

**Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I  
der Universität Würzburg**

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

**Entkopplung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase hemmt die  
Mobilisation und Funktion endothelialer Progenitorzellen**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Maximilian Schultheiss**

**aus München**

**Würzburg, August 2008**

## **Referentenblatt**

**Referent:** Prof. Dr. med. Bauersachs

**Koreferent:** Prof. Dr. rer. nat. K. Schuh

**Dekan:** Prof. Dr. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung :** 23.4.2009

**Der Promovend ist Arzt**

## **Inhaltsverzeichnis:**

<b><u>1. Einleitung</u></b>	1
1.1. Die Bedeutung endothelialer Progenitorzellen (EPCs)	1
1.2. Die Struktur der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) und ihre daraus entstehende Funktionsweise	2
1.3. Die Entkopplung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS)	3
1.4. Die EPC-Freisetzung aus dem Knochenmark	4
1.5. Hypothese und Ziele	5
<b><u>2. Material und Methoden</u></b>	
2.1. Tierstudienprotokoll	6
2.2. EPC-Versuche	6
2.2.1. Isolation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMCs)	6
2.2.2. Isolierung der EPCs	7
2.2.3. Charakterisierung und Bestimmung der EPC-Zellzahl	8
2.2.4. Die Messung des Biopteringehaltes der EPCs	12
2.2.5. Detektion reaktiver Stickstoffmonoxid-Verbindungen	12
2.3. Knochenmarksversuche	13
2.3.1. Knochenmarksgewinnung	13
2.3.2. Knochenmarkshomogenisierung	13
2.3.3. Zymographie	13
2.3.4. Westernblot und ELISA	14
2.3.5. SDS-Page bei niedriger Temperatur	15
2.4. Detektion von Sauerstoffradikalen im Knochenmark und in EPCs	15
2.5. Statistische Analyse	16

### **3. Resultate** 17

- 3.1. Verminderte Anzahl und Funktion von EPCs bei diabetischen Patienten -  
Hinweis auf die eNOS-Entkopplung 17
- 3.2. Durch Glukosegabe bei kultivierten EPCs hervorgerufene eNOS-Entkop-  
plung und Superoxidanionen-vmittelte EPC-Dysfunktion - Effekte der Inhi-  
bierung der Proteinkinase C und der Behandlung mit Tetrahydrobiopterin 20
- 3.3. Die eNOS-Entkopplung im Knochenmark bei experimentell hervor-  
gerufenem Diabetes mellitus - Konsequenzen für die zirkulierenden EPCs 24

### **4. Diskussion:** 26

- 4.1. Die Rolle von reaktiven Sauerstoffradikalen bei der EPC-Dysfunktion 28
- 4.2. Die Entkopplung der eNOS 31
- 4.3. Ursachen der verminderten EPC-Spiegel 35
- 4.4. Die Freisetzung der EPCs aus dem Knochenmark 36

### **5. Zusammenfassung** 39

### **6. Literaturverzeichnis** 41

### **7. Anhang zu Material und Methoden** 56

### **8. Abkürzungsverzeichnis** 61

### **9. Danksagung**

## **1. Einleitung:**

### **1.1. Die Bedeutung endothelialer Progenitorzellen (EPCs):**

Bei der Atherogenese spielt die funktionelle und morphologische Integrität des Endothels eine ganz entscheidende Rolle. Am Beginn des Kontinuums kardiovaskulärer Erkrankungen steht häufig eine Schädigung des Endothels. Diese initiale Schädigung führt über verschiedene pathophysiologische Wege zur Atherosklerose und kardiovaskulären Erkrankungen (Dzau et al. 2006). Kardiovaskuläre Risikofaktoren schädigen das Endothel, erzeugen eine Entzündungsreaktion, welche eine Invasion von Monozyten und eine Proliferation von glatten Muskelzellen hervorruft und damit zu der Genese eines atherosklerotischen Plaques führt (Libby et al., 2002).

Trotz großer Anstrengungen ist die Pathogenese der Atheroskleroseentstehung nur unzureichend verstanden. Bisher hat man die Meinung vertreten, dass die entstandenen „Lücken“ im Endothel durch Proliferation der ortsständigen Endothelzellen geschlossen werden. In jüngster Zeit wurde eine vom Knochenmark stammende Zellpopulation identifiziert, welche von zirkulierenden oder aus dem Knochenmark stammenden mononukleären Zellen isoliert werden kann – die EPCs (Asahara et al., 1997; Shi et al., 1998). Weitere Ursprungsquellen der EPCs scheinen unter anderem Darm und Leber zu sein (Aicher et al., 2007; Ergün et al., 2007). Diese Zellen exprimieren eine Vielzahl von endothelialen Oberflächenmarkern, wie Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR2), AC133+ und CD34+, besitzen die Fähigkeit sich als zirkulierende Zellen zu funktionell reifen Endothelzellen auszudifferenzieren und damit geschädigtes Endothel zu ersetzen (Asahara et al., 1998). Zudem scheinen EPCs auch durch parakrine Effekte die Neovaskularisation zu verbessern (Aicher et al., 2003; De Palma et al., 2003). Die EPCs wiederum werden durch T-Zellen mittels angiogenetischer Zytokine in ihrer Funktion stimuliert (Hur et al., 2007).

Bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen konnte gezeigt werden, dass verminderte Spiegel an zirkulierenden EPCs die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit steigern (Hill et al., 2003; Tepper et al., 2002; Vasa et al., 2001; Schmidt-Lucke et al., 2005; Werner et al., 2005). Die Zahl der zirkulierenden EPCs stellt sogar einen eigenständigen prognostischen Parameter für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse dar. Selbst unter Berücksichtigung der traditionellen

Risikofaktoren und weiterer Faktoren, wie z.B. des Voranschreitens der Erkrankung (Schmidt-Lucke et al., 2005) oder der Schwere der Erkrankung sowie der Ejektionsfraktion des linken Ventrikels und weiterer Faktoren (Werner et al., 2005), besteht eine signifikante, negative Korrelation zwischen dem Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen und der Höhe der zirkulierenden EPCs. Die Neovaskularisation konnte durch Injektion von EPCs nach Hinterbein-Ischämie oder in ischämischen Herzen in Tierstudien gesteigert werden (Urbich et al., 2003). In ersten klinischen Studien wurde beobachtet, dass eine Infusion oder Injektion von Progenitorzellen, welche aus dem Knochenmark oder aus der Zirkulation gewonnen worden waren, die Perfusion, Kontraktilität als auch Ejektionsfraktion des Herzens bei ischämischer Herzkrankheit verbesserten (Losordo et al., 2004; Strauer et al., 2002; Assmus et al., 2002; Britten et al., 2003; Zeng et al., 2007).

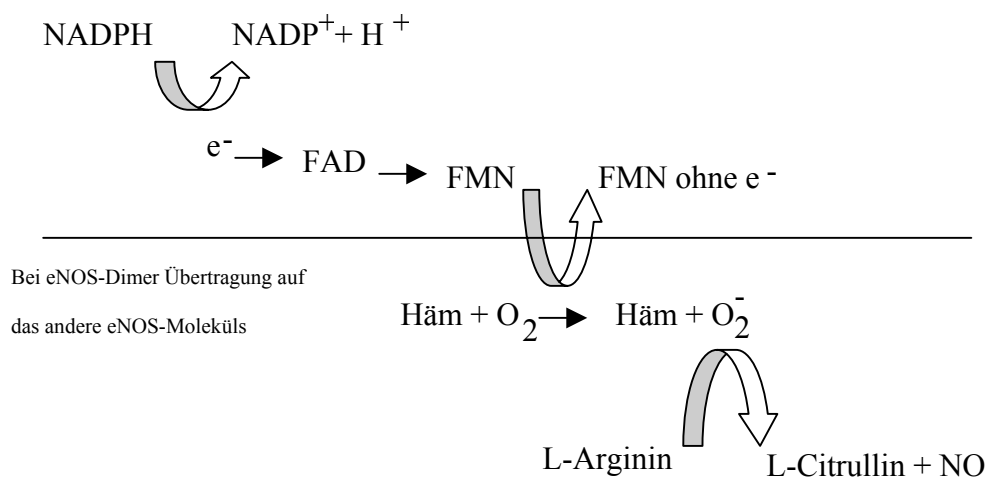
Verminderte EPC-Spiegel wurden auch bei Diabetes mellitus Typ I und II beschrieben (Loomans et al., 2004; Tepper et al., 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Thrombospondin-1 vermittelte Mobilisierung von EPCs bei Patienten mit Diabetes Mellitus vermindert ist, dadurch eine verspätete Reendothelialisierung von verletztem Endothel eintritt und dies folglich die Entstehung einer arteriellen Gefäßkrankheit fördert (Li et al., 2006). Diese Veränderungen sind höchst-wahrscheinlich Bestandteil der Pathogenese der vaskulären Komponente bei Diabetes mellitus (Fadini et al., 2005). Obwohl die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) von größter Bedeutung bei der Regulation der Funktionsweise als auch der Mobilisierung von EPCs ist (Aicher et al., 2003; Verma et al., 2004), gibt es bisher keine Daten über die Rolle der eNOS-Entkopplung und die daraus entstehenden Folgen auf die EPCs bei Diabetes mellitus, welcher einen der bedeutendsten Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellt.

## **1.2. Die Struktur der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) und ihre daraus entstehende Funktionsweise:**

Die NOS besteht aus einer C-terminal lokalisierten Reduktase-Domäne und einer N-terminalen Oxidase-Domäne an der Stickstoffmonoxid (NO) erzeugt wird. Die Oxidase-Domäne enthält eine Häm-Gruppe und kann (6R-)5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>),

molekularen Sauerstoff ( $O_2$ ) und das Substrat L-Arginin binden (Förstermann et al., 1994).

Durch Elektronentransport von reduziertem Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat ( $NADPH^+$ ) über Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) und Flavinmononucleotid (FMN) wird an der Häm-Gruppe  $O_2$  zu aktiviertem Sauerstoff - einem Superoxidanion ( $O_2^-$ ) reduziert.  $O_2^-$  bindet im ersten Schritt der NO-Synthese an L-Arginin und führt damit zur Bildung von N-hydroxy-L-Arginin. Im zweiten Schritt wird N-hydroxy-L-Arginin zu L-Citrullin und NO oxidiert (Stuehr et al., 2001).



### **1.3. Die Entkopplung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS):**

Im Normalzustand produziert die eNOS vasoprotektives NO. Bisher wurde immer angenommen, dass dies die Funktion des Enzyms sei. Diese Funktion kann sich aber unter pathologischen Umständen ändern.

Kardiovaskuläre Risikofaktoren führen hauptsächlich durch die Aktivierung und gesteigerte Expression der NADPH-Oxidase (NOX) zur erhöhten Bildung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) im Endothel und damit zu dessen Dysfunktion. Grund zu dieser Annahme gaben mehrere Tierversuchsmodelle mit induziertem Diabetes mellitus (Hink et al., 2001), spontanen hypertensiven Ratten (SHRs) (Li et al., 2006), experimentell erzeugter Hypercholesterinämie (Wernholtz et al., 1999) und Angiotensin-II-Infusion (Rajagopalan et al., 1996), bei denen jeweils eine NOX-Aktivierung und damit gesteigerte ROS-Bildung gezeigt werden konnten. Infolge dieser

gesteigerten ROS-Bildung scheint die eNOS ihre enzymatische Reaktion zu verändern. Die genauen molekularen Mechanismen der eNOS-Entkopplung sind noch ungeklärt, aber im Endeffekt bildet die eNOS bei hohen ROS-Konzentrationen, wie z.B. in diabetischen Blutgefäßen, selbst  $O_2^-$  und führt dadurch zu einer weiteren Endothelschädigung. Die Aktivierung von  $O_2$  zu  $O_2^-$  wird von der NO-Produktion entkoppelt und dadurch trägt die eNOS selbst zur ROS-Bildung bei.

Eine entscheidende Rolle der NOX bei der Initiierung der pathophysiologischen Vorgänge, die dann zu einer gesteigerten ROS-Bildung bzw. eNOS-Entkopplung führen, ist sehr wahrscheinlich. Grund zur Annahme dieser Vermutung gaben Versuche mit NOX (p47phox)-knockout Mäusen. Hier wurde durch Deoxycorticosteronacetat (DOCA) und erhöhte Kochsalzgabe eine Hypertonie bei Mäusen induziert, welche konsekutiv eine gesteigerte ROS-Bildung zeigten. Diese ROS-Bildung konnte durch Gabe von  $N^G$ -nitro-L-Arginin (L-NNA), einem NOS-Inhibitor, deutlich gesenkt werden. Die p47phox-knockout-Mäuse hatten primär schon eine deutlich reduzierte ROS-Produktion, welche durch Gabe von L-NNA aber auch nicht weiter reduziert werden konnte (Landmesser et al., 2003). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die eNOS der p47phox-knockout Mäuse nicht an der ROS-Bildung beteiligt war. Folglich kam es vielleicht durch die ausgeschaltete NOX zu keiner bedeutenden initialen ROS-Bildung und dadurch konnte es auch zu keiner eNOS-Entkopplung kommen.

#### **1.4. Die EPC-Freisetzung aus dem Knochenmark:**

Das Knochenmark stellt ein Reservoir vieler Stammzellpopulationen dar, so auch von EPCs (Lyden et al., 2001). Normalerweise befinden sich die Stammzellen im Kontakt zu Knochenmarks-Stromazellen, bestehend aus Fibroblasten, Endothelzellen und unter anderem auch Osteoblasten, welche ein Mikroenvironment erzeugen, das die Stammzellen zum größten Teil in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzykluses hält (Cheng et al., 2000). Bei der Freisetzung von EPCs aus dem Knochenmark scheinen Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und NO eine entscheidende Rolle zu spielen (Thum et al. 2006).

Die MMPs können zur Freisetzung von extrazellulären oder an Zelloberflächen gebundenen Zytokinen führen (Vu und Werb, 2000), wie zum Beispiel des Vascular



Endothelial Growth Factors (VEGF), welche ihrerseits dann die Angiogenese regulieren können (Bergers et al., 2000). Ein zweiter wichtiger Mechanismus besteht darin, dass die MMP-9 löslichen Kit-ligand freisetzen kann. Dieser Kit-ligand kann an c-Kit, den Kit-ligand-Rezeptor, binden und damit zu einem Transfer von endothelialen und hämatopoetischen Stammzellen in einen proliferativen Zustand führen (Heissig et al., 2002).

In eNOS-Knockoutmäusen (NOS3<sup>-/-</sup>) findet sich eine defekte VEGF-vermittelte Mobilisierung von EPCs, welche zu einer deutlich erhöhten Sterblichkeit nach Myelosuppression mittels 5-Fluorouracil (5FU) führte. Eine intravenöse Transfusion mit wild-typ Progenitorzellen konnte im Gegensatz zu einer Knochenmarkstransplantation von wild-typ Knochenmark die defekte Neovaskularisation bei den NOS3<sup>-/-</sup> in einem Extremitäten-Ischämie-Modell wiederherstellen (Aicher et al., 2003). Diese Beobachtungen deuten auf die große Bedeutung der durch Stromazellen exprimierten eNOS bei der Mobilisierung von EPCs aus dem Knochenmark hin.

### **1.5 Hypothese und Ziele**

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit ist die Untersuchung der EPC-Dysfunktion und insbesondere der Rolle der eNOS-Entkopplung beim Diabetes mellitus.

Die zugrundeliegende Hypothese ist, dass es beim Diabetes mellitus glukosespezifisch zu einer gesteigerten ROS-Bildung kommt und diese, wie schon bei murinen endothelialen Zellen nachgewiesen, eine eNOS-Entkopplung verursachen könnte. Folge der eNOS-Entkopplung wäre eine gesteigerte ROS-Bildung als auch eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit. Eine Mitbeteiligung beider pathologischen Folgezustände der eNOS-Entkopplung sind mögliche Ursachen der EPC-Dysfunktion beim Diabetes mellitus.

## **2. Material und Methoden:**

### **2.1. Tierstudienprotokoll:**

Diabetes mellitus wurde bei männlichen Wistar Ratten (180-200g), welche von Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen wurden, durch eine einmalige intravenöse Injektion von Streptozotocin (50mg/kg) induziert. Nach 12 Wochen wurde eine Hyperglykämie durch ein Blutglukoseüberwachungssystem (Ascensia Elite™, Bayer, Germany) am Morgen nach einer über Nacht bestehenden Fastenperiode festgestellt. Es wurden nur Tiere in die Studie aufgenommen, welche einen höheren Blutglukosespiegel als 300 mg/dl aufwiesen, nachdem sie mit Streptozotocin behandelt worden waren.

