

**Wirkung der Mangan-Superoxiddismutase (Mn-SOD) in humanen
endothelialen Progenitorzellen auf Sauerstoffradikalbildung, Apoptose
und Migrationsfähigkeit**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Ludwig Mugrauer
aus Magdeburg
2015

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Privatdozent Dr. med. Cornelius Müller
2. Gutachter: Professor Dr. med. Armin Welz

Tag der Mündlichen Prüfung: 13.2.2015

Aus der Medizinische Klinik und Poliklinik II
Innere Medizin - Kardiologie, Angiologie, Pneumologie
Direktor: Prof. Dr. med. Georg Nickenig

***Meiner Familie, meiner Oma
und Natalie***

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	7
2	Einleitung.....	10
2.1	Epidemiologie von Herz-Kreislaufkrankungen	10
2.2	Ätiologie und Pathogenese der Atherosklerose	12
2.3	Reaktive Sauerstoffspezies und antioxidative Systeme	22
2.4	Zellbiologie endothelialer Progenitorzellen	30
2.5	Endotheliale Progenitorzellen und oxidativer Stress	35
2.6	Endotheliale Progenitorzellen und Atherosklerose.....	36
2.7	Zielsetzung	39
3	Material und Methoden.....	40
3.1	Versuchsprotokoll	40
3.2	Zellisolierung	41
3.3	Zellkultur	42
3.4	Transfektion und RNA-Interferenz.....	43
3.5	Dichlorfluoresceinmessung	46
3.6	Apoptosemessung.....	46
3.7	Bestimmung der Migrationsfähigkeit	49
3.8	Western Blot.....	50
3.9	Datenverarbeitung und Statistik	52
4	Ergebnisse.....	53
4.1	Regulation der Mn-SOD-Expression in EPC durch RNA-Interferenz.....	53
4.2	ROS-Generierung in Mn-SOD-defizienten EPC.....	56
4.3	Apoptose in Mn-SOD-defizienten EPC	57
4.4	Migrationsfähigkeit von Mn-SOD-defizienten EPC	59
5	Diskussion.....	63

5.1	Methodendiskussion.....	63
5.1.1	Kritische Betrachtung der EPC-Identifikation.....	63
5.1.2	Diskussion der Mn-SOD-Regulation durch RNA-Interferenz.....	65
5.2	Ergebnisdiskussion.....	68
5.2.1	Diskussion der ROS-Generierung in Mn-SOD-defizienten EPC.....	68
5.2.2	Diskussion der Apoptose in Mn-SOD-defizienten EPC.....	69
5.2.3	Diskussion der Migrationsfähigkeit von Mn-SOD-defizienten EPC.....	71
5.3	Conclusio: Schlussfolgerung und klinische Bedeutung.....	72
6	Zusammenfassung.....	74
7	Literaturverzeichnis.....	76
8	Danksagung.....	108

1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb	Abbildung
ACE	Angiotensin-converting enzyme
AP-1	Activator protein 1
ApoE ^{-/-}	Homozygotes Fehlen von Apolipoprotein E
AT2	Angiotensin 2
BP	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumine
C	Cytosin
CDX	Cluster of differentiation X
CRP	C-reaktives Protein
CXCR-4	Chemokine (CXC-motif) receptor 4
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
DCF	Dichlorfluorescein
DiLDL	Diacetyliertes low-density lipoprotein
DsRNA	Doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
EBM-2	Endothelial basal medium 2
ECL	Enhanced chemiluminescence
ED	Endotheliale Dysfunktion
EGF	Epidermal growth factor
EGM-2 MV	Microvascular endothelial cell growth medium 2
EZM	Extrazellulärmatrix
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPC	Endotheliale Progenitorzellen
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAK	Focal adhesion kinase
FGF	Fibroblast growth factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOXO	Forkhead-box-protein OX

FVL	Faktor V-Leiden-Mutation
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HDL	High-density lipoprotein
HIF-1	Hypoxia-inducible factor 1
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HSP-60	Heat shock protein 60
H2-DCF-DA	Dichlordihydrofluoresceindiacetat
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL-X	Interleukin X
KDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
M	Molar
MA	Milliampere
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MHC-2	Mayor histocompatibility complex 2
MNC	Mononuclear cells
Mn-SOD	Mangan-Superoxiddismutase
Mn-SOD-siRNA	Mn-SOD-spezifisch transfizierte endotheliale Progenitorzellen
MRNA	Messenger ribonucleinacid
MRP-1	Multidrug resistance protein 1
N	Versuchsanzahl
NF-κB	Nuclear factor-kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	Stickstoffmonoxid
N.s.	Nicht signifikant ($p > 0,1$)
Ns-siRNA	Nicht-spezifisch transfizierte endotheliale Progenitorzellen
OxLDL	Oxidized low-density lipoprotein
P	P-Wert des Signifikanzniveaus
PDGF	Plateled-derived growth factor
PBS	Phosphate buffered saline

PF-4	Platelet factor 4
PIGF	Placental growth factor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonucleinacid
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	Reactive oxygen species
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SDS	Sodium dodecyl sulfat
SEM	Standard error of the mean
SiRNA	Small interfering RNA
Sp-1	Specificity protein 1
SsRNA	Einzelsträngige RNA
SOD	Superoxiddismutase
T	Thymin
TBS	Tris-buffered saline
TGF- β	Transforming growth factor β
TNF	Tumor necrosis factor
U	Uracil
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR-2	Vascular endothelial growth factor receptor 2
VLA-4	Very late antigen 4
VSMC	Vascular smooth muscle cells
UEA-1	Ulex europaeus agglutinin 1

2 Einleitung

2.1 Epidemiologie von Herz-Kreislaferkrankungen

Die Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen nehmen unter epidemiologischen Gesichtspunkten eine herausragende Stellung ein. In Deutschland und der westlichen Welt stellen Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems seit Jahren die häufigste Todesursache dar. Das Statistische Bundesamt konnte für 2009 bei 41,7 % aller Verstorbenen eine solche Erkrankung als ursächlich erfassen. Besonders bei älteren Menschen waren Erkrankungen des kardiovaskulären Systems Todesursache Nummer eins. Über 91% der hieran Verstorbenen waren älter als 65 Jahre. Insgesamt starben 2009 in Deutschland 356.462 Personen an einer Herz-Kreislauf-Erkrankung. Seit Jahren bilden die chronische ischämische Herzkrankheit, der akute Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz die drei häufigsten Todesursachen in der Bundesrepublik (Statistisches Bundesamt, 2010).

Gleichzeitig verursachten diese mit 35,2 Milliarden Euro den größten Anteil (14,9 %) der Gesundheitskosten in Deutschland im Jahr 2006 aus (Statistisches Bundesamt, 2009). Ihnen kommt daher eine außerordentliche sozioökonomische Bedeutung zu.

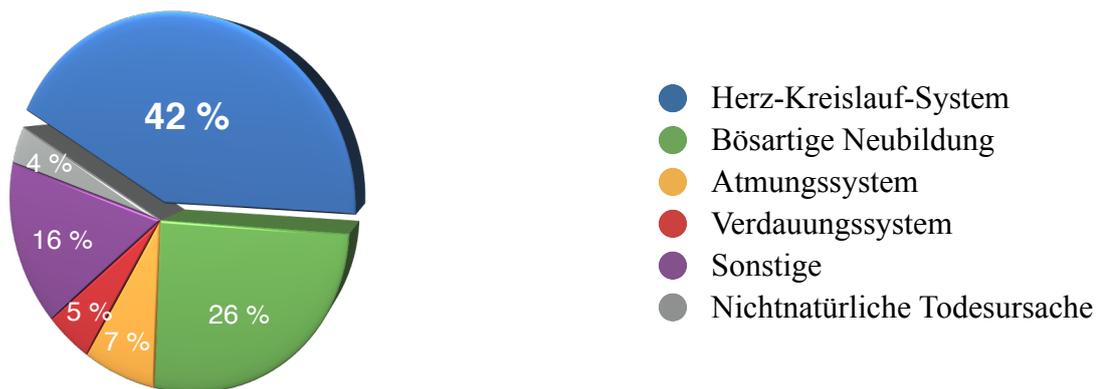


Abbildung 1: Todesursachen in Deutschland 2009 (Bundesamt für Statistik, 2010).

Diese Tendenz ist jedoch nicht auf westliche Industrienationen beschränkt. Kardiovaskuläre Erkrankungen repräsentieren, trotz der großen Infektionskrankheiten wie HIV-Infektion und Tuberkulose, auch weltweit die häufigste Todesursache. Die

Haupttrisikofaktoren kardiovaskulärer Erkrankungen haben gleichlaufend pandemische Ausmaße angenommen. In Deutschland ist jeder zweite Bürger übergewichtig oder adipös (Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, 2008). Die globale Prävalenz von Übergewicht und Adipositas veranschaulicht nachfolgende Karte.

