

Aus dem Bereich Innere Medizin III
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Regulation endothelialer Progenitorzellen durch Pioglitazon und
Prostaglandin E1**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2007

vorgelegt von: Christoph Gensch
geb. am: 03.11.1978 in Zweibrücken

Gewidmet meinen Eltern, Großeltern und meiner Freundin Nicole.

„Per aspera ad astra“

Seneca

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	S.7
1.1 Zusammenfassung (Deutsch)	S.7
1.2 Zusammenfassung (Englisch)	S.9
2. Einleitung	S.11
2.1 Atherosklerose, Koronare Herzerkrankung, periphere arterielle Verschlusskrankheit	S.11
2.2 Endotheliale Progenitorzellen	S.12
2.2.1 Freisetzung endothelialer Progenitorzellen	S.12
2.2.2 Charakterisierung endothelialer Progenitorzellen	S.13
2.3 Glitazone (Thiazolidindione)	S.13
2.4 Prostaglandin E1	S.14
2.5 Fragestellung der Arbeit	S.14
3. Material und Methoden	S.15
3.1 Versuchstiere	S.15
3.2 Zellkultur	S.15
3.2.1 Kulturbedingungen	S.16
3.2.2 Zellkultur endothelialer Progenitorzellen der Milz	S.16
3.2.3 Migrationsessay	S.17
3.2.4 Kultur humaner EPC und Quantifizierung der Apoptose	S.17
3.3 Disc-Neoangiogenese-Model	S.18
3.4 Fluorescence Activated Cell Sorter	S.18
3.4.1 FACS-Analyse Blut	S.18
3.4.2 FACS-Analyse Knochenmark	S.19
3.5 Real-Time-RT-PCR	S.19
3.6 Proteinexpression und Western Blotting	S.20
3.6.1 Proteinisolation und Proteinbestimmung nach Lowry	S.21
3.6.2 Gelelektrophorese	S.21
3.6.3 Protein-Transfer	S.21
3.6.4 Antikörperinkubation	S.21

3.7 Auswertung	S.22
3.7.2 Statistik	S.22
3.8 Verwendete Substanzen	S.23
4. Ergebnisse	S.25
4.1 Ergebnisse nach Behandlung mit dem PPAR-γ-Agonisten Pioglitazon	S.25
4.1.1 EPC-Quantifizierung durch FACS-Analyse im Blut und Knochenmark	S.25
4.1.2 Bedeutung der endothelialen NO-Synthase	S.25
4.1.3 EPC-Quantifizierung durch DiLDL/Lectin-Färbung	S.27
4.1.4 EPC-Funktionsbestimmung durch Migrationsessay	S.28
4.1.5 Auswirkungen der Pioglitazonbehandlung auf die Neoangiogenese	S.30
4.1.6 Einfluss von Pioglitazon auf die Apoptose endothelialer Progenitorzellen	S.31
4.2 Ergebnisse nach Behandlung mit Prostaglandin E1	S.34
4.2.1 EPC-Quantifizierung durch DiLDL/Lectin-Färbung	S.34
4.2.2 EPC-Quantifizierung durch FACS-Analyse im Blut und Knochenmark	S.35
4.2.3 EPC-Funktionsbestimmung durch Migrationsessay	S.38
4.2.4 Auswirkungen der Prostaglandin-E1-Behandlung auf die Neoangiogenese	S.39
4.2.5 Prostaglandin-E1-Einfluss auf die Apoptose endothelialer Progenitorzellen	S.41
4.2.6 Wirkungen des Prostaglandinderivats Iloprost auf endotheliale Progenitorzellen	S.42
4.2.7 Wirkungen von Prostaglandin E1 in Kombination mit körperlichem Training	S.43
5. Diskussion	S.46
5.1 Auswirkungen des PPAR-γ-Agonisten Pioglitazon auf endotheliale Progenitorzellen	S.46
5.2 Auswirkungen von Prostaglandin E1 auf endotheliale Progenitorzellen	S.49
5.3 Ausblick	S.53
6. Literaturverzeichnis	S.54
7. Dank	S.57
8. Lebenslauf	S.58

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
BSA	Bovine Serum Albumine
BW	body weight
bzw.	beziehungsweise
C	Kontrolle
°C	Grad Celsius
ca.	Zirka
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
DAPI	Diamidino-phenylindole
DiLDL	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninelabeled –acetylated LDL
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBM	Endotheliales Basalmedium
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
eNOs	endotheliale Nitric-oxide-Synthase
EPC	endotheliale Progenitorzellen
FACS	Fluorescence Aktivated Cell Sorter
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
kg, g, mg, µg, ng	Kilogramm, Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
h	hour
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDL	High Density Lipoprotein
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogencarbonat
KHK	Koronare Herzkrankheit
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LDL	Low Density Lipoprotein
LNMA	N ω -monomethyl-L-arginine
L-NAME	NG-nitro-L-arginine methyl ester
LY	LY 294002
m, cm	Meter, Zentimeter
M, mM, µM, nM	Molar, Millimolar, Mikromolar, Nanomolar
MNC	Mononukleäre Zellen

min	Minute
mmol, μ mol, nmol	Millimol, Mikromol, Nanomol
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
PAD	peripheral artery disease
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction/Polymerase Kettenreaktion
PE	Phytoerythrin
PGE1	Prostaglandin E1
ph	ph-Wert
PI3-Kinase	Phosphatidy1-3-Kinase
po	per os
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Rounds per minute
RT	Reverse Transkriptase
s.c.	subkutan
SDF-1	stromal cell-derived factor 1
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TRF2	telomere repeat binding factor
TZD	Thiazolidinediones
U	units/Einheiten
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VEGFR2	Vascular endothelial growth factor R2
vs	versus
Wort	Wortmanin
%	Prozent

1. Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung (Deutsch)

Regulation endothelialer Progenitorzellen durch Pioglitazon und Prostaglandin E1

Endotheliale Progenitorzellen (EPC) stellen ein neues Paradigma in der vaskulären Biologie dar. Bisher ging man davon aus, dass regenerative Prozesse im Endothel durch lokale adulte Endothelzellen vermittelt werden. Neue Befunde zeigen, dass zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark eine wichtige Rolle spielen. EPC beeinflussen die endotheliale Homöostase, verbessern die Funktion des Endothels und steigern die Angiogenese. Experimentelle und klinische Befunde weisen darauf hin, dass PPAR- γ -Agonisten (Glitazone, TZD) unabhängig von ihrer insulin-sensitivierenden Wirkung die Endothelfunktion verbessern, allerdings sind die zugrunde liegenden Mechanismen erst zum Teil verstanden. Prostaglandin E1 (PGE1) wird zur Behandlung von Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) eingesetzt. Auch hier sind die molekularen Wirkmechanismen jedoch nur zum Teil bekannt. Daher untersuchten wir in diesem Zusammenhang die Regulation endothelialer Progenitorzellen (EPC) aus dem Knochenmark.

Der PPAR- γ -Agonist Pioglitazon steigert die Neoangiogenese und verringert die Apoptose von endothelialen Progenitorzellen.

Behandlung von C57/Bl6 Mäusen mit Pioglitazon, 20 mg/kg KG, steigerte die Anzahl Sca-1/VEGFR-2 positiver zirkulierender EPC im peripheren Blut ($235 \pm 60\%$ (10d); n=24 pro Gruppe, p<0,05), sowie im Knochenmark ($166 \pm 30\%$ (10d); p<0,05). Glitazone erhöhten die Anzahl der kultivierten DiLDL/Lectin positiven EPC der Milz auf $231 \pm 21\%$ (n=24 p<0,01; 10d, 14d, 20d). Pioglitazon steigerte die SDF-1 induzierte migratorische Kapazität pro EPC Anzahl auf $246 \pm 73\%$ (10d) und $253 \pm 19\%$ (20d). Die gesteigerte migratorische Kapazität war mit einer Hochregulation der Expression des telomere repeat-binding factors (TRF2) assoziiert. Die Behandlung mit Glitazonen verdoppelte *in vivo* die Neoangiogenese (disk assay, $214 \pm 42\%$, n=6; 20d, p<0,05). Kultivierte EPC der mit Pioglitazon-behandelten Mäuse waren durch eine Reduktion der Apoptose gekennzeichnet ($65 \pm 2,8\%$; p<0,05). Glitazone inhibierten die H₂O₂-induzierte Apoptose auch in kultivierten humanen EPC um 42,8% (n=8, p<0,05, Annexin V FACS). Der Effekt wird durch die PI3-Kinase vermittelt.

Zusammengefasst steigert der PPAR- γ -Agonist Pioglitazon die Anzahl endothelialer Progenitorzellen im peripheren Blut und im Knochenmark. Der Effekt ist durch eine Reduktion der Apoptoserate gekennzeichnet. Die Hochregulation der EPC ist mit einer gesteigerten EPC-Funktion und Neoangiogenese assoziiert und könnte auf diese Weise zu den vaskulären Effekten der Glitazone beitragen.

Regulation der endothelialen Progenitorzellen durch Prostaglandin E1

Die Behandlung von C57/Bl6 Mäusen mit PGE1, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG, steigerte die Anzahl Sca-1/VEGFR-2 positiver zirkulierender EPC im peripheren Blut ($122\pm 7\%$ (10d); $119\pm 6\%$ (20d)), sowie im Knochenmark ($125\pm 11\%$ (10d); $142\pm 15\%$ (20d)). PGE1 erhöhte die Anzahl DiLDL/Lectin positiver, aus der Milz stammender EPC auf $170\pm 20\%$ (14d) und $174\pm 14\%$ (20d). PGE1 steigerte die SDF-1 induzierte migratorische Kapazität bei pro EPC Zahl auf $140\pm 11\%$ (10d), $146\pm 22\%$ (14d) und $160\pm 16\%$ (20d). Die gesteigerte migratorische Kapazität war mit einer Hochregulation der Expression des telomere repeat-binding factors (TRF2) assoziiert. Die Behandlung mit PGE1 verdoppelte *in-vivo* die Neoangiogenese (disk assay, $218\pm 27\%$). Kultivierte EPC der mit PGE1-behandelten Mäuse waren durch eine Reduktion der Apoptose gekennzeichnet. PGE1 inhibierte die H₂O₂-induzierte Apoptose auch in kultivierten humanen EPC. Der Effekt wird durch die PI3-Kinase vermittelt. Alle Effekte von PGE1 auf EPC waren in Gegenwart des NO-Inhibitors L-NAME (50 mg kg⁻¹ p.o.) aufgehoben. Eine Behandlung mit dem Prostaglandin I₂ Derivat Iloprost (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG, 20d) zeigte dagegen keine Hochregulation der EPC. Freiwilliges körperliches Training (Laufrad) steigerte die EPC-Anzahl in Mäusen. Behandlung mit PGE1 führte zu einer geringgradigen additiven Steigerung der Sca-1/VEGFR-2- und DiLDL/lectin positiven EPC sowie der Migration. n=10-24 für alle Gruppen, alle Effekte p<0,05.

Zusammengefasst steigert PGE1 die Anzahl der EPC im peripheren Blut und Knochenmark in Mäusen. Der Effekt ist additiv zu körperlichem Training, NO-abhängig und charakterisiert durch eine PI3-Kinase vermittelte Reduktion der Apoptose. Die Hochregulation der EPC ist mit einer gesteigerten EPC-Funktion und Neoangiogenese assoziiert.

Ausblick

Die Charakterisierung der Biologie von endothelialen Progenitorzellen aus dem Knochenmark, einem neuen systemischen Parameter der Gefäßfunktion, kann dazu beitragen, den Wirkmechanismus vasoaktiver Substanzen besser zu verstehen und sie dadurch besser einzusetzen.

1.2 Zusammenfassung (Englisch)

Regulation of endothelial progenitor cells by pioglitazone and prostaglandin E1

Endothelial progenitor cells (EPC) represent a new paradigm in vascular biology. Until now it has been assumed that regenerative processes in endothel are mediated through local adult endothelcells. New results show that circulating endothelial progenitor cells from the bone marrow play an important role. EPC influence endothelial homeostasis, improve endothelial function and increase angiogenesis.

PPAR- γ -agonists (thiazolidinediones, TZDs) may improve endothelial function independently of insulin sensitizing. However, the underlying molecular mechanisms are incompletely understood. Prostaglandin E1 (PGE1) is used for the treatment of patients with peripheral artery disease (PAD): However the cellular mechanisms of the vascular effects are only partially understood. In this context we examined the influence of bone marrow-derived endothelial progenitor cells.

The PPAR- γ -agonist pioglitazone increases neoangiogenesis and prevents apoptosis of endothelial progenitor cells

Mice were treated with pioglitazone, 20 mg/kg/day for 10 days. Treatment with TZD upregulated circulating Sca-1/VEGFR-2 positive EPC in the blood ($235\pm 60\%$) and the bone marrow ($166\pm 30\%$), cultured spleen-derived DiLDL/Lectin positive EPC increased to $231\pm 21\%$ ($n=24$ per group). Upregulation of EPC was persistent after 20 days. TZD increased SDF-1-induced migratory capacity per number of EPC by $246\pm 73\%$ and increased expression of telomere repeat-binding factor 2 by $320\pm 50\%$. *In vivo* neoangiogenesis was increased 2-fold ($214\pm 42\%$, 20d). The NOS inhibitor L-NAME did not inhibit the TZD-induced upregulation of EPC. EPC from TZD-treated animals showed reduced *in vivo* apoptosis ($65\pm 2.8\%$ of vehicle). In cultured human EPC, pre-treatment with pioglitazone prevented H₂O₂-induced apoptosis. Inhibition of EPC apoptosis by TZD was abolished in the presence of LY294002, but not by LNMA.

In summary, TZDs upregulated both number and functional capacity of endothelial progenitor cells. Pioglitazone prevents apoptosis of EPC in mice as well as in human EPC in a PI3K-dependent, but NO-independent manner. Reduction of EPC apoptosis by TZD may be a potentially beneficial mechanism for patients with vascular diseases.

Regulation of endothelial progenitor cells by prostaglandin E1

Treatment of C57/Bl6 mice with PGE1, 10 µg/kg BW increased the number of circulating Sca-1/VEGFR-2 positive EPC in the blood compared to vehicle (122±7% and 119±6 % after 10 and 20 days). EPC in the bone marrow were upregulated to 125±11% (10d) and 142±15% (20d). PGE1 increased DiLDL/Lectin positive spleen-derived EPC to 170±20 and 174±14 % after 14 and 20 days. PGE1 enhanced the SDF-1 induced migratory capacity per number of EPC to 140±11%, 146±22% and 160±16% after 10, 14 and 20 days. Greater migratory capacity was associated with upregulation of expression of telomere repeat-binding factor (TRF2). Treatment with PGE1 enhanced *in-vivo* neoangiogenesis by 2-fold (disk assay, 218±27%). EPC of PGE1-treated mice were characterized by reduced apoptosis. Similarly, PGE1 prevented H2O2-induced apoptosis in cultured human EPC. The effect is mediated by PI3-kinase. All effects of PGE1 on EPC were completely prevented by co-treatment with the NO-inhibitor L-NAME 50 mg kg⁻¹ po. Treatment with the prostaglandin I2 derivative iloprost (10 µg/kg BW, 20d) did not alter EPC numbers or function. Physical exercise is the basis of the treatment of patients with PAD. Voluntary running increased EPC numbers in mice. Treatment with PGE1 resulted in an additional increase of Sca-1/VEGFR-2- and DiLDL/lectin positive EPC as well as migration. n=10-24 for all groups, all effects p<0.05.

In mice, prostaglandin E1 increases the number of EPC in the blood and the bone marrow. The effect is additive to physical exercise, depends on nitric oxide and is characterized by reduction PI3-kinase mediated of apoptosis. PGE1-mediated upregulation of EPC is associated with improved EPC function and enhanced angiogenesis and may therefore be beneficial for selected patients with peripheral artery disease.

Outlook

The characterization of the biology of bone marrow-derived EPC as a new systemic parameter of vascular function can contribute to a better understanding of the molecular mechanism and possible applications of vasoactive substances.

2. Einleitung

2.1 Atherosklerose, koronare Herzerkrankung, periphere arterielle Verschlusskrankheit

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen in Deutschland (Stat. Bundesamt 2003), Europa, Amerika und Teilen Asiens die häufigste Todesursache dar (ROSS 1986). Die Ursache der koronaren Herzerkrankung ist eine progrediente Lumeneinengung der Koronargefäße durch Atherosklerose. Das daraus resultierende Sauerstoffdefizit des Myokards kann sich in reversibler Myokardischämie, Myokardinfarkt, Herzrhythmusstörungen und Herzinsuffizienz äußern. Neben genetischer Disposition führen Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Erhöhung des LDL-Cholesterinspiegels, erniedrigter HDL-Cholesterinspiegel (WILSON 1999; ROSS 1999; LIBBY 2001) und Nikotinkonsum zu vermehrten Endothelschäden, die die Basis der Entstehung der Atherosklerose darstellen.

Atherosklerose ist nicht auf die Koronarien begrenzt, sondern betrifft das gesamte Gefäßsystem. Weitere Folgeerkrankungen der Atherosklerose sind z.B. die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und der ischämische Schlaganfall (LITHELL 1994). Zwischen den verschiedenen Manifestationsformen der Atherosklerose bestehen enge Korrelationen (REACH Register Steg 2007). Die Sterblichkeit von pAVK Patienten ist im Vergleich zu Patienten ohne pAVK massiv erhöht. Auch die Anzahl nicht tödlicher Ereignisse in Form eines Myokardinfarktes oder Schlaganfalls waren bei pAVK Patienten deutlich erhöht (getABISStudie Diehm 2007). Die pAVK erweist sich in diesem Zusammenhang als Markererkrankung für ein atherosklerotisch verändertes gesamtes Gefäßsystem. Sie tritt altersabhängig auf mit einer Inzidenz von 2-6 Erkrankungen pro 1000 Personen bei über 50-jährigen und mit einer Inzidenz von 5-10 Erkrankungen pro 1000 bei über 70-jährigen (Kannel 1985; Leng 1996).

Die Prävention der pAVK besteht in der Vermeidung bzw. Reduktion der atherosklerotischen Risikofaktoren. Grundlage der kurativen therapeutischen Intervention ist die Förderung der Kollateralenbildung durch körperliche Aktivität und Gehtraining. Zur Prophylaxe arterieller Thrombosen wendet man Thrombozytenaggregationshemmer an. Bei der fortgeschrittenen pAVK im Fontaine-Stadium III-IV stellt die Applikation von Prostaglandinen eine Therapieoption dar. Insbesondere in fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose sind die therapeutischen Möglichkeiten allerdings begrenzt. Die Verbesserung regenerativer Prozesse

bzw. intravaskulärer Reparaturprozesse zur Minimierung von Endothelschäden stellt in diesem Zusammenhang eine große Herausforderung dar.

