8  $\mu$ m Porengröße) inkubiert. Dann wurden die Zellen in 24-well Kulturplatten, die endotheliales Basismedium (Clonetics, Deutschland), 50 ng/ml VEGF und 100 ng/ml stromal cell-derived factor (SDF)-1 enthielten, überführt, um die Migrationskapazitäten der EPC zu messen. Nach 24 Stunden wurden die vom oberen Kompartiment durchgewanderten Zellen am Boden der Membran mit dil-acLDL ge-

färbt und danach manuell mittels fluoreszenzmikroskopischer Auswertung des Membranbodens ausgezählt (n=4).

#### **2.4.6 IGF-1-Rezeptorexpression auf EPC**

Für die Analyse der IGF-1-Rezeptorexpression wurden endotheliale CFU und monozytäre EPC mit einem anti-IGF-1-Rezeptor-Antikörper (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) für 12 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und ein mit Rhodamin-markierter Maus-IgG-Antikörper für 4 Stunden hinzugefügt. Im Anschluß wurden die Zellen zusätzlich mit FITC-markierten UEA-1 gefärbt, gewaschen und dann mittels Immunfluoreszenz weiter analysiert.

#### **2.4.7 Western Blot-Analyse**

EPC wurden vier Tage lang mit endothelialeem Wachstumsmedium (EBM-2 supplementiert mit EBM SingleQuots (Clonetics, Deutschland) und 20% FCS) kultiviert. Danach wurde auf FCS- und IGF-1-freiem EBM-2-Medium gewechselt und die Zellen mit steigenden Konzentrationen IGF-1 oder rhGH für acht Stunden behandelt. Der Proteingehalt der Zellysate wurde mit Hilfe des Bradford Assays bestimmt. Die Zellysate mit Ladungspuffer gemischt und auf einem 12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen (Immuno-Blot® 0,2 µm, Bio-Rad) geblottet, dann zwei Stunden in Tris gepufferten Saline-Tween (TBS-T) mit 5% Blockagens (Amersham) inkubiert, und anschließend nochmals über Nacht mit den primären Antikörpern (s.u.) bei 4°C. Die Banden wurden mittels Chemilumineszenzassay (ECL+Plus, Amersham) dargestellt. An Antikörpern wurden mit anti-eNOS, anti-phospho-eNOS (Ser1177) (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland), anti-Akt, anti-phospho-Akt (Cell Signaling Technologies, Beverly, USA) und anti-GAPDH (Abcam, Cambridge, Großbritannien) verwendet.

#### **2.4.8 eNOS-Aktivität**

Die eNOS-Aktivität wurde durch Bestimmung der Konversion von L-[guanidino-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]Arginin zu <sup>15</sup>N-Nitrit mittels einer gekoppelten Gaschromatographie/ Mas-

senspektrometrie-Methode beschrieben bestimmt<sup>77</sup>. Die EPC wurden hierzu mit 5mM L-[guanidino-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]Arginin für 24 Stunden bei 37°C inkubiert, danach das Verhältnis des gebildeten <sup>15</sup>N-Nitrit/ <sup>14</sup>N-Nitrit berechnet.

#### **2.4.9 Telomeraseaktivität**

Nach magnetischer Zellsortierung (MACS) von CD133<sup>+</sup>-Zellen wurde die Telomeraseaktivität sowohl in diesen Zellen als auch in kultivierten EPC mittels PCR-Assays nach dem Herstellerprotokoll (Roche, Penzberg, Germany) bestimmt. Die Telomeraserepeatamplificationsprotokoll- (TRAP-) Assays wurden mit Biotin markierten Telomerase-Primern wie beschrieben durchgeführt<sup>72</sup>.

#### **2.4.10 Statistische Analysen**

Die Daten wurden als Mittelwert±mittlerer Standardfehler (SEM) angegeben. Die statistische Analyse wurde mittels one-way ANOVA und mit dem Fisher's protected least-significant difference Test durchgeführt. Es wurde das StatView 5.0 Statistic Program (Abacus Concepts, Berkeley, USA) verwendet. Die statistische Signifikanz wurde für P<0,05 angenommen.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Altersabhängige IGF-1-Spiegel, Anzahl und Funktion der EPC**

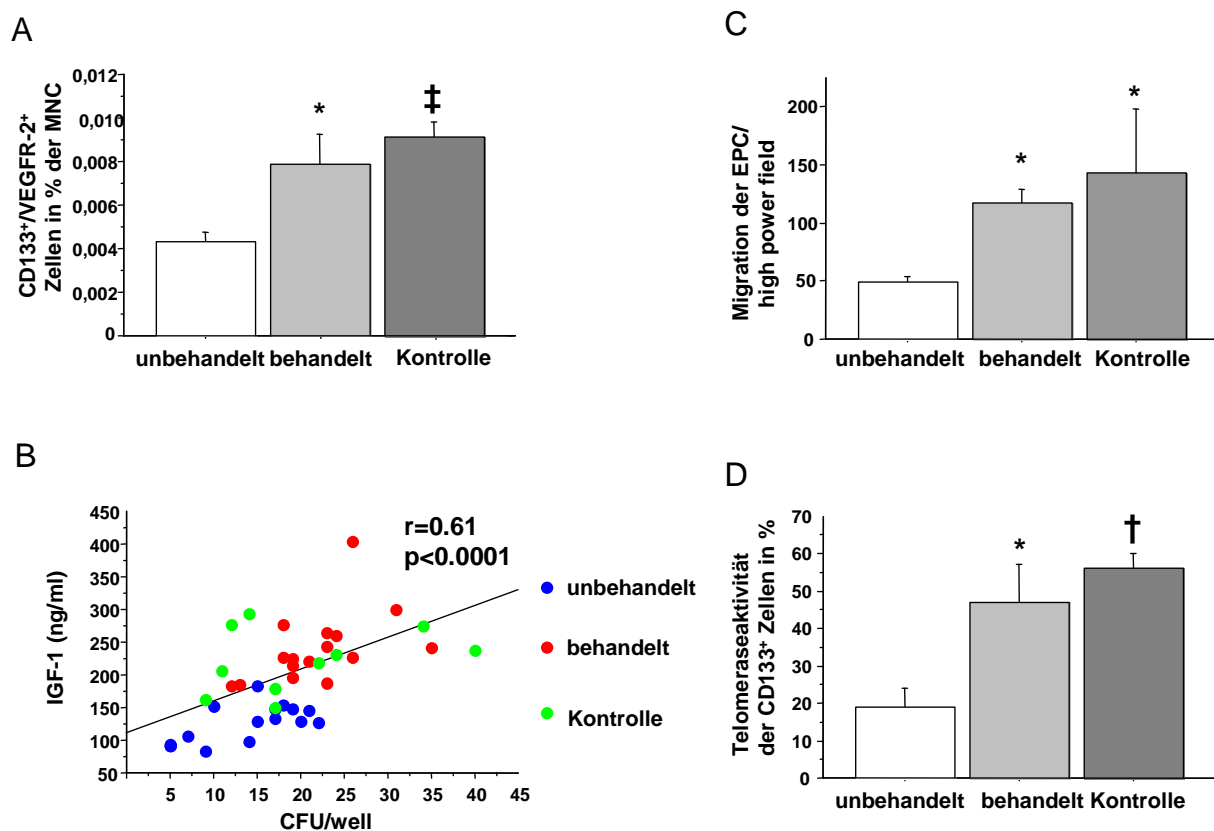
Die IGF-1-Plasmaspiegel waren bei der Studiengruppe der älteren männlichen Teilnehmer (Durchschnittsalter  $57,4 \pm 1,4$  Jahre) im Vergleich zu der jüngeren Gruppe (Durchschnittsalter  $27,5 \pm 0,9$  Jahre) signifikant erniedrigt ( $126,0 \pm 7,2$  ng/ml vs  $223,1 \pm 15,7$  ng/ml;  $p < 0,0001$ ). Zusätzlich wurde nach Unterschieden bei der Anzahl und Funktion der endothelialen Vorläuferzellen zwischen der jüngeren und älteren Studiengruppe gesucht. Es zeigte sich, daß bei den älteren Probanden niedrigere Konzentrationen zirkulierender CD133- und VEGFR-2-positiver Zellen vorhanden waren (Abbildung 6A). Zudem war auch die Funktion der EPC eingeschränkt. Dies zeigte sich durch ihre reduzierte Fähigkeit, Kolonien zu bilden (Abbildung 6B), und eine verminderte Migrationsfähigkeit der Zellen (Abbildung 6C).