### **2.2. EPC-Versuche:**

#### **2.2.1. Isolation von mononukleären Zellen aus peripheren Blut (PBMCs):**

Die PBMCs wurden aus Leukapheresematerial oder aus Vollblut, welches mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Blutentnahmeröhrchen (Sarstedt) von gesunden Freiwilligen, von Typ II diabetischen (n=5; Alter 70.6± 1.7 Jahre) oder nicht diabetischen Patienten (n=5; Alter 70.0±2.9 Jahre) abgenommen worden war, isoliert. Die Glukose- als auch die HbA1c-Werte wurden morgens nach einer über Nacht dauernden Fastenperiode bei den Patienten gemessen. Die genauen Charakteristika der Patienten sind in Tabelle 1 dargestellt. Der Diabetes war bei den Patienten bis dato noch nicht diagnostiziert worden, so dass die Patienten auch keine Medikation bezüglich des Diabetes Mellitus Typ II erhalten hatten. Bis maximal 4h nach Blutentnahme wurden aus 20 ml Proben mittels Ficoll-Dichtezentrifugation PBMCs gewonnen. Dafür wurden 2,5ml mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) und EDTA verdünntes Blut (Blut mit 4fachem Volumen PBS + EDTA 2mM) vorsichtig über 2ml Ficollflüssigkeit geschichtet und anschließend bei 800g mit Ausschaltung der Bremse zentrifugiert (Megafuge 1.0 R; Haereus). Der entstandene weiße Film aus mononukleären Zellen oberhalb der Ficollflüssigkeit wurde vorsichtig abpipetiert. Diese mononukleären Zellen wurden danach zweimalig mit PBS gewaschen (Hill et al., 2003) und nach Zugabe von 500µl CryoSFM Einfriermedium (PromoCell) für weitere Untersuchungen schockgefroren.

Die Ratten-PBMCs wurden ebenfalls durch Ficoll-Dichte-Zentrifugation wie oben beschrieben aus Rattenvollblut gewonnen (Hill et al., 2003).

	Patienten mit Diabetes mellitus Typ II	Patienten ohne Diabetes mellitus
n	5	5
Geschlecht (männlich/weiblich)	2/3	2/3
Alter (in Jahren)	70.6 +- 1.7	70.0 +- 2.9
Plasmaglukosespiegel (in mg/dl)	294 +- 32.0	100 +- 6.4
HbA1c (in %)	8.8 +- 0.59	5.4 +- 0.06
Bluthochdruck	3	3
Koronare Herzkrankheit	1	1
Medikation:		
Aspirin	1	2
Beta-Blocker	3	3
ACE-Hemmer	2	2
Statin	2	2

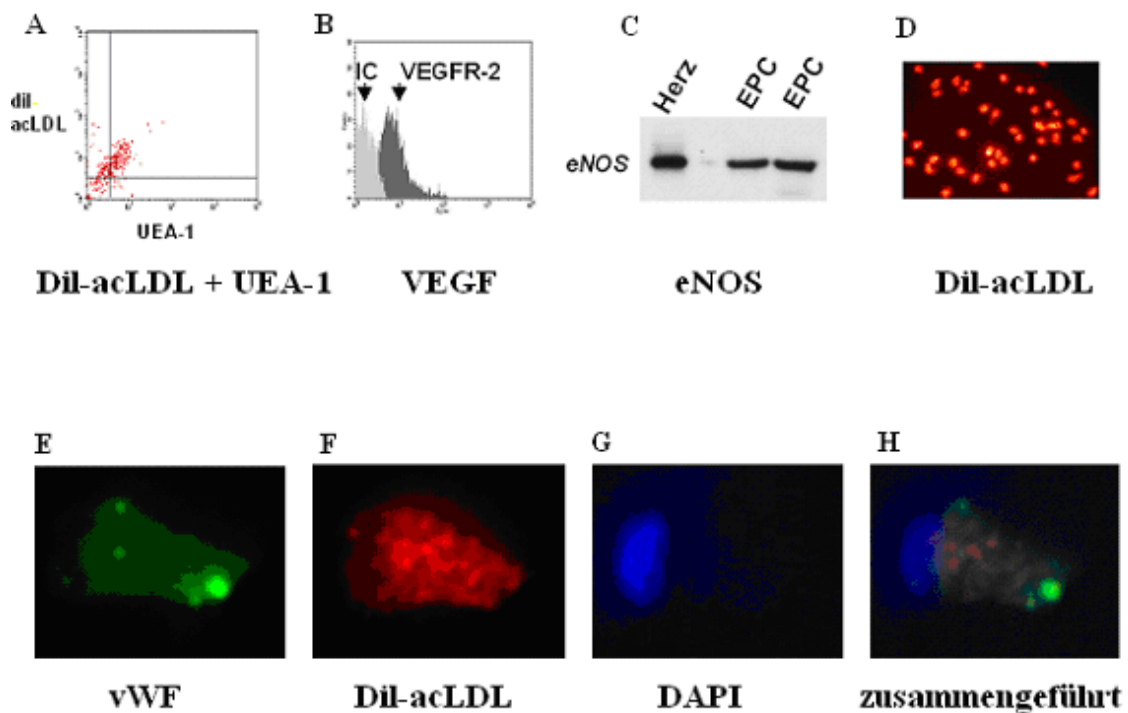
**Tabelle 1. Patientencharakteristika**

### 2.2.2. Isolierung der EPCs:

Für die Isolierung der monozytischen EPCs benutzten wir eine Adhäsions-bezogene Selektionsmethode, wie sie schon früher beschrieben wurde (Thum et al., 2005; Ii et al., 2006; Thum et al., 2006; Romagnani et al., 2005). Hierbei wurden die PBMCs ( $2 \times 10^5$ ) auf mit Fibronectin ( $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) beschichteten 8-well chamber slides (Lab-Tek, Germany) in EBM-2 Kulturmedium (Clonetics, Germany), welches mit EBM SingleQuots (Clonetics, Germany) und 20%igem fetalem Kälberserum (FCS) versetzt war, für 3 Tage kultiviert. Für die Zellzahlbestimmung wurde immer die Neubauer-Zählkammer (Marienfeld) benutzt. Um eine Kontamination der Probe mit ausgereiften, endothelialen, zirkulierenden Zellen zu verhindern, haben wir den Überstand der Kultur 2h nach dem initialen Aussähen vorsichtig mittels einer Pipette abgenommen und auf neue mit Fibronectin beschichteten 8-well chamber slides übertragen.

### 2.2.3. Charakterisierung und Bestimmung der EPC-Zellzahl:

Die Charakterisierung der EPCs wurde durch zelluläre Aufnahme von 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate markiertem acetylierten LDL (dil-acLDL; Molecular Probes, Eugene, USA), die Bindung von fluoreszierendem Isothiocyanat (FITC)-konjugiertem Lektin von *Ulex europaeus* (UEA-1) (Sigma, Germany), die Expression des VEGFR-2 (Abcam, Cambridge, UK), der eNOS (Transduction Laboratories, BD Biosciences, Germany) sowie des von-Willebrand-Faktors (vWF) (Sigma) vollzogen. Bezüglich ihrer Funktionalität wurde ihre Fähigkeit bei der Neovaskularisation mitzuhelfen, die zelluläre Migrationsfähigkeit und die Fähigkeit zelluläre Einheiten zu formen, nachgewiesen (Abbildung 2) (Thum et al., 2006).



**Abbildung 1. Charakterisierung der endothelialen Progenitorzellen.** (A) Aufnahme von Dil-acLDL und Bindung von UEA-1, (B) Expression von VEGFR-2, (C) Expression von eNOS, (D) fluoreszierendes Dil-acLDL, (E) Expression des vWF, (E-H) Lokalisation des vWFs und von Dil-acLDL im EPC, (G) Diamino-Phenylindol (DAPI)

### 2.2.3.1. Zelluläre Aufnahme von acetyliertem LDL, das Binden von fluoreszierendem Isothiocyanate (FITC)-konjugiertem Lektin, Bestimmung der Zellzahl:

Nach der Isolation der EPCs wurde mit dem Ziel, nur noch die adhären den Zellen in den chamber slides zu belassen, zweimal mit PBS gewaschen. Darauf folgend wurden die Zellen bei 37°C in serum freiem EBM-2 Medium, welches 10µg/ml dil-acLDL (Molecular Probes, Eugene, USA) und 20 µg/ml UEA-1 (Sigma, Germany) enthielt, für 4h inkubiert. Diese beiden Marker lassen es zu, die EPCs sowohl in der Fluoreszenzmikroskopie als auch in der Durchflußzytometrie (FACS) -Analyse als solche zu erkennen und damit zählbar zu machen. Für alle weiteren Versuche mit gefärbten EPCs diente derselbe Versuchsaufbau. Die Zellen wurden danach erneut mittels PBS gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) betrachtet. Nur doppelt positive (dil-acLDL und UEA-1) Zellen in mindestens 4 unabhängigen, zufällig gewählten Feldern wurden gezählt.

Zu der Überprüfung der gewonnenen Zellzahlen im Fluoreszenzmikroskopieversuch wurde zusätzlich die Zahl der doppelt positiven Zellen für dil-acLDL und UEA-1 mittels FACS-Analyse (FACScan, Becton Dickinson) bestimmt. Nach dem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mittels einer dreiminütigen Inkubation mit einer Trypsin/EDTA Lösung (Trypsin/EDTA Solution 0,25%/0,02%; 50µl) von den chamber slides abgelöst. Durch die Zugabe von 100µl FCS / PBS (Mischungsverhältnis FCS zu PBS 1:3) ist die Reaktion des Trypsins gestoppt worden. Nach Abzentrifugation (5min; 4°C; 1200rpm) und Resuspension (250µl) wurde die Bestimmung der Zellzahl mittels FACS-Analyse vorgenommen.

### 2.2.3.2. Die Expression von VEGFR-2:

Die Expression des VEGFR-2 in dil-acLDL und UEA-1 doppelt positiven Zellen wurde ebenfalls durch eine FACS-Analyse bestimmt. Hier haben wir nach dem Waschschrift mit PBS die Zellen 15min lang mit einem monoklonalen anti-VEGFR-2 Mausantikörper (Abcam, Cambridge, UK; 20 µg/ml) auf Eis inkubiert, gefolgt von einer 10minütigen Inkubation mit Biotin markiertem Ziegen-anti-Maus-IgG Antikörper (Abcam, Cambridge, UK; 1 µg/ml) und danach einer 10minütigen Inkubation mit Cy5 markiertem Streptavidin (Sigma). Zusätzlich wurde die Expression des VEGFR-2 von

adhärierenden dil-acLDL und UEA-1 doppelt positiven Zellen 3 Tage nach der Kultivierung mittels Westernblotanalyse bestimmt (Thum et al., 2006).

#### 2.2.3.3 Koexpression von Dil-acLDL und von-Willebrand-Faktor bei den EPCs:

Hierfür wurden mit Dil-acLDL vorgefärbte EPCs nach einem Waschschrift mit PBS für 2h mit anti-vWF-Hasenantikörper (Sigma-Aldrich) bei einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Darauf folgend wurden die EPCs für eine weitere Stunde mit anti-Hasen-FITC-Gänseantikörper (Abcam) bei einer Verdünnung von 1:500 behandelt. Abschließend wurden die so gefärbten EPC in einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135, Zeiss) im Hinblick auf deren Koexpression als auch deren zellulärer Lokalisation betrachtet (Abbildung 1E-H).

#### 2.2.3.4. Integrationsfähigkeit der EPCs bei der Bildung von gefäßähnlichen Strukturen (Matrigel – Assay)

Der Versuch beruht auf der gemeinsamen Kultivierung von markierten EPCs und reifen Endothelzellen auf Matrigel. Die Anzahl der sich bei der Gefäßbildung beteiligenden EPCs kann so evaluiert werden.

$2 \times 10^4$  mit dil-acLDL markierte EPCs wurden mit  $4 \times 10^4$  Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) in 8 Glasslide Wells (Becton Dickinson) kultiviert. Die Wells waren jeweils mit 200 $\mu$ l Matrigel (BD Bioscience, Deutschland) vorbehandelt worden. Als Kulturmedium wurden jeweils 200 $\mu$ l EBM-2 Medium, welches mit Supplementen (ohne Insulin-like Growth Factor (IGF-1)) und FCS, Cambrex, Belgien) und entweder 0-100 ng/ml IGF-1 (Sigma – Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) oder 10-100ng/ml rekombinanter humaner Growth Factor (rhGH) (Pharmacia, Erlangen, Deutschland) versetzt war, zugegeben. Nach einer 24stündigen Inkubationsdauer bei 5% Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) und 37°C wurden die sich an der Gefäßbildung beteiligenden EPCs mittels Fluoreszenzmikroskopie gezählt. Mindestens vier zufällig ausgewählte mikroskopische Blickfelder wurden von jeweils zwei Untersuchern gezählt (Thum et al., 2006).

#### 2.2.3.5. Migrationsfähigkeit der EPCs

Die Migrationsfähigkeit der EPCs wurde mittels des modifizierten Boydenkammerassays untersucht (Heeschen et al., 2004). Inlets (Falcon HTS Fluoro Block insert, 8µm Porengröße) wurden mit 200µl Zellsuspension beladen. Die Zellsuspension enthielt  $1 \times 10^5$  kultivierte und mit dil-acLDL gefärbte EPCs in endotheliale Kulturmedium (EBM2 ohne FCS + Zusätze, Cambrex, Deutschland), versetzt mit 1% bovinem Serumalbumin V (Sigma). Diese Inlets wurden dann in 24er-Companion-wells Kulturschalen (Becton Dickinson) eingesetzt. Die Wells waren basal mit endotheliale Kulturmedium (EBM-2 Medium ohne FCS + Zusätze, Cambrex, Deutschland) gefüllt, welches entweder mit 50 ng/µl VEGF (Sigma) und 100 ng/µl Stromazellenwachstumsfaktor (SDF-1) (Sigma) oder keinen Zusätzen versetzt war. Dieser Ansatz wurde für 20h bei 37°C ohne Bewegung inkubiert. Um die Migrationsfähigkeit der EPCs zu beurteilen, haben wir die Zellen durch 2%iges Paraformaldehyd (Sigma) fixiert und danach manuell durch Fluoreszenzmikroskopie gezählt (n=4) (Thum et al., 2006).

#### 2.2.3.6. Kolonieformende Einheiten (Colony forming units: CFU):

$1 \times 10^6$  PBMCs, welche durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert worden waren, wurden auf mit Fibronectin ( $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) beschichteten 12 well Kulturschalen (Becton Dickinson) in EndoCult™ Medium (Stem Cell Technologies, USA) kultiviert. Nach 48h wurden, um die Kontamination mit ausgereiften Endothelzellen zu verhindern, der Überstand vorsichtig abgenommen und dieser in neue mit Fibronectin beschichtete 24-well Kulturschalen gegeben. Das Medium wurde alle 3 Tage erneuert und die Kolonien nach 12 Tagen quantifiziert und evaluiert. Eine Kolonie wurde als eine solche gezählt, wenn sie „runde“ Zellen im Zentrum und in der Peripherie länglichere, mit Zellausläufern versehene „ausprießende“ Zellen aufwies (Thum et al., 2006). Ein solches Gebilde gilt als frühes Entwicklungsstadium bei der Formation von zellulären Kolonien durch Endothelzellen (Hill et al., 2003; Thum et al., 2005). Die Zugehörigkeit dieser Zellen zu der endothelialen Reihe wurde durch immunhistochemisches Färben des von Willebrandt Faktors, des VEGFR-2 und des CD31 vorher schon nachgewiesen (Hill et al., 2003). Wir haben getestet, ob die

Kolonien UEA-1 binden. Dafür wurde eine zweistündige Inkubation der Zellen mit 20 µg/ml UEA-1 vor der Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Nur typische Kolonien, welche gleichfalls für UEA-1 positiv waren, wurden gezählt.

#### 2.2.4. Die Messung des Biopteringehaltes der EPCs:

Durch eine High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) -Analyse wurde der Biopteringehalt der EPCs gemessen. Dafür wurde eine Oxidationsmethode, wie sie schon früher beschrieben worden ist, genutzt (Fukushima 1980). Zwei Testreihen wurden durchgeführt: die eine bestimmte das gesamte Biopterin (BH<sub>4</sub>, BH<sub>2</sub> und Biopterin) und die andere jenes Biopterin, das durch Salz stabil oxidiert (BH<sub>2</sub> und Biopterin) worden war. Die Differenz zwischen beiden ergab den Gehalt an BH<sub>4</sub> in den EPCs. Um diese Messung durchzuführen, haben wir eine nukleosidische C-18 Säule (4,6 x 250mm, 5 µm) mit einer Lösung, bestehend aus 5% Methanol und 95% Wasser, und einer Flussrate von 1.0 ml/min. benutzt. Der Fluoreszenzdetektor wurde für die Exzitation auf 350nm und für die Emission auf 450nm gestellt.

#### 2.2.5. Detektion reaktiver Stickstoffmonoxidverbindungen:

Peroxynitrit ist das direkte Reaktionsprodukt aus NO und O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Es ist ein hochreaktives Molekül, das bei seiner Reaktion mit Molekülen 3-Nitrotyrosin bildet. 3-Nitrotyrosin stellt damit einen guten Biomarker für reaktive NO-Verbindungen dar (Tsikas et al., 2005). Humane EPCs wurden für 24h mit 30 mmol/L Glukose behandelt und danach auf Eis lysiert. Mittels HPLC wurde 3-Nitrotyrosin vom Zelllysate getrennt und durch eine Kombinationsmethode, bestehend aus einer Gas-Chromatographie (Trace 2000 Serie Gas Chromatograph ausgestattet mit einem AS 2000 Autosampler (CE Instruments, Austin, TX)) und einer Massenspektroskopie (Modell ThermoQuest TSQ 7000 (Finnigan MAT, San Jose, CA)), analysiert (Tsikas et al., 2005).



## **2.3. Knochenmarksversuche:**

### **2.3.1. Knochenmarksgewinnung:**

Für die Entnahme des Knochenmarks wurden die Röhrenknochen von Rattenbeinen durch standardchirurgische Techniken präpariert und danach durch das Einspritzen von 500µl PBS-EDTA (2m M) mittels einer 20µm Nadel (Becton Dickinson) das gesamte Knochenmark gewonnen (Thum et al., 2006). Durch Zentrifugation (Hettich) bei 4°C und einer Aufarbeitung auf Eis wurde das Zellpellet vom „Überstand“ getrennt und durch Schockgefrierung beider Bestandteile für weitere Versuche konserviert.