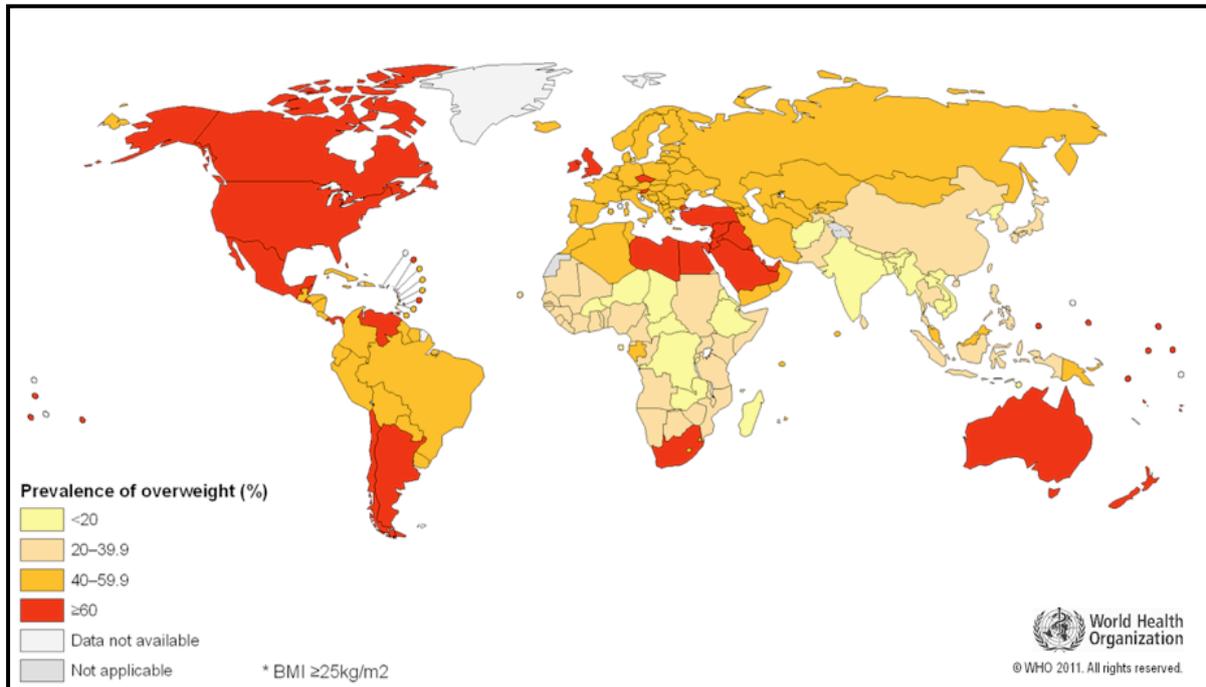


Abbildung 2: Prävalenz von Übergewicht und Adipositas für beide Geschlechter. Besonders hohe Werte finden sich in Ländern mit „westlichem Lebensstil“. Dazu gehören Nord- und Südamerika., Nord- und Mitteleuropa, Australien, Südafrika und der nahe Osten (WHO, 2011b).

Die Prävalenzverteilung unzureichender körperlicher Aktivität erweist sich als annähernd identisch und verweist auf vernetzte Kausalzusammenhänge kardiovaskulärer Risikofaktoren (WHO, 2011a).

Die Global-burden-of-disease-Studie der WHO führt 32 % (Frauen) bzw. 27 % (Männer) aller Todesfälle auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurück (WHO, 2008). In diesem Bericht wird ein Index eingeführt, welcher angibt, wie viele gesunde Lebensjahre durch eine Erkrankung genommen werden (DALY, „Disability-adjusted-life-years“). Die chronische ischämische Herzkrankheit und zerebrovaskuläre Erkrankungen nahmen im Jahr der Untersuchung den vierten bzw. sechsten Platz der DALY-Rangliste ein. Für

2030 wird eine Verschiebung für beide Krankheiten auf die Ränge zwei und vier prognostiziert.

Zusammengefasst stellen Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems mitsamt dessen Hauptrisikofaktoren das größte medizinische Problem weltweit dar. Die Auswirkungen auf das globale Finanzsystem sind derzeit immens und werden sich bei gleichbleibender Entwicklung noch verschärfen. Auf dem Weltwirtschaftsforum 2010 wurde verkündet, dass in naher Zukunft die größte Belastung der Volkswirtschaft nicht der Endlichkeit fossiler Brennstoffe, nicht von Finanzkrisen, Klimaschäden oder Kriegen entspringt, sondern aus direkten und indirekten Kosten durch Wohlstandserkrankungen wie KHK, Adipositas und Diabetes mellitus (World economic forum, 2010).

2.2 Ätiologie und Pathogenese der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist die bedeutsamste und häufigste Veränderung des arteriellen Gefäßsystems, die definitionsgemäß mit Verhärtung, Verdickung, Elastizitätsverlust und Lumeneinengung einhergeht (Pschyrembel, 2007; Übersichtsarbeiten: Hansson, 2005; Libby, 2002; Lüscher, 2000; Ross, 1999). Sie bevorzugt typische Regionen innerhalb der systemischen Zirkulation. In erster Linie sind die herznahen großen Arterien vom elastischen Typ (Aorta, Karotiden, Iliakalgefäße) sowie die mittelgroßen muskulären Arterien (Koronarien, Popliteatrifurkation) betroffen.

Atherosklerotische Prädilektionsstellen weisen eine Reihe hämodynamischer Besonderheiten auf. Sie finden sich an Aufzweigungen sowie konvexen Gefäßwandsegmenten. Kennzeichnend sind niedrige bzw. turbulente Strömungskräfte mit multidirektionaler Wandschubspannung (Gimbrone et al., 2000; McMillan, 1985). Diese verkörpert eine biologisch bedeutsame Größe für die Endothelfunktion. Durch scherkraftsensible Promotorregionen können hämodynamische Kräfte Einfluss auf die endotheliale Expression leukozytärer Adhäsionsproteine und proinflammatorischer Gene nehmen (Dai et al., 2004; Nagel et al., 1994). Demgegenüber zeigen Studien, dass ein nichtturbulentes, laminäres Blutflussprofil ein potenter antiapoptotischer Stimulus für Endothelzellen ist, welcher zur Induktion eines atheroprotektiven Gensatzes führen kann (Boon und Horrevoets, 2009; Pan, 2009). Auf molekularer Basis konnte detailliert

aufgeschlüsselt werden, wie die Übersetzung vasomechanischer Kräfte in biochemische Signale funktioniert (Ando und Yamamoto, 2009; Li et al., 2005). Dies verdeutlicht erstens, dass hämodynamische Faktoren die endotheliale Suszeptibilität für atherosklerotische Läsionen steuern und zweitens, dass vasoprotektive Effekte eines körperlichen Trainings an großen Leitungsarterien zumindest partikulär über die Zunahme unidirektionaler Wandschubspannung und der damit verbundenen Genexpression vermittelt werden (Schmidt-Trucksäss et al., 2008; Ziegler et al., 1998).

Das Verständnis der Atherosklerose wird durch deren ätiologische Heterogenität wie auch der pathogenetischen Komplexität erschwert und unterliegt einem dynamischem Wandlungsprozess. Über genetische Ursachen der Erkrankung ist wenig bekannt. Eine Erkrankung des Lipoproteinstoffwechsels sei als Beispiel hereditärer Prädisposition für atherosklerotische Gefäßschäden erwähnt. Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie weisen bei homozygoter Konstellation LDL-Cholesterinspiegel zwischen 500 - 1200 mg/dl auf und können bereits im Kindesalter eine KHK entwickeln (Herold und Oette, 2008). Die Faktor V-Leiden-Mutation (FVL) sei exemplarisch als Vertreter einer hereditären hämatologischen Erkrankung genannt, welche die große Rolle hämostatischer Parameter für Atherogenese und Atherothrombose betonen soll. Im Mausmodell konnten Eitzmann und Mitarbeiter (2005) konstatieren, dass FVL-Homozygotie zu verstärkter Atherosklerose führt. In genomweiten Assoziationsstudien konnten Risikovarianten für die Entstehung einer chronisch-ischämischen Herzkrankung identifiziert werden (Schunkert et al., 2010).