Auch die Telomeraseaktivität isolierter CD133<sup>+</sup>-Vorläuferzellen war bei der älteren Gruppe im Vergleich mit der jüngerer Studienteilnehmer auf 33,6% reduziert (Abbildung 6D).

### **3.2 Behandlung von Patienten mit rekombinanten humanem Wachstumshormon (rhGH)**

Die rhGH-Behandlung der älteren Studiengruppe erhöhte den IGF-1-Spiegel im Serum von  $126,0 \pm 7,2$  ng/ml auf  $241,1 \pm 13,8$  ng/ml ( $p < 0,0001$ ; Abbildung 6B). In den von älteren Teilnehmern nach rhGH-Gabe entnommenen Blutproben waren die CD133- und VEGFR-2-positiven Zellen um das Doppelte erhöht (Abbildung 6A). Auch die Anzahl der endothelialen CFU war nach der Behandlung gesteigert und korrelierte mit den IGF-1-Plasmaspiegeln ( $r = 0,61$ ;  $p < 0,0001$ ; Abbildung 6B). Anschließend wurde untersucht, ob die erhöhten IGF-1-Spiegel zu einer Veränderung der Funktion der zirkulierenden EPC führen. Es zeigte sich eine

deutliche Verbesserung der Migrationskapazität isolierter EPC nach der Behandlung mit rhGH. Sie war um mehr als das Doppelte erhöht und näherte sich der Kapazität der jungen Kontrollgruppe an (Abbildung 6C). Gefäßendothelzellen weisen in atherosklerotischen Läsionen bei älteren Patienten einen alterungsassoziierten Phänotyp auf<sup>73</sup>. Deswegen wurde zusätzlich die Telomeraseaktivität isolierter Progenitorzellen auf eine Veränderung nach der rhGH-Behandlung getestet. Die Telomeraseaktivität war nach Wachstumshormongabe um das 2,3-fache ( $p < 0,5$ ) erhöht und entsprechend mit der Aktivität der jungen Probanden vergleichbar (Abbildung 6D).



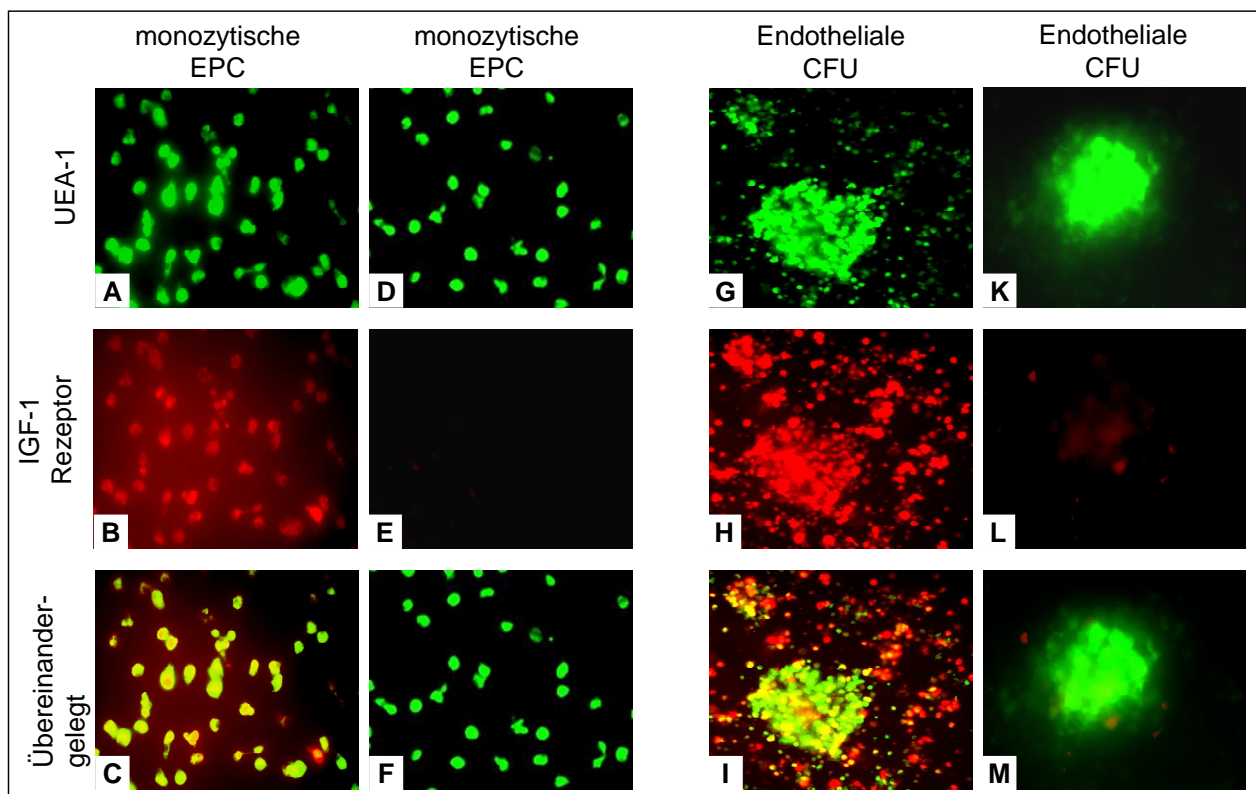
**Abbildung 6: Anzahl und Funktion der zirkulierenden EPC der jungen und älteren Studienteilnehmer vor und nach der Behandlung mit rekombinanten Wachstumshormon.**

A.: Anzahl der zirkulierenden CD133<sup>+</sup> -/ VEGFR-2<sup>+</sup> -Zellen der mononukleären Zellen in %. B.: Korrelation zwischen IGF-1-Spiegeln und der Anzahl der endothelialen kolonieformenden Einheiten (CFU) bei den jüngeren und älteren Teilnehmern vor und nach Behandlung mit rekombinanten Wachstumshormon. C.: Migrationskapazität der endothelialen Progenitorzellen von unterschiedlichen Studiengruppen. D.: Telomeraseaktivität der CD133<sup>+</sup>-Zellen aus verschiedenen Studiengruppen in %. \*= $p < 0,5$ ; †= $p < 0,01$ ; ‡= $p < 0,001$ .



### 3.3 EPC und IGF-1-Rezeptor

Zunächst wurden die EPC auf das Vorhandensein des IGF-1-Rezeptors untersucht, um zu prüfen, ob die beobachteten Effekte der rhGH-Behandlung durch die erhöhten IGF-1-Konzentrationen vermittelt werden konnten. Sowohl auf monozytären EPC<sup>75</sup> als auch auf endothelialen CFU konnte der IGF-1-Rezeptor nachgewiesen werden (Abbildung 7). Zum Nachweis der funktionellen Aktivität des IGF-1R in EPC wurden weitere in-vitro-Studien durchgeführt (s.u.).



**Abbildung 7: Expression des Insulin-like-growth-factor-1-Rezeptors auf humanen endothelialen Progenitorzellen**

Bindung des FITC-konjugiertem Lectin UEA-1 auf der Oberfläche der monozytären endothelialen Progenitorzellen (A, D) und an endotheliale kolonieformende Einheiten (CFU) (G, K). Die Graphiken B und H zeigen die IGF-1R-Expression auf monozytären EPC und CFU. In den Graphiken E und L werden nur ein rhodaminmarkierter IgG-Antikörper verwendet (Negativkontrolle). Die Bilder C, F, I und M zeigen die übereinandergelegten Abbildungen. Die Versuche wurden mindestens n=5 wiederholt.

### 3.4 IGF-1 verbessert die Funktion kultivierter EPC

IGF-1 führte zu einer vermehrten Bildung  $\text{dil-acLDL}^+/\text{UEA-1}^+$ -Zellen aus kultivierten peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC), was auf eine Stimulie-

zung der Differenzierung der EPC hinweist (Abbildungen 8A, B). Außerdem verbesserte die Behandlung mit IGF-1 sowohl die CFU-Bildung als auch die Migrationskapazität der EPC. Auch die Fähigkeit, sich in vaskuläre Strukturen auf Matrigel einzubauen, war bei den IGF-1-behandelten EPC erheblich verstärkt (Abbildungen 8A, B).

Zusätzlich erhöhte die IGF-1-Gabe die Telomeraseaktivität in den kultivierten EPC um mehr als das Doppelte (Abbildung 9).