2.2 Endotheliale Progenitorzellen

Neue Erkenntnisse zeigen, dass die kardiovaskuläre Funktion und Angiogenese in einem signifikanten Maße von zirkulierenden Progenitorzellen aus dem Knochenmark beeinflusst wird (Werner 2005). Eine Untergruppe dieser adulten Stammzellen sind die endothelialen Progenitorzellen (EPC). Erstmals nachgewiesen wurden endotheliale Progenitorzellen aufgrund ihrer Fähigkeit die Neoangiogenese zu steigern bzw. die Ausbildung von Kollateralkreisläufen zu begünstigen (Asahara 1997). EPC fördern vaskuläre Reparaturprozesse und verbessern die Endothelfunktion und stellen damit ein gefäßprotektives Prinzip dar (Aicher 2003; Dimmeler 2001; Hill 2003; Werner 2003). Die Reendothelialisierung stellt, neben der Gefäßneubildung, einen weiteren wichtigen Wirkungsmechanismus endothelialer Progenitorzellen dar. So tragen EPC nach Induktion einer Endothelschädigung zur Regeneration des geschädigten Areals bei (Walther 2002; Werner 2002; Werner 2003). Auch konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass die intravenöse Transfusion endothelialer Progenitorzellen die Wiederherstellung einer intakten Gefäßschicht beschleunigt und so die Neointimabildung nach einer herbeigeführten Gefäßschädigung reduziert (Werner 2003). Prospektive Untersuchungen zeigen, dass eine verminderte Anzahl von zirkulierenden EPC einen zellulären Marker darstellt, welcher, unabhängig von anderen Parametern, einen Einfluss auf die kardiovaskuläre Mortalität und Morbidität hat (Werner 2005). Da die Anzahl und Funktion endothelialer Progenitorzellen bei Patienten mit kardialen Risikofaktoren erniedrigt ist, wäre eine medikamentöse Therapieoption zur Hochregulation dieser Stammzellsubpopulation wünschenswert.

2.2.1 Freisetzung endothelialer Progenitorzellen

Die genauen molekularen Mechanismen der Mobilisierung endothelialer Progenitorzellen sind noch nicht geklärt, allerdings sind endogene und exogene Faktoren bekannt, die zur vermehrten Freisetzung von EPC führen können. Ein wichtiger endogener Parameter ist hierbei die Ischämie induzierte EPC-Mobilisation. So führt in Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt die Gewebeischämie zu einer erhöhten Anzahl der EPC im peripheren Blut (Shintani 2001). Vermittelt wird die Hochregulation der EPC-Anzahl über Mediatoren wie Stickstoffmonoxid

(NO) und den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) (Sintani 2001). Nach exogener Zufuhr von VEGF konnte eine gesteigerte Mobilisierung endothelialer Progenitorzellen beobachtet werden (Asahara 1999). Weiterhin bewirken G-CSF (Powell 2005), GM-CSF (Takahashi 1999), Erythropoietin (Heeschen 2003), Angiopietin (Hattori 2001), Östrogene (Strehlow 2003), HMG-CoA-Reduktasehemmer (Vasa 2001, Llevadot 2001) sowie körperliches Training (Laufs 2004) eine erhöhte Freisetzung endothelialer Progenitorzellen.

2.2.2 Charakterisierung endothelialer Progenitorzellen

In den meisten durchgeführten Untersuchungen werden zwei Markerkombinationen zur Isolation und Quantifizierung der endothelialen Progenitorzellen verwendet. Diese sind die Kombinationen des Stammzellmarkers CD34 und des endothelialen Marker KDR (Asahara 1997; Vasa 2001; Strehlow 2003). Für die CD34/KDR positiven EPC wurde in der EPCAD-Studie gezeigt, dass diese Population einen Parameter darstellt, der eine Vorhersage über das Auftreten kardiovaskulärer Morbidität und kardiovaskulärer Mortalität treffen kann (Werner 2005). Eine weitere FACS unabhängige Methode der EPC Bestimmung ist eine Charakterisierung durch Isolation mononukleärer Zellen, Adhäsion auf Fibronectin, DiLDL-Phagozytose und Lectin-Färbung.

2.3 Glitazone (Thiazolidindione)

Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) Agonisten wie Rosiglitazon oder Pioglitazon sind Medikamente, die zur oralen Therapie des Diabetes mellitus Typ II eingesetzt werden. Sie führen über eine Verbesserung der Insulinsensitivität zu einer Reduktion des Blutglucosespiegels. Zusätzlich zu ihren insulin-sensitivierenden Effekten legen neuere Erkenntnisse die Vermutung nahe, dass diese Medikamente Endothel-abhängig die Gefäßfunktion verbessern und einen günstigen Einfluss auf inflammatorische Biomarker der Arteriosklerose haben (Marx 2005; Hetzel 2005; Pfutzner 2005; Pistrosch 2004). Interessanterweise scheinen diese vaskulären Effekte möglicherweise auch unabhängig von einer Reduktion des Glucosespiegel aufzutreten (Hetzel 2005; Pistrosch 2004; Marx 2005; Horio 2005). Weiterhin unterstützen Experimente an kultivierten vaskulären Zellen die Vermutung, dass ein direkter positiver Einfluss auf wichtige Regulationsmechanismen der Arteriosklerose wie zelluläre Adhäsionsmoleküle, Gewebefaktoren, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor und der

Matrix-Metalloproteinase besteht (Marx 2002, 2004; Plutzky 2003). Diese Erkenntnisse führen zu der Hypothese, dass Glitazone möglicherweise unabhängig von ihrer metabolischen Komponente vaskuloprotektive Effekte besitzen (Marx 2004).

2.4 Prostaglandin E1

Prostaglandin E1 (PGE1) wird hauptsächlich bei der Behandlung von Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit angewendet (Hirsch 2006). Zu den bekannten Wirkungen von PGE1 zählt eine Verbesserung der arteriellen Vasodilatation (Needleman 1977) sowie mögliche positive Effekte auf die Angiogenese, die Thrombozytenaggregation, die Blutviskosität und die Fibrinolyse (Kuss 2003; Mehrabi 2002; Marchesi 2003; Schror 2004; Sinha 1978; Vaughan 1989; Weiss 2000). Diese Effekte werden zum Teil durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) und den vascular endothelial growth factor (VEGF) hervorgerufen, von denen bekannt ist, dass sie nach der Behandlung mit PGE1 in Zellkulturen ansteigen (Haider 2005; Weiss 2004; Ziche 1994). Die zellulären Mechanismen, welche die vaskulären Effekte von Prostaglandin E1 hervorrufen, sind nur unvollständig verstanden.

2.5 Fragestellung der vorgelegten Arbeit

Die Experimente testen die Hypothese, dass die Medikamente Prostaglandin E1 und Pioglitazon die Zahl und Funktion von endothelialen Progenitorzellen beeinflussen. Folgende Fragen soll die vorliegende Arbeit beantworten:

- 1) Führt die Behandlung von Mäusen mit Pioglitazon bzw. Prostaglandin E1 zu einer Regulation der Anzahl der endothelialen Progenitorzellen aus dem Knochenmark?
- 2) Steigern diese Medikamente die Funktionsfähigkeit der endothelialen Progenitorzellen?
- 3) Welche Mechanismen sind an der Wirkung von Pioglitazon und Prostaglandin E1 auf EPC beteiligt?
- 4) Haben die Hochregulation und die gesteigerte Funktion der endothelialen Progenitorzellen ein funktionelles Korrelat?

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Die Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit den institutionellen Richtlinien (Tierversuchsgenehmigung K110/180-07) durchgeführt. Die Tiere wurden in artgerechter Weise in Käfigen alleine oder in Gruppen bis zu 6 Mäusen gehalten. Die Mäuse hatten in beiden Versuchsreihen ständig freien Zugang zu Trockenfutter und Wasser.

In der Pioglitazon-Versuchsreihe wurden männliche C57/Bl6 Mäuse (Charles River) mit NaCl (Kontrolle) oder Pioglitazon 20 mg/kg/Tag s.c. (Takeda Pharma GmbH, Aachen, Germany) behandelt. Eine separate Gruppe von Mäusen wurde mit NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (Sigma) behandelt, welches dem Trinkwasser hinzugefügt wurde (Tagesdosis, ~50 mg/kg; Konzentration im Trinkwasser, 1.5 mg /ml) (Kojda 1999). Serumkonzentrationen von Glukose, Gesamtcholesterin, HDL-Cholesterin oder LDL-Cholesterin wurden durch das Institut für Klinische Chemie, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg bestimmt.

In der Prostaglandin E1 Versuchsreihe wurden männliche C57/Bl6 Mäuse (Charles River) sowie eNOS -/- Mäuse (B6129/P2-Nos3, Charles River) entweder mit NaCl (Kontrolle) oder Prostaglandin E1 1 µg/kg/Tag s.c. bzw. 10 µg/kg/Tag s.c. (Schwarz Pharma) oder dem Prostaglandin I2 Derivat Iloprost 10 µg/kg/Tag s.c. bzw. 100 µg/kg/Tag s.c. (Schering) behandelt. Auch in dieser Versuchsreihe wurde eine separate Gruppe von Mäusen mit L-NAME behandelt. Um die Effekte von freiwilligem Lauftraining zu überprüfen, wurden die Käfige mit Laufrädern (12.8 cm Durchmesser) kombiniert mit einem Tachometer (Sigma Sport BC401) ausgestattet (Laufs 2004, 2005). Jede der körperlich aktiven Mäuse wurde, um die tägliche individuelle Laufstrecke zu dokumentieren, in einem Einzelkäfig gehalten. Die Mäuse rannten freiwillig. Die durchschnittliche Laufleistung lag bei 4800±850 m/24h.

3.2 Zellkultur

Die Isolation endothelialer Progenitorzellen aus der Milz beruht auf einem mehrstufigen Selektionsprozess. In einem ersten Schritt werden mittels einer Ficoll-Trennung die mononukleären Zellen (MNC) der Milz isoliert. Anschließend werden die MNCs durch die Fähigkeit der Adhäsion auf Fibronectin weiter differenziert. Die Population der endothelialen

Progenitorzellen ist durch die Fähigkeit DiLDL zu phagozytieren und durch Lectin färbbar zu sein gekennzeichnet.

3.2.1 Kulturbedingungen

Die mononukleären Zellen (MNC) der Milz wurden in einer 5%igen CO₂ Atmosphäre bei 37° C in Gewebekulturschalen (10 cm Durchmesser) in Kultur gebracht. Das Medium, endotheliales Basalmedium (EBM), wurde mit Zusatzstoffen (1µg/mL Hydrocortisone, 3µg/mL Bovine Brain Extract, 30µg/mL Gentamicin, 50µg/mL Amphotericin B, 10µg/mL hEGF, 20% fetalem Kälberserum) versetzt und unter sterilen Bedingungen alle 2 Tage gewechselt.

3.2.2 Zellkultur endothelialer Progenitorzellen der Milz

Die MNC wurden mittels einer Ficoll-Trennung, einer Dichtegradient abhängigen Zentrifugation, isoliert. Hierzu wurden 15 ml Biocoll in 50ml Falcons pipettiert und vorsichtig mit 40 ml einer PBS verdünnten Milzzellen-EDTA Lösung überschichtet. Die Zellen wurden anschließend 20 min bei Raumtemperatur mit 2400 rpm ohne Bremse zentrifugiert, die MNC aus der Interphase wurden vorsichtig mit der Pipette in neue 50 ml Falcons überführt und mit PBS auf 50ml aufgefüllt (erneute Zentrifugation 10 min bei Raumtemperatur 2400 rpm mit Bremse). Die Zell-Pellets wurden resuspendiert in 5 ml endotheliale Basalmedium (EBM, Cell System) und 4×10^6 mononukleäre Zellen wurden auf fibronectinbeschichteten Platten in endotheliale Basalmedium kultiviert (Werner 2002, 2003; Strehlow 2003; Laufs 2004). Nach 7 Tagen in Kultur wurden die adhären Zellen inkubiert und die EPC identifiziert durch die Aufnahme von 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninelabeled -acetylated LDL (DiLDL, 2.4 µg/ml, CellSystems) und Färbung mit FITC Giffonia (bandeiraea) simplicifolia lectin I (lectin, 10 µg/ml) (Vector Laboratories). Die Messungen wurden dreifach durchgeführt und die doppelt positiven Zellen wurden durch zwei unabhängige verblindete Untersucher manuell gezählt (Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse E600, 10 X Vergrößerung). Der apoptotische Zelltod wurde mittels ELISA der zytoplasmatischen histone-assoziierten DNA Fragmente (Cell Death Detection ELISA-plus, Roche) quantifiziert.

3.2.3 Migrationsassay

Die migratorische Kapazität der EPC wurde in einer modifizierten Boyden Kammer bestimmt (Vasa 2001). Am ersten Tag wurden 4×10^6 MNC ausgesät auf beschichteten 6-well Kulturplatten und für 4 Tage kultiviert. Danach wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mittels Trypsin abgelöst und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300 μ l EBM resuspendiert und gezählt. 1×10^5 Zellen wurden in 500 μ l EBM plus Zusatzstoffe in die obere Kammer pipettiert (HTS Fluoroblock, BD Biosciences, 8 μ m pore size) und die Kammer wurde in eine 24-well Platte mit EBM plus Zusatzstoffe und 100 ng/ml SDF-1 (R&D Systems) gestellt. Nach 24 Stunden wurde der Filter vorsichtig entfernt, gewaschen, inkubiert, mit DiLDL gefärbt und fixiert. Die SDF-1 stimulierte migratorische Kapazität wurde quantifiziert durch Zählung der migrierten EPC an der Filterunterseite mittels eines Fluoreszenzmikroskops (40 X Vergrößerung).

3.2.4 Kultur humaner EPC und Quantifizierung der Apoptose

Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut von gesunden menschlichen Probanden (n=6) wurden isoliert durch eine Dichtegradient abhängige Zentrifugation mit Biocoll, wie oben beschrieben. Bei der folgenden Isolierung wurden 10^6 MNCs/ml in Medium auf mit Fibronectin (Sigma) beschichteten Kulturplatten ausgebracht, ernährt durch endotheliales Basalmedium (CellSystems) angereichert mit Zusatzstoffen. Nach 4 Tagen in Kultur wurden nicht adhärente Zellen durch Auswaschung mit phosphat-gepufferter kochsalzhaltiger Lösung entfernt, adhärente Zellen wurden in frischem Medium inkubiert, entweder mit oder ohne Pioglitazon, H₂O₂ (Sigma), Ly294002 (Biomol) und LNMA (Alexis). EPCs wurden identifiziert durch Doppelanfärbung mit 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'- tetramethylindocarbocyaninelabeled acetylated low-density lipoprotein (DiLDL) und Lectin.

Erkennung der Apoptose durch FACS-Analyse: Adhärente Zellen wurden mit Trypsin gelöst, gewaschen mit PBS und inkubiert mit fluoreszierendem Isothiocyanat konjugiertem Annexin V (Werner 2006). IgG 2a-fluoreszierende Isothiocyanate (Pharmingen) dienten dabei als Negativkontrolle. Die FACS-Analyse wurde mit dem FACS Calibur Gerät (Becton Dickinson) und der Cell Quest software (BD Biosciences) durchgeführt.

Erkennung der Apoptose durch DAPI Färbung: Die Zellen wurden auf mit humanem Fibronectin beschichteten Glasplättchen kultiviert, fixiert in 4% Formaldehyd und gefärbt mit 4',6-diamidino-phenylindole (DAPI; 0.2 μ g/ml in 10 mmol/l Tris-HCl, pH 7.0, 10 mmol/l EDTA,

100 mmol/l NaCl) für 20 min. 500 Zellen wurden von zwei unabhängigen verblindeten Beobachtern gezählt und dabei der Prozentsatz der apoptotischen Zellen bestimmt.

3.3 Disc-Neoangiogenese-Modell

Das Disc-Neoangiogenese-Modell zählt zu den etablierten Methoden um Wachstum und Funktionalität neu entstandener Kapillargefäße zu beurteilen (Fajardo 1988). Ein Polyvinylschwamm (Rippey), zu beiden Seiten bedeckt von einer zellundurchlässigen Nitrozellulosemembran (Millipore), wurde den Mäusen subkutan implantiert. Der so präparierte Polyvinylschwamm erlaubt es den Kapillaren lediglich von der Seite in den Randsaum einzusprossen (Laufs 2004; Heeschen 2002). Nach 20 Tagen wurden fluoreszierende Mikrosphären (0.2 µm; Molecular Probes) durch Injektion in den linken Ventrikel in das Kapillarsystem der Mäuse perfundiert. Daher werden nur funktionelle neu entstandenen Kapillaren dargestellt. Ausgewertet wurde der Neoangiogenesebereich mit Hilfe der Lucia Measurement Version 4.6 Software.

3.4 Fluorescence Activated Cell Sorter

Die Durchflusszytometrie misst physikalischen Strahlen, die man erhält, wenn Partikel in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Lichtstrahl geleitet werden. Dabei kann jede einzelne Zelle bezüglich mehrerer Parameter wie Granularität und Größe gleichzeitig untersucht werden. Suspensierte Zellen werden zuerst mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert und dann über eine Kapillare aus dem Röhrchen in das Durchflusszytometer gesaugt und untersucht.

3.4.1 FACS- Analyse Blut

Wir entnahmen unseren Versuchstieren 50-100 µl EDTA Vollblut aus der Vena cava inferior. Zur Zelllyse wurde das Mausblut mit 3 ml Pharmlyse (1:10 verdünnt mit destilliertem Wasser) versetzt, bei Raumtemperatur inkubiert, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellsuspension wurde mit FACS Puffer BSA auf 100 µl aufgefüllt und zur Blockung unspezifischer Bindungen mit 10 µl Fc-Block (Becton Dickinson) 10 min bei 4°C behandelt.

Die funktionsfähige Lymphozytenpopulation wurde analysiert durch die Antikörper Sca-1-FITC (E13-161.7, Pharmingen) und VEGFR-2 PE (Flk-1) (Avas12 α 1, Pharmingen). Isotypen-Antikörper (FITC rat IgG2a, PE rat IgG2a) dienten als Kontrolle in jedem Experiment (Becton Dickinson). Alle Antikörper wurden in 10 μ l Dosen den Zellsuspensionen hinzugefügt und 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend je zweimal mit 2ml FACS-Puffer gewaschen und 10 min bei 1750 rpm zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 200 μ l PBS resuspendiert und zur Messung vorbereitet.

3.4.2 FACS-Analyse Knochenmark

Knochenmark wurde aus Maus-Femur und -Tibia präpariert und mit FACS Puffer BSA als Lösungsmittel durch einen Filter (100 μ m Nylon-Mesh in conical tube) separiert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (1000 rpm, 4°C, 10 min) und mit 1ml verdünnter Pharmlyse (1:10 verdünnt mit destiliertem Wasser) resuspendiert. Nach 5 min Inkubationszeit bei 4°C wurde mit 2ml FACS Puffer BSA geblockt, zentrifugiert und das Zellpellet mit 1ml FACS Puffer BSA resuspendiert. Nach einer Zellzählung wurden 1×10^6 Zellen in 50 μ l Suspension weiterverarbeitet. Zur Blockung unspezifischer Bindungen wurden die Zellen mit 10 μ l Fc-Block (Becton Dickinson) 10 min bei 4°C behandelt. Die Lymphozytenpopulation wurde analysiert durch die Antikörper Sca-1-FITC (E13-161.7, Pharmingen) und VEGFR-2 PE (Flk-1) (Avas12 α 1, Pharmingen). Isotypen-Antikörper (FITC rat IgG2a, PE rat IgG2a) dienten als Kontrolle in jedem Experiment (Becton Dickinson). Alle Antikörper wurden in 10 μ l Dosen den Zellsuspensionen hinzugefügt und 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend je zweimal mit 2ml FACS-Puffer gewaschen und 10 min bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 200 μ l PBS resuspendiert und zur Messung vorbereitet.