### **2.3.2. Knochenmarkshomogenisierung:**

Um Knochenmarksextrakt zu gewinnen wurde das Knochenmark in eiskaltem Extraktionsbuffer (Cacodylic-Puffer für die Zymographie; RIPA-Puffer für die Western Blot Analyse) homogenisiert und schließlich bei 4°C für 20min bei 8000g (Hettich) abzentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Der Proteingehalt der Proben wurde mittels Bradford Protein Assay (Bio-Rad) bei 595nm gegen einen Standard aus lyophilisiertem Rinder-IgG (Protein Standard I, Bio-Rad) photometrisch (Ultrospec 3100 Pro, Amersham) bestimmt.

### **2.3.3. Zymographie:**

Die Knochenmarksextrakte in Cacodylic-Puffer wurden mit Loading-Puffer gemischt und für die Elektrophorese auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel, das 1mg/ml Gelatine (Typ A von der Schweinehaut) beinhaltet, unter nicht reduzierenden Bedingungen (8µg Protein pro lane) aufgetragen. Das Gel wurde 1h in 2,5%igem Triton und danach für 10h in einem Enzympuffer bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Gel mit 0.5% Coomassie Blau G-250 gefärbt und danach durch eine einstündige Inkubation mit 40% Methanol und 10% Acetatsäure mit einem viermaligen Wechsel der Lösung entfärbt. Die Regionen der Verdauung wurden mit der Quantity One Image Software (BioRad) quantifiziert. Als positive Kontrolle und Standardisierung unter den Gelen wurde humane, rekombinante, reine MMP-9 (1 ng, Calbiochem) benutzt. Um das

molekulare Gewicht der aufgetragenen Proteine zu bestimmen wurden Prestained Precision Broad Range Protein Standards (Bio-Rad) verwendet.

#### 2.3.4. Westernblot und ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay):

Für die Westernblot-Analyse wurden alle Proben eines Blots mit RIPA-Puffer auf denselben Proteingehalt genormt. Die Zellextakte (30µl) wurden mit Loading-Puffer (BioLabs; 20µl) gemischt, 5min bei 95°C denaturiert und auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen (pro Tasche 18µl). Als Referenz wurden Prestained Precision Broad Range Protein Standards (Bio-Rad) benutzt. Um die Gele aufeinander beziehen zu können, haben wir immer eine Probe in mindestens 2 Gelen laufen lassen. Durch Gelelektrophorese wurden die Proteine aufgetrennt und mittels Westernblot über Nacht auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran (Immun-Blot 0.2 µm, Bio-Rad) transferiert. Anschließend wurde die PVDF-Membran 2h in mit Tris gepufferter Salz-Tween Lösung (TBS-Tween Puffer), welcher mit 5% blocking agent (Amersham) versetzt war, geblockt und danach über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurden die PVDF Membranen 3 x 5min mit TBS-Tween Puffer gewaschen und danach mit einem Anti-Mouse-AK (Cell Signaling) erneut für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte erneut das Waschen der PVDF-Membranen 3 mal 5min mit TBS-Tween Puffer. Die Sekundärantikörper waren mit Meerrettichperoxidase konjugiert und ermöglichten die Detektion der Banden mittels Chemilumineszenz Assay (ECL Plus, ECL, Amersham). Die Blots wurden auf Autoradiografiefilm (Hyperfilm<sup>TM</sup>ECL, Amersham) dokumentiert (Entwicklermaschine: Kodak IS 440 CF) und densitometrisch mittels Scion Image for Windows Version Beta 4.0.2 (Scion Cooperation) ausgewertet. Scion Image basiert auf der Software des National Institutes of Health Image.

Als primäre Antikörper wurden der Maus-anti-eNOS-AK (Verdünnung 1: 2500), Maus-anti-phospho-eNOS-AK (Ser1177) (Verdünnung 1: 5000) (Transduction Laboratories, BD Biosciences, Germany) und der Maus-anti-GAPDH-AK (dieser wurde nicht über Nacht, sondern nur für 1h bei Raumtemperatur am Tag der Entwicklung inkubiert (Abcam, Acris, Germany); Verdünnung 1: 100000) benutzt.

### 2.3.5. SDS-Page (Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) bei niedriger Temperatur:

Die Knochenmarksextrakte in RIPA-Puffer wurden mit 3 x SDS Loading Puffer bei 0°C gemischt. Die Proben wurden auf ein 7.5%iges Polyacrylamidgel geladen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Gele und die Puffer wurden vor der Elektrophorese auf 4°C heruntergekühlt und die Elektrophoresekammern während der Elektrophorese in ein Eisbad gestellt. Danach wurde der eNOS Dim er/Monomer durch Westernblot-Analyse wie oben beschrieben bestimmt.

## **2.4. Detektion von Sauerstoffradikalen im Knochenmark und in EPCs:**

Um die Sauerstoffradikalbildung zu messen wurden mehrere Methoden angewendet:

### 2.4.1. Detektion von Malondialdehyd:

Die Malondialdehyd-Thiobarbituratsäure-Addukte (MDA-TBA-Addukte) wurden durch eine HPLC gemessen (Wong et al., 1987). Hierbei haben wir den Knochenmarksüberstand separiert und die proteinfreien Extrakte durch eine C18 Säule (Micro Bondapark, Waters) in einem HPLC-System (Pharmacia LKB, Germany) fraktioniert. Wir benutzten eine Flussrate von 1 ml/min, einen Druck von 1800psi und eine Temperatur von 35°C. Die exakte Quantifizierung wurde durch das Benutzen von 1,13,3-Tetraethoxypropan-Standards (Sigma) durchgeführt.

### 2.4.2. Bestimmung der Superoxidanionen durch Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz:

Um die Baseline jedes Versuchs exakt zu bestimmen haben wir jeweils mit einem Szintillationsröhrchen, welches mit Lucigenin (5µM) und Krebs/HEPES Puffer bereits gefüllt war, Messungen bei 37°C ohne die Zellextrakte durchgeführt bis ein stabiles Signal warzunehmen war. Nach der Zugabe der Knochenmarkszell extrakte, welche in PBS-Puffer resuspendiert worden waren, wurden alle 30sek. für 20 min in dem Luminometer (Wallac, Freiburg, Germany) Messungen durchgeführt. Um die Effekte zu

ermitteln, die durch eine NOS-Blockade mittels L-NNA (1mM) hervorgerufen wurden, wurde nach dessen Zugabe eine erneute Messreihe mit einer Dauer von 20min. mit Messintervallen von 30sec. durchgeführt. Das spezifische Chemilumineszenzsignal jeder Probe wurde durch die Subtraktion der Hintergrundaktivität (Signal bei der Baselinemessung) errechnet und als Zählung pro Minute pro Mikrogramm Protein dargestellt. Diese Methode wurde früher schon beschrieben (Bendall et al., 2005).

#### 2.4.3. Dihydroethidium Assay:

Das redoxensitive, zellmembranpermeable Fluorophor Dihydroethidium (DHE) wird in der Anwesenheit von  $O_2^-$  zu fluoreszierendem Ethidium oxidiert. Kultivierte EPCs wurden mit DHE (2.5 $\mu$ M) (Sigma) für 30min. inkubiert. Nach dem Waschen wurde die Hauptstrahlfluoreszenz jeder Probe durch Fluoreszenzmikroskopieevaluation von mindestens 4 unterschiedlichen Gesichtsfeldern gemessen. Der zelluläre ROS-Gehalt in menschlichen EPCs wurde zusätzlich in einem FACSCalibur Flußcytometer (Becton Dickinson, San Juan, CA, USA) bestimmt. Die Fluoreszenz wurde mittels eines FL-3 (670nm) Filters bestimmt und die Histogramme von 1000 Ereignissen wurden experimentell ermittelt. Die Zellen, welche eine DHE-Fluoreszenz aufwiesen, wurden mit Hilfe der Cell Quest Software (Becton Dickinson) ausgewertet.

#### 2.5. Statistische Analyse:

Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  mittlerer Standardfehler dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit one-way ANOVA durchgeführt und die gewonnenen Ergebnisse durch die Anwendung des Fisher's post Tests verglichen. Die statistische Analyse wurde mit StatView 5.0 Statistikprogramm (Abacus Concepts, Berkley, CA, USA) durchgeführt. Eine statistische Signifikanz wurde bei  $P < 0.05$  festgelegt.

### **3. Resultate:**

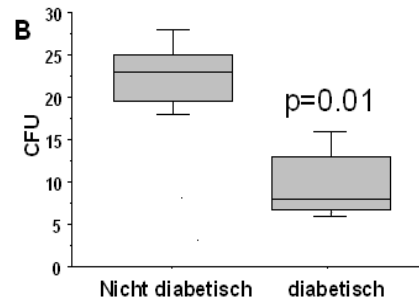
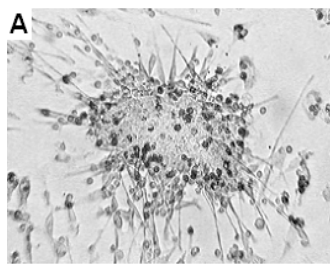
#### **3.1. Verminderte Anzahl und Funktion von EPCs bei diabetischen Patienten –**

##### **Hinweis auf die eNOS-Entkopplung:**

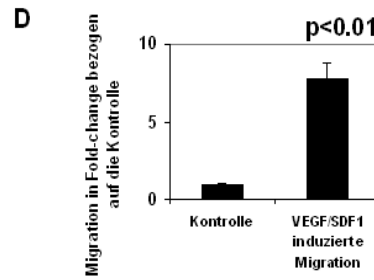
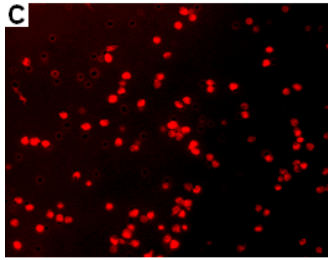
Diabetische Patienten (Alter  $70.6 \pm 1.7$  Jahre) waren charakterisiert durch eine erhöhte Plasmaglukosekonzentration ( $294.0 \pm 32.0$  mg/dl vs.  $100.0 \pm 6.4$  mg/dl) und einen erhöhten HbA1c-Spiegel ( $8.8\% \pm 0.6\%$  vs.  $5.4\% \pm 0.1\%$ ) verglichen mit nicht diabetischen, altersgleichen Probanden (Alter  $70.0 \pm 2.9$  Jahre).

Die Bildung von endothelialen CFUs waren bei den diabetischen Patienten im Vergleich zu nicht diabetischen Patienten vermindert ( $9.8 \pm 1.9$  CFUs vs.  $22.6 \pm 1.7$  CFUs;  $p=0.001$ ; Abb. 2A, B).

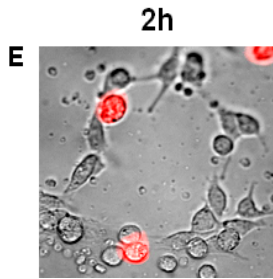
EPCs von diabetischen Patienten zeigen eine erhöhte Produktion von ROS ( $11.7 \pm 0.7$  vs.  $6.2 \pm 1.1$  arbiträre Einheiten;  $p < 0.001$ ; Abb. 3A, 3B) und eine verminderte Migrationsfähigkeit im Vergleich zu nicht diabetischen, altersgleichen Subjekten ( $40.4 \pm 4.6$  vs.  $72.7 \pm 6.2$  migrierte Zellen;  $p < 0.0001$ ; Abb. 3A-3C). Nachdem die NOS der EPCs von den diabetischen Patienten durch Gabe von L-NNA inhibiert wurde, war die ROS-Produktion vermindert und die migratorische Fähigkeit um  $34.6 \pm 5.6\%$  ( $p < 0.05$ ; Abb. 3A-3C) erhöht. Eine Inkubation der EPCs diabetischer Patienten mit pegylierter Superoxiddismutase (SOD) konnte die ROS-Produktion komplett abfangen und die Migrationsfähigkeit um  $60.1 \pm 11.3\%$  ( $p < 0.001$ ; Abb. 3A-3C) verbessern.



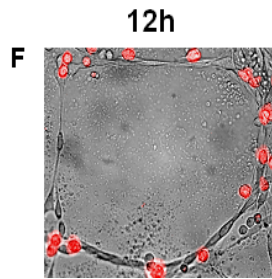
• CFUs



• Migration



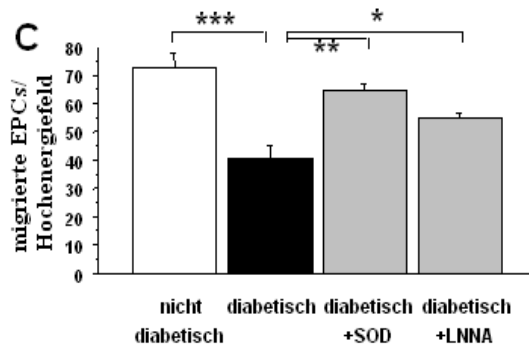
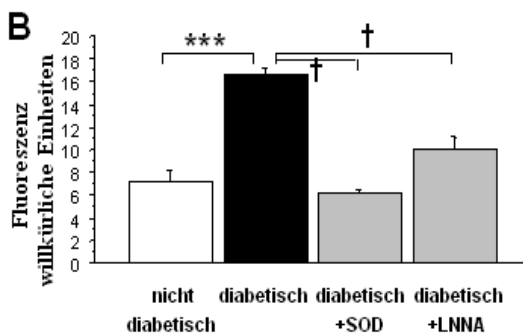
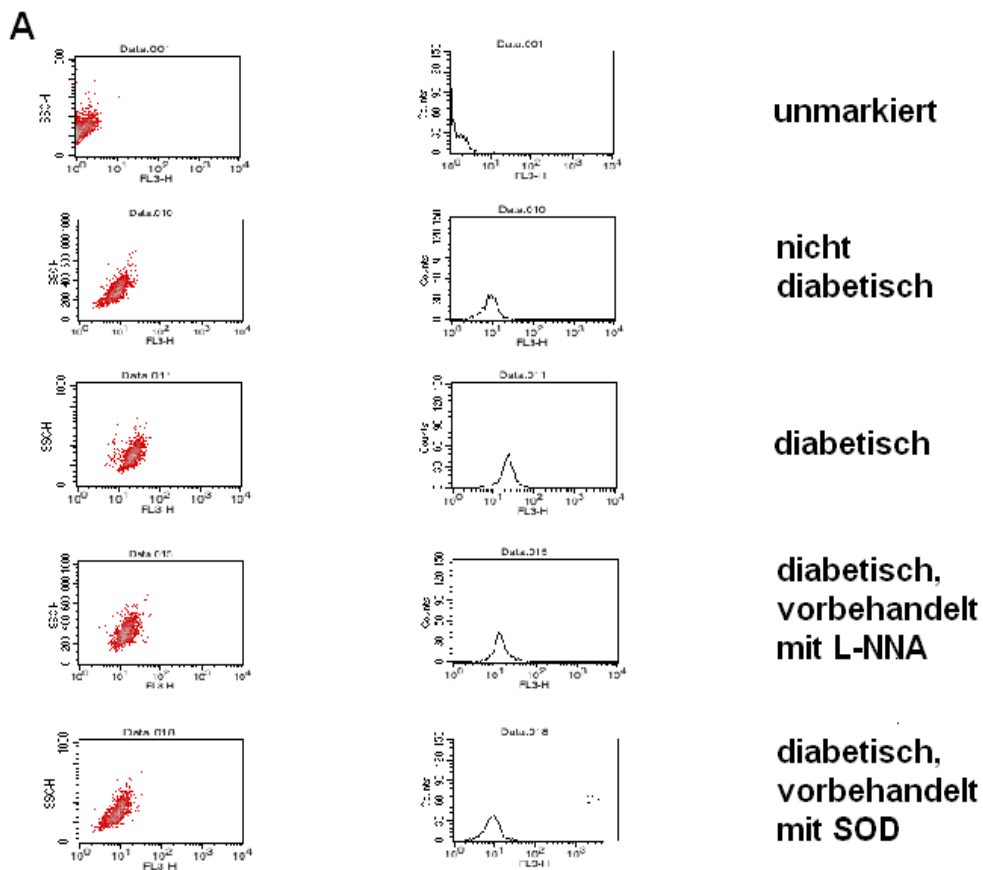
2h



12h

• Neovaskularisation

**Abbildung 2: Zirkulierende endotheliale Progenitorzellen sind bei Patienten mit Diabetes mellitus in ihrer Funktion gestört; Charakterisierung der endothelialen Progenitorzellen.** Zahl der endothelialen kolonieformenden Einheiten (CFUs) bei diabetischen und nicht diabetischen Patienten (A, B); Charakterisierung der monozytischen endothelialen Progenitorzellen (rot markiert): Bildung von CFUs (A); Migrationsfähigkeit hervorgerufen durch einen VEGF/SDF1 Gradienten (C,D); Integrationsfähigkeit bei der Bildung von Gefäßen (Matrigel Assay: gleichzeitige Kultivierung von endothelialen Progenitorzellen und humanen Endothelzellen der Umbilikalvene (E,F).