Im Gegensatz dazu führte eine Gabe von rhGH - bis auf eine geringe Verbesserung der Zellmigration - zu keiner nennenswerten Veränderung der EPC in den verwendeten Assays (Abbildungen 8 und 9).

Die Hemmung des IGF-1R durch Vorbehandlung mit einem inhibitorischen IGF-1R-Antikörper bzw. mit dem PI3K-Inhibitor Wortmannin führte zu einer Aufhebung der IGF-1 vermittelten Effekte (Abbildungen 8 und 9).

Abb. 8A

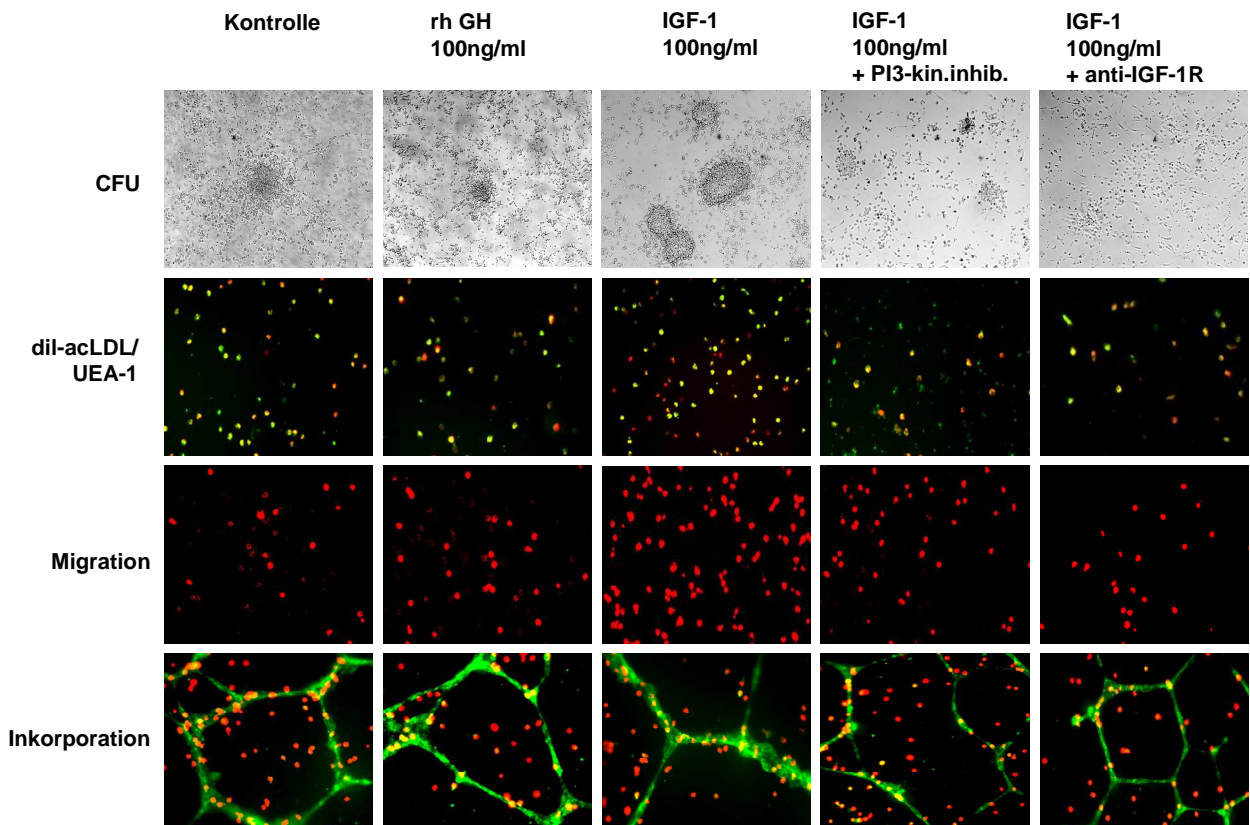
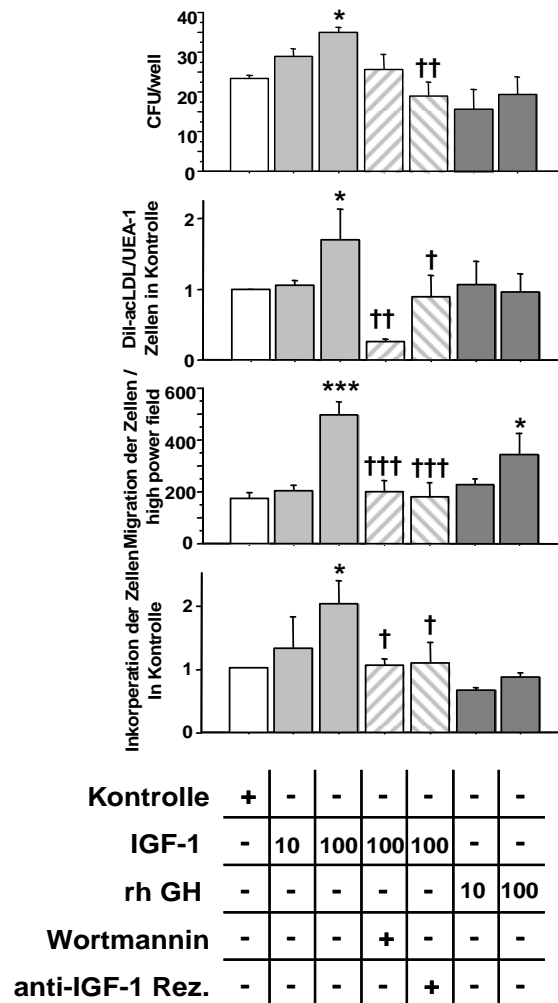
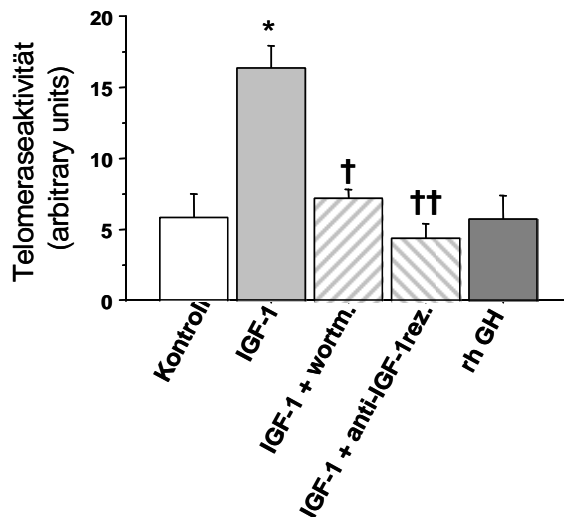


Abb. 8B



**Abbildung 8: Effekte von IGF-1 und rhGH auf die Funktion endothelialer Progenitorzellen**

Die kolonieformenden Einheiten (CFU), die Differenzierung von dil-acLDL<sup>+</sup>/UEA-1<sup>+</sup>-Zellen (dil-acLDL/UEA-1), die Migrationskapazität (Migration) und die Inkorporation der EPC in vaskuläre Strukturen auf Matrigel nach 24-stündiger Behandlung mit rhGH (100 ng/ml), IGF-1 (100 ng/ml), und der gleichzeitigen Behandlung von IGF-1 mit dem PI3K-Inhibitor Wortmannin (100 nM) oder einem inhibitorischen IGF-1-Rezeptor-Antikörper (10 µg/ml). Die repräsentativen Bilder (A) und die statistische Zusammenfassung (B) basieren auf einem Minimum von n=5 Experimenten pro Studiengruppe. \*=p<0,05 vs Kontrolle; \*\*\*=p<0,0001 vs Kontrolle; †=p<0,05 vs IGF-1 (100 ng/ml); ††=p<0,01 vs IGF-1 (100ng/ml); †††=p<0,0001 vs IGF-1 (100ng/ml).