3.5 Real-Time-RT-PCR

Die Real-Time-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die isolierte RNA wurde quantifiziert und 2 μ g mit DEPC-Wasser auf insgesamt 5 μ l Volumen gebracht. Nach Zugabe von 1 μ l Random-Primer (1:10 Verdünnung) wurde das Gemisch 5 Minuten bei 95°C erhitzt und danach auf Eis abgekühlt. Dem RNA-

Primer-Gemisch wurde nun ein Mix aus 4 µl 5x First-Strand-Puffer, 1,5 µl Dithioerithiol (0,1 M), 1,5 µl dNTP (10 mM), 5,5 µl DEPC-Wasser, 0,5 µl RNase-Inhibitor und 1 µl MMLV-RT (monoleukämie murine Leukämie Virus Reverse Transcriptase) zugefügt und für 60 Minuten bei 42°C inkubiert. Die Real-Time PCR wurde mit dem TaqMan System (Prism 7700 Sequence detection System, PE Biosystems) durchgeführt. Für eNOS wurden die Primer 5'-TTCCGGCTGCCACCTGATCCTAA-3' und 5'-AACATATGTCCTTGCTCAAGGCA-3', für 18S die Primer 5'-TTG ATT AAG TCC CTG CCC TTT GT und 5'-CGA TCC GAG GGC CTA ACTA benutzt. Pro Bedingung wurden 12,5 µl Puffer (SYBR Green), je 0,1 µl der Primer sowie 1 µl der RT und 11 µl Wasser eingesetzt. Es wurden 48 Zyklen zu je 15 Sekunden bei 95°C und 15 Sekunden bei 60°C durchgeführt. Bei der Quantifizierung wurde die eNOS mRNA Expression auf die Expression des Housekeeping Gens 18S bezogen.

3.6 Proteinexpression und Western Blotting

Der Western Blot stellt eine molekularbiologische Methode dar, mit der eine quantitative Protein-Bestimmung möglich ist.

3.6.1 Proteinisolation und Proteinbestimmung nach Lowry

Um die Proteinexpression bestimmen zu können, wurden die Zellen mit Hilfe eines Lysepuffers (0,1 M Tris, pH 6,8, 4% SDS, 20% Glycerol, Leupeptin 1µg/ml, Aprotinin 1µg/ml) von den Kulturschalen abgeschabt. Das gewonnene Gesamtlisat wurde 4 Minuten bei 95°C erhitzt, um eine Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Die Proteinbestimmung des Gesamtlisates aus glatten Gefäßmuskelzellen erfolgte nach der Methode von LOWRY et al., (1951), eine der Biuret-Methode verwandte, kolorimetrische Methode. Im ersten Schritt wird ein Kupfer-Protein-Komplex in alkalischer Lösung gebildet (Biorad[®], D_C Protein Assay Reagent A). Dieser Komplex reduziert dann ein zugegebenes Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagens (Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagens; Biorad[®], D_C Protein Assay Reagent B), wobei sich die Lösung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration intensiv blau färbt. Die Absorption der Lösung wurde bei 540 nm photometrisch gemessen. Als Standard diente Rinderserumalbumin in einem Konzentrationsbereich von 100 - 1000 µg/ml.

3.6.2 Gelelektrophorese

Um die Konzentration des zu untersuchenden Proteins bei verschiedenen Versuchsbedingungen vergleichen zu können, wurden jeweils 25 µg des Gesamtlysates auf ein Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurde ein 10% SDS-Polyacrylamidgel verwendet. Die Elektrophorese wurde in Anwesenheit eines β-Mercaptoethanolpuffers (5% β-Mercaptoethanol, 20% Glycerol, 20% zehnpromzentiges SDS, 2,5% Bromphenol Blau) durchgeführt.

3.6.3 Protein-Transfer

Die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte mit Hilfe eines Transfer-Puffers (20 % Methanol, 14,5g/l Glycin, 2,9 g/l Trizma[®]) und Filtern sowie der Semi-Dry-Transfer-Cell von Biorad[®].

3.6.4 Antikörperinkubation

Um die unterschiedliche Proteinexpression auf den so hergestellten proteinbeladenen Nylonmembranen untersuchen zu können, wurden sie mit TRF2 (H-300 rabbit polyclonal Ab; Santa Cruz sc-9143; 1:250) und β-actin (Sigma A5441; 1:500) für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die nichtgebundenen Antikörperfragmente wurden mit PBS-Tween-Puffer (8 g/L NaCl, 0,2 g/l KCl, 0,24 g/l KH₂PO₄, 1,44 g/l Na₂HPO₄, 1 ml/l TWEEN) abgewaschen. Danach wurden die Membranen mit einem peroxidasekonjugiertem Goat-Anti-Rabbit-Antikörper oder Goat-Anti-Mouse-Antikörper (1:4000 Verdünnung, 30 Minuten, Raumtemperatur; Sigma Deutschland) inkubiert. Die ungebundenen Fragmente wurden ebenfalls mit PBS-Tween abgewaschen. Die an die Proteinbanden gebundenen Fragmente wurden mit dem ECL-Kit (enhanced chemiluminescence) von Amersham auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht und densitometrisch quantifiziert.

3.7 Auswertung

3.7.1 Statistik

Die Daten wurden vorgelegt mit Mittelwert \pm Standardabweichung. Die Auswertung erfolgte mit dem Computer-Program SPSS. Sofern anwendbar wurden t-Tests, ANOVA und Neuman-Keuls-Tests durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0.05$ angenommen.

3.8 Verwendete Substanzen

Agarose ultrapure Electrophoresis Grade, Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Agarose, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Aprotinin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Boyden Kammer, Becton Dickinson Biosciences, New Jersey USA
Bromphenolblau, E. Merck, Darmstadt
BSA, Serva, Heidelberg
C57/Bl6 Mäuse, Charles River, MA USA
Diethylpyrocarbonat (DEPC), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
DiLDL, CellSystems, St. Katharinen
Dinatriumhydrogenphosphat, VWR, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT), Ambion, Austin USA
EBM, CellSystems, St. Katharinen
eNOS -/- Mäuse B6129/P2-NOS3, Charles River, MA USA
Ethidiumbromid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
FACS Calibur Gerät, Becton Dickinson Biosciences, New Jersey USA
Fc-Block, Becton Dickinson Biosciences, New Jersey USA
Fibronectin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Fetales Kälberserum (FKS), Böhringer, Mannheim
Glycerol, Serva, Heidelberg
Glycin, Serva, Heidelberg
Goat-Anti-Mouse, Biotin-konjugiert, Dianova
Goat-Anti-Rabbit, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
H₂O₂, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
HTS Fluoroblock, Becton Dickinson Biosciences, New Jersey
Kaliumchlorid, E. Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat, E. Merck, Darmstadt
Lectin, Vector Laboratories, Peterborough GB
Leupeptin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
L-NAME, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
LNMA, Alexis, Nottingham GB
Ly294002, Biomol, Hamburg

Methanol, Riedel-De Häen, Seelze
Mikrosphären, Molecular Probes Invitrogen, Karlsruhe
M-MLV Reverse Transkriptase, Life Technologies, Eggenstein
Natriumchlorid, Carl Roth GmbH + Ko, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS), Serva, Heidelberg
Nitrozellulosemembran, Millipore, MA USA
Pharmlyse, Becton Dickinson Biosciences, New Jersey
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Pioglitazon, Takeda Pharma GmbH, Aachen
Prostaglandin E1, Schwarz Pharma, Monheim
Prostaglandin I2 Derivat Iloprost, Bayer-Schering, Berlin
Protein-Assay Reagent A+B, Biorad, München
RNAse A, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Sca-1-FITC, E13-161.7, Becton Dickinson Biosciences, New Jersey
SDF-1, R&D Systems, MN USA
SDS, VWR, Darmstadt
SYBR-Green I dye, PE Biosystems, CA USA
 β -Actin, C-11, rabbit, Santa Cruz USA
TRF2, H-300, rabbit, Santa Cruz USA
Tris, VWR, Darmstadt
Tween, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
VEGFR-2, (Flk-1) Avas12 α 1, Becton Dickinson Biosciences, New Jersey
Wortmanin, Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse nach Behandlung mit dem PPAR- γ -Agonisten Pioglitazon

4.1.1 EPC-Quantifizierung durch FACS-Analyse in Blut und Knochenmark

Die Behandlung von C57/Bl6 Mäusen mit Pioglitazon 20 mg/kg/Tag über den Zeitraum von 10 Tagen führte zu keiner Änderung der Serumkonzentrationen von Glucose, Gesamtcholesterin, HDL-Cholesterin und LDL-Cholesterin.

Sca-1/VEGFR-2 positive endotheliale Progenitorzellen wurden durch FACS-Analyse quantifiziert. Die Behandlung mit Glitazonen steigerte die Anzahl zirkulierender EPC im peripheren Blut auf 235 ± 60 % im Vergleich zu NaCl-behandelten Tieren ($n=24$ pro Gruppe, $p < 0,02$) (**Abb. 1A**). Glitazone steigerten nicht nur die Anzahl zirkulierender EPC im Blut, sondern auch im Knochenmark. EPC im Knochenmark wurden auf 166 ± 30 % gesteigert ($p < 0,05$) (**Abb. 1B**).

4.1.2 Bedeutung der endothelialen NO-Synthase

Von der NO-Synthase ist bekannt, dass sie einen wichtigen Regulationsmechanismus zur EPC-Freisetzung darstellt (Aicher 2003). Aus diesem Grund untersuchten wir die Wirkungen von Pioglitazon auf die eNOS Expression mittels RT-PCR. Die Behandlung mit Pioglitazon (20 mg/kg/Tag, 10 Tage) änderte die eNOS mRNA Expression in der Aorta nicht ($104 \pm 2,4$ % im Vergleich mit kontrollbehandelten Tieren, $n=4$). Um zu überprüfen, ob die Hochregulation der EPC durch die NO-Synthase vermittelt ist, behandelten wir die Mäuse ($n=14$) mit Glitazonen und dem NOS-Inhibitors L-NAME (L-NAME, 50 mg/kg) (Kojda 1999). Von dieser Konzentration des Inhibitors L-NAME ist bekannt, dass er die durch körperliche Aktivität hervorgerufene Hochregulation der EPC verhindert (Laufs 2004). Die zusätzliche Applikation von L-NAME führte weder zu einer Inhibition der Pioglitazon induzierten Hochregulation der Sca-1/VEGFR-2 positiven EPC im Blut noch im Knochenmark (**Abb. 1**).

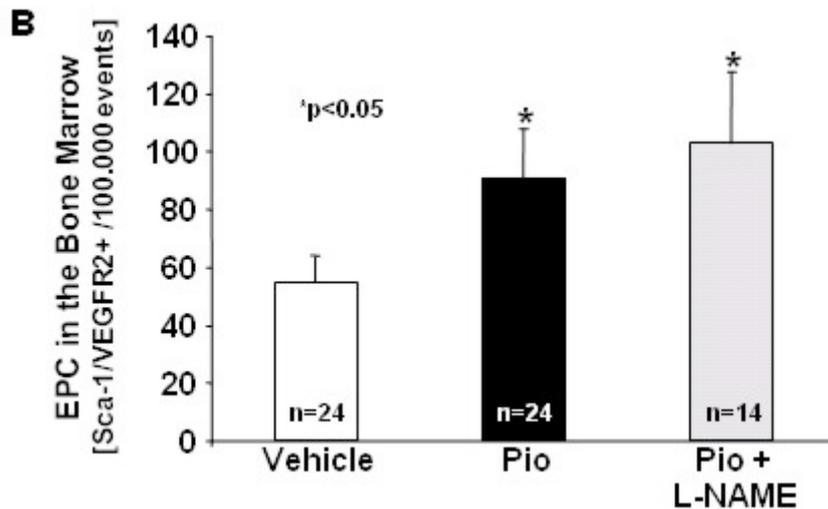
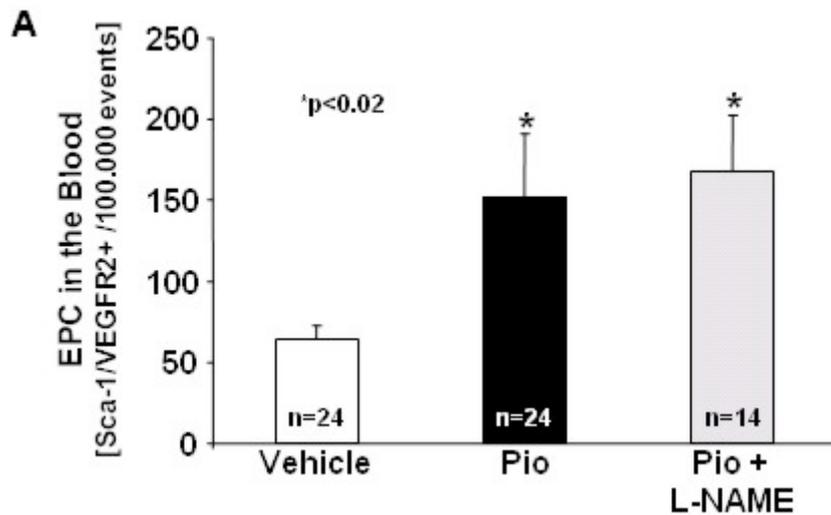
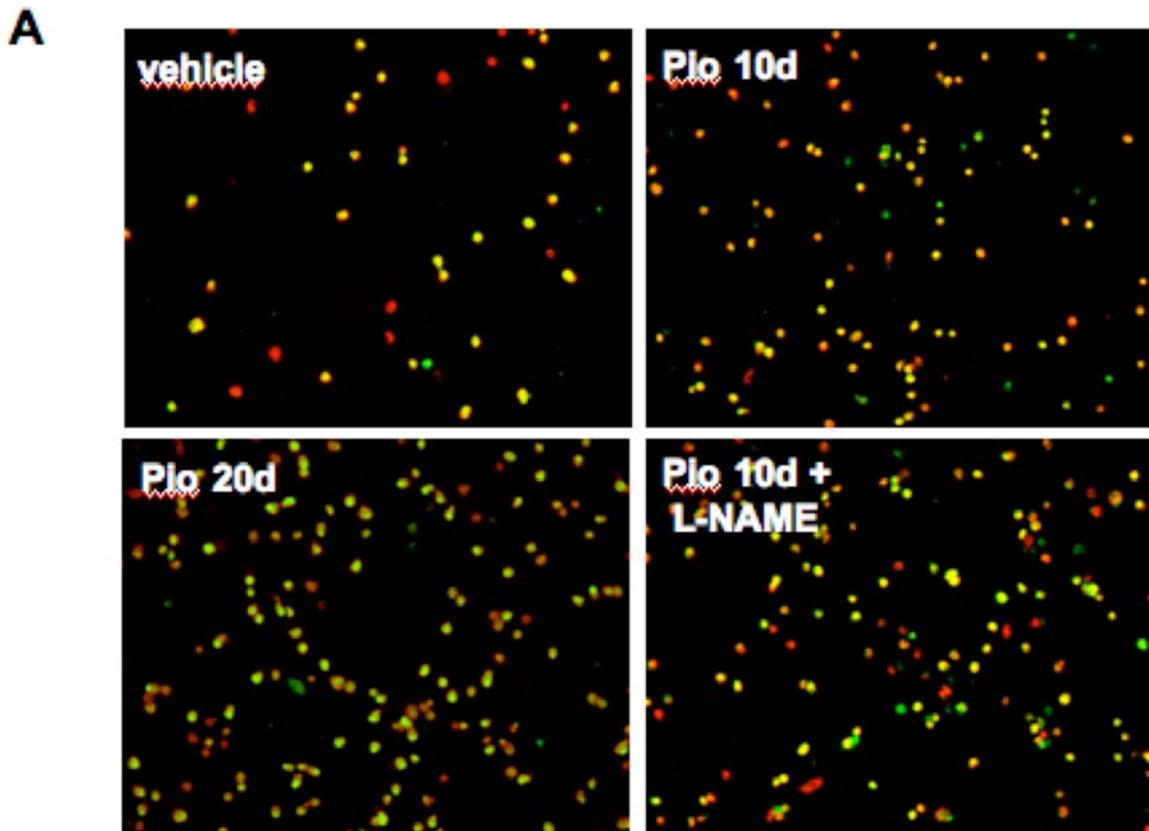


Abbildung 1

Quantifizierung der Sca-1/VEGFR2⁺ endothelialen Progenitorzellen mittels FACS-Analyse aus dem peripheren Blut (A) und aus dem Knochenmark (B), in Mäusen behandelt mit NaCl (weisse Balken), Pioglitazon (Pio, schwarze Balken) 20 mg/kg/d und Pio + NO-Inhibitor L-NAME (50 mg/kg/d, graue Balken) für 10 Tage.

4.1.3 EPC-Quantifizierung durch DiLDL/Lectin-Färbung

Als zweite Methode der EPC-Bestimmung wurden DiLDL/Lectin positive EPC in ex-vivo kultivierten mononukleären Zellen der Milz quantifiziert. Bei Tieren, die über die Dauer von 10 Tagen mit Glitazonen behandelt wurden, beobachteten wir einen Anstieg der kultivierten EPC auf 231 ± 21 % im Vergleich zur Kontrollgruppe ($n=24$, $p<0,01$) (**Abb. 2**). Die Hochregulation der EPC blieb auch nach 20tägiger Behandlung konstant (234 ± 19 % zur Kontrollgruppe, $n=14$, $p<0,01$). Auch hier führte die Inhibition der NO-Synthase durch L-NAME nicht zu einer Aufhebung des Glitazon-induzierten Anstiegs der EPC.



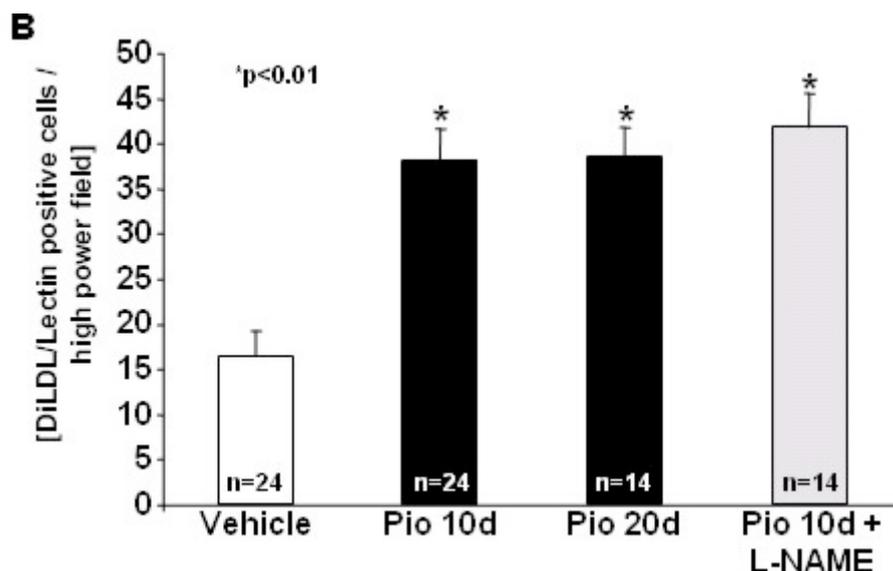


Abbildung 2

(A) Repräsentative Fluoreszenzmikroskopie von Lectin und DiLDL-positiven endothelialen Progenitorzellen und (B) Quantifizierung nach Behandlung mit NaCl (weisse Balken, 10 Tage), Pioglitazon 20 mg/kg/d (Pio, schwarze Balken, 10 und 20 Tage), und Pio + L-NAME (50 mg/kg/d, graue Balken, 10 Tage).