Das Wissen über Ätiologie und Pathogenese der Atherosklerose erfährt derzeit eine bemerkenswerte Evolution. Diese wurde maßgeblich durch große epidemiologische Untersuchungen wie der „Framingham Heart Study“ und der „Atherosclerosis Risk in Communities Study (ARIC)“ vorangetrieben. Darin haben sich Parameter herauskristallisiert, welche mit statistischer Signifikanz mit Atherosklerose und Folgeerkrankungen assoziiert sind. Anhand dieser prospektiven Studien haben sich arterielle Hypertonie, Alter, Bewegungsmangel, Diabetes mellitus, Dyslipoproteinämie, Rauchen, chronische Niereninsuffizienz und eine positive Familienanamnese als wichtigste kardiovaskuläre Risikofaktoren etabliert. Treten mehrere Entitäten gleichzeitig auf, verhält sich die Risikoerhöhung multiplikativ. Zwei Faktoren vergrößern das Risiko eines Myokardinfarkts etwa um das vierfache, drei um den Faktor acht (Keil, 2000; O'Donnell

und Kannel, 1998). Im klinischen Alltag kann das kardiovaskuläre Zehn-Jahres-Risiko mit Risikokalkulatoren errechnet werden (z.B. PROCAM, ESC-Risikokalkulator, Framingham-Risk-Score).

Diese enge statistische Verknüpfung konnte man lange nicht mit klaren wissenschaftlichen Aussagen über Kausalität und Pathomechanismus füllen. Geleitet von morphologischen Aspekten begriff man die Atherosklerose im letzten halben Jahrhundert als eine Cholesterinspeichererkrankung, die sich anatomisch auf die Lamina propria intima (subendotheliales Bindegewebe) projiziert. Arbeiten in den 1990er Jahren konnten belegen, dass die identifizierten Risikofaktoren, trotz ihres heterogenen Charakters, ein gemeinsames primäres Resultat erzielen: Endothelschädigung mit konsekutiver Funktionseinschränkung. Dies wird unter dem Begriff der endothelialen Dysfunktion (ED) zusammengefasst. Damit bildet die ED die früheste Gefäßschädigung der atherosklerotischen Krankheitskaskade und wird als obligatorische Stufe der Atherogenese angesehen (Ross, 1999).

Dieses Konzept ist inzwischen dahingehend erweitert worden, dass Atherosklerose als chronisch-inflammatorischer Prozess interpretiert wird, an dem sowohl humorale als auch zelluläre Komponenten des Immunsystems beteiligt sind (Fan und Watanabe, 2003; Libby et al., 2009; Stoll und Bendszus, 2006). Dieser nimmt einen endothelialen Ausgang, erstreckt sich aber auf das ganze Gefäßsystem und impliziert zudem metabolische Veränderungen. Die pathophysiologische Kaskade scheint also morphologisch im subendothelialen Kompartiment abzulaufen, tatsächlich ist sie endothelialen Ursprungs. Die ED manifestiert sich zunächst in einer Permeabilitätsstörung mit verminderter NO-Freisetzung (Davignon und Ganz, 2004; Abb. 3). Die reduzierte NO-Verfügbarkeit im Gefäßendothel stellt derzeit die früheste fassbare pathophysiologische Veränderung der ED dar und muss als zentrales pathogenetisches Ereignis begriffen werden. Aufgrund seiner Rolle als zentrales Signal- und Effektormolekül verliert das Endothel durch den NO-Mangel substantielle atheroprotektive Fähigkeiten (Pepine, 2009). Die endothelvermittelte Vasodilatation ist eingeschränkt (Ludmer et al., 1986) und es tritt eine Expressionsenthemmung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF κ B (Lazzerini et al., 2009) ein, welcher nachfolgende inflammatorische Elemente der Atherogenese stimuliert. Eine endotheliale Permeabilitätsstörung äußert sich in einer Infiltration und Oxidation von LDL-Partikeln

(oxLDL) im subendothelialen Raum. OxLDL kann als ein entscheidendes gefäßschädigendes Agens angesehen werden, dessen Akkumulation eine Schlüsselposition im Rahmen der atherosklerotischen Plaueformierung zukommt (Schwartz et al., 1991; Sary, 1994). Es provoziert die nächsten pathophysiologischen Schritte (Leitinger, 2003; Skálén et al., 2002). Durch Induktion von Apoptose in Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) vermag oxLDL zudem initiale Gefäßschäden zu

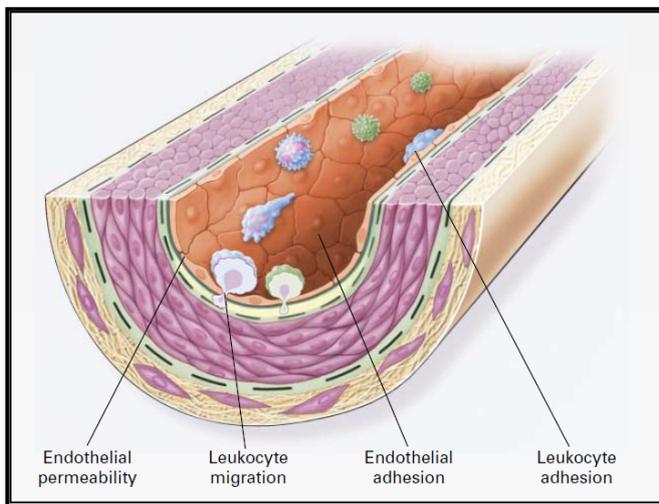


Abbildung 3: Schematischer Querschnitt einer Arterie. Die endotheliale Dysfunktion verkörpert die erste Stufe der Atherosklerose. Das Endothel erfährt eine Funktionsstörung. Die Adhäsion und Transmigration von Leukozyten ist gesteigert (aus Ross, 1999).

aggravieren (Adams et al., 2000). In einer frühen Phase der Atherogenese lassen sich mitochondriale DNA-Schäden sowie Dysfunktionen als ein wichtiges subzelluläres Korrelat nachweisen (Ballinger et al., 2002). Während gesundes Endothel inflammatorische Zellen nicht bindet, exprimiert es nun die Adhäsionsmoleküle VCAM-1, P- und E-Selektin (Cybulsky und Gimbrone, 1991), an die als erste zelluläre Vertreter Thrombozyten rezeptorvermittelt andocken (Gawaz et al., 2005; Massberg et al., 2002). Synergistisch wirken aktivierte

Thrombozyten und Endothelien, in-

dem durch die Expression weiterer Adhäsionsproteine und Sekretion von Chemokinen Leukozyten zum initialen Entzündungsprozess dirigiert werden (Langer und Gawaz, 2008; Weber, 2005). Retiniertes oxLDL stimuliert diesen Vorgang (Gerszten et al., 1999). Als frühes Ereignis der Atherogenese folgen eine Adhäsion wie auch Transmigration von T_H -Lympho- und Monozyten in das subendotheliale Kompartiment (Abb. 4). Dort startet ein bilateraler Kommunikationsprozess zwischen immigrierten Leukozyten einerseits und residenten Endothelien bzw. VSMC andererseits. Stimuliert durch die Zytokine MCP-1, M-CSF, PF-4 und TGF- β aus endothelialen und thrombozytären Quellen, proliferieren erstgenannte und differenzieren sich weiter zu Makrophagen. Im

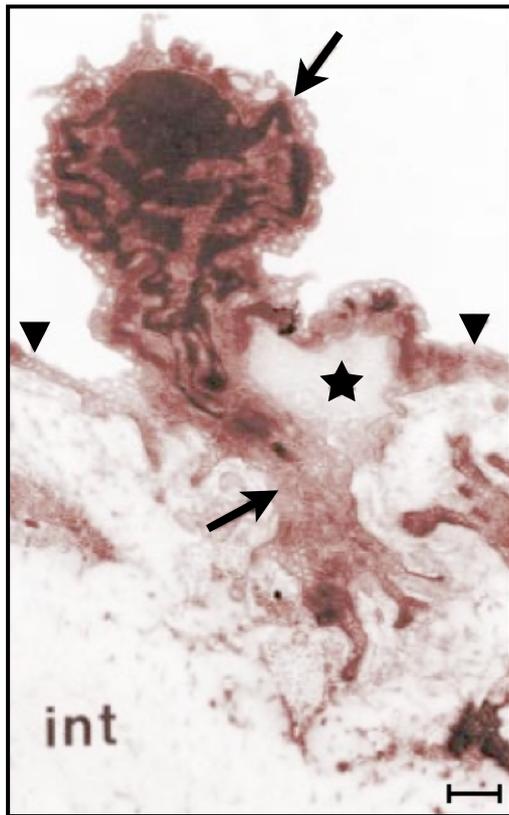


Abbildung 4: Transmigration eines Monozyten durch die Intima (int). Die Aufnahme zeigt einen Monozyten (großer Pfeil), der sich zwischen zwei Endothelzellen (Pfeilköpfe) hindurchbewegt, um eine Lipidablagerung im sub-endothelialen Raum (Stern) zu erreichen; Die Maßstabsleiste entspricht $0,5 \mu\text{m}$ (aus Lusus, 2000).