**Abbildung 9: Telomeraseaktivität in kultivierten EPC nach Behandlung mit IGF-1 oder rhGH**

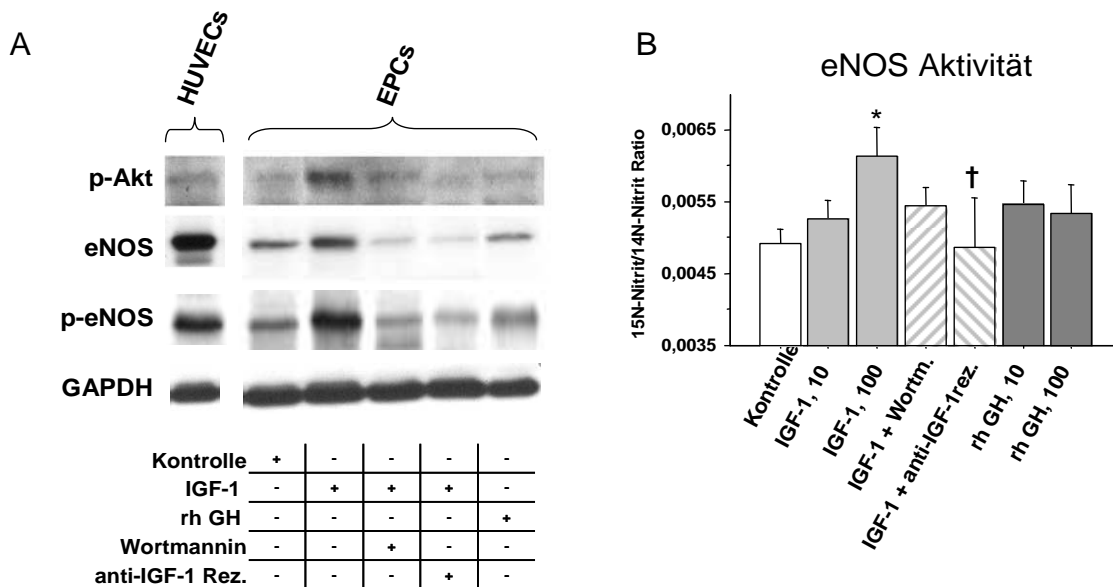
Dargestellt ist die Telomeraseaktivität in den kultivierten EPC nach Behandlung mit rhGH (100 ng/ml), IGF-1 (100 ng/ml) und der gleichzeitigen Behandlung von IGF-1 mit dem PI3K-Inhibitor Wortmannin (100 nM) oder einem inhibitorischen IGF-1-Rezeptor - Antikörper (10 µg/ml). Mindestens n=5 Experimente wurden pro Studiengruppe durchgeführt. \*= $p < 0,001$  vs Kontrolle; †= $p < 0,001$  vs IGF-1 (100 ng/ml); ††= $p < 0,0001$  vs IGF-1 (100 ng/ml).

### 3.5 Erhöhte PI3Kinase-/Akt-vermittelte Expression und Phosphorylierung der eNOS in EPC durch IGF-1

Sowohl die Funktion als auch die Differenzierung der EPC wird zum Teil durch die Aktivität der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase reguliert. Deswegen wurde außerdem untersucht, ob eine rhGH- oder eine IGF-1-Behandlung die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-/Akt-/eNOS-Signalkaskade beeinflusst. Tatsächlich induzierte die IGF-1-Gabe sowohl die Akt-Phosphorylierung, als auch die Expression und Phosphorylierung an Ser1177 von eNOS (Abbildung 10A). Ferner erhöhte die IGF-1-Behandlung auch die eNOS-Aktivität (Abbildung 10B).

Die Hemmung der PI3K verhinderte die IGF-1-vermittelte Phosphorylierung von Akt, und reduzierte die eNOS-Expression und Phosphorylierung. Weiterhin bewirkte die Gabe eines inhibitorischen Antikörpers gegen den IGF-1-Rezeptor sowohl eine Hemmung der PI3K-/Akt-/eNOS-Signalkaskade (Abbildung 10A) als auch der eNOS-Aktivität (Abbildung 10B).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigte sich nach der Behandlung mit rhGH nur eine geringe Auswirkung auf die eNOS-Expression. Das Wachstumshormon beeinflusste die Phosphorylierung von Akt oder eNOS bzw. die eNOS-Aktivität nicht (Abbildung 10A).



**Abbildung 10: eNOS-Expression, -Phosphorylierung und -Funktion in humanen EPC**

A.: Proteinexpression von phosphoryliertem Akt, eNOS, Phospho-eNOS und GAPDH nach 8-stündiger Inkubation der kultivierten EPC mit Wachstumshormon (rhGH; 100 ng/ml) oder IGF-1 (100 ng/ml) mit oder ohne Wortmannin (100 nM; PI3K-Inhibitor) oder einem inhibitorischen IGF-1-Rezeptorantikörper (10 µg/ml). B.: NOS-Aktivität gemessen an der Konversion von L-[guanidino-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]Arginin zu <sup>15</sup>N-Nitrit in humanen EPC-Kulturen. \*= $p < 0.05$  vs Kontrolle; †= $p < 0.05$  vs IGF-1 (100ng/ml). Mindestens n=4 Experimente wurden pro Studiengruppe durchgeführt.

## 4 Diskussion

Mit zunehmendem Alter steigt das Risiko, arteriosklerotische Veränderungen zu entwickeln. Eine mögliche Ursache ist die reduzierte Anzahl und die Dysfunktion der EPC, wodurch es zu einer mangelhaften Reparatur von Gefäßläsionen kommt. Da dies ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung kardiovaskulärer Erkrankungen darstellt, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwiefern diese Prozesse beeinflusst werden können und welche Mechanismen für diese Veränderungen verantwortlich sind.

Die Ergebnisse dieser Studie legen dar, daß die altersbedingt verminderte Anzahl und beeinträchtigte Funktion der zirkulierenden EPC durch Wachstumshormon induzierten Anstieg des IGF-1-Spiegels verbessert werden kann. Dies wurde sowohl durch in-vivo- als auch in-vitro-Untersuchungen bestätigt.

Die durchgeführte klinische Studie zeigt, daß bei den älteren Studienteilnehmern die Zahl und Dysfunktion der EPC durch eine Wachstumshormontherapie gesteigert werden kann. Nach zehntägiger Behandlung mit rekombinantem humanem Wachstumshormon nähern sich die Serumspiegel und die Funktionsfähigkeit der EPC den Werten der jungen Vergleichsgruppe an.

Zusätzlich durchgeführte in-vitro-Experimente, in welchen die Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren auf die EPC untersucht wurde, erweitern und untermauern die Ergebnisse der klinischen Studie. So zeigt sich, daß der Wachstumsfaktor IGF-1 die Proliferations-, Migrations- und Überlebensfähigkeit der EPC deutlich erhöht. Darüber hinaus kam es durch die Behandlung mit IGF-1 zu einem Anstieg über die PI3K-/Akt-Signalkaskade gesteuerte eNOS-Phosphorylierung und -Aktivität. Dies erklärt zumindest zum Teil die verbesserte Funktion der mit IGF-1 behandelten Zellen. Die Blockade des IGF-1-Rezeptors durch einen spezifischen IGF-1-Rezeptorantikörper bzw. Zugabe des PI3K-Inhibitors Wortmannin hoben die IGF-1-vermittelten Effekte dagegen auf.

Sowohl die reduzierte Anzahl an zirkulierenden EPC<sup>78</sup> als auch deren funktionelle Beeinträchtigung<sup>17</sup> bestätigen Ergebnisse früherer Studien<sup>17,78</sup>. Die alters-

bedingte Abnahme der EPC ist unabhängig von der Prävalenz anderer kardiovaskulärer Risikofaktoren oder der kardialen Funktion<sup>78</sup>. Neueste Studien belegen außerdem, daß Patienten mit reduzierten zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse und Herztod unabhängig von anderen kardiovaskulären Risikofaktoren haben<sup>39</sup>.

Therapien, die die EPC-Spiegel und -Funktion wiederherstellen, könnten daher womöglich eine wichtige Rolle für die zukünftige Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen spielen. So wurde beispielsweise erstmalig eine Stimulation der EPC unter Verwendung bestimmter Statine, die diese eNOS-abhängig mobilisieren<sup>42</sup>, beobachtet<sup>34,39,79</sup>.