4.1.4 EPC-Funktionsbestimmung durch Migrationsassay

Als etablierter Parameter der EPC-Funktion wurde die SDF-1-induzierte Migration in einer modifizierten Boyden Kammer mit VEGF als chemischem Lockstoff bestimmt. Die Behandlung mit Glitazonen steigerte die Anzahl migratorisch aktiver Zellen nach 10 Tagen auf 246 ± 73 % im Vergleich zur Kontrollgruppe ($n=14$, $p<0,05$) und auf 235 ± 19 % nach 20 Tagen ($n=14$, $p<0,01$) (**Abb. 3**).

Der Telomer repeat-binding factor 2 ist ein Regulator der replikativen Potenz von EPC. (Spyridopoulos 2004). Aus diesem Grund quantifizierten wir die TRF2 Expression durch Western Blotting. Es stellte sich heraus, dass die Behandlung mit Glitazonen die TRF2 Expression in den EPC der Mäusen um 320 ± 50 % steigert ($n=5$, $p<0,05$).

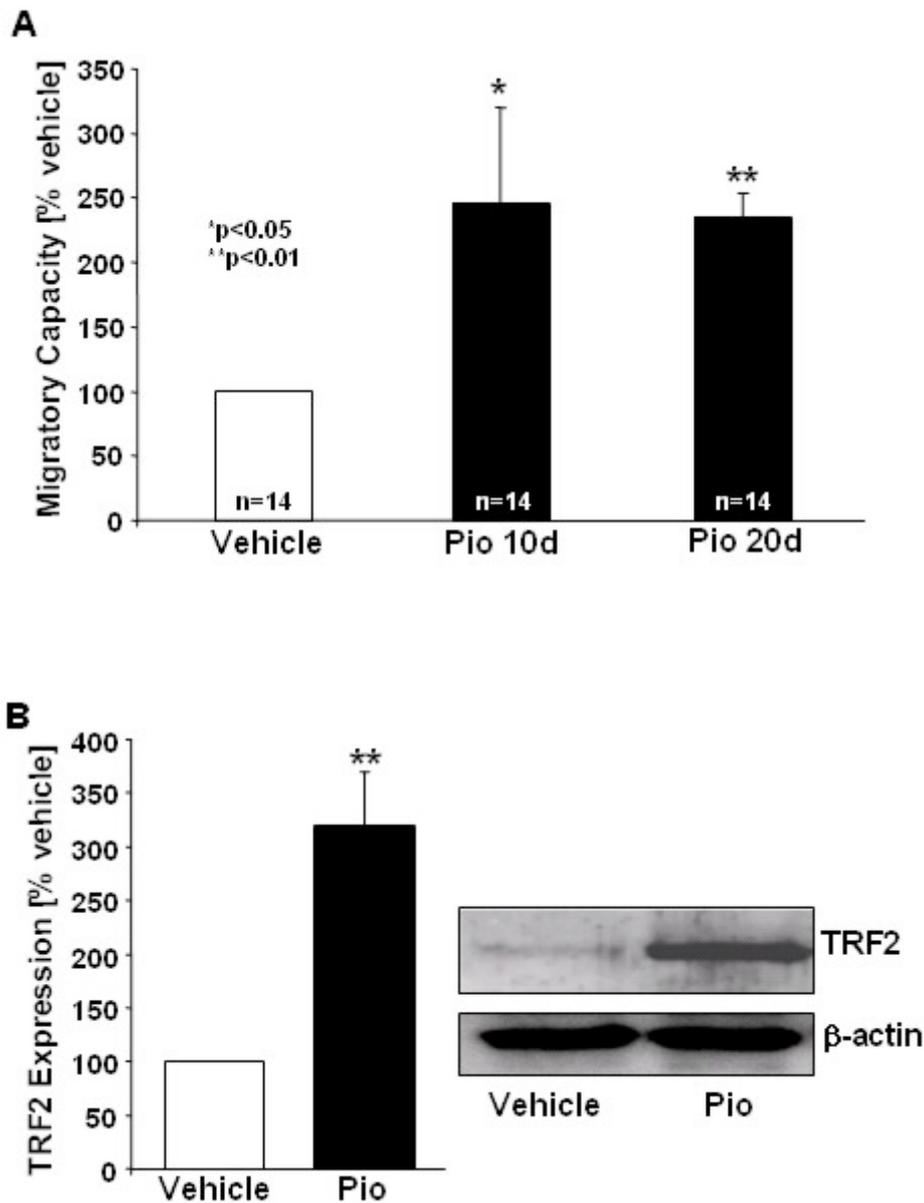


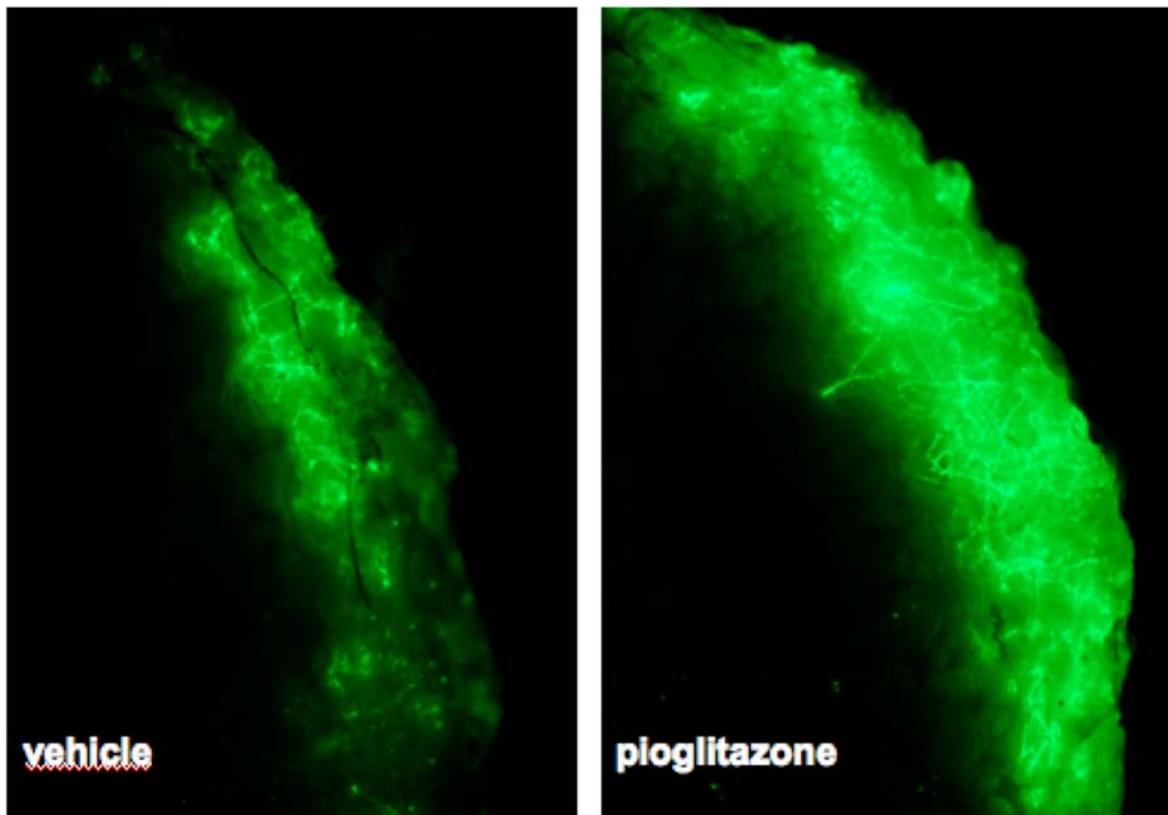
Abbildung 3

(A) Auswirkung der Behandlung mit Pioglitazon 20 mg/kg/d (Pio, schwarze Balken, 10 und 20 Tage) auf die Migration in einer modifizierten Boyden Kammer unter Verwendung von VEGF 50 ng/ml als Lockstoff.

(B) Quantifizierung und repräsentativer Western Plot der Proteinexpression des Telomer repeat-binding factor (TRF2) von murinen EPC behandelt mit Pioglitazon 10 μ M über 24 h.

4.1.5 Auswirkungen der Pioglitazonbehandlung auf die Neoangiogenese

Die Verbesserung der Neoangiogenese ist eine der am besten untersuchten Funktionen der endothelialen Progenitorzellen (Asahara 1997). Um die Effekte auf die Neoangiogenese *in vivo* zu untersuchen, quantifizierten wir das Einwachsen funktioneller neuer Gefäße in einen subkutan implantierten Polyvinyl Schwamm. Wir taten dies, indem wir nach 20 Tagen das Gefäß- und Kapillarsystem der Mäuse mit fluoreszierenden Mikrosphären (0.2 μm) perfundierten. Durch die systemische Applikation via den linken Ventrikel stellten wir sicher nur die funktionellen Kapillaren zu quantifizieren. Die Behandlung mit Pioglitazon führte zu einer Verdoppelung der Neoangiogenese ($214 \pm 42\%$, $n=6$, 20 Tage, $p < 0,05$) (**Abb. 4**).



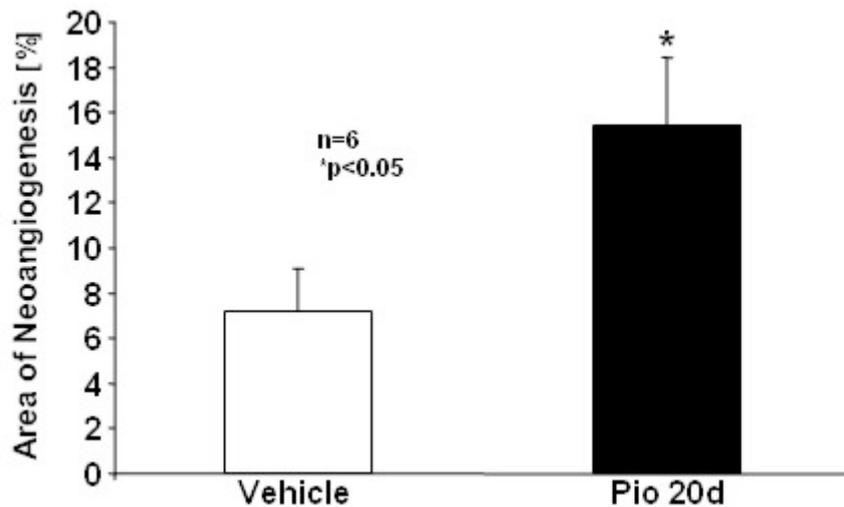


Abbildung 4

Auswirkung der Behandlung mit Pioglitazon 20 mg/kg/d (Pio, schwarze Balken, 20 Tage) auf die Neoangiogenese. (A) Repräsentatives Beispiel und (B) Quantifizierung der Gefäßneubildung am Randsaum des Polyvinylschwamms.

4.1.6 Einfluss von Pioglitazon auf die Apoptose endothelialer Progenitorzellen

EPC Apoptose ist möglicherweise ein Mechanismus, um die Anzahl zirkulierender EPC zu regulieren (Dimmeler 2001; Laufs 2004; Urbich 2005). Aus diesem Grund quantifizierten wir die Apoptoserate von *in vivo* mit Glitazonen behandelten murinen endothelialen Progenitorzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. **Abb. 5** zeigt, dass Pioglitazon die EPC Apoptose verglichen mit der Kontrollgruppe um 65 ± 2.8 % verringert ($n=6$, $p<0,05$).

Um herauszufinden, inwieweit diese Beobachtungen auf menschliche Zellen zu übertragen sind, kultivierten wir endotheliale Progenitorzellen von 6 gesunden Probanden *ex vivo* mit Pioglitazon in An- bzw. Abwesenheit von Wasserstoffperoxid (H_2O_2), einem Apoptoseinduktor. Die Analyse der Apoptose durch zwei voneinander unabhängige Verfahren, Annexin V FACS und morphologische Analyse (Urbich 2005), zeigte einen signifikanten Rückgang des programmierten Zelltodes in der Gegenwart von Pioglitazon ($n=6$, $p<0,05$) (**Abb. 6**). Die Inhibition der Pioglitazon-vermittelten EPC Apoptose wurde unter dem Einfluss des PI3K Inhibitors LY294002 (10 μ M) komplett aufgehoben. Keinen Einfluss auf die Glitazon induzierte Apoptose Inhibition zeigte dagegen die Applikation des NOS-Inhibitors LNMA (1 mM) (**Abb.**

6C). Genau wie in murinen Zellen war die Protein Expression des TRF2 auch in mit Pioglitazon (1 μ M, 72 h) behandelten humanen EPC gesteigert (344 ± 36 %).

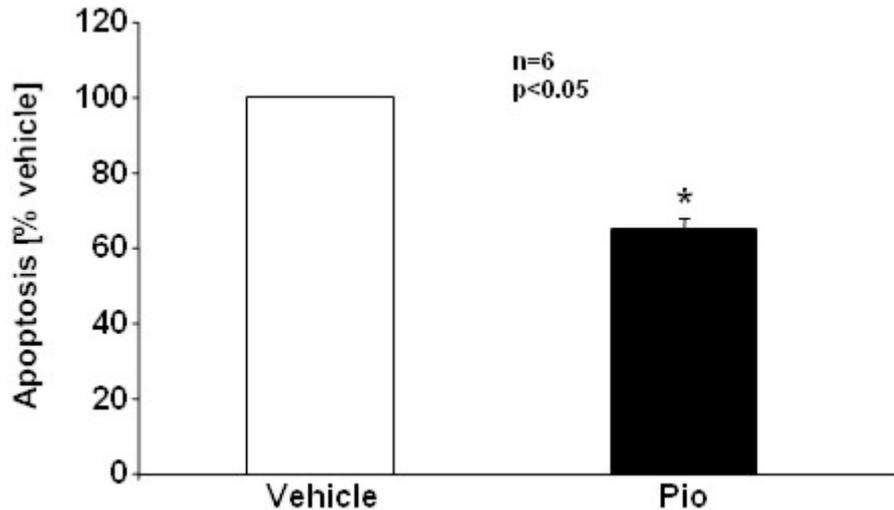
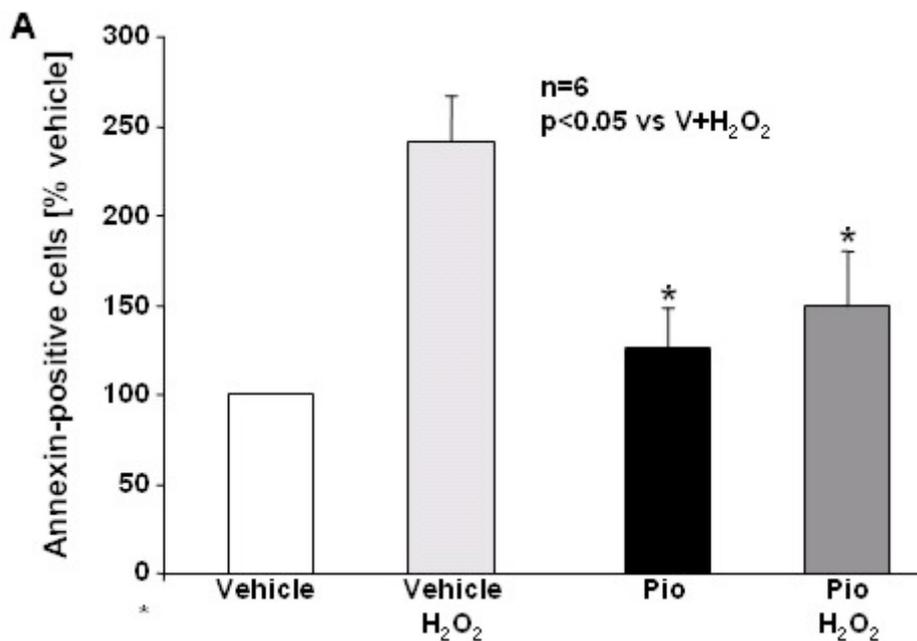


Abbildung 5

Apoptoserate von EPC aus Mäusen, welche mit Pioglitazon 20 mg/kg/d (Pio, schwarze Balken, 20 Tage) behandelt waren, verglichen mit NaCl-behandelten Tieren.



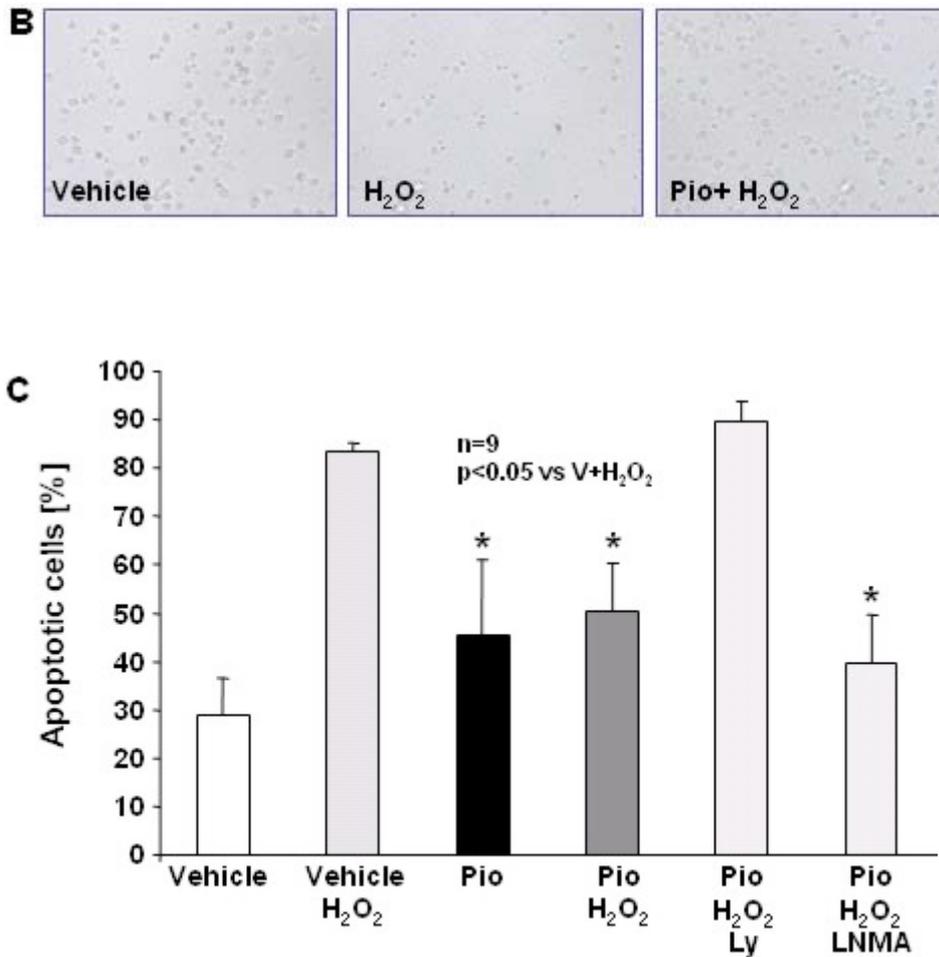


Abbildung 6

Regulation der Apoptose in humanen endothelialen Progenitorzellen. (A) Nachweis der Apoptose durch Annexin V Färbung. Auswirkung der Behandlung mit Pioglitazon 10 μ M alleine und in der Gegenwart von H₂O₂ (500 μ M, 24 h) auf die Apoptose in kultivierten humanen EPC.