**Abbildung 3: Die Entkopplung de r eNOS führt ROS-vermittelt zu einer EPC-Dysfunktion bei diabetischen Patienten.** Die FACS-Analyse zeigt den zellulären ROS-Spiegel (A, B) und die Migrationsfähigkeit (C) isolierter EPCs. Die EPCs stammen entweder von diabetischen oder nicht diabetischen Patienten. Eine Untergruppe der EPCs der diabetischen Patienten wurden vorher mit Superoxiddismutase (SOD) oder N<sup>G</sup>-nitro-L-Arginin (L-NNA) vorbehandelt. \* P<0.05, \*\* P<0.001, \*\*\* P<0.0001; † P<0.0001. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ±SEM. n=5 Messungen pro Gruppe.

### **3.2. Durch Glukosegabe bei kultivierten EPCs hervorgerufene eNOS-Entkopplung und Superoxidanionen-vermittelte EPC-Dysfunktion - Effekte der Inhibierung der Proteinkinase C (PKC) und der Behandlung mit Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>)**

Eine Behandlung kultivierter EPCs mit Glukose erhöhte die ROS-Produktion um das 3fache und verminderte die Migrationsfähigkeit der EPCs um  $55.7 \pm 8.2\%$  ( $p < 0.001$ ). Im Vergleich dazu erzeugte Mannitol (30mM) als osmotische Kontrollsubstanz keinen Effekt (Abb. 4A, 4B). Nach der Zugabe pegylierter SOD zu den glukosebehandelten EPCs war eine verminderte Migrationsfähigkeit nicht mehr feststellbar (Abb. 4B). Durch Inhibierung der NOS mit L-NNA war ebenfalls der schädliche Einfluss der Glukose teilweise rückgängig zu machen (Abb. 4A, 4B). Der Einsatz des NOX-Inhibitors DPI führte zu einer geringeren Wirkung als L-NNA sowohl bei der Verhinderung der  $O_2^-$ -Generierung als auch bei der Migrationsfähigkeit. Für letzteres war die Wirkung nicht signifikant.

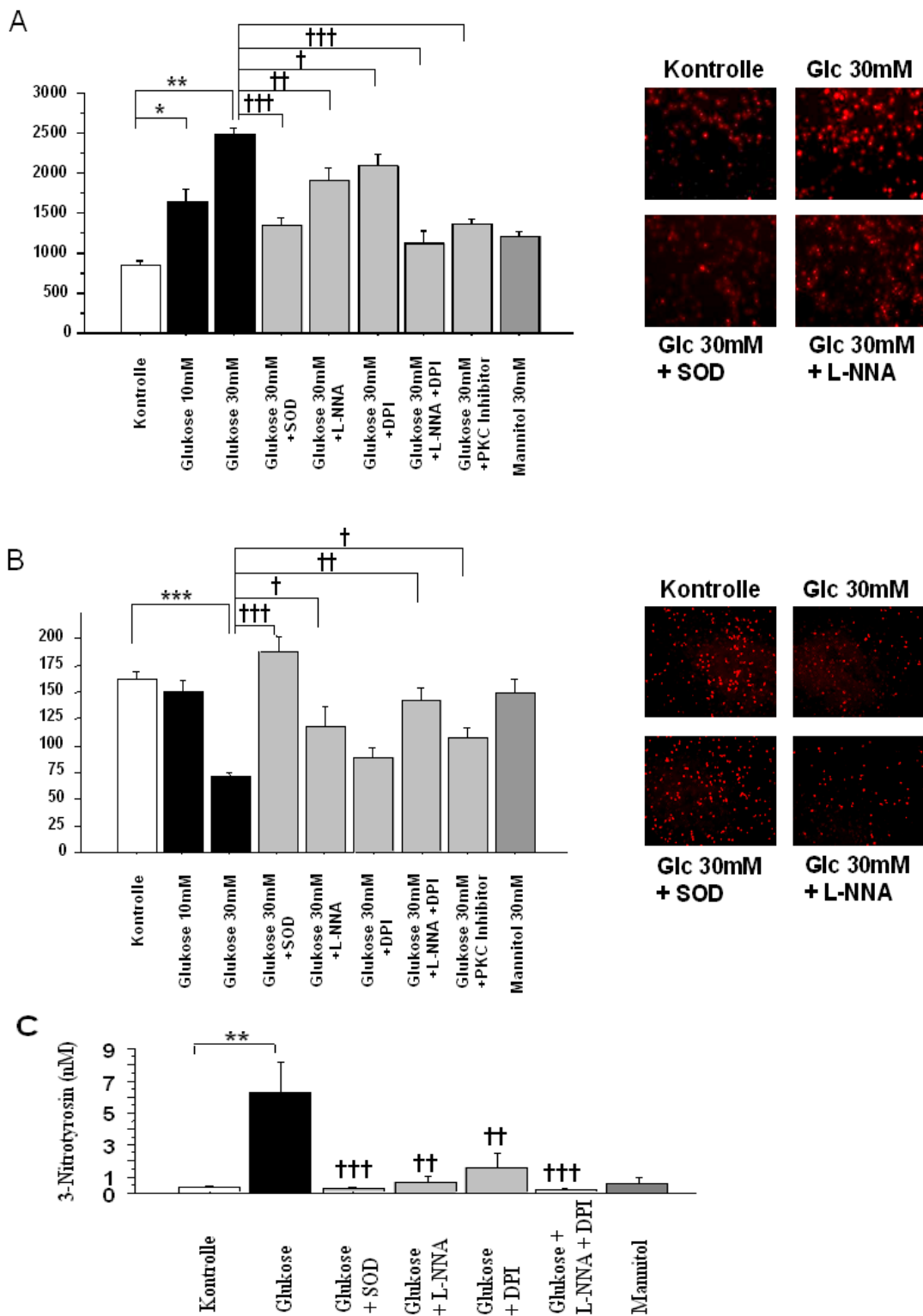
Die PKC ist beteiligt an der vaskulären  $O_2^-$ -Generierung in diabetischen Gefäßen (Hink et al., 2001) und könnte dabei einen aktivierenden Einfluss auf die NOX haben (Quagliariello et al., 2003). Um zu analysieren, welche Bedeutung der PKC bei der glukosevermittelten ROS-Produktion zukommt, inhibierten wir diese mit Chelerythrin bei glukosebehandelten EPCs. Ergebnis war eine verminderte  $O_2^-$ -Produktion und eine verbesserte EPC-Funktion (Abb. 4A, 4B).

Erstaunlicherweise sind die Ergebnisse der ROS-Produktion und der Migrationsfähigkeit von EPCs nicht völlig konform mit denen der 3-Nitrotyrosin-Messung. Hierbei zeigt sich nämlich schon eine dramatische Reduktion von reaktiven NO-Verbindungen bei der Inkubation mit DPI, was aber nicht zu einer gleich großen EPC-Funktionsverbesserung oder ROS-Verminderung führte. Dieser Trend gilt auch für die anderen Substanzen.

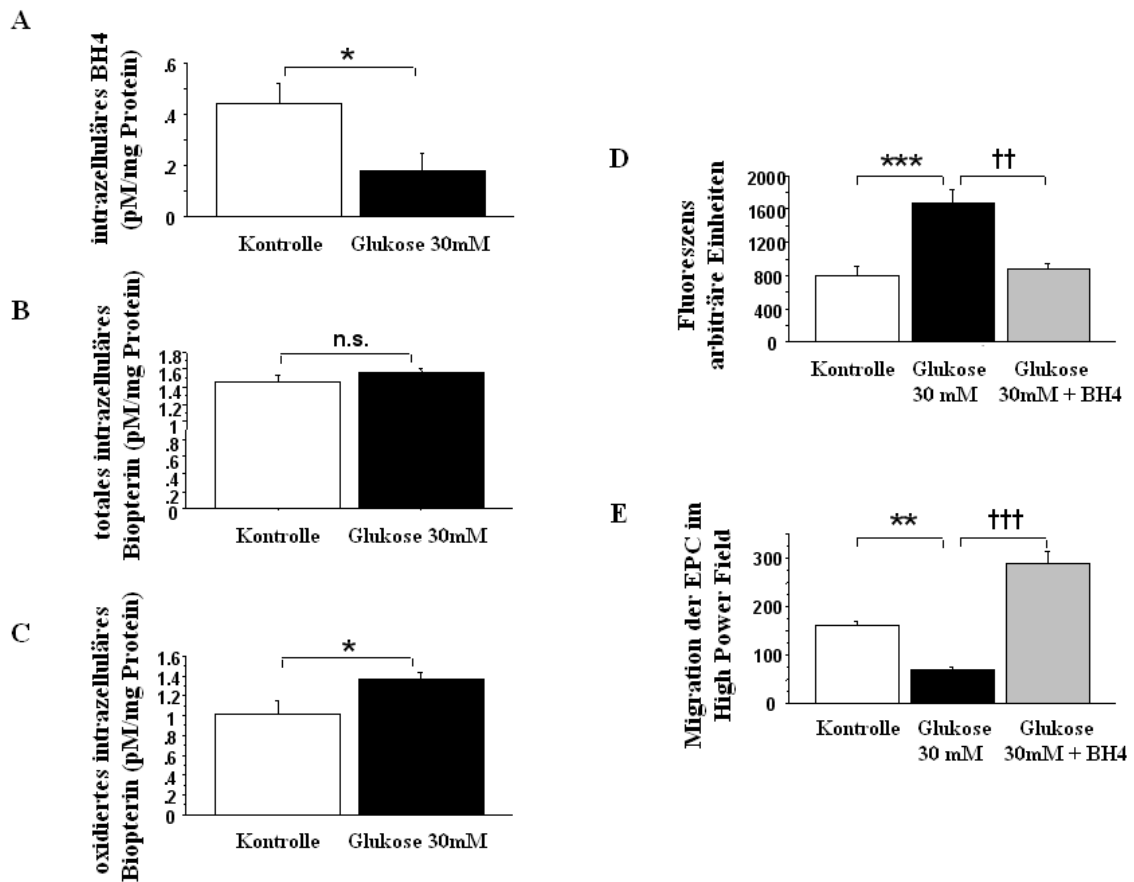
In der Literatur ist ein mechanistischer Zusammenhang zwischen der eNOS-Entkopplung und einer Verminderung des essentiellen eNOS-Kofaktors BH<sub>4</sub> beschrieben (Hink et al., 2001; Forstermann et al., 2006). Bei mit Glukose behandelten EPCs wurden die intrazellulären Konzentrationen von BH<sub>4</sub>, oxidiertem Biopterin und dem gesamten Biopterin in Zelllysaten gemessen. Im Vergleich zu nicht mit Glukose



behandelten EPCs waren die intrazellulären Konzentrationen von BH<sub>4</sub> um 59% vermindert, dafür aber der Gehalt an oxidiertem Biopterin erhöht und das Gesamtbiopterin nicht signifikant verändert (Abb. 5A, 5B, 5C). Um zu testen, ob dieser Vorgang reversibel ist, haben wir den mit Glukose behandelten EPCs exogen BH<sub>4</sub> zugeführt. Konsekutiv stieg die intrazelluläre Verfügbarkeit um das 5fache, die erhöhte O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion wurde normalisiert und die Migrationsfähigkeit der EPCs signifikant verbessert.



**Abbildung 4: Glukosebehandlung führt zu einer NOS-Entkopplung und einer verminderten EPC-Migrationsfähigkeit.** A) Messen der Fluoreszenz von Ethidiumbromid nach Färben von kultivierten EPCs mit redoxsensitivem, zellpermeablem Fluorophor DHE. B) Migrationsfähigkeit der EPCs. C) Bildung von 3-Nitrotyrosin. Die EPCs wurden mit steigenden Konzentrationen von Glukose, Glukose + SOD, Glukose + L-NNA, Glukose + NOX-Inhibitor DPI, Glukose + DPI + L-NNA, Glukose + Chelerythrin (ein PKC-Inhibitor) oder Mannitol. \* P<0.001; \*\* P<0.0001; † P<0.05 vs Glukose, 30mM; †† P<0.01 vs Glukose, 30mM; ††† P<0.0001 vs Glukose, 30mM. Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM dar. n=4-6 Messungen pro Studiengruppe.



**Abbildung 5: Reversibilität der durch Glukose induzierten EPC-Dysfunktion durch die BH<sub>4</sub>-Gabe.** Messung des intrazellulären BH<sub>4</sub>-Spiegels (A), des totalen Biopterins (B), des durch Salz stabilisierten, oxidierten Biopterins (BH<sub>2</sub> + Biopterin) (C), von O<sub>2</sub><sup>-</sup> (D) und der Migrationsfähigkeit der EPCs (E). Die EPCs wurden mit Glukose oder Glukose + BH<sub>4</sub> (10μM) behandelt. n=4-6 Messungen pro Experiment. \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\*P<0.001; †† P<0.01 vs Glukose, ††† P<0.001 vs Glukose. Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM dar.

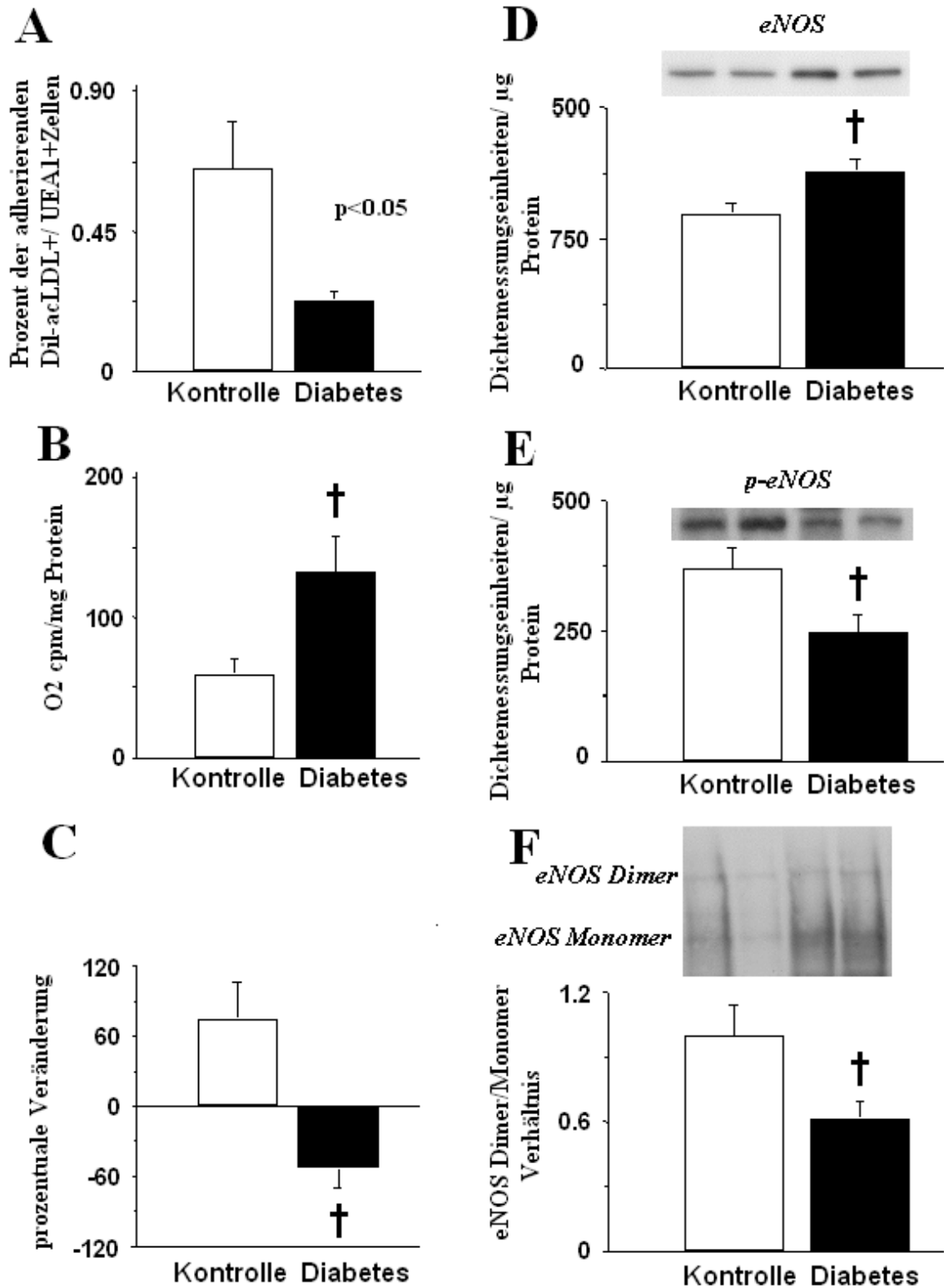
### **3.3. Die eNOS-Entkopplung im Knochenmark bei experimentell hervorgerufenem Diabetes mellitus - Konsequenzen für die zirkulierenden EPCs:**

Bei diabetischen Ratten haben wir die EPC-freisetzenden Mechanismen im Knochenmark bezüglich pathologischer Veränderungen untersucht, um zu verstehen, weshalb die EPC-Serumspiegel bei Diabetikern vermindert sind. Die diabetischen Ratten hatten eine höhere Serumglukosekonzentration als die Kontrolltiere ( $459 \pm 39$  mg/dl vs.  $151 \pm 15$  mg/dl,  $p < 0.0001$ ) und die zirkulierenden EPCs waren um  $39 \pm 5\%$  vermindert ( $p < 0.05$ ) (Abb. 6A, B). Wir haben durch einen preplating-Schritt die EPCs von den murenen endothelialen Zellen gereinigt. Danach wurden die Zellen durch die Aufnahme von acLDL, das Binden von UEA-1-Lektin (Abb. 6A,B), die Expression von VEGFR-2 sowie eNOS (Abb. 6C) und die Bildung von Kolonien charakterisiert. Bezüglich funktioneller Eigenschaften zeichneten sich die EPCs durch eine Adhärenz und Integration bei sich aus arteriellen endothelialen Zellen bildenden Gefäßen aus, nachdem sie 12h auf Matrigel kultiviert worden waren (Abb. 6D).