Unterschied zur physiologischen Abwehrreaktion findet jetzt eine Modifizierung monozytärer Oberflächenrezeptoren statt (Yan und Hansson, 2007). Die Makrophagen internalisieren oxLDL via Scavenger-Rezeptor (Miller et al., 2003; Peiser et al., 2002) und verwandeln sich in lipidspeichernde Schaumzellen („Lipophagen“). Ist die Kapazität der monozytären Cholesterinaufnahme überschritten, lagert sich das Cholesterin extrazellulär im subendothelialen Raum ab, was in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung als „Atheromlücke“, in der Sudanrotfärbung als „orangerote Fettablagerungen und doppelbrechende Cholesterinkristalle“ imponiert (Thomas, 2006).

Der beschriebene zelluläre Proliferations- und Differenzierungsprozess sowie die kontinuierliche Cholesterinretention führen zur zweiten Stufe der Atherosklerose, der sogenannten „Frühen Läsion“ (auch „Fettstreifen“ oder „Fatty streaks“; Abb. 5). Solche Läsionen lassen sich bereits in der Kindheit nachweisen (Berenson et al., 1998b; Tuzcu et al., 2001). In einem proatherogenem Milieu können frühe

Läsionen weiter reifen und im jungen Erwachsenenalter klinische Relevanz erreichen (Strong et al., 1999). Diese Betrachtungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass initiale atherosklerotische Läsionen bereits in der Kindheit erworben werden können und danach, abhängig von Ausmaß und Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren, ihr Reifungsprozess stattfindet (Berenson et al., 1998a). Vor dem Hintergrund einer hohen Prävalenz kardiovaskulärer Risikofaktoren bei Kindern (Després et al., 1990; Müller-Riemenschneider et al., 2010) muss die Primärprävention von Herz-Kreislauf-erkrankungen daher in der Kindheit bzw. im Jungendlichenalter beginnen.

Während dieser ersten Phase der Atheromentstehung wächst die Plaque vornehmlich extraluminal, was bedeutet, dass zunächst keine Lumeneinengung auftritt.

Erhöhte HDL-Cholesterinkonzentrationen wirken hier pleiotrop gefäßprotektiv. Sie können dazu beitragen, die Atherombildung zu hemmen, indem der reverse Cholesterintransport von Gefäßwand zur Leber mit anschließender biliärer Exkretion gefördert wird. Weiter sind vielfältige antiinflammatorische, antioxidative und antithrombotische Effekte beschrieben (Barter et al., 2004; Mineo et al., 2006). Dabei sind nicht nur Quantität, sondern auch Qualität der HDL-Moleküle wichtig (Chiesa und

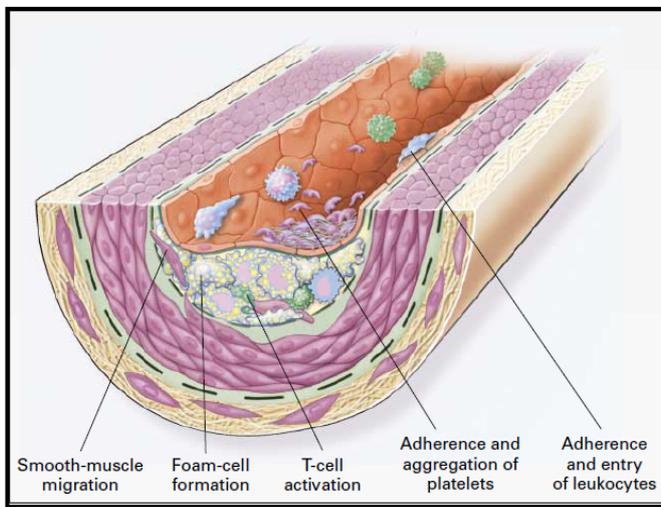


Abbildung 5: Frühe Läsion: Fettstreifen und immigrierte VSMC bilden Neointima. Leukozyten immigrieren (aus Ross, 1999).

Sirtori, 2003; Nissen et al., 2003). Die vaskulären Umbauprozesse verhalten sich bis zum Stadium der frühen Läsion klinisch stumm. Sie bilden allerdings das histopathologische Fundament fortgeschrittener Läsionen.

Die in Stadium 2 noch dezente zentripetale VSMC-Migration durch die Membrana elastica interna in die (Neo-) Intima intensiviert sich zunehmend (Raines und Ross, 1993). Stimuliert durch Wachstumsfaktoren der PDGF-Familie proliferieren diese

und (trans-) differenzieren sich zu Myofibroblasten, was von einer Synthese zusätzlicher Extrazellulärmatrix (EZM) begleitet wird. Regressive Veränderungen, Apoptose und Verkalkungen mit konsekutivem Elastizitätsverlust führen zur Bildung fortgeschrittener Plaques oder Atherome (Abb. 6). Eine hämodynamisch relevante Lumenstenosierung kann ab diesem Stadium eintreten. Der histopathologische Befund dieses Stadiums folgt einem „fibrodestruktivem Muster“ (Riede und Freudenberg, 2009), in welchem man regelmäßig eine fibrotische Mediadystrophie mitsamt perivaskulärem entzündlichem Infiltrat der Adventitia diagnostizieren kann. Die Veränderungen sind sowohl abhängig von Gefäßprovinz als auch von Gefäßdurchmesser und reichen von atheromatösen, fibrotischen und sklerosierenden Läsionen bis zur „Lipohyalinose“ (Thomas, 2006). Eine

schützende fibromuskuläre Deckplatte aus Myofibroblasten und EZM ummantelt den nekrotischen Lipidkern aus avitalen Schaumzellen und extrazellulärem oxLDL und trennt ihn so vom zirkulierenden Blut (Abb. 6; Libby, 2001). Interessanterweise scheinen besonders Lymphozyten vom T_{H1} -Subtyp atherosklerotische Plaques zu fördern, während eine T_{H2} -Antwort mit humoraler Immunaktivität als atheroprotektiv diskutiert wird (Binder et al., 2004).

Makrophagen, nun als antigenpräsentierende Zellen fungierend, exponieren Spaltprodukte von oxLDL respektive HSP-60 mittels MHC-2-Molekül. Durch Bindung an den T-Zellrezeptor wird die gegenseitige Aktivierung mit konsekutivem Proliferationsreiz zwischen T_H -Lymphozyten und Makrophagen initiiert und ein chronischer Entzündungs-

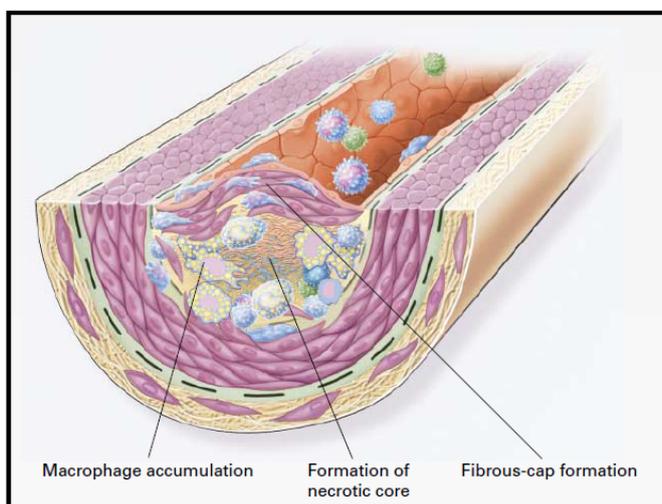


Abbildung 6: Fortgeschrittene Läsion (Atherom) mit fibrotischer Intimahyperplasie, nekrotischem Lipidkern und Bildung einer fibromuskulären Deckplatte (aus Ross, 1999).

prozess etabliert (Robertson und Hansson, 2005). Molekulare Botenstoffe sind dabei Interferon- γ , IL-1 und TNF. Dies lässt sich als weiteren Beleg einer klassisch zellulären Immunreaktion werten. Neben Leukozyten sind auch Endothelzellen in diesen Aktivierungsprozess eingebunden (Hansson, 2001). Koordiniert wird er durch eine Vielzahl biochemischer Moleküle. Dazu gehören inflammatorische Zytokine, Adhäsionsproteine, reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Proteasen, vasoaktive Substanzen und Koagulationsfaktoren (Hansson und Libby, 2006). Diese wirken in vielfältiger Weise proatherogen, unterminieren die Formierung einer stabilen Plaqueoberfläche bzw. sind in der Lage, die EZM-Komponenten zu degradieren und die fibromuskuläre Deckplatte gleichsam zu destabilisieren (Abb. 8 C; Galis et al., 1994). Die Elemente des plasmatischen Gerinnungssystems, Faktor XIII, Faktor XII, Faktor X, der Thromboplastin-Faktor-VII-Komplex, Thrombin, Fibrinogen, Kallikrein und Bradykinin können auf sämtliche Stadien der Atherogenese stimulierend wirken und den Phänotyp der