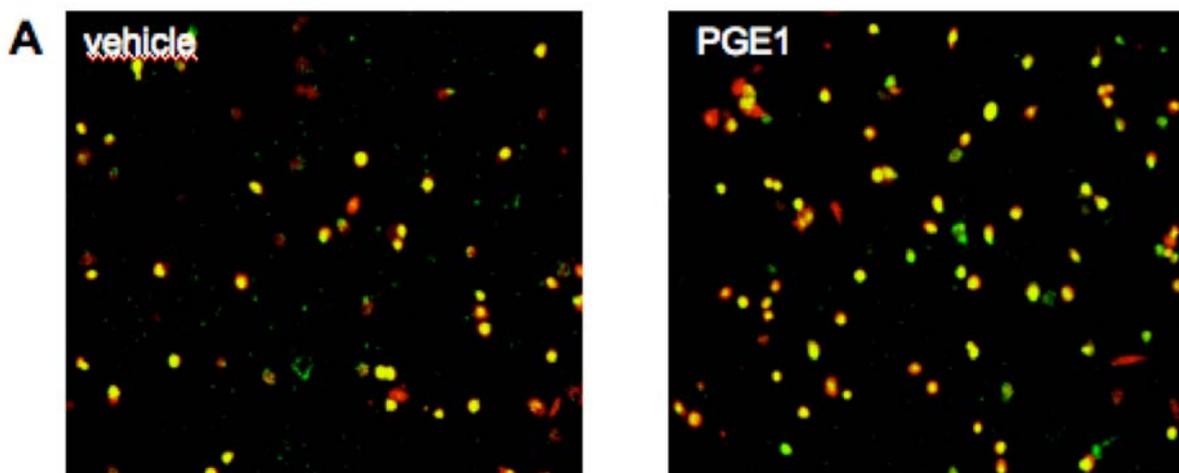
(B) Repräsentative Beispiele und (C) Quantifizierung des apoptotischen Zelltodes durch morphologische Analyse. 500 Zellen wurden durch zwei unabhängige verblindete Beobachter gezählt und die prozentuale Apoptoserate der EPC wurde nach Behandlung mit Pioglitazon 10 μ M alleine und in der Gegenwart von H₂O₂ (500 μ M, 24 h), sowie nach 30 min Vorbehandlung mit LY294002 (10 μ M) oder LNMA (1 mM), bestimmt.

4.2 Ergebnisse nach Behandlung mit Prostaglandin E1

4.2.1 EPC-Quantifizierung durch DiLDL/Lectin-Färbung

Um die Auswirkungen von Prostaglandin E1 auf EPC zu testen, wurden C57/Bl6 Mäuse mit PGE1 1µg/kg/Tag, 10 µg/kg/Tag oder NaCl für 10 bzw. 20 Tage behandelt. Die Behandlung mit PGE1 steigerte die Anzahl aus der Milz stammender EPC auf 170±20 % nach 10 Tagen und 174±14 % nach 20 Tagen im Vergleich zu NaCl behandelten Kontrolltieren (**Abb. 7**). Die Applikation von PGE1 1µg/kg/Tag über die Dauer von 10 und 20 Tagen sowie die Behandlung mit PGE1 10 µg/kg/Tag über 10 Tage führte zu einer Steigerung der Anzahl endothelialer Progenitorzellen in ähnlichem Ausmaß (n=12, p<0,05).

Die endotheliale NO-Synthase stellt einen wichtigen Regulationsmechanismus zur EPC-Freisetzung dar (Aicher 2003). Um zu prüfen, ob die Hochregulation der EPC durch die NO-Synthase vermittelt ist, wurden die Mäuse (n=12) mit PGE1 und dem NO-Inhibitor (L-NAME) in der Dosierung 50 mg/kg (Laufs 2004; Kojda 1999) behandelt. Alle Auswirkungen von PGE1 auf die endothelialen Progenitorzellen wurden durch die gleichzeitige Behandlung mit dem NO-Inhibitor LNAME vollständig aufgehoben (**Abb. 7**). Die Behandlung mit dem Prostaglandin Derivat Iloprost 100 µg/kg/Tag hatte keine Wirkungen auf die Anzahl der aus der Milz stammenden endothelialen Progenitorzellen.



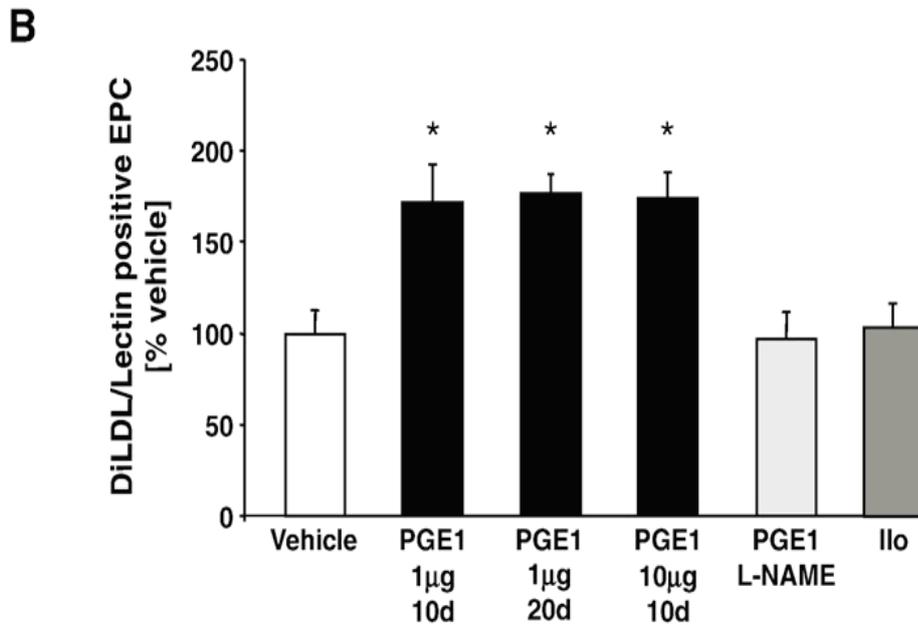
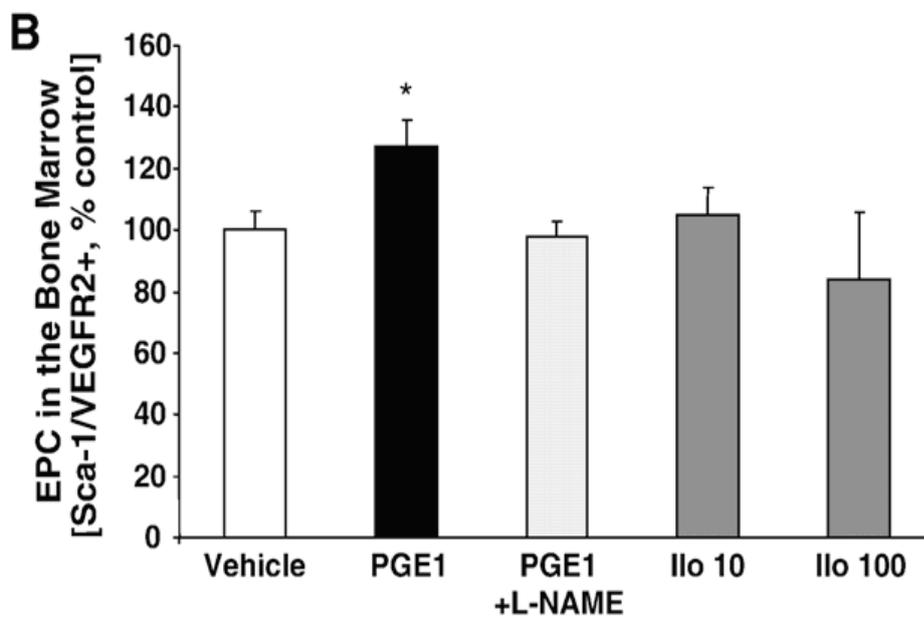
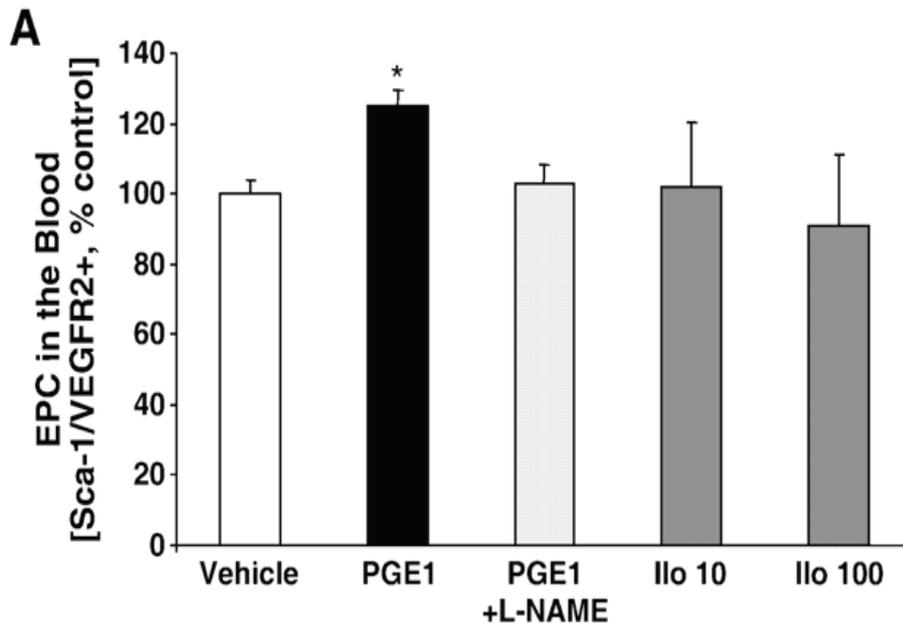


Abbildung 7

(A) Repräsentative Fluoreszenzmikroskopie von DiLDL/Lectin-positiven endothelialen Progenitorzellen und (B) Quantifizierung nach Behandlung von C57/Bl6 Mäusen mit NaCl (weisse Balken, 10 Tage), Prostaglandin E1 1 µg/kg/Tag (PGE1, schwarze Balken, 10 Tage und 20 Tage) und 10 µg/Tag (PGE1 10, schwarze Balken, 10 Tage) und PGE1 10 µg + L-NAME (50 mg/kg/Tag, hellgraue Balken, 10 Tage) und Iloprost (100 µg/kg/Tag, 10 Tage); n =12 pro Gruppe; *p<0,05.

4.2.2 EPC-Quantifizierung durch FACS-Analyse in Blut und Knochenmark

Als weitere Methode der EPC-Bestimmung quantifizierten wir Sca-1/VEGFR-2 positive EPC mittels FACS-Analyse. Behandlung mit PGE1 steigerte die Anzahl zirkulierender EPC im peripheren Blut auf 122±7 % nach 10 Tagen und 119±6 % nach 20 Tagen im Vergleich zu NaCl behandelten Kontrolltieren (n=18, p<0,05) (**Abb. 8**). PGE1 steigerte nicht nur die Anzahl zirkulierender EPC im peripheren Blut, sondern auch im Knochenmark. EPC im Knochenmark wurden auf 125±11 % (10d) und 142±15 % (20d) (n=18, p<0,05) gesteigert. Auch hier führte eine Inhibition der NOS durch L-NAME zu einer kompletten Blockierung der PGE1 induzierten EPC-Steigerung (n=12, p<0,05). Behandlung mit PGE1 bei eNOS -/- Mäusen führte weder im peripheren Blut noch im Knochenmark zu einer Steigerung der Anzahl endothelialer Progenitorzellen.



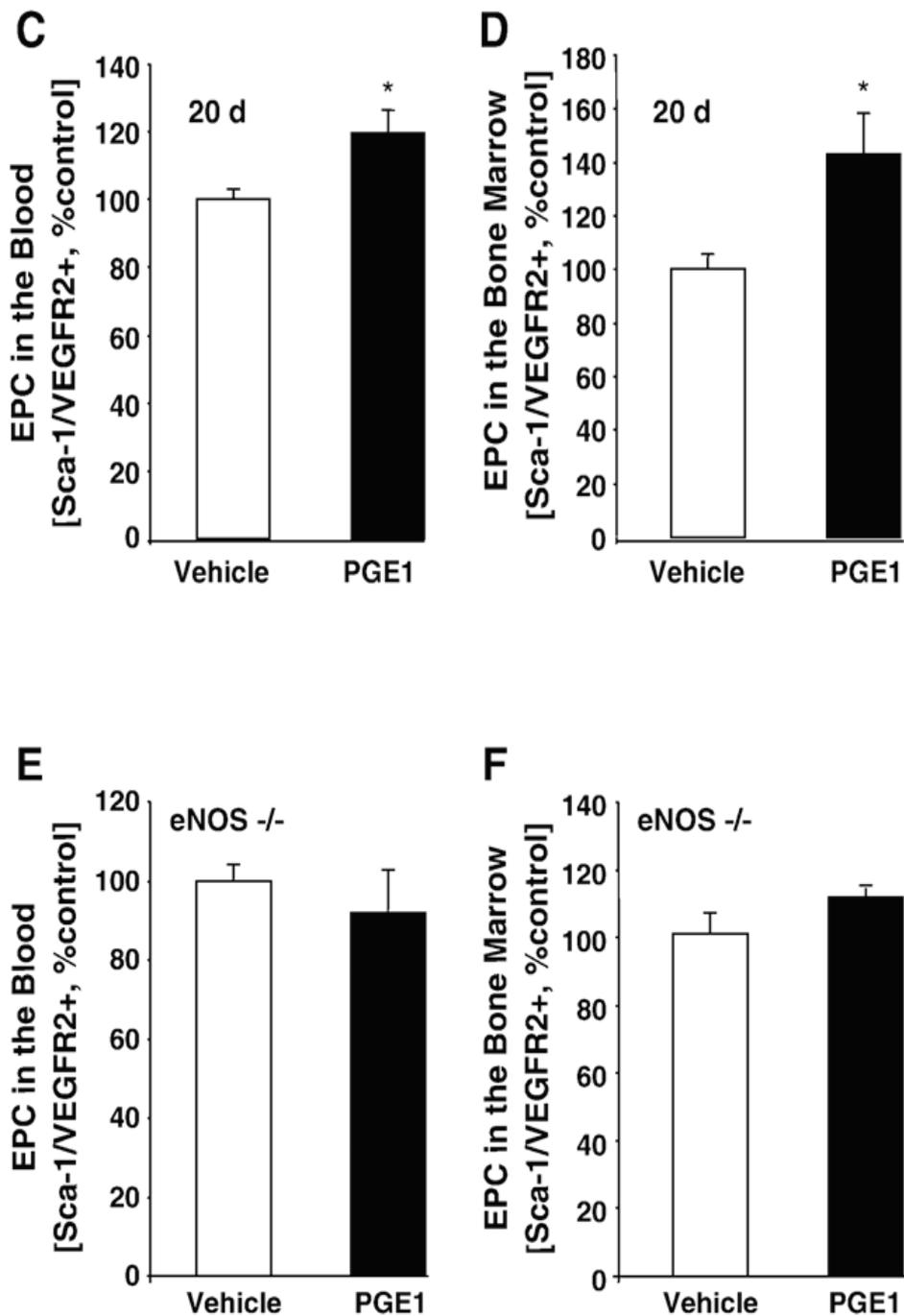


Abbildung 8

Quantifizierung der Sca-1/VEGFR2⁺ endothelialen Progenitorzellen mittels FACS-Analyse aus dem peripheren Blut (A) und aus dem Knochenmark (B), in Mäusen behandelt mit NaCl (weisse Balken), Prostaglandin E1 10 µg/kg/Tag (PGE1, schwarze Balken), PGE1 + L-NAME 50 mg/kg/Tag (hellgraue Balken) und dem Prostaglandinderivat Iloprost 10 und 100 µg/kg/Tag (Ilo dunkelgraue Balken) über 10 Tage. (C) Sca-1/VEGFR2⁺ endotheliale Progenitorzellen im peripheren Blut und im (D)

Knochenmark nach 20 Tagen. (E) Sca-1/VEGFR2⁺ EPC im peripheren Blut und (F) im Knochenmark bei eNOS^{-/-} Mäusen nach 10 Tagen Behandlung mit Prostaglandin; n=12-18 für alle Gruppen; *p<0,05.

4.2.3 EPC-Funktionsbestimmung durch Migrationsassay

Die SDF-1-induzierte Migration in einer modifizierten Boyden Kammer mit VEGF als chemischem Lockstoff zeigte eine gesteigerte Anzahl migratorisch aktiver EPC in der mit PGE1 behandelten Gruppe. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die migratorische Kapazität auf 140±11 % nach 10 Tagen, auf 146±22 % nach 14 Tagen und auf 160±16 % nach 20 Tagen gesteigert (n=10, p<0,05). Der Telomer repeat-binding factor 2 ist ein Regulator der replikativen Potenz endothelialer Progenitorzellen (Spyridopoulos, 2004). Aus diesem Grund wurde die TRF2 Expression durch Western Blotting quantifiziert. Es stellte sich heraus, dass die Behandlung mit PGE1 die TRF2 Expression in Mäusen verdoppelt (n=6, p<0,05) (Abb. 9).