Sowohl die Mobilisierung der EPC aus dem Knochenmark zu der Läsionsstelle in der Blutbahn als auch die Revaskularisierung ischämischer Gebiete wird zum Teil von NO reguliert<sup>32,34,80</sup>. Da bei wachstumshormondefizienten Patienten die systemische NO-Bildung gestört ist, haben diese ein erhöhtes Risiko, eine koronare Herzerkrankung zu entwickeln<sup>57,81,82</sup>. Die Behandlung wachstumshormondefizienter Patienten mit rekombinantem humanem Wachstumshormon normalisierte die von IGF-1 stimulierte NO-Produktion. Gleichzeitig senkte sich der periphere, arterielle Druck und sowohl morphologische als auch funktionelle arteriosklerotische Veränderungen bildeten sich in den großen Arterien zurück<sup>55,57,83</sup>. Thum et al. wiesen nach, daß IGF-1 der Hauptstimulus für die verstärkte NO-Bildung nach Wachstumshormonbehandlung ist<sup>84</sup>. Im Tierversuch zeigte sich eine Erhöhung der IGF-1-Spiegel sowie der eNOS-Expression allerdings erst nach einer siebentägigen Wachstumshormonsubstitution. Keine Verbesserung konnte hingegen während einer zweitägigen GH-Kurztherapie erzielt werden.

Mehrere klinische Studien zeigen, daß niedrige IGF-1-Spiegel mit einem erhöhten Risiko für eine koronare Herzerkrankung assoziiert sind<sup>18,85</sup>. Weiterhin zeigte sich, daß die kardiovaskuläre Mortalität älterer Menschen bei erhöhten IGF-1-Spiegeln reduziert ist<sup>85</sup>. Diese Ergebnisse führen zu der Schlußfolgerung, daß die Wiederherstellung der physiologischen IGF-1-Spiegel eine protektive Wirkung auf die Progression kardiovaskulärer Erkrankungen haben könnte. Die

hier vorgelegten Daten bezüglich der IGF-1-vermittelten Stimulation der regenerativ wirkenden EPC untermauern die gefäßprotektiven Eigenschaften von IGF-1. Dies muß jedoch in weiteren Studien geprüft werden<sup>46,47</sup>, bevor es für einen therapeutischen Einsatz in Frage kommen könnte, da es bisher noch keine Studien über mögliche Nebeneffekte einer Langzeitsubstitution von Wachstumshormon bei nichtwachstumsdefizienten Menschen gibt.

Im Herzen induziert das IGF-1-Rezeptorsystem nicht nur eine Proliferation kardialer Stammzellen, sondern auch eine Erhöhung der Telomeraseaktivität, wodurch es der zellulären Alterung entgegenwirkt. Zusätzlich bewahrt es die funktionelle Aktivität kardialer Stammzellen<sup>86,87,88</sup>. Die Regeneration des Myokards nach einer Ischämie bzw. Myokardinfarkt wird unter anderem durch IGF-1 gesteuert<sup>89</sup>. Diese Annahme wird durch die Arbeiten von Kofidis et al. unterstützt. Diese zeigen, daß nach Transfer embryonaler Stammzellen IGF-1 deren Differenzierung und Funktion fördert und auf diese Weise zur myokardialen Restitution beiträgt<sup>90</sup>. In unserer Studie zeigte sich, daß EPC ebenfalls den aktiven IGF-1R exprimieren. Der IGF-1R wurde in zwei verschiedenen EPC-Zelltypen nachgewiesen: endotheliale CFU und monozytäre EPC<sup>75</sup>. Außer auf kardiovaskulären Vorläuferzellen wird der IGF-1R auch auf erytroiden<sup>91</sup>, osteogenen<sup>92</sup> und neuralen<sup>93</sup> Progenitorzellen exprimiert. Dies legt den Schluß nahe, daß der IGF-1R generell auf Progenitorzellen exprimiert sein könnte. Hierdurch eröffnet sich ein neues Gebiet therapeutischer Möglichkeiten, mittels Wachstumshormonen die Funktion gestörter Vorläuferzellen zu verbessern und damit kardiovaskulären Erkrankungen entgegenzuwirken<sup>28</sup>.

Desweiteren zeigen die aktuellen Daten eine Verbindung zwischen IGF-1 und der EPC-Funktion. Die altersabhängige Reduktion der IGF-1-Spiegel und der zirkulierenden EPC sowie die beeinträchtigte Funktion der endothelialen Vorläuferzellen stehen wahrscheinlich in einem direkten Zusammenhang. Eine zehntägige rhGH-Therapie reichte aus, um die Spiegel der zirkulierenden EPC der älteren Studienteilnehmer auf das Niveau der jüngeren Kontrollgruppe anzuhäben. Da die gestörte Funktion der EPC bei älteren Patienten mit chronischer ischämischer Herzerkrankung das therapeutische Potential für eine klinische Zelltherapie womöglich limitieren könnte<sup>94</sup>, hat die Erkenntnis, daß die Behand-



lung mit rhGH die funktionelle Einschränkung der EPC älterer Menschen positiv beeinflusst, wichtige klinische Bedeutung. Es stellt die Möglichkeit in Aussicht, die Funktion der beeinträchtigten EPC, vor allem bei älteren Menschen, zu verbessern und dadurch den Erfolg einer Zelltransplantation, z. B. zu einer kardialen Regeneration nach Myokardinfarkt, zu optimieren.

Weitere Hinweise für eine Korrelation zwischen IGF-1 und EPC kommen auch von früheren in-vitro-Studien. IGF-1 kann direkt der endothelialen Dysfunktion entgegenwirken, indem es die NO-Produktion verstärkt und die Insulinsensitivität erhöht<sup>53</sup>. IGF-1 steigert die NOS-Aktivität durch Interaktion mit dem Tyrosinkinaserzeptor, der dann die PI3K aktiviert, was in Folge zu einer Induktion der Kinase Akt führt<sup>95,96</sup>. Die Aktivierung dieser Signalkaskade fördert im Herzen Zellwachstum sowie das Überleben von Zellen<sup>11</sup>. Die aktuelle Studie zeigt erstmalig, daß IGF-1 die PI3K/Akt-vermittelte eNOS-Aktivität in humanen EPC steigert. Diese Aktivierung trägt wahrscheinlich zu der beobachteten Verbesserung der EPC-Funktion nach IGF-1-Behandlung bei. Interessanter Weise ist dieser Effekt IGF-1 abhängig. Die alleinige Behandlung der Zellen mit rhGH in den in-vitro-Experimenten zeigte kaum eine nennenswerte Veränderung der EPC-Funktion. Eine Blockade des IGF-1-Rezeptors mittels spezifischen Rezeptorantikörpern unterbrach dagegen die Signalkaskade und verhinderte auf diese Weise den IGF-1-vermittelten Effekt auf die Zellzahl und die Funktionsverbesserung der EPC. Diese Ergebnisse wurden zusätzlich im Tierversuch bestätigt. Nach siebentägiger Wachstumshormonbehandlung von Mäusen konnte eine erhöhte Aktivität der NO-Synthase nachgewiesen werden. Durch Blockade des IGF-1-Rezeptors wurde dieser Effekt aufgehoben. Bei Behandlung der Tiere mit rekombinanten IGF-1 kam es ebenfalls zu einer erhöhten NO-Aktivität<sup>84</sup>.

Die Überexpression von IGF-1 in transgenen Zelllinien führt zu einer erhöhten Telomeraseaktivität und zur Stimulation der funktionellen Kapazität alternder kardialer Stammzellen<sup>86</sup>. Dies ist eine wichtige Erkenntnis, da sowohl chronischer oxidativer Streß<sup>97</sup> als auch endogene NO-Inhibitoren die Telomerintegrität gefährden, die Alterung der EPC beschleunigen und schließlich zu reduzierten EPC-Zahlen führen<sup>12,98,99</sup>. Neueste Studien deuten darauf hin, daß Gefäßzellalterung durch Telomerverkürzung zur Atherogenese beiträgt<sup>73</sup>. Diese Studie

zeigt nun, daß erhöhte IGF-1-Spiegel auch die Telomeraseaktivität der endothelialen Vorläuferzellen sowohl in vitro als auch in vivo steigern. Dies könnte vor allem bei Erkrankungen mit beschleunigter Zellalterung, wie der Arteriosklerose, von wichtiger klinischer Bedeutung sein.

Obwohl die Wachstumshormone GH und IGF-1 in die Erhaltung normaler Körperfunktionen involviert sind, tragen sie auch zur Progression einiger Tumorerkrankungen bei<sup>100,101,102,103</sup>. So werden z. B. bei Brust-, Kolon-, Prostata- und Lungenkarzinomen erhöhte IGF-1-Spiegel nachgewiesen. Außerdem exprimieren die entarteten Zellen dieser Tumoren den IGF-1R<sup>100</sup>. Deswegen sollten weitere klinische Untersuchungen zur Rolle von Wachstumshormonen in der Stammzellbiologie mit Vorsicht durchgeführt werden. Zwar gibt es bei wachstumshormondefizienten Patienten während der Substitutionstherapie keine erhöhte Inzidenz von Krebserkrankungen<sup>104</sup>, es fehlen jedoch Kenntnisse der Wirkung einer längeren Wachstumshormonerhöhung bei älteren, nicht wachstumshormondefizienten Erwachsenen. Es werden folglich Langzeitstudien zur Bestimmung der Effizienz und der Sicherheit einer rhGH-Therapie bei älteren, nicht wachstumshormondefizienten Erwachsenen notwendig sein.