prozess etabliert (Robertson und Hansson, 2005). Molekulare Botenstoffe sind dabei Interferon- γ , IL-1 und TNF. Dies lässt sich als weiteren Beleg einer klassisch zellulären Immunreaktion werten. Neben Leukozyten sind auch Endothelzellen in diesen Aktivierungsprozess eingebunden (Hansson, 2001). Koordiniert wird er durch eine Vielzahl biochemischer Moleküle. Dazu gehören inflammatorische Zytokine, Adhäsionsproteine, reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Proteasen, vasoaktive Substanzen und Koagulationsfaktoren (Hansson und Libby, 2006). Diese wirken in vielfältiger Weise proatherogen, unterminieren die Formierung einer stabilen Plaqueoberfläche bzw. sind in der Lage, die EZM-Komponenten zu degradieren und die fibromuskuläre Deckplatte gleichsam zu destabilisieren (Abb. 8 C; Galis et al., 1994). Die Elemente des plasmatischen Gerinnungssystems, Faktor XIII, Faktor XII, Faktor X, der Thromboplastin-Faktor-VII-Komplex, Thrombin, Fibrinogen, Kallikrein und Bradykinin können auf sämtliche Stadien der Atherogenese stimulierend wirken und den Phänotyp der

atherosklerotischen Plaque maßgeblich beeinflussen (Borissoff et al., 2011). Die Rolle von Matrixmetalloproteinasen und Cysteinproteasen im Rahmen des EZM-Katabolismus ist ebenfalls gut verstanden (Jones et al., 2003; Liu et al., 2004).

Eine instabile Plaquematrix geht mit einer Veränderung der hämöstatischen Eigenschaften vom endothelialen und subendothelialen Verband einher. Unter physiologischen Bedingungen wird Thromboplastin exklusiv in subendothelialen Schichten, VSMC, Fibroblasten der Adventitia und in Perizyten synthetisiert, nicht aber in gesunden Endothelzellen (Mackmann, 2004). In fortgeschrittenen Läsionen findet man hingegen Thromboplastin auf Makrophagen und VSMC des Lipidkerns (Moreno et al., 1996). Die atherosklerotische Deckmatrix darf man sich also nicht als statisches Gebilde vorstellen. Vielmehr wird sie durch dynamische Umbauprozesse in Struktur und Stabilität regelmäßig moduliert. Neben den lokalen Mediatoren können atherogene Risikofaktoren die Reifung und das Schicksal komplizierter Läsionen beeinflussen (Burke et al., 1997). An dieser Stelle sei die Hypothese einer mikrobiell-induzierten Atherogenese erwähnt. Bislang existiert weder klinisch noch im Tiermodell eine Evidenz, dass Mikroorganismen atherosklerotische Plaques direkt verursachen (Libby et al., 1997; Ross, 1999). Aufgrund einer hohen Durchseuchungsrate ist die Unterscheidung zwischen Koinzidenz und Kausalität schwierig (Jackson et al., 1997; Mussa et al., 2006). Die Auswirkungen des atherosklerotischen Prozesses bleiben nicht auf die lokale Endothelschädigung begrenzt, sondern greifen auf die systemische Vaskulatur über. Vermittelt durch Schlüsselmoleküle findet eine bidirektionale Vernetzung mit systemisch-wirksamen Kommunikations- bzw. Reaktionswegen von Immunologie und Hämostase statt. So lassen sich im Blut atherosklerotischer Patienten Akute-Phase-Proteine hepatischen Ursprungs in erhöhten Konzentrationen nachweisen (Koenig und Khuseyinova, 2007). Von klinischem Interesse sind insbesondere Fibrinogen, IL-6 und CRP. Erhöhte Spiegel sind mit gesteigerter kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität vergesellschaftet (Lindahl et al., 2000; Liuzzo et al., 1994; Thompson et al., 1995). Der CRP-Wert ist daher in gängige Risikoberechnungen eingearbeitet worden (Ridker et al., 2007). Patienten mit normalem LDL-Cholesterinwerten jedoch erhöhtem CRP profitieren von einer Statintherapie, deren antiinflammatorische Wirkung durch eine CRP-Reduktion reflektiert wird. Die Inzidenz großer kardiovaskulärer Ereignisse konnte, unabhängig von einer Einflussnahme auf den Cholesterinmetabolismus, signifikant

reduziert werden (Ridker et al., 2008). Ein stabilisierender Effekt auf die Plaquematrix ist daran beteiligt (Levine et al., 1995). Zentraler Vermittler zwischen lokalem Atherom und systemisch-inflammatorischer Reaktion scheint Interleukin-6 zu sein (Hansson, 2005; Hansson und Libby, 2006). Umgekehrt kann ein chronischer gefäßferner Entzündungsprozess wie es beispielsweise für die Parodontitis dokumentiert ist, zu atherosklerotischen Läsionen beitragen (DeStefano et al., 1993). Mit zunehmender Größe engen die Plaques das Gefäßlumen halbmondförmig ein und können in Konsequenz eine hämodynamisch relevante Ischämie nachgeschalteter Gefäßareale hervorrufen. In der Koronarzirkulation geschieht dies typischerweise ab einer Stenose von circa 70 %. Das nächste pathomorphologische Stadium wird als „komplizierte Läsion“ bezeichnet

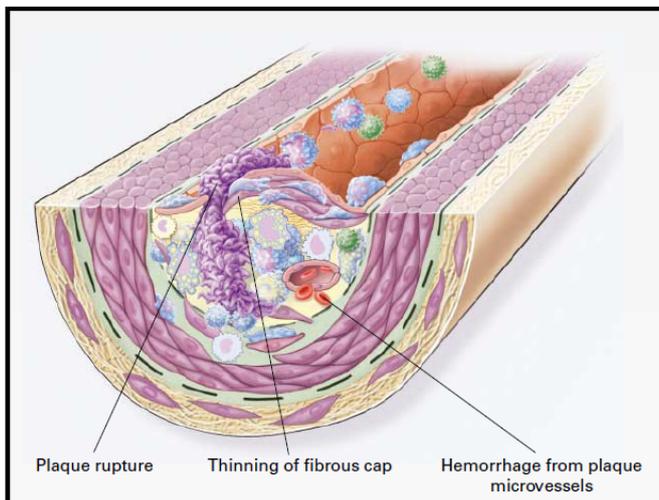


Abbildung 7: Stadium der „komplizierten Läsion“: Die Läsion ist durch einen kräftigen, leukozytenreichen Lipidkern charakterisiert, der hingegen durch eine zarte fibromuskuläre Deckplatte abgedeckt wird. Zusätzlich tritt eine pathologische Neovaskularisierung ein. Diese Situation ist hochgradig instabil und neigt zur Ruptur mit konsekutiver Atherothrombose (aus Ross, 1999).

(Abb. 7). Hier entstehen in Umgebung einer atroph-verschmälerten Media aberrante intraatheromatöse Netzwerke von Mikrogefäßen, welche erstens die Leukozyteninfiltration zusätzlich begünstigen und zweitens intraatheromatöse Hämorrhagien verursachen können (Sluimer und Daemen, 2009). Durch Endothelerosion oder Ruptur einer instabilen Atheromoberfläche (Abb. 8 A und B) kann es zu einer direkten Thrombusbildung mit akutem Gefäßverschluss (z.B. akutes Koronarsyndrom) bzw. zur Thromboembolie kommen (Hansson, 2005; Libby und Theroux, 2005). Verschärft wird diese Situation durch die Beobachtung, dass atherosklerotische Läsionen mit gleichem Maß ihrer Entzündungsaktivität bzw. Instabilität zur

Steigerung ihrer Thromboplastinaktivität neigen und dadurch ein hohes atherothrombotische Potential bergen (Ardissino et al., 1997; Toschi et al., 1997; van der Wal et al., 1994). Diese Einbindung rechtfertigt die Verwendung des Begriffs Athero-

thrombose und betont die enge Verzahnung der Entitäten Atherosklerose und Thrombose (Borissoff et al., 2011). Das Risiko eines akuten atherothrombotischen Ereignisses wird maßgeblich von qualitativen Aspekten der Plaquebiologie determiniert, nicht vom Stenosegrad der Läsion. Während komplizierte Läsionen mit strukturstarker fibromuskulärer Deckplatte und relativ kleinem Lipidkern („stabile Plaque“) oft eine deutliche Lumeneinengung mit klinischen Symptomen bewirken, tendieren solche, mit großer leukozytärer Präsenz und hoher Entzündungsaktivität bei gleichzeitiger Faserarmut, dünner Deckplatte und moderatem Stenosegrad (asymptomatische Stenose), zu Erosion und Ruptur („vulnerable Plaque“) (Libby, 2001 und 2006). Ergebnisse von