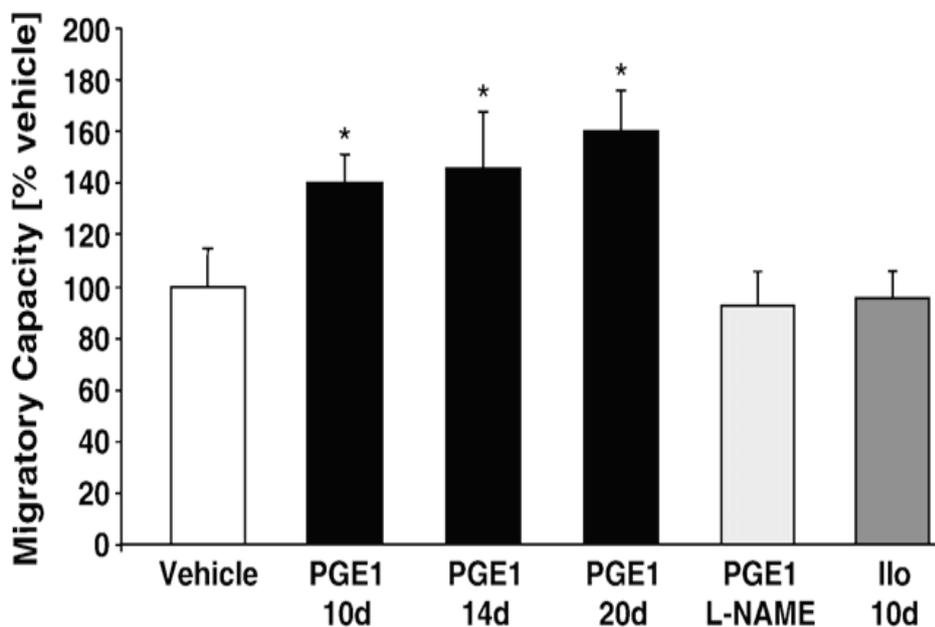


Abbildung 9

Auswirkung der Behandlung mit Prostaglandin E1 10 µg/kg/Tag (PGE1, schwarze Balken, 10, 14 und 20 Tage), PGE1 10 µg/kg/Tag + L-NAME 50mg/kg/Tag (hellgraue

Balken, 10 Tage) und Iloprost 100 µg/kg/Tag (dunkelgraue Balken, 10 Tage) auf die Migration der EPC in einer modifizierten Boyden Kammer unter Verwendung von VEGF 50 ng/ml als chemischen Lockstoff; n=10 pro Gruppe; *p<0,05.

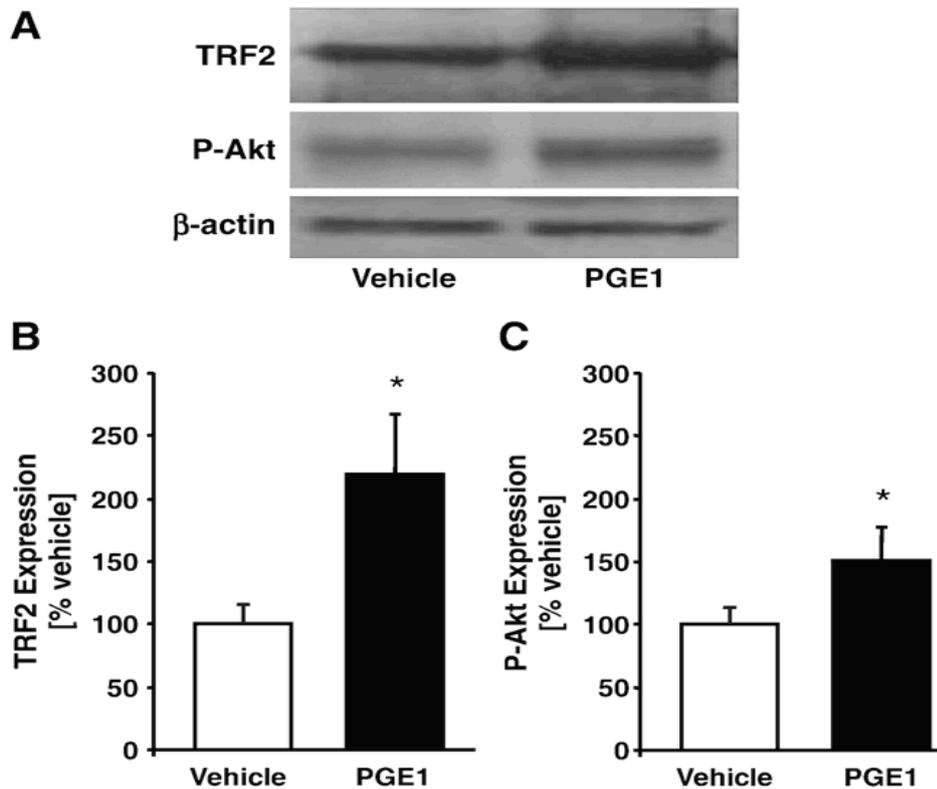


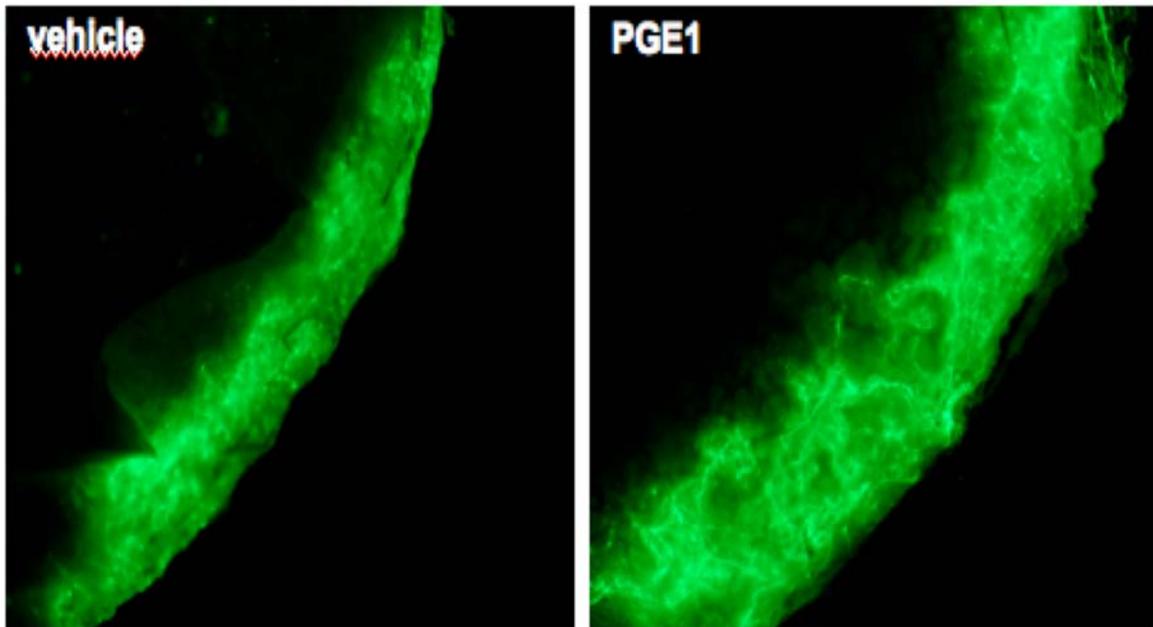
Abbildung 9

(A) Repräsentativer Western Plot und (B) Quantifizierung der Protein Expression des Telomer repeat-binding factor (TRF2) und der p-Akt Proteinexpression von murinen EPC behandelt mit Prostaglandin E1 10 µM über 24 h; n=6 pro Gruppe; *p<0,05.

4.2.4 Auswirkungen der Prostaglandin-E1-Behandlung auf die Neoangiogenese

Eine der am besten untersuchten Funktionen der endothelialen Progenitorzellen sind die positiven Effekte auf die Neoangiogenese (Asahara, 1997). Um die Auswirkungen auf die Neoangiogenese zu untersuchen, quantifizierten wir das Einwachsen funktioneller neuer Gefäße in einen subkutan implantierten Polyvinyl Schwamm. Die Behandlung mit Prostaglandin E1 führte zu einer Verdoppelung der Neoangiogenese (218±27%, n=12, 20 Tage) (**Abb. 10**).

A



B

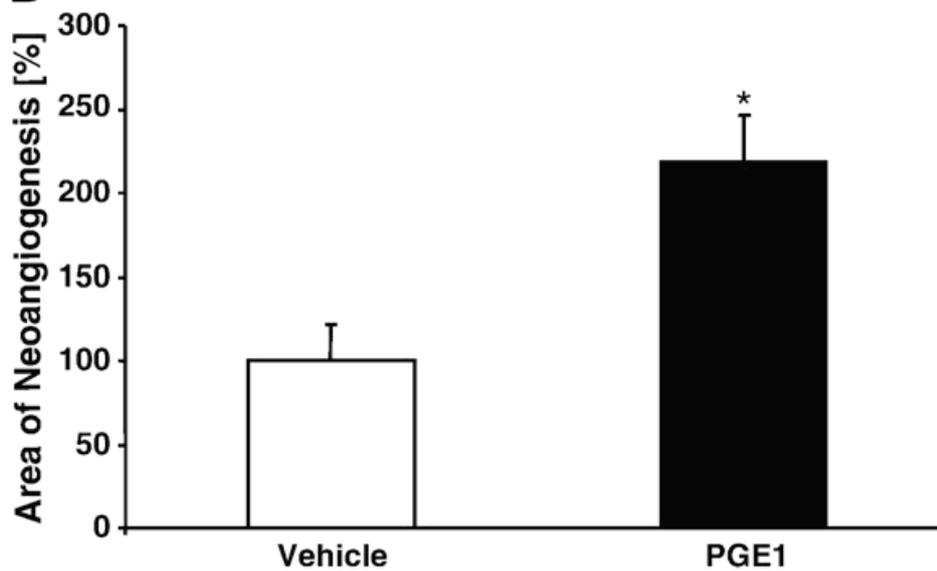
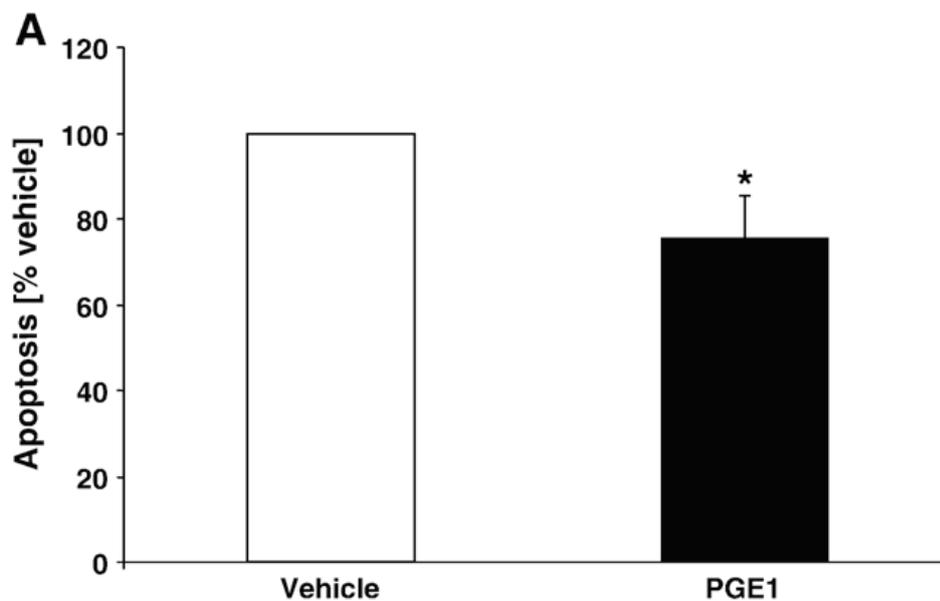


Abbildung 10

Auswirkung der Behandlung mit Prostaglandin E1 10 ug/kg/Tag (PGE1, schwarze Balken, 20 Tage) auf die Neovascularisation. (A) Repräsentatives Beispiel und (B) Quantifizierung der Gefäßneubildung am Randsaum des Polyvinylschwamms; n=12 pro Gruppe; *p<0,05.

4.2.5 Prostaglandin-E1-Einfluss auf die Apoptose endothelialer Progenitorzellen

Wir quantifizierten die Apoptoserate von *in vivo* mit PGE1 behandelten endothelialen Progenitorzellen von Mäusen. Verglichen mit der Kontrollgruppe wiesen sie eine signifikante Reduktion der Apoptose auf; n=6 pro Gruppe; *p<0,05 (**Abb. 11**). Um herauszufinden, inwieweit diese Beobachtungen auf menschliche Zellen zu übertragen sind, kultivierten wir endotheliale Progenitorzellen von 6 gesunden Probanden *ex vivo* mit Prostaglandin in An- bzw. Abwesenheit von H₂O₂. Die Analyse der Apoptose zeigte einen signifikanten Rückgang des programmierten Zelltodes in der Gegenwart von PGE1 (p<0,05). Die Inhibition der prostaglandin-vermittelten EPC-Apoptose wurde sowohl unter dem Einfluss des PI3K Inhibitors Wortmannin (100 nM) als auch durch LY294002 (10 µM) sowie dem NOS-Inhibitor LNMA (1 mM) (**Abb. 11**) komplett aufgehoben.



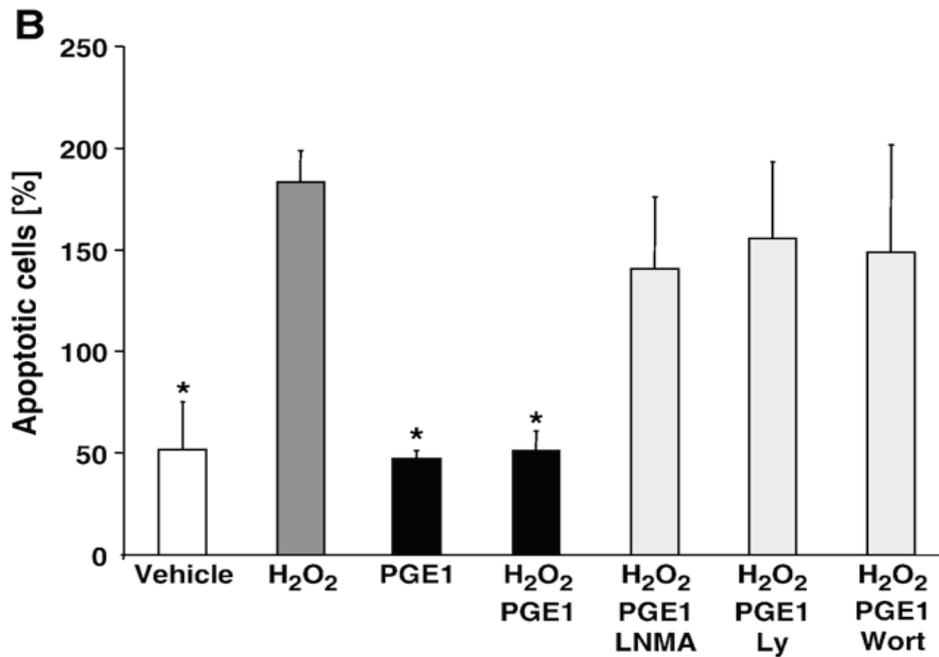


Abbildung 11

(A) Apoptoserate von aus Mäusen isolierten EPC, behandelt mit Prostaglandin E1 10 µg/kg/Tag (PGE1, schwarze Balken, 20 Tage), verglichen mit kontrollbehandelten Tieren; n=6 pro Gruppe; *p<0,05.

(B) Regulation der Apoptose in humanen endothelialen Progenitorzellen. 500 Zellen wurden durch zwei unabhängige verblindete Beobachter gezählt und die prozentuale Apoptose der EPC wurde bestimmt nach Behandlung mit Prostaglandin E1 (PGE1, 1 µM, 24 h)M alleine und in der Gegenwart von H₂O₂ (500 µM, 24 h) sowie nach 30minütiger Vorbehandlung mit LNMA (1 mM), LY294002 (Ly, 10 µM) oder Wortmannin (Wort, 100 nM).

4.2.6 Wirkungen des Prostaglandinderivats Iloprost auf endotheliale Progenitorzellen

Im Gegensatz zu denen durch PGE1 hervorgerufenen Effekte führte die Behandlung mit einem anderen Prostaglandin, dem Prostaglandin I2 Derivat Iloprost 10 µg/kg/Tag über die Dauer von 10 Tagen, zu keinem Anstieg der Sca-1/VEGFR-2 positiven EPC im Blut oder im Knochenmark. Auch die Anzahl der EPC in kultivierten mononukleären Zellen der Milz und die migratorischen Kapazität der EPC blieben unverändert (Abb. 7B; Abb. 8A/8B; Abb. 9).

4.2.7 Wirkungen von PGE1 in Kombination mit körperlichen Training

Freiwilliges körperliches Training steigert die Anzahl und Funktion von endothelialen Progenitorzellen in Mäusen (Laufs 2004). Körperliche Aktivität oder Gehtraining ist eine Grundlage der Behandlung von Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit (Hirsch 2006). Um einen potentiellen additiven Effekt zu untersuchen, testeten wir die Auswirkungen von freiwilligem körperlichem Training in Kombination mit PGE1 Behandlung (10 µg/kg/d, 14 Tage). Die Kombination beider Therapieverfahren steigerte sowohl die Anzahl Sca-1/VEGFR2⁺ endothelialer Progenitorzellen im Blut und Knochenmark als auch die Anzahl der DiLDL/lectin positiven kultivierten Zellen. Auch die migratorische Kapazität der EPC verbesserte sich (**Abb. 12**). Verglichen mit der Trainingsgruppe führte die zusätzliche Behandlung mit PGE1 zu einer geringgradigen additiven Steigerung der EPC Zahl im Blut (251±14 % vs 215±13 % der Kontrollen), im Knochenmark (227±11 % vs 188±9 %) und in der Milz (180±10 % vs 137±16 %). Auch die positiven Auswirkungen des körperlichen Trainings auf die EPC Funktion wurden durch gleichzeitige Behandlung mit PGE1 gesteigert (168±21 % vs 130±13 % im Verhältnis zur Kontrollgruppe); n=12 pro Gruppe; p<0,05.