Auch in Hinsicht auf neue Therapiestrategien werden weitere prospektive Studien benötigt, um die Effekte der rhGH-vermittelten IGF-1-Erhöhung bei Gefäßerkrankungen, die mit reduzierter EPC-Anzahl und gestörter Funktion einhergehen, zu untersuchen.

Die Daten dieser Studie belegen, daß IGF-1 ein wichtiger Regulator der Funktion und Anzahl humaner EPC ist. Die Korrektur der altersbedingt reduzierten Zahl und Dysfunktion der EPC durch den wachstumshormonvermittelten Anstieg von IGF-1 könnte die endotheliale Regeneration bei Gefäßschädigung fördern und dadurch kardiovaskulären Ereignissen womöglich vorbeugen.

## 5 Zusammenfassung

Im Alter reduziert sich die Anzahl und Funktion zirkulierender endothelialer Progenitorzellen (EPC). Gleichzeitig sinken die Spiegel des Insulin-like growth factor-1 (IGF-1), und das Risiko, arteriosklerotische Läsionen auszubilden, steigt. Unsere Daten weisen auf einen direkten Zusammenhang zwischen Alter, IGF-1-Spiegeln sowie Zahl und Funktion zirkulierender EPC hin.

IGF-1 stimuliert nicht nur die Angiogenese, sondern besitzt auch vasoprotektive Eigenschaften. In dieser Studie wurde die Anzahl und Funktion der EPC gesunder männlicher Probanden (n=16) vor und nach 10tägiger Behandlung mit humanem rekombinantem Wachstumshormon (0,4 mg s.c./Tag) untersucht. Als Kontrollgruppe dienten junge Studienteilnehmer (n=10). Sowohl ihre IGF-1-Spiegel ( $223,1 \pm 15,7$  ng/ml vs  $126,0 \pm 7,2$  ng/ml) als auch die Anzahl zirkulierender CD133<sup>+</sup>/VEGF-2<sup>+</sup> EPC waren im Vergleich mit der älteren Teilnehmergruppe höher. Zusätzlich zeigten sich eine bessere EPC-Funktion und eine höhere Telomeraseaktivität. Die Behandlung mit Wachstumshormon erhöhte die IGF-1-Spiegel und die Anzahl der zirkulierenden EPC bei den älteren Probanden deutlich. Auch zeigten sie eine erhöhte Fähigkeit, Kolonien zu bilden und eine vermehrte Migrationskapazität. Außerdem war der Einbau in gefäßähnliche Strukturen durch Wachstumshormonbehandlung verbessert und die Telomeraseaktivität mit der jungen Kontrollgruppe vergleichbar.

In vitro-Untersuchungen zeigten, daß Expression, Phosphorylierung und Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS) in EPC von IGF-1 mittels des IGF-1-Rezeptors stimuliert werden. IGF-1 erhöht in vivo und in vitro die Funktion der EPC über den IGF-1-Rezeptor sowie den Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg.

Die durch Wachstumshormon vermittelte Erhöhung von IGF-1 könnte eine neue Therapiestrategie zur Verminderung vaskulärer Defekte bei Patienten mit verminderter Anzahl und Funktion von EPC darstellen. Weitere Untersuchungen sowie klinische Studien sollten durchgeführt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

<sup>1</sup> Hach-Wunderle V. in Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J. (Hrsg.). 2004. Basislehrbuch Innere Medizin. Urban & Fischer Verlag, 3. Auflage. S. 207

<sup>2</sup> Pschyrembel: Klinisches Wörterbuch. 2002. De Gruyter Verlag, 259. Auflage. S. 126

<sup>3</sup> Libby P. in Dietel M., Suttorp N., Zeitz M. (Hrsg.). 2005. Harrison's Innere Medizin. Deutsche Ausgabe in Zusammenarbeit mit der Charité. ABW Wissenschaftsverlag, 16. Ausgabe. S. 1528-32

<sup>4</sup> Krautzig S., Kurowski V. in Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J. (Hrsg.). 2004. Basislehrbuch Innere Medizin. Urban & Fischer Verlag, 3. Auflage. S. 65-68

<sup>5</sup> Thum T., Borlak J. 2004. Mechanistic role of cytochrom P450 monooxygenases in oxidized low-density lipoprotein-induced vascular injury-therapy through LOX-1 receptor antagonism? *Circ Res* 94,e1-e13

<sup>6</sup> Behrendt D., Ganz P. 2002. Endothelial Function: From Vascular Biology to Clinical Applications. *Am J Cardiol* 90 (suppl),40L-48L

<sup>7</sup> Falk E. 2006. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 47 (8 suppl), C7-12

<sup>8</sup> Libby P. in Dietel M., Suttorp N., Zeitz M. (Hrsg.). 2005. Harrisons Innere Medizin. Deutsche Ausgabe in Zusammenarbeit mit der Charité. ABW Wissenschaftsverlag, 16. Ausgabe. S. 1531

<sup>9</sup> Hach-Wunderle V. in Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J. (Hrsg.). 2004. Basislehrbuch Innere Medizin. Urban & Fischer Verlag, 3. Auflage. S. 208

<sup>10</sup> Strehlow K. et al. 2003. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. Circulation 107,3059-65

<sup>11</sup> Sussman M.A., Anversa P. 2004. Myocardial aging and senescence: where have the stem cells gone? Annu Rev Physiol 66,29-48

<sup>12</sup> Thum T., Tsikas D., Stein S., Schultheiss M., Eigenthaler M., Anker S. et al. 2005. Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginin. J Am Coll Cardiol 46, 1693-701

<sup>13</sup> Boger RH., Vallance P., Cooke JP. 2003. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a key regulator of nitric oxide synthase. Atherosclerosis Suppl 4,1-3

<sup>14</sup> Boger RH. 2003. When the endothelium cannot say 'NO' anymore: ADMA, an endogenous inhibitor of NO synthase, promotes cardiovascular disease. Europ Heart. 24, 1901-02

<sup>15</sup> Libby P. in Dietel M., Suttrop N., Zeitz M. (Hrsg.). 2005. Harrisons Innere Medizin. Deutsche Ausgabe in Zusammenarbeit mit der Charité. ABW Wissenschaftsverlag, 16. Ausgabe. S. 1533-36

<sup>16</sup> Ferrari A., Radaelli A., Centola M. 2003. Aging and the cardiovascular system. *J Appl Physiol* 95, 2591-97

<sup>17</sup> Heiss C., Keymel S., Niesler U., Ziemann J., Kelm M., Kalka C. 2005. Impaired progenitor cell activity in age - related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 1441-8

<sup>18</sup> Juul A., Scheike T., Davidsen M., Gyllenborg J., Jorgensen T. 2002. Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease - a population-based case-control study. *Circulation* 106,939-44

<sup>19</sup> Esper RJ., Nordaby, RA. et al. 2006. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol* 5,4

<sup>20</sup> Hristov M., Erl W., Weber P. 2003. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23,1185-89

<sup>21</sup> Garmy - Susini B., Varner J.A. 2005. Circulating endothelial progenitor cells. *British Journal of Cancer* 93,855-58

<sup>22</sup> Hristov M., Weber Chr. 2004. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med* 8,498-508

<sup>23</sup> Aicher A, Zeiher A, Dimmeler S. 2005. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension* 45,321-325

<sup>24</sup> Urbich C, Dimmeler S. 2004. Endothelial Progenitor Cells: Functional characterization. *Trends Cardiovasc Med* 14,318-22

<sup>25</sup> Khakoo A, Finkel T. 2005. Endothelial progenitor cells. *Annu Rev Med* 56,79-101

<sup>26</sup> Rauscher F., Goldschmidt - Clermont P., Davis B., Wang T. et al. 2003. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation*. 108,457-463

<sup>27</sup> Lin Y et al. 2000. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 105,71-77

<sup>28</sup> Thum T, Bauersachs J. 2005. Endothelial progenitor cells as potential drug targets. *Cardiovas & Haemat Dis*,277-86