Bei der Proteinexpression im Knochenmark zeigte sich, dass die eNOS bei den diabetischen Ratten vermehrt exprimiert wurde. Die phosphorylierte Form der eNOS als auch die Proteinkinase Akt zeigte aber eine verminderte Konzentration im Vergleich zu den nicht diabetischen Tieren. Das Dimer/Monomer-Verhältnis, ein Indikator für die eNOS-Entkopplung, war zum Monomer hin verschoben.

Die diabetischen Tiere zeigten in Folge dessen auch eine deutlich erhöhte ROS-Produktion. Die Formation des MDA-TBA-Aldukts, ein Index der ROS-Generierung, war um das 4.9fache bei den diabetischen Ratten erhöht. Nach der Inhibierung der NOS durch L-NNA zeigte sich eine verminderte  $O_2^-$ -Konzentration im Knochenmark der diabetischen Tiere. Dies deutet auf eine Entkopplung der eNOS und damit auf die Mitbeteiligung der eNOS an der ROS-Produktion hin. Bei den nichtdiabetischen Tieren zeigte sich nach NOS-Inhibierung durch L-NNA eine Zunahme der  $O_2^-$ -Konzentration im Knochenmark.

Die MMP-9 ist eine essentielle Protease für die Freisetzung von EPCs aus dem Knochenmark. Deshalb haben wir die Aktivität dieser Proteinase im Knochenmark untersucht. Es zeigte sich, dass diese stark vermindert war und mit den reduzierten EPC-Spiegeln signifikant korrelierte ( $r=0.7$ ,  $p < 0.01$ ).



**Abbildung 6: Ratten mit STZ -induziertem Diabetes mellitus zeigen verminderte zirkulierende EPC-Spiegel und eine Entkopplung der eNOS im Knochenmark.** (A) zirkulierende EPCs (n=6 Kontrollen; n=7 diabetische Tiere) (B) O<sub>2</sub>-Produktion in Knochenmarksextrakten gemessen durch Lucigenin (5µM) hervorgerufene gesteigerte Chemilumineszenz und (C) die prozentuale Veränderung nach Zugabe von L-NNA (1mmol/L). Mittels Western Blot Analyse ermittelte Expression der phosphorylierten eNOS (D) und der phosphorylierten Form p-eNOS (E). Das Verhältnis von eNOS-Dimer zu -Monomer. Kontrollen= Kontrollratten, n=7; Diabetes= Ratten mit Streptozotocin induziertem Diabetes mellitus, n=7. † P<0.05, †† P<0.001 vs. Kontrollen.

#### **4. Diskussion:**

Diabetische Patienten haben eine sehr viel höhere Wahrscheinlichkeit endotheliale Läsionen und Atherosklerose zu entwickeln als gesunde Menschen. Ein Grund hierfür könnte die Dysfunktion der EPCs sein, welche beim Diabetes mellitus vorliegt. Die EPC-Dysfunktion wiederum könnte unter anderem durch die Entkopplung der eNOS begründet sein, welche in der vorliegenden Arbeit bei EPCs von Patienten mit Diabetes mellitus Typ II, bei glukosebehandelten EPCs und vom Knochenmark gewonnener EPCs diabetischer Ratten nachgewiesen wurde. Jeweils ging die eNOS-Entkopplung mit einer verminderten EPC-Funktion einher. Die eNOS-Entkopplung mit ihrer Folge der gesteigerten ROS-Bildung und verminderten Bioverfügbarkeit von NO, könnte damit zumindest einen Teil der verminderten EPC-Zahl im Blut und der verminderten Funktion der EPCs bei Diabetes mellitus erklären und stellt möglicherweise ein relevantes pharmakologisches Ziel für zukünftige Therapien dar.

Hintergrund der pathologischen Auswirkungen einer eNOS-Entkopplung ist, dass NO das Gefäßsystem vor Atherosklerose und Thrombose schützt, indem es die Leukozytenadhäsion, Proliferation von glatten Muskelzellen und die Thrombozytenadhäsion als auch -aggregation hemmt. NO hemmt die Leukozytenadhäsion durch eine verminderte Expression des Leukozytenadhäsionsmoleküls CD11/CD18 (Kubes et al., 1991) und sowohl die DNA-Synthese, Mitogenese als auch Proliferation glatter Muskelzellen (Garg et al., 1989; Tanner et al., 2000). Die Thrombozytenaggregation und -adhäsion am Endothel wird durch NO herabgesetzt. NO wirkt dadurch einer Thromboseentstehung entgegen. Zusätzlich werden die glatten Muskelzellen durch die verminderte Thrombozytenaktivierung einer geringeren Konzentration an Plättchenwachstumsfaktor ausgesetzt, was wiederum einen antiproliferativen Effekt auf jene ausübt (Förstermann et al., 1994). Als Resultat eines Fehlens dieser Mechanismen konnte bei eNOS-defizienten Mäusen ein früheres Auftreten und schnelles Voranschreiten einer Atherosklerose nachgewiesen werden (Knowels et al., 2000).

Zusätzlich zu den antiatherogenen Wirkungen von NO scheint es eine große Bedeutung in Bezug auf die Funktionsfähigkeit der EPCs zu besitzen und damit auf einen der wichtigsten Gefäßreparaturmechanismen. Exogen zugeführtes NO kann die verminderte

Migrationsfähigkeit von EPCs bei Diabetes mellitus rückgängig machen (Segal et al., 2006).

Generell wird eine gesteigerte eNOS-Expression durch die normalerweise daraus entstehende erhöhte NO-Produktion als ein positiver Zustand angesehen. Unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen, wie unter anderem bei Bluthochdruck oder Diabetes mellitus, ist aber eine Hochregulation der eNOS-Expression mit einer verminderten endothelabhängigen Vasodilatation verbunden (Vaziri et al., 1998; Hink et al., 2001; Guzik et al., 2002). Dieser Zusammenhang wird durch die sogenannte eNOS-Entkopplung erklärt (Forstermann et al., 2006). In diesem Zustand produziert die eNOS anstatt NO selbst  $O_2^-$  und besitzt daher eine auf die Gefäße bezogene proatherogene und auf die EPCs bezogene hemmende bzw. schädigende Wirkung.

Die eNOS-Entkopplung wurde bei mehreren Gefäßkrankheiten, unter anderem auch bei Diabetes mellitus, in experimentellen und klinischen Studien nachgewiesen (Hink et al., 2001; Cai et al., 2004; Satoh et al., 2005). Das gemeinsame Auftreten von Diabetes mellitus und eNOS-Entkopplung wurde im Herzen, in Gefäßen und bei der Niere beschrieben (Hink et al., 2001; Consentino et al., 1997; Molnar et al., 2005; Satoh et al., 2005). Die Folge der eNOS-Entkopplung ist eine verminderte Bioverfügbarkeit an NO, eine gesteigerte  $O_2^-$ -Produktion und ein vermindertes Vorliegen der eNOS-Dimer-Isoform. Im Gegensatz dazu steht die gleich gebliebene oder sogar erhöhte Expression der eNOS (Cai et al., 2005; Molnar et al., 2005; Satoh et al., 2005). Als ein wichtiger Faktor bei der eNOS-Entkopplung wurde eine Verminderung der Konzentration des essentiellen Kofaktors  $BH_4$  beschrieben (Alp et al., 2004; Landmesser et al., 2003; Cai et al., 2005; Kuzkaya et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass EPCs von diabetischen Patienten gesteigerte intrazelluläre Level an ROS, eine verminderte Kapazität zur Bildung endothelialer CFUs und eine verminderte Migrationsfähigkeit besitzen. Alle diese Parameter konnten durch eine NOS-Blockade mit L-NNA verbessert werden. In-vitro wurde nachgewiesen, dass hohe Glukosekonzentrationen in EPCs zu einer gesteigerten ROS-Produktion und einer verminderten Funktion der EPCs führen.

## **4.1. Die Rolle von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) bei der EPC-Dysfunktion**

### **4.1.1. Das antioxidative Abwehrsystem der EPCs**

Wie schon erwähnt kommt es im Rahmen des Kontinuums kardiovaskulärer Erkrankungen zu einer gesteigerten ROS-Bildung. EPCs besitzen per se ein stärkeres antioxidatives Abwehrsystem als andere Zellen: Aus Blut gewonnene EPCs besitzen eine erhöhte Expression für Gene, die für antioxidative Proteine kodieren. Infolgedessen ist die Sensitivität der EPCs gegenüber ROS-induziertem Zelltod verringert (Dernbach et al., 2004). Diese hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber ROS, wie wir sie bei den EPCs finden, wird als allgemeine Eigenschaft von Stammzellen angesehen (Ramalho-Santos et al., 2002). Ausgestattet mit einem derartigen antioxidativen Abwehrsystem ist es den EPCs möglich, in ischämischen oder nekrotischen Geweben zu überleben, in denen ein hoher durch inflammatorische Zytokine induzierter oxidativer Stress vorliegt (Cramer et al., 2003), um letztendlich zu einer Regeneration des Gewebes beizutragen.

Das empfindlichste Organell für ROS stellt das Mitochondrium dar, weil ständig ein Potential für die Produktion von  $O_2^-$  besteht.  $O_2^-$  wird durch die Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid und dieses durch die Katalase und die Glutathionperoxidase (GPx-1) entgiftet. Beide letztgenannten Enzyme sind an der Mitochondrienmembran lokalisiert und gelten daher als die primären Enzyme für die Abwehr von ROS. Tatsächlich konnte in zwei in-vitro Studien eine erhöhte Proteinkonzentration für die GPx-1 und die manganhaltige Superoxiddismutase (MnSOD) in EPCs nachgewiesen werden (Dernbach et al., 2004; He et al., 2004).

### **4.1.2. Die ambivalente Rolle von ROS**

ROS besitzen aber nicht nur eine schädigende Wirkung auf das Gefäßsystem, sondern spielen eine ambivalente Rolle: hohe Konzentrationen an ROS sind toxisch und begünstigen die Entstehung der Atherosklerose, geringe Konzentrationen hingegen sind für die volle Aktivierung der Angiogenese nach Ischämie sogar notwendig. Ein Beispiel hierfür ist, dass Mäusen, denen eine Untereinheit der NOX ( $gp91^{phox}$ ) fehlt, eine verminderte Neovaskularisation nach Ischämie zeigen (Tojo et al., 2005). Hierbei scheinen ROS als intrazellulärer Signalmechanismus die Angiogenese zu fördern und



einer Schädigung des Endothels vorzubeugen (Chen et al., 1995; Skyschally et al., 2003; Tanaka et al., 2002). In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde mit Hilfe von extrazellulären-SOD-Knockout-Mäusen (ecSOD-knockout-Mäusen) die essentielle Rolle der ecSOD bei der Neovaskularisation beschrieben (Kim et al., 2007).

#### 4.1.3. EPC-Dysfunktion als Folge erhöhter ROS

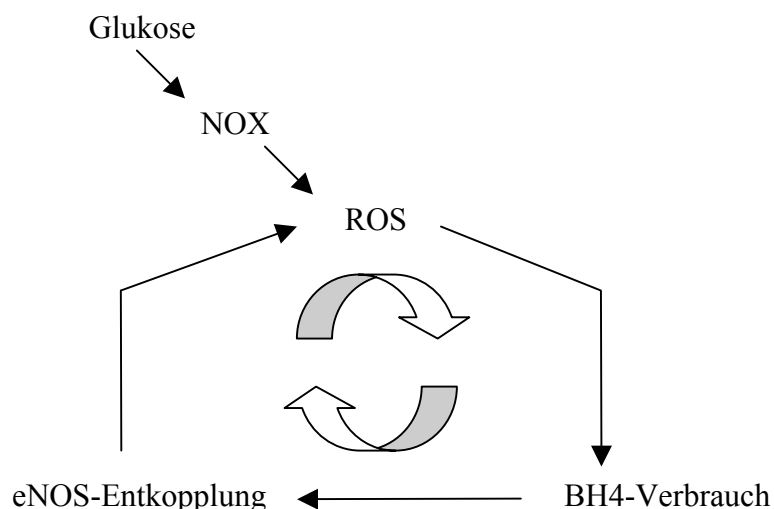
Trotz der beschriebenen erhöhten Widerstandskraft von EPCs gegenüber ROS konnten Galasso et al. mit Hilfe von GPx-1-knockout-Mäusen eine direkte Korrelation zwischen einer erhöhten ROS-Produktion und einer EPC-Dysfunktion bezüglich Migration und Angiogenese in-vitro und in-vivo nachweisen. Zudem waren die EPC-Blutspiegel nach Ischämie oder VEGF-Gabe vermindert (Galasso et al., 2006). Außerdem war die Rekrutierung von EPCs aus dem Knochenmark als auch deren peripherer Blutspiegel bei den eben erwähnten ecSOD-knockout-Mäusen ebenfalls vermindert (Kim et al. 2007).

In zwei kürzlich veröffentlichten Arbeiten an diabetischen EPCs ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse. Sorrentino et al. beobachteten in ihrer Arbeit mit EPCs diabetischer Patienten eine gesteigerte ROS-Bildung in Kombination mit einer deutlich verminderten Reendothelialisierungskapazität in-vivo. Durch Hemmung der p47<sup>phox</sup> mittels small-interfering RNA konnte die Reendothelialisierung und die ROS-Produktion nahezu normalisiert werden (Sorrentino et al., 2007). Chen et al. erreichten hingegen durch eine antioxidative Therapie keine Besserung der EPC-Funktion und sehen daher die EPC-Dysfunktion als ROS-unabhängig (Chen et al., 2007).

Im Einklang mit den Ergebnissen von Sorrentino et al. stehen auch die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten. Bei diabetischen Patienten war eine erhöhte Konzentration an ROS im Blut nachweisbar und die Funktion der EPCs war deutlich eingeschränkt. Durch unsere Zellkulturversuche konnten wir eine direkte Korrelation zwischen Glukoseapplikation und gesteigerter ROS-Bildung nachweisen. Dass dies ein Glukose-spezifischer Effekt und nicht durch osmotischen Stress bedingt ist, haben wir durch die Gabe von Mannitol nachgewiesen, da bei dessen Applikation keine Veränderungen bezüglich der ROS-Bildung oder EPC-Funktion feststellbar waren.

Daher scheinen alleine die erhöhten Glukosespiegel bei Diabetikern eine Steigerung der ROS zu induzieren und sekundär zu einer EPC-Dysfunktion zu führen.

Nicht übereinstimmend sind unsere Ergebnisse mit denen von Sorrentino et al. bezüglich der Rolle der NOX. Sorrentino et al. konnten durch deren Blockade eine nahezu Normalisierung der ROS-Produktion als auch der Reendothelialisierung hervorrufen. Wir hingegen erhielten lediglich eine minimale Funktionsverbesserung der EPCs. Die von Sorrentino et al. gewonnenen EPCs stammten von Patienten mit einem sehr niedrigen HbA1c ( $6,6 \pm 0,2\%$ ). Daraus ist vermutlich zu folgern, dass der glukosespezifische ROS-Stress in den EPCs relativ gering war. Folglich hat der Verbrauch von BH<sub>4</sub> erst begonnen und es ist noch nicht zu einer massiven eNOS-Entkopplung gekommen. Die NOX könnte in diesem Zusammenhang ein Initiatorenzym für den Circulus vitiosus der eNOS-Entkopplung darstellen, welches die eNOS-Entkopplung durch eine erste ROS-Generierung triggert. Wenn sich aber die eNOS-Entkopplung bereits verselbstständigt hat und ein Großteil der ROS durch diese gebildet wird, hat die Ausschaltung der NOX nur noch eine untergeordnete Bedeutung. Folge wäre nämlich nur eine geringe Reduzierung der ROS-Konzentration und eine weiter bestehende eNOS-Entkopplung mit einer nicht nur starken ROS-Bildung, sondern auch verminderten NO-Bioverfügbarkeit.



**Circulus vitiosus der eNOS-Entkopplung**

Durch die Differenzierung zwischen der allgemeinen ROS-Bildung - inhibiert durch die Gabe von MnSOD - und jener, welche durch die NOS hervorgerufen wird - Inhibierung durch L-NNA - konnten wir den Anteil der ROS-Produktion, welcher durch die NOS-Entkopplung hervorgerufen wird, identifizieren. Knapp 60% der ROS-Bildung wird durch die entkoppelte NOS hervorgerufen. Die durch die NOS-Entkopplung gesteigerte ROS-Produktion führt unabhängig von einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit zu einer EPC-Dysfunktion. Dies lässt sich daraus ableiten, dass nach der Blockade der NOS durch L-NNA es zu einer 34%igen Verbesserung der EPC-Funktion kam, obwohl zu diesem Zeitpunkt definitiv kein NO mehr zur Verfügung stand. Diese Funktionsverbesserung ist damit alleine auf das Fehlen der durch die entkoppelte NOS produzierten ROS zurückzuführen. Die genauen molekularen Mechanismen wie es durch erhöhte ROS zu einer EPC-Dysfunktion kommt sind aber weitestgehend unklar. Die schützende Rolle der eNOS scheint mit diesen Ergebnissen nur unter normoglykämischen Bedingungen zu bestehen, da bei hyperglykämischen Bedingungen die eNOS entkoppelt wird und anstatt NO hauptsächlich  $O_2^-$  produziert wird. Dies unterstreicht die herausragende Rolle der eNOS bei der ROS-Bildung und konsekutiv auch bei der dadurch entstehenden EPC-Dysfunktion.