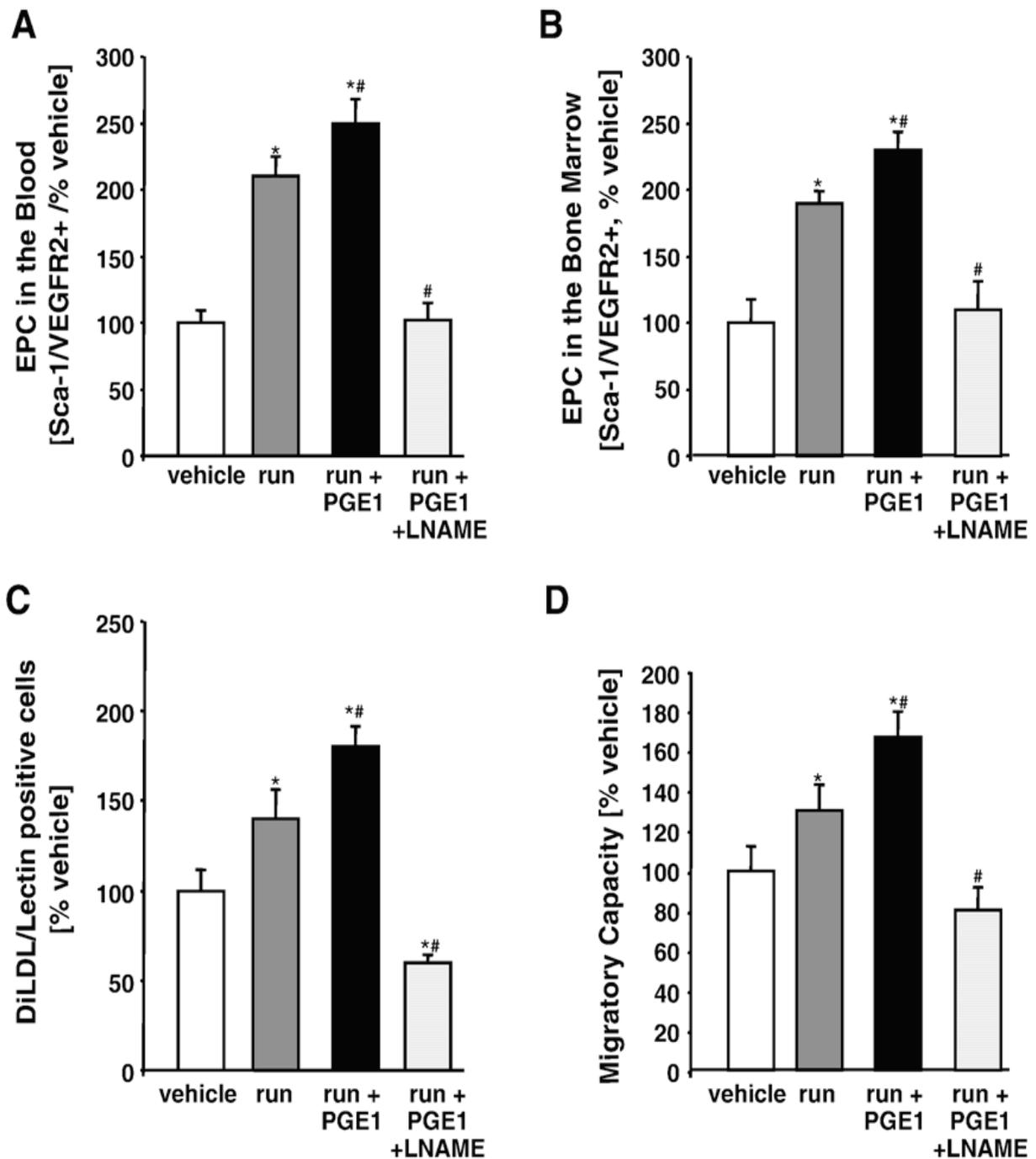


Abbildung 12

Auswirkung der Behandlung mit Prostaglandin E1 (PGE1, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$) in Kombination mit körperlichem Training (run). Quantifizierung der Sca-1/VEGFR2⁺ endothelialen Progenitorzellen mittels FACS Analyse im peripheren Blut (A) und im Knochenmark (B) (Kontrolle weisse Balken, Training dunkelgraue Balken, Training+PGE1 schwarze Balken, Training+PGE1+L-NAME hellgraue Balken, 14 Tage). (C) Auswirkung der Behandlung auf DiLDL/Lectin positive mononukleäre Zellen

der Milz. (D) Auswirkung der Behandlung auf die migratorische Kapazität in einer modifizierten Boyden Kammer mittels VEGF 50 ng/ml als Lockstoff; n=12 pro Gruppe; *p<0,05 vs Kontrolle, #p<0,05 vs Training.

5. Diskussion

Als endotheliale Progenitorzellen bezeichnet man eine Stammzellsubpopulation mit bereits endothelialer Programmierung, aber noch erhaltener Stammheit. Das bedeutet, dass sie einerseits eine echte Selbsterneuerungskapazität mit proliferativem Potential besitzen, andererseits die Fähigkeit haben, in verschiedene differenzierte Gewebe auszureifen. EPC stellen ein neues Paradigma in der vaskulären Biologie dar. Bisher ging man davon aus, dass regenerative und proliferative Prozesse im Endothel durch mitotische Zellteilung lokaler adulter Endothelzellen repariert bzw. initiiert werden. Neue experimentelle Befunde zeigen, dass die zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen die endotheliale Homöostase, die Funktion des Endothels und die Angiogenese beeinflussen (Asahara 1997; Dimmeler 2001; Hill 2003; Werner 2003).

Klinische Befunde weisen darauf hin, dass PPAR- γ -Agonisten (Glitazone, TZD) unabhängig von ihrer insulin-sensitivierenden Wirkung die Endothelfunktion verbessern, allerdings sind die zugrunde liegenden Mechanismen erst zum Teil verstanden. Prostaglandin E1 (PGE1) wird zur Behandlung von Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) eingesetzt, auch hier sind die molekularen Wirkmechanismen nur zum Teil bekannt. Daher untersuchten wir in diesem Zusammenhang die Regulation endothelialer Progenitorzellen (EPC) aus dem Knochenmark.

5.1 Auswirkungen des PPAR- γ -Agonisten Pioglitazon auf endotheliale Progenitorzellen

Unsere Experimente zeigen, dass die Behandlung mit dem PPAR- γ -Agonisten Pioglitazon die Anzahl der endothelialen Progenitorzellen sowohl im peripheren Blut als auch im Knochenmark erhöht. Diese Hochregulation der EPC-Zahl beobachteten wir in gesunden Wild-Typ Mäusen, wobei die Glitazonbehandlung weder die Glucose noch die Lipid Serum Spiegel veränderte. Die Hochregulation hielt über die Dauer von mindestens 20 Tagen an. Zusätzlich zu der Steigerung der EPC Zahl verbessert die Behandlung mit Pioglitazon die migratorische Kapazität der EPC, die einen wichtigen Marker der EPC-Funktion darstellt. Weiterhin reduzierte Pioglitazon die Apoptose von EPC in Mäusen sowie in kultivierten humanen EPC. Positive Auswirkungen von Pioglitazon beobachteten wir auch im Hinblick auf die Neoangiogenese.

Einen zentralen Mechanismus der Gewebeprotektion bei Gefässerkrankungen stellt die Neoangiogenese, definiert als Ausprossung neuer Gefäße aus bereits bestehenden vaskulären Strukturen, dar. Aufgrund ihrer Fähigkeit, die Neoangiogenese zu steigern und die Bildung von Kollateralkreisläufen zu begünstigen, wurden EPC erstmals nachgewiesen (Ashara 1997; Urbich 2004). Kennzeichen der Angiogenese ist die Rekrutierung endothelialer Progenitorzellen mit nachfolgender Differenzierung zu ausgereiften Endothelzellen. Die Effekte auf die Neoangiogenese *in vivo* stellen deshalb einen wichtigen Parameter dar, um die EPC-Funktion zu bestimmen (Urbich 2004). Wir haben beobachtet, dass eine systemische Behandlung mit Pioglitazon zu einem deutlichen Anstieg der Neoangiogenese führt. Allerdings steht diese Beobachtung in Kontrast zu anderen veröffentlichten Ergebnissen, die zeigten, dass die Applikation von PPAR- γ -Agonisten zu einer Inhibition der chorioidalen und cornealen Neovaskularisation sowie zu einer Inhibition der Vaskularisierung von verschiedenen Tumor-Modellen führte (Panigrahy 2002; Murata 2000; Xin 1999). Unsere Daten befinden sich jedoch in Übereinstimmung mit Beobachtungen von Wang et. al., die zeigten, dass der PPAR- γ -Agonist Rosiglitazon die Differenzierung aus dem Knochenmark stammender Progenitorzellen in endotheliale Vorläuferzellen fördert (Wang 2004). In dieselbe Richtung geht die kürzlich erschienene Arbeit von Pistrosch et. al., die eine Hochregulation der endothelialen Progenitorzellen in Typ II Diabetikern durch Rosiglitazon zeigte (Pistrosch 2005). Ebenfalls in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen zeigten Verma et al., dass Rosiglitazon eine Schädigung der EPC Funktion, hervorgerufen durch Behandlung mit C-reaktivem Protein, verhindert (Verma 2004). In unserer Studie zeigen wir pro-angiogenetische Effekte durch Pioglitazon nach systemischer Applikation. Wir verwendeten dazu das Neoangiogenese-Disc-Modell, welches zu den etablierten Methoden zählt, um Entstehung und Wachstum von neu entstandenen Kapillargefäßen mit voller funktioneller Kapazität zu überprüfen (Fajardo 1988). Die Diskrepanz zwischen unseren Beobachtungen *in vivo* und den bereits publizierten Berichten über die anti-angiogenetischen Effekte durch Glitazone in Zellkulturen und Tierversuchen, wie zum Beispiel die chick chorioallantoic membrane oder die avascular cornea, weist Parallelen zu den Beobachtungen auf, die man über die Auswirkungen von Statinen auf die Neoangiogenese machte. Statine führen zu einer Inhibition der Angiogenese in hohen Konzentrationen und in Zell-Kultur-Modellen, fördern aber die Angiogenese und steigern die Anzahl der endothelialen Progenitorzellen in niedriger Konzentration sowie *in vivo* (Urbich 2002). Wir nehmen an, dass Glitazone eine Doppelrolle in der Signalkaskade der Angiogenese spielen. Bei der systemischen Applikation, die eine relative niedrige Gewebekonzentration hervorruft, wird die Anzahl und Migration der EPC gesteigert, wohingegen die anti-angiogenetischen Effekte durch hohe lokale

Dosen zu erklären sind. So könnten unsere Beobachtungen der Pioglitazon induzierten Steigerung der Neoangiogenese dazu beitragen, die verringerte Morbidität von Mäusen nach post-MI Herzinsuffizienz (Shiomi 2002) und ischämischen Schlaganfall (Pereira 2005) nach Glitazonbehandlung zu erklären.

Neben den hochregulierenden Wirkungen auf die EPC Zahl verbessert die Behandlung mit Glitazonen die migratorische Kapazität der EPC. Die migratorische Kapazität stellt einen wichtigen Marker der Funktion endothelialer Progenitorzellen dar. Erst kürzlich konnten Spyridopoulos et al. zeigen, dass die Verschlechterung der Replikation sowie der funktionellen Kapazität in EPC während der Proliferation in der Zellkultur über den Einfluss von Statinen auf das telomere-capping protein TRF2 verhindert werden kann. Eine Überexpression einer dominanten negativen Mutante des TRF2 Proteins reduzierte die Statin-induzierte Migration auf Normalwerte (Spyridopoulos 2004). Unsere Studie zeigt, dass Pioglitazon sowohl bei murinen als auch bei humanen endothelialen Progenitorzellen zu einer Steigerung der Expression des TRF2 Proteins beiträgt. Unsere Daten weisen daher darauf hin, dass Pioglitazon einen positiven Effekt auf die Telomerbiologie in endothelialen Progenitorzellen hat.

In einigen Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass die endotheliale NO-Synthase einen wichtigen Regulator der EPC Freisetzung darstellt (Urbich 2004; Laufs 2004; Aicher 2003). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigte sich, dass ein Anstieg der EPC, z.B. hervorgerufen durch körperliche Aktivität, in der Anwesenheit des NOS-Inhibitors L-NAME oder in eNOS-/- Mäusen gehemmt wird (Laufs 2003). Verschiedene Auswirkungen der Glitazone, wie zum Beispiel die Verbesserung der Endothelfunktion, legten die Vermutung nahe, dass Pioglitazon die EPC Freisetzung via eNOS reguliert (Hetzl 2005, Pistrosch 2004). Aber konträr zu unserer Hypothese konnten wir weder eine Hochregulation der vaskulären eNOS mRNA Expression noch einen Rückgang der Glitazon induzierten EPC Anstiegs in der Gegenwart des NOS Inhibitors L-NAME beobachten. Die regulativen Effekte von Pioglitazon auf endotheliale Progenitorzellen scheinen auf einem eNOS unabhängigen Effekt zu beruhen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Hochregulation endothelialer Progenitorzellen via Pioglitazon durch eine reduzierte Rate des apoptotischen Zelltodes gekennzeichnet ist. Diese Beobachtung machten wir bei mit Glitazonen behandelten kultivierten endothelialen Progenitorzellen. Die Beobachtung bestätigte sich bei der Behandlung von kultivierten humanen EPC mit Glitazonen. Die Glitazon induzierte Inhibition der Apoptose in humanen EPC wurde durch die Anwesenheit

eines NOS Inhibitors nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu wurden die Glitazon induzierten Effekte auf die EPC Apoptose in der Gegenwart des PI3 Kinase Inhibitors LY294002 komplett aufgehoben. Auch die Applikation von LNMA blieb ohne Wirkung auf die inhibierte Apoptoserate. Die Inhibition der EPC Apoptose via PI3 Kinase stellt einen neuartigen Wirkmechanismus endothelialer Progenitorzellen dar.

Übereinstimmend mit den hier gezeigten Effekten von Glitazonen auf endotheliale Progenitorzellen im Mausmodell konnten Werner et al. in einer klinischen Studie zeigen, dass die systemische Applikation von Glitazonen auch bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit und normaler Glucosetoleranz zu einer Hochregulation der EPC führt (Werner 2007).

5.2 Auswirkungen von Prostaglandin E1 auf endotheliale Progenitorzellen

Auch bei der Behandlung der Mäuse mit dem Pharmakotherapeutikum Prostaglandin E1 zeigte sich, dass die Behandlung mit PGE1 die Anzahl der endothelialen Progenitorzellen sowohl im peripheren Blut als auch im Knochenmark erhöht. Diese Hochregulation der EPC-Zahl beobachteten wir in gesunden wild-typ Mäusen persistierend für mindestens 20 Tage.

Zusätzlich zu der Steigerung der EPC Anzahl verbessert die Behandlung mit Prostaglandin E1 die Migrationsfähigkeit endothelialer Progenitorzellen. Unsere Studie zeigt weiterhin, dass PGE1 möglicherweise zu einer Steigerung der Expression des TRF2 in EPC beiträgt. Diese Daten lassen vermuten, dass Telomer-regulierende Proteine eine Rolle für die Kontrolle der EPC-Funktion spielen.

Neoangiogenese stellt einen zentralen Mechanismus der Gewebeprotektion bei Gefässerkrankungen dar. Die Ergebnisse zeigen, dass eine systemische Behandlung mit Prostaglandin E1 zu einem deutlichen Anstieg der Neoangiogenese *in vivo* führt. Diese Beobachtung befindet sich in Übereinstimmung mit der gesteigerten Neoangiogenese in der Cornea von Hasen nach lokaler Applikation von PGE1 (Ziche 1995) und von *in vitro* durchgeführten Angiogenesemodellen. So konnten Mehrabi et al. in einer klinisch-experimentellen Studie nachweisen, dass eine Prostaglandin E1 Behandlung eine Steigerung der Angiogenese im Myokard von Patienten mit ischämischer Herzkrankheit induziert. In einem weiteren Versuch zeigte sich bei explantierten Patientenherzen, die mit Prostaglandin E1 vorbehandelt wurden, eine verstärkte Stimulation der Angiogenese (Mehrabi 2001, 2002). Es konnte auch gezeigt werden, dass die Behandlung mit PGE1 NO-vermittelt zu einer Steigerung

der Angiogenese führt (Ziche 1994). Den genauen quantitativen Beitrag, den endotheliale Progenitorzellen neben anderen PGE1-vermittelten positiven Effekten leisten, gilt es allerdings noch in zukünftigen Studien genauer zu untersuchen.

Die endotheliale NO-Synthase stellt einen wichtigen Regulator der EPC Freisetzung dar (Aicher 2003). Bezüglich der endothelialen NO-Synthase (eNOS) konnte gezeigt werden, dass sie bei Behandlung mit PGE1 ansteigt (Haider 2005; Weiss 2004; Ziche 1994). Tatsächlich ist die PGE1 induzierte Hochregulation der EPC NO-abhängig, denn die gleichzeitige Behandlung mit dem NOS Inhibitor L-NAME hob die positiven Effekte der PGE1 Behandlung auf die EPC Zahl und Funktion komplett auf. Dementsprechend hatte die Behandlung von eNOS -/- Mäusen mit PGE1 keine Effekte auf die EPC-Anzahl oder Funktion.

Interessanterweise zeigte sich, dass EPC aus mit PGE1 behandelten Mäusen durch eine reduzierte Rate des apoptotischen Zelltodes gekennzeichnet sind. Diese Beobachtung war nicht beschränkt auf murine EPC, sondern bestätigte sich auch bei kultivierten humanen EPC, die mit PGE1 behandelt wurden. Die Reduktion des apoptotischen Zelltodes war hierbei NO abhängig. Die Inhibition der anti-apoptotischen Effekte sowohl durch Wortmannin als auch durch LY294002 sowie die gesteigerte Expression von p-Akt zeigte, dass der Effekt durch die PI3-Kinase vermittelt ist. Die Inhibition der Progenitorzell-Apoptose stellt einen neuen Wirkmechanismus von PGE1 dar, bei dem weiterführende Studien vielleicht den molekularen Mechanismus, der diesen Effekt hervorruft, noch detaillierter aufzeigen könnten.

Um die Frage zu klären, wie spezifisch unsere Ergebnisse für PGE1 sind, wiederholten wir die Experimente mit dem Prostaglandin I2 Derivat Iloprost, welches ebenfalls bei der Behandlung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit eingesetzt wird (Hirsch 2006; Creutzig 2004; Grant 1992). Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Prostaglandin E1 veränderte die Behandlung mit dem Prostaglandin I2 Derivat weder die EPC Zahl noch deren Funktion.

Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass körperliche Aktivität die Anzahl der EPC steigert sowie deren Funktion verbessert. Diese Effekte sind über die NO-Synthase vermittelt (Laufs 2004; Laufs 2005; Adams 2004; Bonsignore 2002). Während der Behandlung von Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit stellt die körperliche Bewegung die Basis der Therapie dar, wobei Prostaglandine gewöhnlich in Kombination mit der Bewegungstherapie eingesetzt werden (Hirsch 2006; Amendt 2005). Aus diesem Grunde testeten wir, ob die beobachteten

Effekte auch in Kombination mit körperlichem Training nachzuweisen sind. Unsere Studie zeigte, dass PGE1 in Mäusen auch in Kombination mit körperlichem Training die Anzahl und Funktion der endothelialen Progenitorzellen steigert bzw. verbessert. Auf der Basis der Daten dieser präklinischen Studie scheint es in der Zukunft sinnvoll, die Wirkungen von PGE1 auf endothelialen Progenitorzellen in Patienten zu überprüfen. Klinische Erfahrungen und klinische Studien zeigen, dass einige Patienten mit Extremitätenischämie von einer intravenösen PGE1-Therapie profitieren können, während andere Patienten keinen Vorteil von der Therapie mit PGE1 hatten. Daher zeigen nicht alle durchgeführten Studien einen signifikanten Effekt (Hirsch 2006; Creutzig 2004; Amendt 2005). Die Erfolglosigkeit einer pharmakologischen Therapie stellt ein ernstes Problem der Behandlung von Patienten mit kritischer Extremitätendurchblutung dar. Es könnte interessant und wichtig sein zu überprüfen, ob sich EPC als potentielle Marker eignen, anhand derer man eine Auswahl der Patienten treffen könnte, die von einer Behandlung mit PGE1 profitieren, und anhand derer man die Intensität und Dauer der Behandlung von Patienten mit pAVK durch PGE1 steuern könnte.