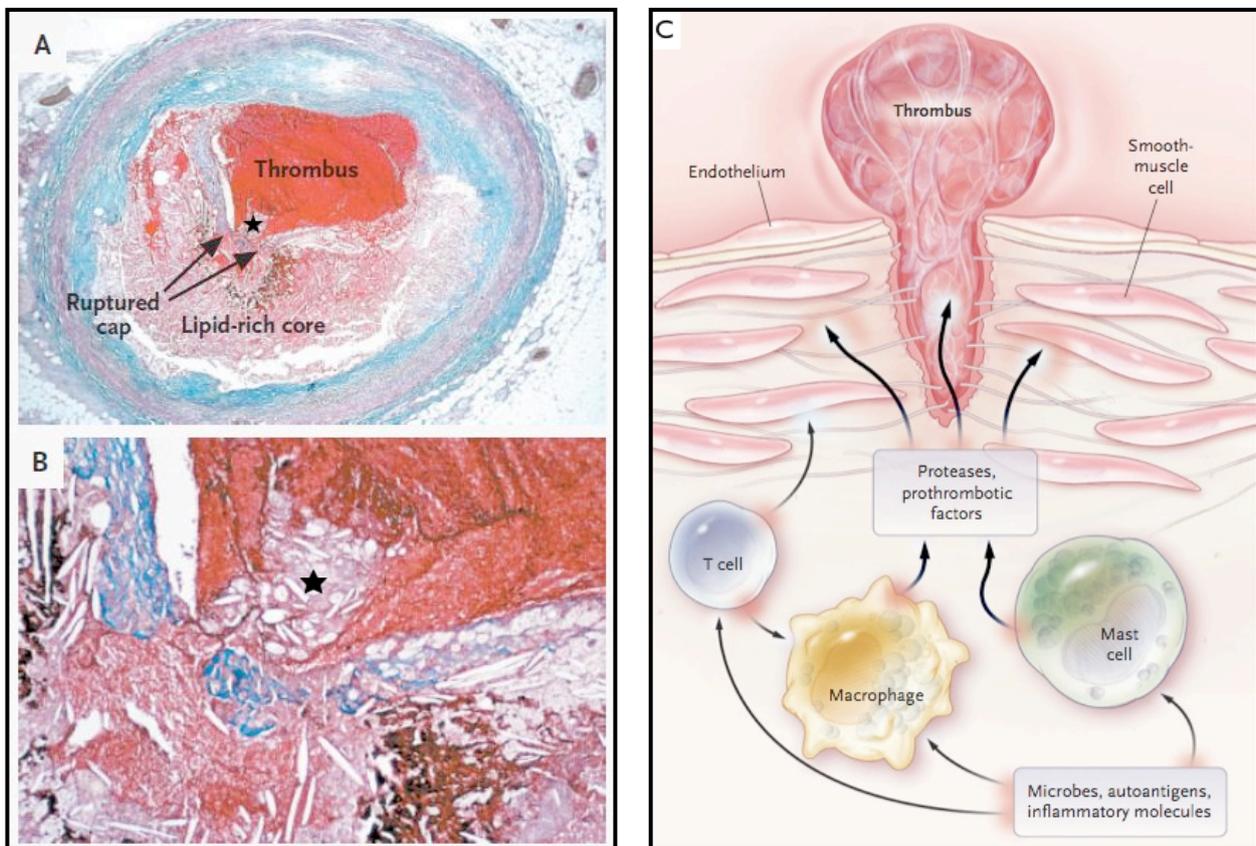


Abbildung 8: Querschnitt einer atherosklerotischen Läsion in humaner Koronararterie. Der Patient verstarb an fulminantem Myokardinfarkt. A: Die fibröse Kappe des Plaquekerns ist rupturiert (Pfeile) und thrombogenes Material gelangt in den Blutstrom. B: Vergrößerung von A. Der Ausschnitt demonstriert, wie atheromatöses Material des Kerns durch die rupturierte Deckplatte (Sternchen) das Gefäßlumen erreicht. Die Plaquerruptur induzierte hier wahrscheinlich die lokale Thrombosierung. C: Durch Sekretion von Proteasen tragen aktivierte Immunzellen zur Destabilisierung der kollagenen Plaquematrix bei. Zusätzlich werden prothrombotische Faktoren synthetisiert, die das thrombogene Potential der Läsion zusätzlich erhöhen (aus Hansson, 2005).

Sektionsstudien bei Patienten mit letaler Koronarokklusion erwiesen sich mit diesem pathogenetischem Konzept vereinbar (Burke et al., 1999; Davies, 1990). Konsequenz dieser Erkenntnis ist, dass eine große Zahl asymptomatischer Patienten ein reales und unvorhersehbares Risiko für ein fulminantes kardiovaskuläres Ereignis als Erstmanifestation einer atherosklerotischen Grunderkrankung tragen (Arnett et al., 1979).

2.3 Reaktive Sauerstoffspezies und antioxidative Systeme

Das erstmalige Auftreten einer sauerstoffhaltigen Atmosphäre wird vor etwa zweieinhalb Milliarden Jahren datiert (Bekker et al., 2004), ihre Persistenz begann vor 800 bis 542 Millionen Jahren (Frei et al., 2009). Sie stellte einen mächtigen evolutionsbiologischen Motor dar (Wray et al., 1996) und resultiert in der heutigen Biodiversität. Zum einen, um eine effiziente aerobe Energiegewinnung zu gewährleisten, zum anderen, um toxische Nebeneffekte des aeroben Metabolismus zu minimieren, haben aerob lebende Organismen seitdem eine Vielzahl biochemischer Adaptionen hervorgebracht.

Die wichtigste Entität oxidierender Stoffe sind, neben dem Sauerstoff selbst, reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Zu ihnen rechnet man das Superoxidanion, das Hydroxylradikal und Wasserstoffperoxid. Sie resultieren aus der sequentiellen Elektronenaufnahme von molekularem Sauerstoff (Apel und Hirt, 2004). Zu den ROS gesellen sich zudem hypochlorige Säure, Stickstoffmonoxid (NO) und Peroxinitrit sowie deren Derivate (Berg et al., 2003). Als Charakteristikum tragen sie ein oder mehrere unpaare Elektronen in ihrer äußeren Elektronenhülle. Aufgrund des Bestrebens eine höhere chemische Ordnung einzunehmen, stellen ROS eine Gruppe instabiler, hochreaktiver Sauerstoffverbindungen dar. Sie sind in der Lage, schnell mit anderen Biomolekülen zu interagieren und diese dadurch strukturell wie auch funktionell zu beeinträchtigen.

Zelluläre Strukturen werden kontinuierlich durch oxidierende und antioxidierende Einflüsse moduliert, d.h. es herrscht ein basales Gleichgewicht zwischen der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies auf der einen Seite und der Fähigkeit des Organismus zur Prävention bzw. Reparatur ROS-assoziiierter Schäden auf der anderen Seite (zelluläre Redoxhomöostase). Entsteht ein Ungleichgewicht zugunsten der oxidativen Belastung, können daraus schwere bis irreversible Zellschäden entstehen.

Dies kann letztlich im programmierten Zelltod münden. Die Reduktion der ROS-Level unterhalb einer physiologischen Reizschwelle kann hingegen wichtige Funktionen für Zellproliferation oder Erregerabwehr hemmen (Bjelakovic et al., 2007). In den Übergangsbereichen antioxidativer Stress - Redoxhomöostase - oxidativer Stress werden vitale Zellreize gesetzt. Ferner sei auf das Konzept biologischer Hormesis im Allgemeinen und der Mitohormesis im Besonderen hingewiesen (Calabrese und Baldwin, 2003). Grundannahme dabei ist, dass eine kleine Menge einer toxischen Substanz positive Wirkung auf den Organismus ausüben kann. Ein solcher dosisabhängiger Umkehreffekt liegt zum Beispiel bei Herzglykosiden, dem Colchicin und wahrscheinlich beim Ethylalkohol vor. Man macht biochemische Adaptionsprozesse dafür verantwortlich.