#### 4.1.4. Andere Ursachen für einen erhöhten ROS-Stress

Auf der anderen Seite bedeuten diese Ergebnisse im Rückschluss auch, dass weitere Systeme wie die mitochondriale ROS-Bildung (Galasso et al., 2006) oder die gesteigerte Aktivierung der mitogenaktivierte Proteinkinase p38 (p38 MAP-Kinase) (Seeger et al., 2005) in EPCs für die restlichen 40% der ROS-Produktion verantwortlich sein müssen.

## **4.2. Die Entkopplung der eNOS**

### 4.2.1. Die Rolle von NO für die EPC-Funktion

Aicher et al. konnten bei eNOS-defizienten Mäusen sowohl eine EPC-Dysfunktion als auch eine verminderte durch VEGF oder 5-FU hervorgerufene EPC-Mobilisierung zeigen. Die intravenöse Infusion von NOS<sup>-/-</sup>-EPCs in NOS<sup>-/-</sup>-Tiere führte zu keiner

Verbesserung der Perfusion. Nach intravenöser Gabe von wildtyp EPCs (NOS<sup>+/+</sup>) in NOS<sup>-/-</sup>-Tiere hingegen ließ sich eine deutlich verbesserte Perfusion nachweisen. Weiter zeigten Wildtypiere nach Transplantation von NOS<sup>-/-</sup>-Knochenmarkszellen eine deutliche Verschlechterung der Neovaskularisation (Aicher et al., 2003). Ob diese EPC-Dysfunktion alleine auf das Fehlen von NO zurückzuführen ist oder ob hierbei auch eine gesteigerte ROS-Bildung eine Rolle gespielt haben könnte, ist in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt. Die eNOS bzw. NO scheint somit für die EPC-vermittelte Angiogenese von großer Bedeutung zu sein. Die Daten von Aicher et al. stehen auch in Übereinstimmung mit Studien, welche die eNOS als essentiell für das Überleben, die Migration und Angiogenese von ausgereiften endothelialen Zellen darstellen (Ziche et al., 1994; Murohara et al., 1999; Dimmeler et al., 1997).

Somit besitzt die Entkopplung der eNOS zwei negative Effekte auf die EPC-Funktion: erstens durch die verminderte Bioverfügbarkeit an NO und zweitens durch eine gesteigerte ROS-Bildung.

Diese Tatsachen verdeutlichen die große Bedeutung der eNOS-Entkopplung und lassen zudem die eNOS-Entkopplung als den wahrscheinlich entscheidenden Mechanismus in Bezug auf die EPC-Dysfunktion erkennen.

#### 4.2.2. Die wichtigsten Ursachen der eNOS-Entkopplung:

##### 4.2.2.1 Argininmangel

Ein relativer Argininmangel und damit unzureichende Enzymsättigung aufgrund gesteigerter Arginaseaktivität bei endothelialer Dysfunktion (Berkowitz et al. 2003; Ming et al. 2004; Hein et al. 2003; Johnson et al. 2005) könnte zu einer eNOS-Entkopplung führen. Durch die Gabe von L-Arginin konnte ein positiver Effekt bei Tierstudien und bei Menschen, die eine Hypercholesterinämie oder einen Bluthochdruck aufwiesen, nachgewiesen werden (Imaizumi et al. 1992; Drexler et al. 1991; Rossitch et al. 1991). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht.

#### 4.2.2.2. Die Bildung von asymmetrischem-Dimethyl-Arginin

Zweitens könnte asymmetrisches-Dimethyl-Arginin (ADMA) als endogener Inhibitor der NOS zu deren Entkopplung führen. Die Plasmakonzentration von ADMA ist bei Patienten mit Diabetes mellitus erhöht (Lin et al. 2002). Die Dimethylarginase-Dimethylaminohydrolase (DDAH) ist für den Abbau von ADMA zuständig. In Versuchen mit diabetischen Ratten konnte gezeigt werden, dass das Enzym DDAH redoxabhängig gehemmt bzw. aktiviert wird. Bei diabetischen Ratten war die DDAH-Aktivität vermindert und somit akkumulierte ADMA in den Zellen (Lin et al. 2002). Diese Daten lassen die Vermutung zu, dass eine gesteigerte ROS-Produktion zu erhöhten ADMA-Spiegeln führt. Erhöhte ADMA-Spiegel vermindern die NO-Synthese durch eine eNOS-Inhibierung oder könnten diese sogar entkoppeln (Böger et al. 2000). Ob die in vivo erreichte ADMA-Konzentration aber tatsächlich zu einer eNOS-Hemmung führt, muss erst noch untersucht werden.

#### 4.2.2.3. Das Fehlen von Tetrahydrobiopterin

Drittens spielt höchstwahrscheinlich  $BH_4$  eine entscheidende Rolle bei der eNOS-Entkopplung.  $BH_4$  stellt eines der potentesten endogenen Antioxidantien dar. Ein gesteigerter oxidativer Stress führt zu einer Verminderung der  $BH_4$ -Spiegel (Laursen et al., 2001; Milstien et al., 1999).

Glukose erhöht die endotheliale  $O_2^-$ -Produktion (Consentino et al., 1997) und führt dadurch zur Bildung von Peroxynitrit, dem direkten Reaktionsprodukt aus NO und  $O_2^-$  (Kossenjans et al., 2000). Peroxynitrit oxidiert sehr effektiv  $BH_4$  zu  $BH_2$  (Milstien et al., 1999). Durch das Fehlen des essentiellen Kofaktors  $BH_4$  befindet sich die eNOS in einem „entkoppelten“ Zustand, so dass die Aktivierung des Sauerstoffs von der NO-Produktion getrennt ist und somit anstatt  $NO$   $O_2^-$  gebildet wird. Durch diesen Mechanismus könnte der  $BH_4$ -Mangel die Basis der eNOS-Entkopplung und somit der eNOS-Dysfunktion bei der vaskulären Pathophysiologie darstellen.

Übereinstimmend mit dieser Theorie wurden in Aorten von insulin-resistenten Ratten (Shinozaki et al., 1999), im Plasma von SHRs verglichen mit altersgleichen Wistar-Kyoto-Ratten (Hong et al., 2001), in der Aorta von hypercholesterinämischen Apolipoprotein-E-Knockout Mäusen (Laursen et al., 2001) und in mit DOCA-Salz

behandelten hypertensiven Ratten erniedrigte Spiegel von BH<sub>4</sub> gefunden. Weiter korreliert die NO- und L-Citrullin-Produktion der eNOS eng mit den intrazellulären BH<sub>4</sub>-Konzentrationen (Werner-Felmayer et al., 1993). Eine Gabe von BH<sub>4</sub> kann die eNOS-Dysfunktion unter vielen pathophysiologischen Bedingungen rückgängig machen und somit die eNOS „rückkoppeln“. So konnte z.B. in isolierten Aorten von prähypertensiven Ratten durch BH<sub>4</sub>-Gabe die NOS-abhängige O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Generierung unterbunden werden (Consentino et al., 1997) und die endotheliale Funktion durch Verabreichung von BH<sub>4</sub> restituiert werden. Dies konnte auch bei Tieren mit Diabetes mellitus (Pieper et al., 1997) oder Insulinresistenz (Shinozaki et al., 2000) und bei Patienten mit Hypercholesterinämie (Stroes et al., 1997), Diabetes mellitus (Heitzer et al., 2000) oder essentieller Hypertonie (Higashi et al., 2002) nachgewiesen werden. Die Überexpression der Guanosintriphosphat-Cyclohydrolase 1, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym bei der BH<sub>4</sub>-Synthese, sorgte bei ApoE-KO/eNOS-transgenen Mäusen, welche initial eine gesteigerte ROS-Produktion als auch beschleunigte Atherosklerose-entwicklung zeigten, für eine verminderte ROS-Produktion sowie eine verlangsamte Atheroskleroseentwicklung (Takaya et al., 2007).

Wir konnten demonstrieren, dass auch bei EPCs die intrazelluläre Verfügbarkeit von BH<sub>4</sub> eine kritische Rolle bei der Kopplung und Entkopplung der eNOS spielt. Durch die Glukoseapplikation stieg der ROS-Stress und infolgedessen sank durch Oxidation von BH<sub>4</sub> zu BH<sub>2</sub> oder Biopterin die Konzentration an BH<sub>4</sub> um 59%. Das Gesamtbiopterin differierte in beiden Gruppen nicht. Um zu beweisen, dass die Entkopplung der eNOS auch bei EPCs BH<sub>4</sub>-abhängig ist, haben wir BH<sub>4</sub> zu den diabetischen EPCs gegeben. Hierdurch sank die O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Konzentration deutlich und die Migrationsfähigkeit der EPCs normalisierte sich.

Mit diesen Ergebnissen liegt die Vermutung nahe, dass am Anfang der EPC-Dysfunktion eine vermehrte ROS-Bildung steht, welche zu einem gesteigerten Verbrauch von BH<sub>4</sub>, damit zu einer eNOS-Entkopplung und in Folge dessen zu einer gesteigerten ROS-Bildung führt. Dies würde bedeuten, dass sich hier ein Circulus vitiosus ausbildet, der als Anfangspunkt eine gesteigerte ROS-Bildung hat und selber in einer gesteigerten ROS-Bildung endet.

#### 4.2.3. Interventionsmöglichkeit: Blockade der PKC – Verhinderung einer eNOS-

##### Entkopplung

Ein beschriebener Mechanismus in der Literatur zur Verhinderung einer eNOS-Entkopplung bei Endothelzellen ist die Inhibierung der PKC. Inkubation von vaskulärem Gewebe mit hohen Glukosekonzentrationen führte zu einer gesteigerten intrazellulären Konzentration an Diacylglycerol (DAG), welches die PKC aktiviert (Ishii et al., 1998). Eine durch Glukose induzierte Endothelzell dysfunktion konnte durch PKC-Inhibitoren korrigiert werden (Teschfamiar et al., 1994). Diese in-vitro Beobachtungen konnten durch eine in-vivo Studie bestätigt werden, bei der durch eine Behandlung diabetischer Ratten mit PKC-Inhibitoren die vaskulären Komplikationen vermieden werden konnten (Ishii et al., 1996). Die Aktivierung der PKC führte in diabetischen Gefäßen zu einer gesteigerten  $O_2^-$ -Produktion (Hink et al., 2001). Eine Inhibierung der PKC in-vivo mit N-benzoyl-Staurosporin verhinderte eine gesteigerte eNOS-Expression und eine NOS-vermittelte Superoxidproduktion. Gleichzeitig stieg die NO-Bioverfügbarkeit und die endotheliale Funktion deutlich (Hink et al., 2001). Zudem schien die PKC die NOX zu aktivieren, die eine entscheidende Rolle bei der eNOS-Entkopplung zumindest bei hypertensiven Mäusen spielen könnte (Quagliaro et al., 2003; Landmesser et al., 2003).

Eine Rolle der PKC bei EPCs wurde bisher noch nicht analysiert. Unsere Ergebnisse, dass eine Blockade der PKC mit Chelerythin zu einer deutlich verminderten ROS-Generierung und einer deutlichen EPC-Funktionsverbesserung führte, lassen eine Bedeutung der PKC bei den durch Glukose induzierten Effekten vermuten. Damit stellt die PKC einen weiteren therapeutischen Ansatzpunkt dar.

#### **4.3. Ursachen der verminderten EPC-Spiegel**

Neben der verminderten Funktion stellt sich die Frage, was die Ursache für die Reduktion der EPC-Spiegel ist: Eine gesteigerte Apoptose, eine veränderte Differenzierung der Vorläuferzellen, ein gesteigerter Verbrauch oder eine verminderte Mobilisierung?

Eine gesteigerte Apoptose als Ursache scheint unwahrscheinlich, da die basale Apoptoserate zwischen EPCs von Wildtyp-Mäusen und GPx-1-knockout und NOS-

defizienten Mäusen nicht differenzierte (Gallasso et al., 2006). Die Differenzierung von Progenitorzellen in Richtung der endothelialen Linie scheint deutlich beeinträchtigt zu sein. Die GPx-1-knockout-Mäuse zeigten eine verminderte Expression des Flk-1. Zudem ist auch die Mobilisierung, nachgewiesen durch erniedrigten EPC-Spiegel nach Ischämie und VEGF-Gabe, deutlich vermindert. Die spezifischen molekularen Mechanismen für diese Effekte sind unbekannt, aber neben der erhöhten Konzentration an ROS, insbesondere im Knochenmark, könnte eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO eine entscheidende Rolle spielen.

#### **4.4. Die Freisetzung der EPCs aus dem Knochenmark**

Obwohl schon in mehreren Studien ein verminderter EPC-Spiegel im Blut von diabetischen Patienten nachgewiesen worden ist (Bahlmann et al., 2005; Krankel et al., 2005), wurden die EPC-mobilisierenden Wege im Knochenmark bisher noch nicht untersucht.

##### **4.4.1. Die Rolle der eNOS**

Bei der Regulation der EPC-Freisetzung, insbesondere bei einer gesteigerten Freisetzung, spielt die eNOS eine entscheidende Rolle. Aicher et al. konnte bei eNOS-defizienten Mäusen keine generelle Reduktion des EPC-Spiegels nachweisen, sehr wohl aber eine deutlich verminderte Freisetzung nach Gabe von VEGF oder 5-FU. Beide führen normalerweise zu einer gesteigerten Freisetzung von EPCs (Aicher et al., 2003). Weiter konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die eNOS-Expression der Stromazellen für die EPC-Freisetzung von großer Wichtigkeit ist. Grund zu dieser Annahme gab das Ergebnis, dass die VEGF-induzierte EPC-Mobilisierung bei NOS<sup>-/-</sup>-Mäusen mit transplantiertem wildtyp-Knochenmark deutlich reduziert war im Vergleich zu wildtyp-Mäusen mit transplantiertem wildtyp-Knochenmark oder NOS<sup>-/-</sup>-Knochenmark (Aicher et al., 2003). Dies bedeutet, dass die verminderte EPC-Freisetzung bei den NOS<sup>-/-</sup>-Mäusen mit transplantiertem wildtyp-Knochenmark nur durch ein defektes Knochenmarkstroma verursacht sein kann und folglich die verminderte NO-Bioverfügbarkeit zu einer verminderten EPC-Freisetzung geführt hat.



#### 4.4.2. Diabetes mellitus führt zu einer Aktivitätsminderung der eNOS

Im Knochenmark ist die eNOS die vorherrschende Expressionsvariante der NOS, da weder iNOS noch nNOS im Knochenmark gefunden werden konnten (Fox et al., 1998). Wir konnten eine gesteigerte eNOS-, und Proteinkinase B (Akt) -Expression bei gleichzeitig verminderter Phosphorylierung jener Enzyme im Knochenmark von diabetischen Ratten feststellen. Dieses Ergebnis stimmt nur zum Teil mit einer kürzlich veröffentlichten Arbeit überein, bei der ebenfalls eine verminderte Phosphorylierung aber keine Expressionsveränderung beider Enzyme gesehen wurde (Chen et al., 2007). Eine verminderte eNOS-Aktivität steht bei hyperglykämischen Endothelzellen in Verbindung mit Glykosylierung und verminderter Phosphorylierung der eNOS an Ser<sup>1177</sup> durch (p)AKT (Du et al., 2001).

#### 4.4.3. eNOS- Monomerisierung – Marker der eNOS-Entkopplung?

Die eNOS-Monomerisierung und die O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion waren im Knochenmark diabetischer Ratten ebenfalls gesteigert. Die O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion konnte durch die Gabe von L-NNA geblockt werden, was auf eine O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion einer entkoppelten eNOS hindeutet. Eine Verbindung zwischen eNOS-Monomerisierung und der eNOS-Entkopplung wurde bei der Behandlung von Endothelzellen mit Peroxynitrit oder Glukose beschrieben (Cai et al., 2005; Molinar et al., 2005). Im Knochenmark diabetischer Ratten war das eNOS-Dimer/Monomer-Verhältnis hin zum Monomer verschoben. Studien mit Inhibitoren der Dimerisierung von iNOS lassen vermuten, dass wenn einmal ein Dimer geformt ist, es kaum oder gar nicht mehr zu einer Monomerisierung kommt (McMillan et al., 2000). Es ist wahrscheinlich, dass dies auch bei der eNOS der Fall ist. Zusätzlich scheint die eNOS nur als Dimer aktiv zu sein und, je nachdem ob gekoppelt oder entkoppelt, NO bzw. O<sub>2</sub><sup>-</sup> zu generieren. Dies bedeutet, dass auch in der entkoppelten Form die eNOS als Dimer vorliegt. Die Struktur der gekoppelten eNOS könnte aber eine andere sein, die eine stabilere Form der eNOS zur Folge hat und damit zu einem gesteigerten eNOS-Dimer/Monomer-Verhältnis in der Analyse führt. Auch wenn das Dimer/Monomer-Verhältnis nicht direkt funktionell mit einer Entkopplung der eNOS in Bezug steht, kann es aufgrund der beschriebenen Umstände und Ergebnisse Marker für die eNOS-Entkopplung sein (Bauersachs et al.,

2005). Wir können nicht ausschließen, dass die NOX oder andere Superoxidbildende Systeme an der  $O_2^-$ -Produktion beteiligt waren. Trotzdem scheint die Entkopplung der eNOS im diabetischen Knochenmark bezüglich der  $O_2^-$ -Produktion eine absolut bestimmende Rolle zu spielen, da eine NOS Blockade mit L-NNA zu einer Normalisierung der  $O_2^-$ -Bildung im Vergleich zu Kontrolltieren geführt hat.