5.3 Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass endotheliale Progenitorzellen eine neue Dimension der vaskulären Biologie darstellen. Eine Vielzahl neuerer Erkenntnisse lassen vermuten, dass diese aus dem Knochenmark kommenden Stammzellen einen erheblichen Einfluss auf die vaskuläre und kardiale Funktionsfähigkeit haben. Bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren ist die Funktionsweise der EPC beeinträchtigt. Die Suche nach Mediatoren, Triggerfaktoren und Medikamenten, die in der Lage sind, die Anzahl und Funktionsfähigkeit der endothelialen Progenitorzellen zu steigern, ist momentan ein Bereich, der intensiven Forschungen unterliegt. Auf der Grundlage unserer präklinischen Daten schlagen wir vor, in klinischen Studien zu prüfen, ob die Verbesserung der EPC-Funktion durch Behandlung mit Pioglitazon oder PGE1 einen relevanten Mechanismus darstellt, um bestimmten Patienten mit kardiovaskulären Krankheiten pharmakotherapeutisch zu helfen.

6. Literaturverzeichnis

- 1) Abtahian F, Guerriero A, Sebзда E et al. Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk. *Science*. 2003;299:247-251.
- 2) Adams V, Lenk K, Linke A et al. Increase of Circulating Endothelial Progenitor Cells in Patients With Coronary Artery Disease After Exercise-Induced Ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:684-690.
- 3) Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C et al. Essential role of endothelial nitric oxid synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med*. 2003;9:1370-1376.
- 4) Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension*. 2005;45:321-325.
- 5) Amendt K. PGE1 and other prostaglandins in the treatment of intermittent claudication: a meta-analysis. *Angiology*. 2005;56:409-415.
- 6) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-967.
- 7) Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999;85:221-228.
- 8) Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*. 1999;18:3964-3972.
- 9) Bonsignore MR, Morici G, Santoro A, Pagano M, Cascio L, Bonanno A, Abate P, Mirabella F, Profita M, Insalaco G, Gioia M, Vignola AM, Majolino I, Testa U, Hogg JC. Circulating hematopoietic progenitor cells in runners. *J Appl Physiol*. 2002;93:1691-1697.
- 10) Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000;6:389-395.
- 11) Creutzig A, Lehmacher W, Elze M. Meta-analysis of randomised controlled prostaglandin E1 studies in peripheral arterial occlusive disease stages III and IV. *Vasa*. 2004;33:137-144.
- 12) Crosby JR, Kaminski WE, Schatteman G, et al. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res*. 2000;87:728-730.
- 13) Diehm C, Darius H, Pittrow D et al. Metabolic syndrome and peripheral arterial occlusive disease as indicators for increased cardiovascular risk. *Dtsch. Med. Wochenschrift* 2007 Jan 5;132(1-2):15-20.
- 14) Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rutten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest*. 2001;108:391-397.
- 15) Fajardo LF, Kowalski J, Kwan HH et al. The disc angiogenesis system. *Lab Invest*. 1988;58:718-724.
- 16) Gill M, Dias S, Hattori K, et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res*. 2001;88:167-174.
- 17) Grant SM, Goa KL. Iloprost. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in peripheral vascular disease, myocardial ischaemia and extracorporeal circulation procedures. *Drugs*. 1992;43:889-924.
- 18) Haider DG, Bucek RA, Giurgea AG, Maurer G, Glogar H, Minar E, Wolzt M, Mehrabi MR, Baghestanian M. PGE1 analog alprostadiol induces VEGF and eNOS expression in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H2066-H2072.

- 19) Heeschen C, Weis M, Aicher A, Dimmeler S, Cooke JP. A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Clin Invest.* 2002;110:527-536.
- 20) Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood.* 2003;102:1340-1346.
- 21) Hetzel J, Balletshofer B, Rittig K et al. Rapid Effects of Rosiglitazone Treatment on Endothelial Function and Inflammatory Biomarkers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1804-1809.
- 22) Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003;348:593-600.
- 23) Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, Hiratzka LF, Murphy WR, Olin JW, Puschett JB, Rosenfield KA, Sacks D, Stanley JC, Taylor LM, Jr., White CJ, White J, White RA, Antman EM, Smith SC, Jr., Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Gibbons RJ, Hunt SA, Jacobs AK, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B. ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease. *Circulation.* 2006;113:e463-e654.
- 24) Horio T, Suzuki M, Takamisawa I et al. Pioglitazone-induced insulin sensitization improves vascular endothelial function in nondiabetic patients with essential hypertension. *Am J Hypertens.* 2005;18:1626-1630.
- 25) Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Nat Acad Sci U S A.* 2000;97:3422-3427.
- 26) Kannel WB, McGee DL, et al. Update on some epidemiological features of intermittent claudication: the Framingham study. *J Am Ger Society* 1985;33:13-18
- 27) Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation.* 2001;103:634-637.
- 28) Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med.* 2001;7:430-436.
- 29) Kojda G, Laursen JB, Ramasamy S, Kent JD, Kurz S, Burchfield J, Shesely EG, Harrison DG. Protein expression, vascular reactivity and soluble guanylate cyclase activity in mice lacking the endothelial cell nitric oxide synthase: contributions of NOS isoforms to blood pressure and heart rate control. *Cardiovasc Res.* 1999;42:206-213.
- 30) Kuss M, Heidrich H, Koettgen E. Hemostatic and fibrinolytic effects of systemic prostaglandin E1 therapy in patients with peripheral arterial disease. *Vasa.* 2003;32:145-148.
- 31) Laufs U, Wassmann S, Czech T, Münzel T, Eisenhauer M, Böhm M, Nickenig G. Physical Inactivity Increases Oxidative Stress, Endothelial Dysfunction, and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:809-814.
- 32) Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, Miche E, Böhm M, Nickenig G. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation.* 2004;109:220-226.
- 33) Leng GC, Lee AJ, Fowkes FGR, et al. Incidence, natural history and cardiovascular events in symptomatic and asymptomatic peripheral vascular disease in the general population. *Int J Epidemiol* 1996;25:1172-81
- 34) Libby P Current Concepts of the Pathogenesis of the Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 2001 104:365-372 104:365-372
- 35) Lithell H Pathogenesis and prevalence of atherosclerosis in hypertensive patients. *Am J Hypertens.* 1994 7(7Pt2):6
- 36) Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone-marrow derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest.* 2001;108:399-405.

- 37) Luttun A, Carmeliet G, Carmeliet P. Vascular progenitors: from biology to treatment. *Trends Cardiovasc Med.* 2002;12:88-96.
- 38) Marchesi S, Pasqualini L, Lombardini R, Vaudo G, Lupattelli G, Pirro M, Schillaci G, Mannarino E. Prostaglandin E1 improves endothelial function in critical limb ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003;41:249-253.
- 39) Marx N, Wöhrle J, Nusser T et al. Pioglitazone reduces neointima volume after coronary stent implantation: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial in nondiabetic patients. *Circulation.* 2005;112:2792-2798.
- 40) Marx N, Duez H, Fruchart JC et al. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. *Circ Res.* 2004;94:1168-1178.
- 41) Marx N. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and atherosclerosis. *Curr Hypertens Rep.* 2002;4:71-77.
- 42) Mehrabi MR, Serbecic N, Tamaddon F, Kaun C, Huber K, Pacher R, Wild T, Mall G, Wojta J, Glogar HD. Clinical and experimental evidence of prostaglandin E1-induced angiogenesis in the myocardium of patients with ischemic heart disease. *Cardiovasc Res.* 2002;56:214-224.
- 43) Mehrabi MR, Ekmekcioglu C, Stanek B, Thalhammer T, Tamaddon F, Pacher R, Steiner GE, Wild T, Grimm M, Spieckermann PG, Mall G, Glogar HD. Angiogenesis stimulation in explanted hearts from patients pre-treated with intravenous prostaglandin E(1). *J Heart Lung Transplant.* 2001;20:465-473.
- 44) Moldovan NI, Asahara T. Role of blood mononuclear cells in recanalization and vascularization of thrombi: past, present, and future. *Trends Cardiovasc Med.* 2003;13:265-269.
- 45) Murata T, He S, Hangai M et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:2309-2317.
- 46) Needleman P, Kulkarni PS, Raz A. Coronary tone modulation: formation and actions of prostaglandins, endoperoxides, and thromboxanes. *Science.* 1977;195:409-412.
- 47) Panigrahy D, Singer S, Shen LQ et al. PPARgamma ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. *J Clin Invest.* 2002;110:923-932.
- 48) Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000;95:952-958.
- 49) Pereira MP, Hurtado O, Cardenas A et al. Rosiglitazone and 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) cause potent neuroprotection after experimental stroke through noncompletely overlapping mechanisms. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005;26:218-229.
- 50) Pflutzner A, Marx N, Lubben G et al. Improvement of cardiovascular risk markers by pioglitazone is independent from glycemic control: results from the pioneer study. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:1925-1931.
- 51) Pistrosch F, Herbrig K, Oelschlaegel U et al. PPARgamma-agonist rosiglitazone increases number and migratory activity of cultured endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis.* 2005;183:163-167.
- 52) Pistrosch F, Passauer J, Fischer S et al. In type 2 diabetes, rosiglitazone therapy for insulin resistance ameliorates endothelial dysfunction independent of glucose control. *Diabetes Care.* 2004;27:484-490.
- 53) Plutzky J. Medicine. PPARs as therapeutic targets: reverse cardiology? *Science.* 2003;302:406-407.
- 54) Powell TM, Paul JD, Hill JM, et al. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:296-301.
- 55) Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med.* 2003;9:702-712.

- 56) Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386:671-674.
- 57) Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Ann Rev Cell Dev Biol*. 1995;11:73-91.
- 58) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med*. 1986;314:488-500.
- 59) Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126.
- 60) Schror K, Hohlfeld T. Mechanisms of anti-ischemic action of prostaglandin E1 in peripheral arterial occlusive disease. *Vasa*. 2004;33:119-124.
- 61) Shi Q, Rafii S, Wu MH-D, et al. Evidence for circulating bone marrow derived endothelial cells. *Blood*. 1998;92:362-367.
- 62) Shintani S, Murohara T, Ikeda H et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001;103:2776-2779.
- 63) Shiomi T, Tsutsui H, Hayashidani S et al. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation*. 2002;106:3126-3132.
- 64) Sinha AK, Colman RW. Prostaglandin E1 inhibits platelet aggregation by a pathway independent of adenosine 3',5'-monophosphate. *Science*. 1978;200:202-203.
- 65) Spyridopoulos I, Haendeler J, Urbich C et al. Statins enhance migratory capacity by upregulation of the telomere repeat-binding factor TRF2 in endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2004;110:3136-3142.
- 66) Steg PG, Bhatt DL, Wilson PW et al. One-year cardiovascular event rates in outpatients with atherothrombosis. *JAMA*. 2007 Mar 21;297(11):1253-5
- 67) Strehlow K, Werner N, Berweiler J et al. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation*. 2003;107:3059-3065.
- 68) Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 1999;5:434-438.
- 69) Urbich C, Knau A, Fichtlscherer S et al. FOXO-dependent expression of the proapoptotic protein Bim: pivotal role for apoptosis signaling in endothelial progenitor cells. *FASEB J*. 2005;19:974-976.
- 70) Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004;20:95:343-353.
- 71) Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends Cardiovasc Med*. 2004;14:318-322.
- 72) Urbich C, Dernbach E, Zeiher AM et al. Double-edged role of statins in angiogenesis signaling. *Circ Res*. 2002;90:737-744.
- 73) Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*. 2001;89:E1-E7.
- 74) Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation*. 2001;103:2885-2890.
- 75) Vaughan DE, Plavin SR, Schafer AI, Loscalzo J. PGE1 accelerates thrombolysis by tissue plasminogen activator. *Blood*. 1989;73:1213-1217.
- 76) Verma S, Kuliszewski MA, Li SH et al. 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;109:2058-2067.

- 77) Wang CH, Ciliberti N, Li SH et al. Rosiglitazone facilitates angiogenic progenitor cell differentiation toward endothelial lineage: a new paradigm in glitazone pleiotropy. *Circulation*. 2004;109:1392-1400.
- 78) Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2002;105:3017-3024.
- 79) Weiss TW, Mehrabi MR, Kaun C, Zorn G, Kastl SP, Speidl WS, Pfaffenberger S, Rega G, Glogar HD, Maurer G, Pacher R, Huber K, Wojta J. Prostaglandin E1 induces vascular endothelial growth factor-1 in human adult cardiac myocytes but not in human adult cardiac fibroblasts via a cAMP-dependent mechanism. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;36:539-546.
- 80) Weiss C, Regele S, Velich T, Bartsch P, Weiss T. Hemostasis and fibrinolysis in patients with intermittent claudication: effects of prostaglandin E1. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2000;63:271-277.
- 81) Werner C, Kamani CH, Gensch C, Böhm M, Laufs U (2007) The PPAR-gamma-Agonist Pioglitazone increases number and function of endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease and normal glucose tolerance. *Diabetes*. 2007;56(10):2609-15
- 82) Werner N, Wassmann S, Ahlers P et al. Circulating CD31+/Annexin V+ Apoptotic Microparticles Correlate with Coronary Endothelial Function in Patients With Coronary Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; epub ahead of print.
- 83) 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.
- 84) Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Böhm M, Nickenig G. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res*. 2003;93:e17-e24.
- 85) Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Böhm M, Dirnagl U, Nickenig G. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1567-1572.
- 86) Wilson PW Metabolic risk factors for coronary heart disease: current and future prospects. *Curr Opin Cardiol* 1999 14(2):176-185
- 87) Wollert KC, Meyer GP, Lotz J et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*. 2004;364:141-148.
- 88) Xin X, Yang S, Kowalski J et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 1999;274:9116-9121.
- 89) Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circ Res*. 2002;90:284-288.
- 90) Ziche M, Morbidelli L, Parenti A, Ledda F. Nitric oxide modulates angiogenesis elicited by prostaglandin E1 in rabbit cornea. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*. 1995;23:495-7.:495-497.
- 91) 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;94:2036-2044.

7. Dank

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD. Dr. med. Ulrich Laufs für die freundliche Überlassung des Themas und die großzügigen Möglichkeiten der wissenschaftlichen Betätigung in seiner Arbeitsgruppe. Weiterhin möchte ich mich für seine hervorragende Unterstützung in allen Abschnitten der Arbeit, seine ständige Bereitschaft mir mit seinen hilfreichen Ideen und Kommentaren beratend zur Seite zu stehen, sowie für seine Freundschaft bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Michael Böhm für die Möglichkeit, die Dissertation im Labor der Klinik III für Innere Medizin der Universität des Saarlandes erstellen zu können.

Ein Dank auch an die medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Simone Jäger und Frau Ellen Becker für die Einarbeitung in die Methodik und ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Weiterhin gilt mein Dank allen Doktoranden, Ärzten und wissenschaftlichen Mitarbeitern des Labors für die schöne Zeit, die ich mit ihnen verbringen durfte, und für ihre ständige Hilfsbereitschaft.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Gensch
Vorname: Christoph
Anschrift: Landstuhlerstr. 12
66482 Zweibrücken
Tel.: 06332-867646
Geburtsdatum: 03.11.1978
Geburtsort: Zweibrücken
Familienstand: ledig
Konfession: evangelisch
Eltern: Dr. med. Ulrich Gensch, niedergelassener Internist
Margarethe Gensch, selbstständige Apothekerin

Schulbildung

1986-1990 Hilgardschule Zweibrücken
1990-1999 Helmholtz-Gymnasium Zweibrücken
1999 Abitur am Helmholtz-Gymnasium Zweibrücken

Zivildienst

1999-2000 Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz, im Rahmen des Zivildienstes Ausbildung zum Rettungssanitäter abgeschlossen.

Studium

Oktober 2000 Beginn des Studiums der Humanmedizin

März 2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Dezember 2004 bis Oktober 2006 experimentelle Doktorarbeit bei Herrn Priv. Doz. Dr. med. Ulrich Laufs in der Medizinischen Klinik III der Universität des Saarlandes

Oktober 2007 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Sonstige Aktivitäten

Ehrenamtliche Aktivitäten:

1997-2001 Leiter der Arbeitsgemeinschaft Fußball im Helmholtz-Gymnasium

1999-2002 Vorsitzender der Jungen Union in Zweibrücken

seit 2000 ehrenamtliche Einsätze als Rettungssanitäter im Rettungsdienst des Deutschen Roten Kreuzes.

Sportliche Erfolge (Fußball):

2004/05 Meister der Oberliga-Südwest mit Borussia Neunkirchen

2006, 2007 Deutscher Meister der Medizinstudenten mit der Universitätsauswahl Homburg

2006 Vize-Meister Deutsche Hochschulmeisterschaften mit der Universitätsauswahl Saarbrücken

2003 3. Platz Deutsche Hochschulmeisterschaften mit der Universitätsauswahl Saarbrücken

2002/03 Vize-Meister Verbandsliga Saarland

2001/02 Vize-Meister Verbandsliga Rheinland-Pfalz

Publikationen

Originalarbeiten

Gensch C, Clever Y, Werner C, Hanhoun M, Böhm M, Laufs U. The PPAR-gamma-Agonist Pioglitazone increases Neoangiogenesis and Prevents Apoptosis of Endothelial Progenitor Cells. *Atherosclerosis*. 2007;192(1):67-74.

Gensch C, Clever Y, Werner C, Hanhoun M, Böhm M, Laufs U. Regulation of Endothelial Progenitor Cells by Prostaglandin E1 via Inhibition of Apoptosis. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42(3):670-7.

Werner C, Kamani C, Gensch C, Böhm M, Laufs U. The PPAR-gamma-Agonist Pioglitazone increases number and function of endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease and normal glucose tolerance. *Diabetes*. 2007;56(10):2609-15.

Übersichtsarbeiten

Gensch C, Laufs U. Prostaglandin E1 steigert die Anzahl und Funktion endothelialer Progenitorzellen. *Vasomed*. 2007;4:180.

Abstracts

Gensch Ch, Böhm M, Laufs U. The PPAR-Agonist Pioglitazone Increases Neoangiogenesis and Upregulates Endothelial Progenitor Cells. *Circulation*. 2005; 112(II): 711.

Gensch C, Clever Y, Werner C, Böhm M, Laufs U. Der PPAR-Agonist Pioglitazon steigert Neoangiogenese und endotheliale Progenitorzellen. *72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie*. 2006;P1304.

Gensch C, Clever YP, Hanhoun M, Böhm M, Laufs U. Regulation endothelialer Progenitorzellen durch Prostaglandin E1. *VASA 35: Suppl*. 2006;69:S1.2.

Clever YP, Gensch C, Werner C, Hanhoun M, Böhm M, Laufs U. The PPAR-Agonist Pioglitazone Prevents Apoptosis of Endothelial Progenitor Cells. *European Society of Cardiology Congress*. 2006;Abstract 845.

Gensch C, Clever Y, Werner C, Böhm M, Laufs U. Der PPAR-gamma-Agonist Pioglitazon steigert die Neoangiogenese und verhindert die Apoptose endothelialer Progenitorzellen. *51. Jahreskongress der Saarländisch-Pfälzischen Internistengesellschaft e.V.* 2007;P1.

Gensch C, Clever Y, Werner C, Hanhoun M, Böhm M, Laufs U. Regulation of Endothelial Progenitor Cells by Prostaglandin E1 via Inhibition of Apoptosis. *73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie*. 2007;P1183.

Werner C, Kamani C, Gensch C, Böhm M, Laufs U. The PPAR-gamma-Agonist Pioglitazone increases number and function of endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease and normal glucose tolerance. *Scientific Sessions, American Heart Association*. 2007;Abstract 2046.