Grundsätzlich können durch Oxidation sämtliche Klassen von Biomolekülen betroffen sein: Proteine (z.B. Methämoglobin, α 1-Antitrypsinoxidation), Lipide (z.B. 8-Isoprostan), Lipoproteine (z.B. oxLDL), DNA (z.B. 8-Oxoguanin, Thymindimere) und sekundäre Botenstoffe wie Stickstoffmonoxid (Peroxinitrite). Ein besonders sensibles Ziel oxidativer Schädigung stellen Mitochondrien dar (Cadenas und Davies, 2000). Nach aktuellem Verständnis bilden reaktive Sauerstoffspezies eine fundamentale pathogenetische Grundlage zellulärer Störungen. Seit sich vor einem halben Jahrhundert die Hypothese entwickelt hat, den biologischen Alterungsprozess kausal mit der Akquirierung oxidativer Schäden zu verknüpfen (Harman, 1956), hat dieses Konzept inzwischen eine breite wissenschaftliche Evidenz wie auch Akzeptanz gefunden (Finkel und Holbrook, 2000; von Zglinicki, 2002). Bei allen untersuchten Organismen ist die Rate oxidativer Schädigung direkt verbunden mit der metabolischen Aktivität und korreliert invers mit der Lebenserwartung (Adelman et al., 1988). Im Nematoden *Caenorhabditis elegans* konnten zahlreiche Genmutationen identifiziert werden, welche eine verminderte ROS-Produktion bei erhöhter Lebensspanne zur Folge haben (Finkel und Holbrook, 2000; Honda und Honda, 2002). Umgekehrt konnte ebenfalls eine erhöhte ROS-Generierung bei verminderter Lebensspanne dokumentiert werden (Ishii et al., 1998). Zusätzliche Unterstützung lieferten Untersuchungen an *Drosophila melanogaster*, bei denen eine transgene Überexpression antioxidativer Enzyme zu erhöhter Lebenserwartung führte (Orr und Sohal, 1994). Zudem wird ein kausales Verhältnis zwischen oxidativen Schäden und biologischem Alterungsprozess durch die Einsicht gestützt, dass Menge

und Aktivität antioxidativer Enzyme im Alter absinken (Wei und Lee, 2002). Gleichermaßen wird eine steigende Anzahl von Krankheiten und pathologischen Prozessen mit der Kumulation oxidativer Schäden erklärt. Hier seien als wichtige Beispiele zu nennen: Karzinogenese (Marnett, 2000), interstitielle Lungenerkrankungen (Montuschi et al., 1998), Morbus Wilson (Rossi et al., 2006) Reperfusionsschäden (Yellon und Hausenloy, 2007), Trisomie 21 (Busciglio und Yankner, 1995), Duchenne-Muskeldystrophie (Petrof, 2002), ethyltoxische Hepatitis (Loguercio und Federico, 2003), Diabetes mellitus (Kaneto et al., 2010) und neurodegenerative Erkrankungen (Emerit et al., 2004). Die vorliegende Arbeit beabsichtigt, sich auf die Bedeutung von reaktiven Sauerstoffspezies als wichtige Motoren der Atherogenese zu konzentrieren (Kondo et al., 2009; Touyz, 2004). An der Etablierung der frühen atherosklerotischen Endothelstörung (ED) sind ROS maßgeblich beteiligt (Abe und Berk, 1998), im weiteren Krankheitsverlauf beeinflussen sie Morbidität und Mortalität (Heitzer et al., 2001).

Demgegenüber steht die Erkenntnis, dass ROS nicht nur ein Abfallprodukt des Zellstoffwechsels mit erheblichem Schädigungspotential repräsentieren. Sie sind ein essenzieller Bestandteil für die Aufrechterhaltung physiologischer Zellfunktionen (Dröge, 2002). In erster Linie ist dabei die Integration von extra- und intrazellulären Reizen von Belang, welche durch eine ROS-getragene Signaltransduktion (Lander et al., 1997) mit Proliferation, Differenzierung oder Apoptose beantwortet werden können (Finkel, 1998; Irani, 2000). Dies geschieht durch eine direkte biochemische Modifikation von Zielproteinen (Rezeptoren von Wachstumsfaktoren, Proteinkinasen, Proteinphosphatasen) oder durch die Modulation redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren und zugehöriger Zielgene (Allen und Tresini, 2000; Burdon, 1995). Weiter werden kurz- und langwirksame Adaptionsprozesse der Skelettmuskulatur an physische Belastung über ROS reguliert. Dazu gehören gesteigerte Glukoseaufnahme (Toyoda et al., 2004), optimierte Kontraktionsgeschwindigkeit (Reid, 2001) sowie Faserwechsel, Angiogenese und Induktion antioxidativer Systeme (Vollaard et al., 2005). Ristow und Kollegen konnten tierexperimentell herausarbeiten, dass die Verbesserung der skelettmuskulären Insulinsensitivität durch körperliches Training an die Generierung von ROS gebunden ist. Eine Vitamin C und E-Supplementierung führte zur Entkoppelung dieses Effektes (Ristow et al., 2009). Owusu-Ansah und Banerjee (2009) legten nahe, dass ROS den Differenzierungsprozess der Hämatopoiese koordinieren. Demnach bremst ein Mangel

an ROS die Reifung aller drei myeloischen Reihen und kann zu einem Immundefekt führen. Brandes und Schröder (2008) verdeutlichten die vielfältigen Auswirkungen NADPH-Oxidase-generierter ROS für das vaskuläre System. Der angiogenetische Stimulus von Angiopoeitin-1 und VEGF auf Endothelzellen benötigt ebenso die Anwesenheit und Aktivität der NADPH-Oxidase (Harfouche et al., 2005; Ushio-Fukai et al., 2002). Transgene Mäuse, bei denen eine Untereinheit des Enzyms fehlt, zeigen keine Neovaskularisierung auf VEGF- oder Ischämieeriz (Tojo et al., 2005).

Die Ausführungen sollen verständlich machen, dass ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Radikalbildung und Radikalneutralisierung herrscht, welches, innerhalb

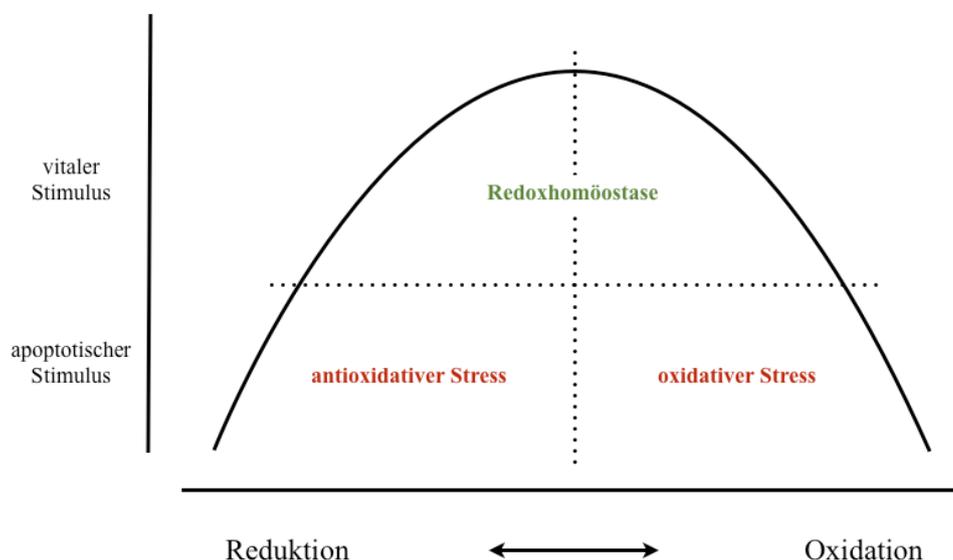


Abbildung 9: Die zelluläre Redoxhomöostase wird durch oxidierende sowie reduzierende Einflüsse moduliert. In definierten Grenzen sind beide Stimuli unabdingbar für physiologische Zellfunktionen und Überleben. Werden diese Grenzwerte überschritten, kann daraus antioxidativer bzw. oxidativer Stress entstehen. Beides zieht gravierende Einschränkungen der Zellfunktion bis hin zur Apoptose nach sich.

bestimmter Grenzen, Voraussetzung für physiologische Zellfunktionen ist (Abb. 9; Wingler und Schmidt, 2009). Um sich einen Überblick über die vielfältigen ROS-Quellen zu verschaffen, ist es sinnvoll, diese nach ihrer exogenen oder endogenen Herkunft einzuteilen. Während exogene Einflüsse wie Pharmaka, UV-Licht oder Zigarettenrauch zu einem kurzfristigen signifikanten Anstieg von ROS führen können, trägt die endogene ROS-Produktion den wesentlichen Anteil der chronisch-oxidativen

Belastung und vermittelt exogene Faktoren. Dafür sind körpereigene Enzyme der Klasse Oxido-reduktasen verantwortlich, die explizit der Radikalproduktion dienen bzw. solche, die ROS als Nebenprodukt im Rahmen einer Redoxreaktion erzeugen. Wichtige Vertreter sind die mitochondriale Cytochrom-C-Reduktase, NADPH-Oxidase, Xanthinoxidase, Cytochrom-P450-Monooxygenasen und die Monoaminoxidase-A (Fruehauf und Meyskens, 2007). Unter pathophysiologischen Bedingungen kann sich die vasoprotektive Funktion der eNOS am Endothel dergestalt umkehren, dass in einer entkoppelten Reaktion toxische Superoxidanionen anstelle NO produziert werden (Förstermann und Münzel, 2006). Alle Oxidoreduktasen sind Teil des physiologischen Metabolismus und leisten einen Beitrag zur basalen ROS-Generierung. Ihr Aktivitätszustand unterliegt jedoch deutlichen inter- und intraindividuellen Unterschieden.