#### 4.4.4. NO als wichtiger Mediator der EPC-Freisetzung

NO führt im Knochenmark durch eine S-Nitrosylierung zu einer Aktivierung der MMP-9 (Gu et al., 2002). MMP-9-defiziente Mäuse zeigen eine deutlich verminderte Fähigkeit, nach Gabe von VEGF oder 5-FU endotheliale und hämatopoetische Stammzellen aus einem ruhenden in einen proliferativen Zustand zu versetzen.

Die MMP-9 ist essentiell für die VEGF- oder 5-FU-induzierte Mobilisierung von endothelialen und hämatopoetischen Stammzellen (Heissig et al., 2003). MMP-9- oder eNOS-defiziente Mäuse zeigen eine deutlich verminderte Fähigkeit endotheliale Stammzellen aus dem Knochenmark zu rekrutieren (Heissig et al., 2003; Aicher et al., 2003). NO vermag die Expression der MMP-9 in den Zellen der glatten Gefäßmuskulatur zu steigern (Marcet-Palacios et al., 2003) und die Aktivität der MMP-9 mittels S-Nitrosylierung zu steigern (Gu et al., 2002). Unter hyperglykämischen Bedingungen kultivierte EPCs zeigen eine verminderte MMP-9-Aktivität und korrelieren mit der verminderten integrativen Kapazität der EPCs (Krankel et al., 2005). Diese Ergebnisse passen sehr gut dazu, dass eine gesteigerte  $O_2^-$ -Produktion zu einer verminderten Bioverfügbarkeit an NO führt (Thum et al., 2006) und es dadurch zu einer verminderten Aktivität der MMP-9 im Knochenmark kommt. Eine verminderte MMP-9-Aktivität könnte mit einer verminderten Zahl an zirkulierenden EPCs verbunden sein. Ursache hiervon ist höchstwahrscheinlich größtenteils die eNOS-Entkopplung.

## **5. Zusammenfassung:**

Eine Schädigung des Endothels ist früh nachweisbar in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen. Beim Diabetes mellitus führt die Entkopplung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) durch Bildung von Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) anstatt von Stickstoffmonoxid (NO) zu einer gesteigerten Produktion an reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) und zu einer Schädigung des Endothels. Bei der Endothelregeneration spielen die kürzlich entdeckten endothelialen Progenitorzellen (EPCs) eine entscheidende Rolle. Für deren Mobilisierung und volle Funktionalität ist die eNOS von essentieller Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, daß die beim Diabetes mellitus bekannte Entkopplung der eNOS auch eine wichtige Rolle bei der verminderten Mobilisierung und Dysfunktion von EPCs spielen könnte.

Bei Patienten mit Typ-II Diabetes waren die EPC-Spiegel im Blut deutlich vermindert, die EPCs von diabetischen Patienten produzierten mehr  $O_2^-$  und ihre Funktion war im Vergleich zu den EPCs von Kontrollen eingeschränkt. Die gestörte Funktion der EPCs ließ sich durch eine Blockade der NOS mit  $N^G$ -nitro-L-Arginin (L-NNA) zu einem großen Teil wiederherstellen. Gleichzeitig war dies auch mit einer verminderten  $O_2^-$ -Produktion verbunden.

In kultivierten EPCs führte die Inkubation mit Glukose zu einer vermehrten  $O_2^-$ -Produktion und einer verminderten Migrationsfähigkeit. Die Proteinkinase C scheint hierbei mechanistisch über eine Aktivierung der NADPH-Oxidase (NOX) von Bedeutung zu sein. Die durch Glukose hervorgerufene gesteigerte  $O_2^-$ -Generierung resultiert in verminderten intrazellulären Tetrahydrobiopterin ( $BH_4$ )-Spiegeln, dem wahrscheinlich entscheidenden pathophysiologischen Mechanismus bei der eNOS-Entkopplung. Nach exogener Zufuhr von  $BH_4$  kam es zu einer signifikanten Funktionsverbesserung der EPCs und einer deutlich verminderten  $O_2^-$ -Produktion.

Im Tiermodell des Diabetes wurden EPC-mobilisierende Mechanismen untersucht. Bei Ratten wurde durch Streptozotocinjektion ein Typ-I-Diabetes hervorgerufen. Bei diesen Tieren konnten ebenso wie bei den diabetischen Patienten verminderte EPC-Spiegel nachgewiesen werden. Ursache hierfür könnte eine Entkopplung der eNOS im

Knochenmark sein. Hier zeigt e sich eine gesteigerte  $O_2^-$ -Produktion, welche durch eine NOS-Blockade mittels L-NNA teilweise reversibel war.

Wahrscheinlich sind die auf die Entkopplung de r eNOS zurückzuführende verm inderte EPC-Mobilisierung und -Funktion m itbestimmende Faktoren in der Pathogenese von vaskulären Komplikationen beim Diabetes mellitus.

## **6. Literaturverzeichnis:**

Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S: Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 2003; 9:1370-1376

Aicher A, Rentsch M, Sasaki K, Ellwart JW, Fändrich F, Siebert R, Cooke JP, Dimmeler S, Heeschen C: Nonbone marrow-derived circulating progenitor cells contribute to postnatal neovascularization following tissue ischemia. *Circ Res* 2007; 100:581-9

Alp NJ, Channon KM: Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:413-20

Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM: Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85:221-8

Assmus B, Schächinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, Grünwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM.: Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002; 106:3009-17

Bahlmann FH, de Groot K, Mueller O, Hertel B, Haller H, Fliser D: Stimulation of endothelial progenitor cells: a new putative therapeutic effect of angiotensin II receptor antagonists. *Hypertension* 2005; 45:526-9

Bauersachs J, Schäfer A: Tetrahydrobiopterin and eNOS dimer/monomer ratio--a clue to eNOS uncoupling in diabetes? *Cardiovasc Res* 2005; 65:768-9

Bendall JK, Alp NJ, Warrick N, Cai S, Adlam D, Rockett K, Yokoyama M, Kawashima S, Channon KM: Stoichiometric relationships between endothelial tetrahydrobiopterin, endothelial NO synthase (eNOS) activity, and eNOS coupling in vivo: insights from transgenic mice with endothelial-targeted GTP cyclohydrolase 1 and eNOS overexpression. *Circ Res* 2005; 97:864-71

Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Ito H, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D: Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000; 2:737-44

Berkowitz DE, White R, Li D, Minhas KM, Cernetich A, Kim S, Burke S, Shoukas AA, Nyhan D, Champion HC, Hare JM: Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. *Circulation* 2003; 108:2000-6

Böger RH, Bode-Böger SM: Asymmetric dimethylarginine, derangements of the endothelial nitric oxide synthase pathway, and cardiovascular diseases. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26:539-45

Britten MB, Abolmali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, Vogl TJ, Martin H, Schächinger V, Dimmeler S, Zeiher AM: Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 2003; 108:2212-8

Cai S, Khoo J, Channon KM: Augmented BH4 by gene transfer restores nitric oxide synthase function in hyperglycemic human endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2005; 65:823-31

Chen W, Gabel S, Steenbergen C, Murphy E: A redox-based mechanism for cardioprotection induced by ischemic preconditioning in perfused rat heart. *Circ Res* 1995; 77:424-9

Chen YH, Lin SJ, Lin FY, Wu TC, Tsao CR, Huang PH, Liu PL, Chen YL, Chen JW : High glucose impairs early and late endothelial progenitor cells by modifying nitric oxide-related but not oxidative stress-mediated mechanisms. *Diabetes* 2007; 56:1559-68

Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dominkowski D, Sykes M, Scadden DT: Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* 2000; 287:1804-8

Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS, Luscher TF: High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation* 1997; 96:25-28

Cramer T, Yamashita Y, Clausen BE, Förster I, Pawlinski R, Mackman N, Haase VH, Jaenisch R, Corr M, Nizet V, Firestein GS, Gerber HP, Ferrara N, Johnson RS: HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 2003; 112:645-57

De Palma M, Venneri MA, Roca C, Naldini L: Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat Med* 2003; 9:789-95

Dernbach E, Urbich C, Brandes RP, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S: Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress. *Blood* 2004; 104: 3591-3597

Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM: Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med* 1997; 185:601-7

Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K, Just H: Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine. *Lancet* 1991; 338:1546-50

Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M: Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest* 2001; 108:1341-8

Fadini GP, Miorin M, Facco M, Bonamico S, Baesso I, Grego F, Menegolo M, de Kreutzenberg SV, Tiengo A, Agostini C, Avogaro A: Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45:1449-57

Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H: Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994; 23:1121-31

Fox SW, Chow JW: Nitric oxide synthase expression in bone cells. *Bone* 1998; 23:1-6.  
Galasso G, Schiekofer S, Sato K, Shibata R, Handy DE, Ouchi N, Leopold JA, Loscalzo J, Walsh K: Impaired angiogenesis in glutathione peroxidase-1-deficient mice is associated with endothelial progenitor cell dysfunction. *Circ Res* 2006; 98:254-61

Garg UC, Hassid A: Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83:1774-7

Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM: Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002; 105:1656-62

He T, Peterson TE, Holmuhamedov EL, Terzic A, Caplice NM, Oberley LW, Katusic ZS: Human endothelial progenitor cells tolerate oxidative stress due to intrinsically high expression of manganese superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:2021-7



Heeschen C, Lehmann R, Honold J, Assmus B, Aicher A, Walter DH, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S: Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation* 2004;109:1615-22

Hein TW, Zhang C, Wang W, Chang CI, The ngchaisri N, Kuo L: Ischemia-reperfusion selectively impairs nitric oxide-mediated dilation in coronary arterioles: counteracting role of arginase. *FASEB J* 2003; 17:2328-30

Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S: Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 2003 109:625-37

Heitzer T, Krohn K, Albers S, Meinertz T: Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 2000; 43:1435-8

Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Fukuda Y, Matsuura H, Oshima T, Chayama K: Tetrahydrobiopterin enhances forearm vascular response to acetylcholine in both normotensive and hypertensive individuals. *Am J Hypertens* 2002; 15:326-32

Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyum AA, Finkel T: Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; 348:593-600

Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Mathies E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzel T: Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 2001; 88:14-22

Hong HJ, Hsiao G, Cheng TH, Yen MH: Supplementation with tetrahydrobiopterin suppresses the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2001; 38:1044-8

Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Krüger M, Strand D, Förstermann U: Paraoxonase-2 reduces oxidative stress in vascular cells and decreases endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation. *Circulation* 2007; 115:2055-64

Hur J, Yang HM, Yoon CH, Lee CS, Park KW, Kim JH, Kim TY, Kim JY, Kang HJ, Chae IH, Oh BH, Park YB, Kim HS: Identification of a novel role of T cells in postnatal vasculogenesis: characterization of endothelial progenitor cell colonies. *Circulation* 2007; 116:1671-82

Ii M, Takenaka H, Asai J, Ibusuki K, Mizukami Y, Maruyama K, Yoon YS, Wecker A, Luedemann C, Eaton E, Silver M, Thornton T, Losordo DW: Endothelial progenitor thrombospondin-1 mediates diabetes-induced delay in reendothelialization following arterial injury. *Circ Res* 2006; 98:697-704

Imaizumi T, Hirooka Y, Masaki H, Harada S, Momohara M, Tagawa T, Takeshita A: Effects of L-arginine on forearm vessels and responses to acetylcholine. *Hypertension* 1992; 20:511-7

Ishii H, Koya D, King GL: Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *J Mol Med* 1998; 76:21-31

Johnson FK, Johnson RA, Peyton KJ, Durante W: Arginase inhibition restores arteriolar endothelial function in Dahl rats with salt-induced hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288:R1057-62

Kim HW, Lin A, Guldborg RE, Ushio-Fukai M, Fukui T: Essential role of extracellular SOD in reparative neovascularization induced by hindlimb ischemia. *Circ Res* 2007; 101:409-19

Knowles JW, Reddick RL, Jennette JC, Shesely EG, Smithies O, Maeda N: Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-)ApoE(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. *J Clin Invest* 2000; 105:451-8

Kossenjans W, Eis A, Sahay R, Brockmann D, Myatt L: Role of peroxynitrite in altered fetal-placental vascular reactivity in diabetes or preeclampsia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278:H1311-9

Krankel N, Adams V, Linke A, Gielen S, Erbs S, Lenk K, Schuler G, Hambrecht R: Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:698-703

Kubes P, Suzuki M, Granger DN: Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:4651-5

Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S: Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2003; 278: 22546-22554

Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG: Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 2003; 111:1201-9

Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG: Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 2001; 103:1282-8

Libby P, Plutzky J: Diabetic macrovascular disease: the glucose paradox? *Circulation* 2002; 106:2760-3

Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Tsuji H, Reaven GM, Cooke JP: Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 2002; 106:987-92

Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, Rookmaaker MB, Verseyden C, de Boer HC, Verhaar MC, Braam B, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ: Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes* 2004; 53:195-9

Losordo DW, Dimmeler S.: Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. *Circulation* 2004; 109:2692-7

Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhuh Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S: Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hemopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001; 7:1194-201

McMillan K, Adler M, Auld DS, Baldwin JJ, Blasko E, Browne LJ, Chelsky D, Davey D, Dolle RE, Eagen KA, Erickson S, Feldman RI, Glaser CB, Mallari C, Morrissey MM, Ohlmyer MH, Pan G, Parkinson JF, Phillips GB, Polokoff MA, Sigal NH, Vergona R, Whitlow M, Young TA, Devlin JJ: Allosteric inhibitors of inducible nitric oxide synthase dimerization discovered via combinatorial chemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:1506-11

Milstien S, Katusic Z: Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 Oct; 263:681-4

Ming XF, Barandier C, Viswam bharan H, Kwa k BR, Mach F, Mazzolai L, Hayoz D, Ruffieux J, Rusconi S, Montani JP, Yang Z: Throm bin stimulates human endothelial arginase enzymatic activity via RhoA/ROCK pathway: implications for atherosclerotic endothelial dysfunction. *Circulation* 2004; 110:3708-14

Molnar J, Yu S, Mzhavia N, Pau C, Chereshev I, Dansky HM: Diabetes induces endothelial dysfunction but does not increase neointimal formation in high-fat diet fed C57BL/6J mice. *Circ Res* 2005; 96:1178-84

Murohara T, Witzenbichler B, Spyridopoulos I, Asahara T, Ding B, Sullivan A, Losordo DW, Isner JM: Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1156-61

Pieper GM: Acute amelioration of diabetic endothelial dysfunction with a derivative of the nitric oxide synthase cofactor, tetrahydrobiopterin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997; 29:8-15

Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Martinelli L, Motz E, Ceriello A: Intermittent high glucose enhances apoptosis related to oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells: the role of protein kinase C and NAD(P)H-oxidase activation. *Diabetes* 2003; 52:2795-804

Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG: Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996; 97:1916-23

Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA: "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* 2002; 298:597-600

Romagnani P, Annunziato F, Liotta F, Lazzeri E, Mazzinghi B, Frosali F, Cosmi L, Maggi L, Lasagni L, Scheffold A, Kruger M, Dimmeler S, Marra F, Gensini G, Maggi E, Romagnani S: CD14+CD34low cells with stem cell phenotypic and functional features are the major source of circulating endothelial progenitors. *Circ Res* 2005; 97:314-22

Rossitch E Jr, Alexander E 3rd, Black PM, Cooke JP: L-arginine normalizes endothelial function in cerebral vessels from hypercholesterolemic rabbits. *J Clin Invest* 1991; 87:1295-9

Satoh M, Fujimoto S, Haruna Y, Arakawa S, Horike H, Komai N, Sasaki T, Tsujioka K, Makino H, Kashihara N: NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288:1144-52.

Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U, Dimmeler S, Zeiher AM: Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 2005; 111:2981-7

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

Segal MS, Shah R, Afzal A, Perrault CM, Chang K, Schuler A, Beem E, Shaw LC, Li Calzi S, Harrison JK, Tran-Son-Tay R, Grant MB: Nitric oxide cytoskeletal-induced alterations reverse the endothelial progenitor cell migratory defect associated with diabetes. *Diabetes* 2006; 55:102-9

Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond W P: Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998; 92:362-7

Shinozaki K, Kashiwagi A, Nishio Y, Okamura T, Yoshida Y, Masada M, Toda N, Kikkawa R: Abnormal biopterin metabolism is a major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/O<sub>2</sub>- imbalance in insulin-resistant rat aorta. *Diabetes* 1999; 48:2437-45

Shinozaki K, Nishio Y, Okamura T, Yoshida Y, Maegawa H, Kojima H, Masada M, Toda N, Kikkawa R, Kashiwagi A: Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in the aortas of insulin-resistant rats. *Circ Res* 2000; 87:566-73

Skyschally A, Schulz R, Gres P, Korth HG, Heusch G: Attenuation of ischemic preconditioning in pigs by scavenging of free oxyradicals with ascorbic acid. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284:H698-703

Sorrentino SA, Bahlmann FH, Besler C, Müller M, Schulz S, Kirchhoff N, Doerries C, Horváth T, Limbourg A, Limbourg F, Fliser D, Haller H, Drexler H, Landmesser U: Oxidant stress impairs in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells from patients with type 2 diabetes mellitus: restoration by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *Circulation* 2007; 116:163-73

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg RV, Kögler G, Wernet P.: Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106:1913-8

Stroes E, Kastelein J, Cosentino F, Erkelens W, Wever R, Koomans H, Lüscher T, Rabelink T: Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 1997; 99:41-6

Stuehr D, Pou S, Rosen GM: Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J Biol Chem* 2001; 276:14533-6

Takaya T, Hirata K, Yamashita T, Shinohara M, Sasaki N, Inoue N, Yada T, Goto M, Fukatsu A, Hayashi T, Alp NJ, Channon KM, Yokoyama M, Kawashima S: A specific role for eNOS-derived reactive oxygen species in atherosclerosis progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:1632-7

Tanaka K, Weirauch D, Kehl F, Ludwig LM, LaDisa JF Jr, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC: Mechanism of preconditioning by isoflurane in rabbits: a direct role for reactive oxygen species. *Anesthesiology* 2002; 97:1485-90

Tanner FC, Meier P, Greutert H, Champion C, Nabel EG, Lüscher TF: Nitric oxide modulates expression of cell cycle regulatory proteins: a cytostatic strategy for inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 2000; 101:1982-9

Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC: Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 2002; 106:2781-6

Teschfamiar B: Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic Biol Med* 1994; 16:383-91

Thum T, Fraccarollo D, Galuppo P, Tsikas T, Ertl G and Bauersachs J: Bone marrow molecular alterations after myocardial infarction: Impact on endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 50-60

Thum T, Fraccarollo D, Thum S, Schultheiss M, Daiber A, Wenzel P, Munzel T, Ertl G, Bauersachs J: Differential effects of organic nitrates on endothelial progenitor cells are determined by oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:748-54



Thum T, Tsikas T, Stein S, Schultheiss M, Eigenthaler M, Anker SD, Poole-Wilson PA, Ertl G and Bauersachs J: Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46:1693-1701

Tojo T, Ushio-Fukai M, Yamaguchi-Tojo M, Ikeda S, Patrushev N, Alexander RW: Role of gp91phox (Nox2)-containing NAD(P)H oxidase in angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Circulation* 2005; 111:2347-55

Tsikas D, Mitschke A, Suchy MT, Gutzki FM, Stichtenoth DO. Determination of 3-nitrotyrosine in human urine at the basal state by gas chromatography-tandem mass spectrometry and evaluation of the excretion after oral intake. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 827:146-56

Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S.: Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation* 2005; 111:1718

Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S.: Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001; 89: E1-7

Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F: Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1998; 31:1248-54

Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, Szmitko PE, Zucco L, Wang CH, Badiwala MV, Mickle DA, Weisel RD, Fedak PW, Stewart DJ, Kutryk MJ: C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation* 2004; 109:2058-67

Victor J. Dzau, MD; Elliott M. Antman, MD; Henry R. Black, MD; David L. Hayes, MD; JoAnn E. Manson, MD, DrPH; Jorge Plutzky, MD; Jeffrey J. Poppe, MD; William Stevenson, MD: The Cardiovascular Disease Continuum Validated: Clinical Evidence of Improved Patient Outcomes Part I: Pathophysiology and Clinical Trial Evidence (Risk Factors Through Stable Coronary Artery Disease) *Circulation* 2006; 114:2850-2870

Vu TH, Werb Z: Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 2000; 14:2123-33

Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Bräsen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, Harrison DG, Böhm M, Meinertz T, Münzel T: Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* 1999; 99:2027-33

Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G: Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005; 353:999-1007

Werner-Felmayer G, Werner ER, Fuchs D, Hausen A, Mayer B, Reibnegger G, Weiss G, Wachter H: Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent nitric oxide synthase activity in the human cervix carcinoma cell line ME-180. *Biochem J* 1993; 289:357-61

Zeng L, Hu Q, Wang X, Mansoor A, Lee J, Feygin J, Zhang G, Suntharalingam P, Boozer S, Mhashilkar A, Panetta CJ, Swingen C, Deans R, Fromm AH, Bache RJ, Verfaillie CM, Zhang J: Bioenergetic and functional consequences of bone marrow-derived multipotent progenitor cell transplantation in hearts with postinfarction left ventricular remodeling. *Circulation* 2007; 115:1866-75

Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Geppetti P, Ledda F: Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest* 1994; 94:2036-44

## **7. Anhang zu Material und Methoden:**

### **Zu 2.1. Tierstudienprotokoll:**

<b>Chemikalien</b>	<b>Firmen</b>
Streptozotizin    Sigm	a

### **Zu 2.2. EPC-Versuche:**

<b>Chemikalien</b>	<b>Firmen</b>
PBS	Pan Biotech
EDTA	Fluka
Ficoll	Amersham
Destilliertes Wasser    Deltaselect	
Fibronektin    Sigm	a
FCS	Sigma
Trypsin / EDTA Solution 0,25% / 0,02%	Biochrom AG, Germany
CO <sub>2</sub>	Riessner
Glukose    Sigm	a

### **Zellkulturmedium:**

500mL Medium + Zusätze (Cambrex #CC-4147, EGM-2 MV Single Quots):

400mL Medium EBM-2

100mL FCS (20%)

0,2m    L Hydrocortison

2,0m    L hFGF-B

0,5mL VEGF

0,5mL R<sup>3</sup>-IGF-1

0,5mL Ascorbatsäure

0,5mL hEGF

0,5mL GA-1000

Zu 2.2.5. Detektion reaktiver Stickstoffmonoxid-Verbindungen:

**Chemikalien Firmen**

1 mol/L Tris-HCL (pH 7,6),	Sigma
0,5 mol/L EDTA	Fluka
1,25 mol/L Dithiotreitol	Sigma

**2.3. Knochenmarksversuche:**

Zu 2.3.2. Knochenmarkshomogenisierung:

**Cacodylic-Puffer:**

Cacodylic acid (10 mmol/l, pH 5.0)
NaCl (0.15 mol/l)
ZnCl <sub>2</sub> (1 mmol/l)
CaCl <sub>2</sub> (20 mmol/l)
NaN <sub>3</sub> (1.5 mmol/l)
0.01% Triton X-100.

**RIPA-Puffer** CellSignaling

Zu 2.3.4. Westernblot und ELISA

<b>Chemikalien:</b>	<b>Firmen:</b>
30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid	Roth
APS VW	R
SDS (Sodiumduodecylsulfat)	VWR
Tris Roth	
Glycin Roth	
Temed Roth	
DTT	
3 x SDS Sample-Puffer	Cell Signaling
Isopropanolol 99%	Sigma
H <sub>2</sub> O Delta	Select

**Puffer:**

Loading-Puffer	20 µl DTT + 180µl 3 x SDS
	Sample Buffer
1,5M Tris pH 8,8 / 0,4% SDS	181,7g in 800ml H <sub>2</sub> O, mit wenig konz. HCL auf pH 8,8 einstellen; auf 1l 4g SDS
1M Tris pH 6,8 / 0,4% SDS	121,1g in 800ml H <sub>2</sub> O, mit mind. 70ml konz. HCL auf pH 6,8 einstellen, auf 1l 4g SDS
10% APS	1g / 10ml H <sub>2</sub> O
Elektrophorese-Puffer (1 x 5, 400ml + 1600ml H <sub>2</sub> O)	
Tris 30,3g	
Glycin	144g
SDS 10g	
H <sub>2</sub> O 2000m	1

**12% Polyacrylamidgel:**

## 12% Trenngel:

30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid	4ml
1,5M Tris pH 8,8 / 0,4% SDS	2,5ml
H <sub>2</sub> O 3,5m	1
10% APS	33,3µl
Temed 6,68µl	

## Sammelgel:

30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid	0,82ml
1 M Tris pH 6,8 / 0,4% SDS	1,6ml
H <sub>2</sub> O 3,81m	1
10% APS	31,3µl
Temed 6,3µl	

**Gelelektrophorese Laufbedingungen:** 15mA im Sammelgel, 20mA im Trenngel

## Western Blot:

Chemikalien Firm	a:
Tris Roth	
Glycin Roth	
SDS Solution 10%	Sigma
NaCl Roth	
Tween 20	Roth
Trizma HCl, 1M, pH 7,6	Sigma
Methanol (reinst)	Merck
Whatman Filterpapier	Merck
Blocking Agent	Amersham
ECL / ECL Plus Western Blotting Reagent	Amersham

## Puffer:

Transfer Puffer	200ml Stocklösung + 400ml Methanol + 1400ml H <sub>2</sub> O + 2ml SDS Solution
Stocklösung für Transfer Puffer(1 x 10):	30,3g Tris + 144g Glycin in 1000ml H <sub>2</sub> O
Blocking Lösung	2g Blocking Agent in 20ml TBS- Tween Puffer
TBS-Tween Puffer	40ml Trizma HCl, 1M, pH 7,6 + 16g NaCl + 2ml Tween 20 in 2000ml H <sub>2</sub> O

**Blotting Bedingungen:** Über Nacht, der Transfer Puffer wurde vorher bei -20° gekühlt,  
bei 30 V

Zu 2.4.2: Bestimmung der Superoxidationen durch Lucigenin-verstärkte

Chemilumineszenz:

**Krebs/HEPES Puffer** in mmol/L:

Lucigenin	0,005	Sigma
NaCl	4,69	Sigma
CaCl <sub>2</sub>	2,5	Sigma
Mg SO <sub>4</sub>	1,2	Sigma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,03	Sigma
NaHCO <sub>3</sub>	25	Sigma
Na-HEPES	20	Sigma
Glukose	5,6	Sigma
pH	7,4	



## 8. Abkürzungsverzeichnis

5FU	5-Fluorouracil	
ADMA	asym	metrisches-Dimethyl-Arginin
Akt	Proteinkinase	B
BH <sub>4</sub>		Tetrahydrobiopterin
CFU	Kolonieform	ende Einheiten
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid	
DAG	Diacylglycerol	
DAPI	Diam	ino-Phenylindol
DDAH	Dim	ethylarginase-Dimethylaminohydrolase
DHE	Dihydroethidium	
dil-ac-LDL	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3-tetram	ethyl-indocarbocyanine perchlorate markiertem acetylierten LDL
DOCA	Deoxycorticosteronacetat	
ecSOD-knockout-Maus	extrazelluläre-SOD-Knockout-Maus	
EDTA	Ethylendiam	intetraacetat
FITC	fluoreszierendem	Isothiocyanat
eNOS	endotheliale	Stickstoffmonoxid-Synthetase
EPC	endotheliale	Progenitorzelle
FACS	Durchflußzytom	etrie
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid	
FCS	f	etalem Kälberserum
FMN	Flavinm	onucleotid
GPx-1	Glutathionperoxidase	
HPLC		High-Performance Liquid Chromatography
HUVEC	Nabelschnurendothelzellen	
IGF-1		Insulin-like Growth Factor
L-NNA	N	<sup>G</sup> -nitro-L-Arginin
MDA-TBA-Addukt	Malondialdehyd-Thiobarbituratsäure-Addukte	
MMP	Matrixm	etalloproteinase
MnSOD	m	anganhaltige Superoxiddismutase

NADPH Nicotinsäuream	id-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NO Stickstoffm	onoxid
NOS 3 <sup>-/-</sup> eNOS-Knockoutm	aus
NOS Stickstoffm	onoxid-Synthetase
NOX NADPH-Oxidase	
O <sub>2</sub> Sauerst	off
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> Superoxidanion	
p38 MAP-Kinase	mitogenaktivierte Proteinkinase p38
PBMC	mononukleären Zellen aus peripheren Blut
PBS phosphatgepufferten	Salzlösung
PKC Proteinkinase	C
PVDF-Membran Polyvinylidendifluorid-Mem	bran
rhGH	rekombinanter humaner Growth Factor
ROS reaktiver	Sauerstoffradikale
SDF1 Strom	azellenwachstumsfaktor
SDS-Page	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SHR	spontane hypertensive Ratten
SOD Superoxid-Dism	utase
TBS-TWEEN	Tris gepufferte Salz-Tween Lösung
UEA-1	FITC-konjugiertem Lektin von Ulex europeus
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR2	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor 2
VWF von-W	illebrand-Faktors

## **9. Danksagung:**

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. G. Ertl, Direktor der Klinik für Innere Medizin I an der Universität Würzburg, für die Möglichkeit an seiner Klinik zu promovieren.

Sehr herzlich danke ich Herrn Professor Dr. med. J. Bauersachs, Oberarzt an der Klinik für Innere Medizin I an der Universität Würzburg, und Herrn Dr. med. T. Thum, meinem unermüdlichem Betreuer und IZKF-Nachwuchsgruppenleiter an derselben Klinik, für ihre engagierte Betreuung, ihre freundschaftliche Unterstützung sowie ihre Ratschläge und Ideen in jeder Phase meiner Doktorarbeit.

Besonders möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der Labore von Herrn Professor Dr. med. J. Bauersachs und Dr. T. Thum bedanken: Frau S. Thum für ihre exzellente Versuchsanweisungen und zahlreichen Hilfestellungen insbesondere bezogen auf alle Zellkulturversuche und die FACS-Analysen, Frau Dr. D. Fraccarollo und Herrn Dr. Galuppo für das Beibringen des ELISAs und der Westernblotanalyse und Frau M. Leutke für ihre viele gute Laune. Weiter möchte ich mich noch bei Priv.-Doz. Dr. D. Tsikas für die Durchführung der eNOS-Aktivitätsassays sehr herzlich bedanken.

# Curriculum Vitae

Arzt Maximilian Schultheiss

## Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 7. Mai 1981 in München

## Ausbildung und beruflicher Werdegang:

Schulbildung: 1987 Peselmüller-Grundschule in München Pasing  
1989 Evangelische Grundschule in Düsseldorf Benrath  
1991 Anette-von-Droste-Hülshoff-Gymnasiums in Düsseldorf Benrath  
1994 Arndt-Oberschule in Berlin Dahlem  
1997 Uppingham-School in den Midlands, England  
2000 Abitur-Prüfung (Arndt-Oberschule in Berlin Dahlem)

Studium: Herbst 2000 Krankenpflegepraktikum am Universitätsklinikum Benjamin-Franklin, Berlin  
Jan.-März 2001 Sprachenschule Don Quijote in Salamanca, Spanien  
April 2001 Studium der Humanmedizin an der Freien-Universität Berlin  
März 2003 Physikum bestanden  
April 2003 Klinischer Abschnitt des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität Würzburg  
Juni 2008 Ärztliche Prüfung bestanden  
April 2009 Bestehen des Rigorosums der Doktorarbeit

Arbeit: September 2008 Beginn der Facharztausbildung an der Augenklinik der Universität Tübingen

## Anhang:

### Originalpaper:

Thum T, Fraccarollo D, **Schultheiss M**, Froese S, Galuppo P, Widder JD, Tsikas D, Ertl G, Bauersachs J: Endothelial nitric oxide synthase uncoupling impairs endothelial progenitor cell mobilization and function in diabetes. *Diabetes*. 2007; (3):666-74.

Thum T, Fraccarollo D, Thum S, **Schultheiss M**, Daiber A, Wenzel P, Munzel T, Ertl G, Bauersachs J: Differential effects of organic nitrates on endothelial progenitor cells are determined by oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; (4):748-54.

Thum T, Tsikas D, Stein S, **Schultheiss M**, Eigenthaler M, Anker SD, Poole-Wilson PA, Ertl G, Bauersachs J: Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 46(9):1693-701.

Dieses Paper ist Gewinner des *Parmley-Preises* 2006

### Veröffentlichte Abstracts:

Thum T, Fraccarollo D, Galuppo P, **Schultheiss M**, Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Uncoupling of the endothelial nitric oxide synthase in bone marrow of diabetic rats – Impact on endothelial progenitor cells. *Circulation Suppl*. 239/B123 (2005)

Thum T, Tsikas T, Stein S, **Schultheiss M**, Eigenthaler M, Anker SD, Poole-Wilson PA, Ertl G and Bauersachs J. (2005) Der endogene NO Synthase Inhibitor asymmetrisches Dimethyl-Arginin (ADMA) repri-miert die Mobilisation und Funktion endothelialer Progenitorzellen. *Frühjahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kardiologie* 2005 (akzeptiert als orale Präsentation)

Thum T, Fraccarollo D, Froese S, **Schultheiss M**, Leutke M and Bauersachs J. Importance of nitric oxide for mobilisation, differentiation and function of endothelial progenitor cells– modulation by NO synthase inhibitors and nitrates. *Frühjahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kardiologie* 2006 (akzeptiert als orale Präsentation)

Thomas Thum, Daniela Fraccarollo, **Maximilian Schultheiss**, Sabrina Froese, Paolo Galuppo, Stefan Frantz, Georg Ertl and Johann Bauersachs. Uncoupling of the endothelial nitric oxide synthase in diabetes: Implications for endothelial progenitor cells. *ESC Barcelona* 2006 (akzeptiert als orale Präsentation).

Thomas Thum, Daniela Fraccarollo, Sabrina Froese, **Maximilian Schultheiss**, Andreas Daiber, Philip Wenzel, Thomas Münzel, Georg Ertl and Johann Bauersachs. Differential effects of long-acting nitrates on endothelial progenitor cells are determined by reactive oxygen species formation. *Circulation, AHA Chicago* 2006 (akzeptiert als orale Präsentation).