<sup>29</sup> Urbich C., Aicher A., Heeschen C., Dernbach E. et al. 2005. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 39,733-42

<sup>30</sup> Bahlmann F.H., De Groot K., Spandau J.M., Landry A.L., Hertel B., Duckert T., Boehm S.M., Menne J., Haller H., Fliser D. 2004. Erythropoietin regulates progenitor cells. *Blood* 103,921-6

<sup>31</sup> Heeschen C. et al. 2004. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 103,4388

<sup>32</sup> Laufs U. Werner, N., Link, A., Endres, M., Wassmann, S., Jurgens, K., Miche, E., Bohm, M., Nickenig, G.. 2004. Physical training increases endothelial pro-

genitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 109,220-6

<sup>33</sup> Orlandi A., Bochaton-Piallat M - L., Gabbiani G., Giusto Spagnoli L. 2006. Aging, smooth muscle cells and vascular pathobiology: Implications for atherosclerosis. *Atherosclerosis* 188,221-30

<sup>34</sup> Aicher A., Heeschen C., Mildner-Rihm C., Urbich C., Ihling C., Technau - Ihling K., Zeiher A., Dimmeler S. 2003. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nature medicine* 1370-76

<sup>35</sup> Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T. et al. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 964-967

<sup>36</sup> Scheubel R et al. 2003. Aging and circulating progenitor cells. *J Am Coll Cardiol* 2073-80

<sup>37</sup> Hill J., Zalos G., Halcox J., Schenke W., Waclawiw M., Quyyumi A., Finkel T. 2003. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348,593-600

<sup>38</sup> Vasa M., Fichtlscherer S., Aicher A., Adler K., Urbich C., Martin H., et al. 2001. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 89,1-7

<sup>39</sup> Schmidt-Lucke, C., Rossig, L., Fichtlscherer, S., Vasa, M., Britten, M., Kamper, U., Dimmeler, S., Zeiher, AM. 2005. Reduced number of circulating endo-



thelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 111,2981-7

<sup>40</sup> Asahara T., Murasawa S. 2004. Endothelial progenitor cells for vasculogenesis. *Physiology* 20,36-42

<sup>41</sup> Thum T., Fraccarollo D., Galuppo P., Tsikas D., Frantz S., Ertl G., Bauersachs J. 2006. Bone marrow molecular alterations after myocardial infarction: Impact on endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res* 70,50-60

<sup>42</sup> Dimmeler S., Aicher A. et al. 2001. HMG - CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase / Akt pathway. *J Clin Invest* 108,391-97

<sup>43</sup> Takemoto M., Liao J.K. 2001. Pleiotropic effects of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21,1712-19

<sup>44</sup> Davidson MH. 2005. Clinical significance of statin pleiotropic effects - hypotheses versus evidence. *Circulation* 111,2280-81

<sup>45</sup> Rutishauser J. 2006. The role of statins in clinical medicine - LDL-cholesterol lowering and beyond. *Swiss Weekly Med* 136,41-49

<sup>46</sup> Carter C., Ramsey M., Sonntag W. 2002. A critical analysis of the role of growth hormone and IGF-1 in aging and lifespan. *TRENDS in genetics*, 295-300

<sup>47</sup> Anversa, P. 2005. Aging and longevity: the IGF-1 enigma. *Circ Res* 97,411-

<sup>48</sup> Delafontaine P., Song Y.-H., Li Y. 2004. Expression, regulation, and function

of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24,435-444

<sup>49</sup> Laughlin G., Barrett-Connor E., Criqui M.H., Kritz-Silverstein D. 2004. The prospective association of serum insulin-like growth factor I (IGF-1) and IGF-binding protein-1 levels with all cause and cardiovascular disease mortality in older adults: the Rancho Bernardo Study. *J Clin Endocrinol Metab* 89,114-20

<sup>50</sup> Kaplan R., Strickler H., Rohan T., Muzumdar R., Brown D. 2005. Insulin-like growth factors and coronary heart disease. *Cardiology in review*, 35-39

<sup>51</sup> Frystyk J., Ledet T., Møller N., Flyvbjerg A., Ørskov H. 2002. Cardiovascular disease and insulin-like growth factor I. *Circulation* 106,893-895

<sup>52</sup> Delafontaine P. 1995. Insulin-like growth factor I and its binding proteins in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 30,825-34

<sup>53</sup> Conti E., Carrozza C., Capoluongo E., Volpe M., Crea F. et al. 2004. Insulin-like growth factor-1 as a vascular protective factor. *Circulation* 110,2260-65

<sup>54</sup> Roberts, N., Jahangiri M., Xu Q. 2005. Progenitor cells in vascular disease. *J Cell Mol Med* 583-91

<sup>55</sup> Pfeifer M., Verhovec R. et al. 1999. Growth Hormone (GH) treatment reverses early atherosclerotic changes in GH-deficient adults. *JCE & M* 84,453-457

<sup>56</sup> Izhar U., Masdai D., Richardson D.M. et al. 2000. Insulin and insulin-like growth factor-1 cause vasorelaxation in human vessels in vitro. *Coron Artery Dis* 11,69-76

<sup>57</sup> Boger RH. et al. 1996. Nitric oxide may mediate the hemodynamic effects of recombinant growth hormone in patients with acquired growth hormone deficiency. A double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Invest* 98,2706-13

<sup>58</sup> Zeng G., Quon M.J.. 1996. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. *J Clin Invest* 98,894-8

<sup>59</sup> Li B., Setoguchi M., Wang X. et al. 1999. Insulin-like growth factor-1 attenuates the detrimental impact of nonocclusive coronary artery constriction on the heart. *Circ Res* 84,1007-19

<sup>60</sup> Redaelli G., Malhotra A., Li B. et al. 1998. Effects of constitutive overexpression of insulin-like growth factor-1 on the mechanical characteristics and molecular properties of ventricular myocytes. *Circ Res* 82,594-603

<sup>61</sup> Kluge A. et al. 1997. Coordinated expression of the insulin-like growth factor system after microembolisation in porcine heart. *Cardiovasc Res* 33,324-31

<sup>62</sup> Conti E., Andreotti F., Sciahbasi A., Riccardi P., Marra G. et al. 2001. Markedly reduced insulin-like growth factor-1 in the acute phase of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 26-32

<sup>63</sup> Murphy LJ. et al. 1995. Phenotypic manifestations of insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) und IGFBP-3 overexpression in transgenic mice. *Prog Growth Factor Res* 6,425-32

<sup>64</sup> Napoli C., de Nigris F., Williams-Ignarro S., Pignalosa O., Sica V., Ignarro L.J. 2006. Nitric oxide and atherosclerosis: An update. *Nitric oxide* 15,265-79

<sup>65</sup> Haendeler J. 2005. Nitric oxide and endothelial cell aging. *Eur J Clin Pharmacol* 62,137-140

<sup>66</sup> Davignon J., Ganz P. 2004. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation* 109 Suppl 3,27-32

<sup>67</sup> Mitchell BJ., Griffiths JE., Mitchelhill KI. et al. 1999. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Current biology* 9,845-848

<sup>68</sup> Zeiher, AM. 1996. Endothelial vasodilator dysfunction: pathogenetic link to myocardial ischaemia or epiphenomenon? *Lancet* 348,10-12

<sup>69</sup> Dimmeler S. et al. 1997. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CRP32-like proteases: a mechanistic clue to the response to injury hypothesis. *Circulation* 95,1760-63

<sup>70</sup> Cai H., Harrison DG. 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*, 87840-44

<sup>71</sup> Hoffmann J., Haendeler J. et al. 2001. Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide. *Circ Res* 89,709-15

<sup>72</sup> Haendeler J., Hoffmann J., Rahman S., Zeiher A.M., Dimmeler S. 2003. Regulation of telomerase activity and anti-apoptotic function by protein-protein interaction and phosphorylation. *FEBS Letters* 536,180-186

<sup>73</sup> Minamino T., Miyauchi H., Yoshida T., Ishida Y., Yoshida H., Komuro I. 2002. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis - role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation* 105,1541-1544

<sup>74</sup> [www.miltenyibiotec.com](http://www.miltenyibiotec.com), 2006

<sup>75</sup> Romagnani P., Annunziato F., Liotta F., Lazzeri E., Mazzinghi B., Frosali F., Cosmi L., Maggi L., Lasagni L., Scheffold A. et al. 2005. CD14+ CD34 low cells with stem cell phenotypic and functional features are the major source of circulating endothelial progenitors. *Circ Res* 97,314-22

<sup>76</sup> Vasa M., Fichtlscherer S., Adler K., Aicher A., Martin H., Zeiher A.M., Dimmeler S. 2001. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 103,2885-90

<sup>77</sup> Thum T., Tsikas D., Frolich J.C., Borlak J. 2003. Growth hormone induces eNOS expression and nitric oxide release in a cultured human endothelial cell line. *FEBS Lett* 555,567-71

<sup>78</sup> Scheubel R.J., Zorn, H., Silber, R.E., Kuss, O., Morawietz, H., Holtz, J., Simm, A. 2003. Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor

cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol* 42,2073-80

<sup>79</sup> Landmesser, U., Engberding, N., Bahlmann, F.H., Schaefer, A., Wiencke, A., Heineke, A., Spiekermann, S., Hilfiker-Kleiner, D., Templin, C., Kotlarz, D., et al. 2004. Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 110,1933-39

<sup>80</sup> Walter D.H., Rittig K., Bahlmann F.H., Kirchmair R., Silver M., Murayama T., Nishimura H., Losordo D.W., Asahara T., Isner J.M. 2002. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bonemarrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 105,3017-24

<sup>81</sup> van den Beld A.W., Bots M.L., Janssen J.A., Pols H.A., Lamberts S.W., Grobbee D.E. 2003. Endogenous hormones and carotid atherosclerosis in elderly men. *Am J Epidemiol* 157,25-31

<sup>82</sup> Svensson J., Bengtsson B.A., Rosen T., Oden A., Johannsson G. 2004. Malignant disease and cardiovascular morbidity in hypopituitary adults with or without growth hormone replacement therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 89,3306-12

<sup>83</sup> Thum T., Bauersachs J. 2005. Growth hormone regulates vascular function - what we know from bench and bedside. *Eur J Clin Pharmacol* 13,1-4

<sup>84</sup> Thum T., Fleissner F., Klink I., Tsikas D., Jakob M., Bauersachs J., Stichtenoeth D.O. 2007. Growth hormone treatment improves markers of systemic nitric oxide bioavailability via insulin-like growth factor-I. *JCEM* 92,11

<sup>85</sup> Roubenoff R., Parise H., Payette H.A., Abad L.W., D'Agostino R., Jacques P.F., Wilson P.W., Dinarello C.A., Harris T.B. 2003. Cytokines, insulin-like growth factor 1, sarcopenia, and mortality in very old community-dwelling men and women: the Framingham Heart Study. *Am J Med* 115,429-35

<sup>86</sup> Torella D., Rota M., Nurzynska D., Musso E., Monsen A., Shiraishi I., Zias E., Walsh K., Rosenzweig A., Sussman M.A. et al. 2004. Cardiac stem cell and myocyte aging, heart failure, and insulin-like growth factor-1 overexpression. *Circ Res* 94,514-24

<sup>87</sup> Urbanek K., Rota M., Cascapera S., Bearzi C., Nascimbene A., De Angelis A., Hosoda T., Chimenti S., Baker M., Limana F. et al. 2005. Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival. *Circ Res* 97,663-73

<sup>88</sup> Linke A., Muller P., Nurzynska D., Casarsa C., Torella D., Nascimbene A., Castaldo C., Cascapera S., Bohm M., Quaini F. et al. 2005. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA* 102,8966-71

<sup>89</sup> Musaro A., Giacinti C., Borsellino G., Dobrowolny G., Pelosi L., Cairns L., Ottolenghi S., Cossu G., Bernardi G., Battistini L. 2004. Stem cell-mediated

muscle regeneration is enhanced by local isoform of insulin-like growth factor 1. Proc Natl Acad Sci U S A 101,1206-10

<sup>90</sup> Kofidis T., de Bruin J.L., Yamane T., Balsam L.B., Lebl D.R., Swijnenburg R.J., Tanaka M., Weissman I.L., Robbins R.C. 2004. Insulin - like growth factor promotes engraftment, differentiation, and functional improvement after transfer of embryonic stem cells for myocardial restoration. Stem Cells 22,1239-45

<sup>91</sup> Ratajczak M.Z., Kuczynski W.I., Onodera K., Moore J., Ratajczak J., Kreggenow D.A., DeRiel K., Gewirtz AM. 1994. A reappraisal of the role of insulin-like growth factor I in the regulation of human hematopoiesis. J Clin Invest 94,320-7

<sup>92</sup> Jia D., Heersche J.N. 2000. Insulin-like growth factor-1 and -2 stimulate osteoprogenitor proliferation and differentiation and adipocyte formation in cell populations derived from adult rat bone. Bone 27,785-94

<sup>93</sup> Zaka M., Rafi M.A., Rao H.Z., Luzi P., Wenger D.A. 2005. Insulin-like growth factor-1 provides protection against psychosine-induced apoptosis in cultured mouse oligodendrocyte progenitor cells using primarily the PI3K/Akt pathway. Mol Cell Neurosci 30,398-407

<sup>94</sup> Heeschen C., Lehmann R., Honold J., Assmus B., Aicher A., Walter D.H., Martin H., Zeiher A.M., Dimmeler S. 2004. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. Circulation 109,1615-22



<sup>95</sup> Withers D.J., Burks D.J., Towery H.H., Altamuro S.L., Flint C.L., White M.F. 1999. IRS-2 coordinates IGF-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat Genet* 23,32-40

<sup>96</sup> Isenovic E.R., Meng Y., Divald A., Milivojevic N., Sowers J.R. 2002. Role of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in angiotensin II and insulin-like growth factor-1 modulation of nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells. *Endocrine* 19,287-92

<sup>97</sup> von Zglinicki T. 2002. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 27,339-44

<sup>98</sup> Kurz D.J., Decary S., Hong Y., Trivier E., Akhmedov A., Erusalimsky J.D. 2004. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci* 117,2417-26

<sup>99</sup> Scalera F., Borlak J., Beckmann B., Martens-Lobenhoffer J., Thum T., Tager M., Bode-Boger S.M. 2004. Endogenous nitric oxide synthesis inhibitor asymmetric dimethyl L-arginine accelerates endothelial cell senescence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24,1816-22

<sup>100</sup> LeRoith D., Roberts C.T. Jr. 2003. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett* 195,127-37

<sup>101</sup> Reinmuth N., Liu W., Fan F. et al. 2002. Blockade of insulin-like growth factor I receptor function inhibits growth and angiogenesis of colon cancer, *Clin Cancer Res* 8,3259-69

<sup>102</sup> Stattin P., Bylund A., Rinaldi S. et al. 2000. Plasma insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-binding proteins, and prostate cancer risk: a prospective study. *J Natl Cancer Inst* 92,1910-17

<sup>103</sup> Kaleko M., Rutter W.J., Miller A.D. 1990. Overexpression of the human insulin like growth factor I receptor promotes ligand dependent neoplastic transformation. *Mol Cell Biol* 10,464-73

<sup>104</sup> Verhelst J., Abs R. 2002. Long-term growth hormone replacement therapy in hypopituitary adults. *Drugs* 62,2399-412

## Danksagung

Ein großes Dankeschön an:

meine Familie für Ihre Unterstützung und Korrekturen.

Dr. Thomas Thum für exzellente Betreuung und unterstützende Diskussionen.

meinen Doktorvater Prof. Dr. Johann Bauersachs für die Überlassung dieses interessanten Themas.

Außerdem vielen Dank an:

Sabrina Thum für das Einarbeiten in die Laborarbeit und Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche.

Dr. Ivonne Klink und Dr. Dirk Stichtenoth für die Überlassung der PBMC - Proben der klinischen Studie.

Dr. Dimitrios Tsikas für die Durchführung des eNOS - Aktivitätsassays.

# Lebenslauf

## PERSÖNLICHE DATEN

---

### SARAH HÖBER

Geburtsdatum: 18.06.1980

Geburtsort: Berlin

Adresse: Apenraderstr. 19  
81929 München

Email: sarah.hoeber@web.de

Telefon: 0176/64062572

## AUSBILDUNG

---

1986-2000 Grundschule und Gymnasium in München

1997-1998 Schulaustauschjahr in Strykersville, NY, USA

2000 Abitur

2000-2001 Aupair - Aufenthalt in Paris, Frankreich

2001-2007 Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg

11/2007 Staatsexamen

seit 02/2008 Assistenzärztin in der I. Medizinischen Klinik des Klinikums Passau

München, den 10.02.2008