Zu den Schutzeinrichtungen gegen oxidativen Stress gehören antioxidative Schutzsysteme, sowie nichtenzymatische und enzymatische, sekundäre Verteidigungsstrategien wie DNA-Reparatur, ein kontrollierter Proteinumsatz ferner metabolische Adaptionen. Zusammen sorgen sie für die Stabilisierung eines physiologischen Redoxpotentials der Zelle. Nichtenzymatische Antioxidanzien können als Puffersysteme für oxidativen Stress betrachtet werden. Für den Menschen spielen das Glutathion-System, die Vitamine A, C und E bzw. deren Derivate und alimentär aufgenommene sekundäre Pflanzenstoffe eine große Rolle (Kalliora et al., 2006). In den meisten Fällen konnte eine atheroprotektive Wirkung in klinischen Studien nachgewiesen werden.

Zusätzlich existiert ein vielfältiges endogenes Arsenal enzymatischer Schutzmechanismen. Diese sind in Geweben mit hohem Sauerstoffumsatz wie Muskulatur, Herz, Niere, Lunge, Leber und Nervensystem besonders präsent. Hier sind in erster Linie die Superoxiddismutase, die Glutathionperoxidase und die Katalase zu nennen. Die Familien der Peroxiredoxine, Thioredoxine und Sulfiredoxine sind spärlicher untersucht, erfüllen aber ähnliche Funktionen (Jönsson und Lowther, 2007; Rhee et al., 2005).

Superoxiddismutasen (SOD) sind eine Familie von Metalloenzymen, die die Auftrennung von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff katalysieren. Diese Reaktion spielt sich typischerweise an der inneren Mitochondrienmembran ab und ist Voraussetzung für den weiteren Metabolismus von Superoxid durch die Enzyme Katalase bzw. Glutathionperoxidase. Obwohl Superoxid in wässriger Lösung auch nichtenzymatisch dissoziiert wird diese Reaktion durch die SOD beträchtlich

beschleunigt. SOD sind evolutionsbiologisch stark konservierte Enzyme und verhalten sich mit einer extrem niedrigen Michaeliskonstanten katalytisch nahezu perfekt (Kriegel und Schellenberger, 2007).

Superoxid ist der Hauptvertreter intrazellulärer ROS. Seine pathophysiologische Bedeutung erwächst aus zweierlei Mechanismen. Es besitzt die Fähigkeit zur Induktion einer Oxidationskaskade (Radikalkettenreaktion) mit Bildung von hochreaktiven Hydroxylradikalen im Rahmen einer Fentonreaktion (Halliwell, 1996). Zudem kann Superoxid mit NO zu toxischem Peroxinitrit reagieren (Reiter et al., 2000), welches über eine Tyrosinnitrierung die Funktion der Mangan-Superoxiddismutase stören kann (Macmillan-Crow et al., 1996). Im Endothel geht dies mit der Anhäufung mitochondrialer DNA- und Funktionsschäden (Ballinger et al., 2002) sowie dem Verlust der NO-vermittelten Atheroprotektion (Higashi et al., 2009) einher. Superoxid kann auf diese Weise als indirekter Vasokonstriktor fungieren und pathologischen Gefäßzuständen wie

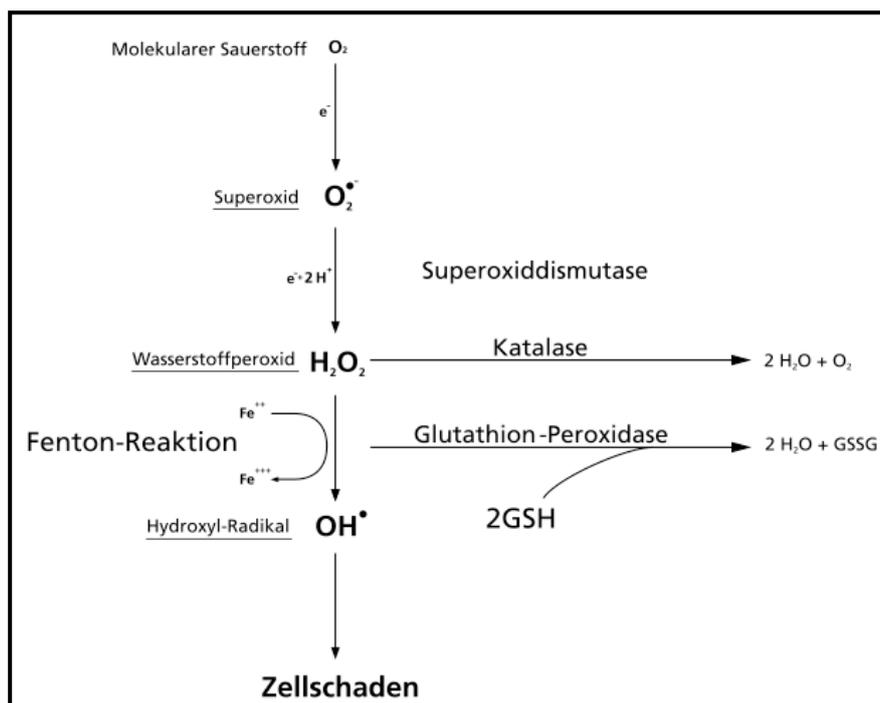


Abbildung 10: Dargestellt ist die schrittweise Reduktion von molekularem Sauerstoff durch Elektronenaufnahme. Zunächst entsteht Superoxid, welches, katalysiert durch die SOD, zu Wasserstoffperoxid weiterreagiert. In Gegenwart von zweiwertigem Eisen können in der Fentonreaktion hochreaktive Hydroxylradikale entstehen. Superoxid stimuliert die Bildung von Fe^{2+} aus Fe^{3+} . Katalase und Glutathionperoxidase neutralisieren intrazelluläre Wasserstoffperoxidmoleküle (modifiziert nach Gram, 1997).

Vasospasmus und Hypertension Vorschub leisten (Laurindo et al., 1991; Nakazono et al., 1991). Zwischen 1 und 4 % der in der mitochondrialen Atmungskette umgesetzten Sauerstoffmoleküle werden nicht vollständig zu H₂O, sondern unvollständig zu Superoxid reduziert (Pohl, 2011; Raha und Robinson, 2000). Die Atmungskette macht damit den Hauptteil der physiologischen ROS-Generierung aus (Chance et al., 1979). Unter Bedingungen erhöhter mitochondrialer Aktivität, z.B. durch intensive Muskelbeanspruchung mit bis zu 15-fach erhöhtem Sauerstoffverbrauch gegenüber Ruhebedingung, kann oxidativer Stress provoziert werden (Ji, 1999; Vollaard et al., 2005). Unter pathophysiologischen Bedingungen kann die Superoxidbildung durch den NADPH-Oxidase-Komplex die Hauptquelle der vaskulären ROS-Belastung darstellen (Dzau, 2001). Die SOD nimmt daher eine Schlüsselposition im antioxidativen Stoffwechsel ein.

Für den Menschen sind drei Isoenzyme mit unterschiedlichen Genloki beschrieben, die sich in Aminosäuresequenz, Lokalisation und Aktivität unterscheiden (Faraci und Didion, 2004). SOD-1 und SOD-3 beinhalten einen Kupfer-Zink-Komplex im aktiven Zentrum und sind zytosolisch bzw. extrazellulär lokalisiert. Das Mangan-komplexierende SOD-2-Isoenzym (Mn-SOD; SOD-2) befindet sich an der inneren Mitochondrienmembran und eliminiert hauptsächlich ROS, die im Rahmen der Atmungskette entstehen (Weisiger und Fridovich, 1973). Untersuchungen an transgenen Mäusen demonstrieren die Bedeutung der Mn-SOD. Tiere mit homozygotem Mn-SOD-Defekt wiesen Neuronendegenerationen auf und verstarben an einer dilatativen Kardiomyopathie (Lebovitz et al., 1996; Li et al., 1995). Eine Mn-SOD-Überexpression führte zu erhöhter Toleranz gegenüber Hyperoxie, wohingegen eine vollständige Mn-SOD-Defizienz die Hyperoxiesensibilität erhöht (Asikainen et al., 2002). Mäuse mit isolierter myokardialer Mn-SOD-Defizienz entwickelten ebenfalls eine dilatative Kardiomyopathie mit spezifischen Defekten der mitochondrialen Atmungskette und des ATP-Metabolismus. Die gleiche Beobachtung konnte für Mn-SOD-defiziente Skelettmuskulatur angestellt werden (Shimizu und Shirasawa, 2009).

Demgegenüber steht die Erkenntnis, dass kardioprotektive Effekte regelmäßiger körperlicher Aktivität partiell durch die Aktivierung der myokardialen Mn-SOD vermittelt werden (Hamilton et al., 2004; Yamashita et al., 1999). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine virusinduzierte Überexpression der Mn-SOD in humanen Endothel-

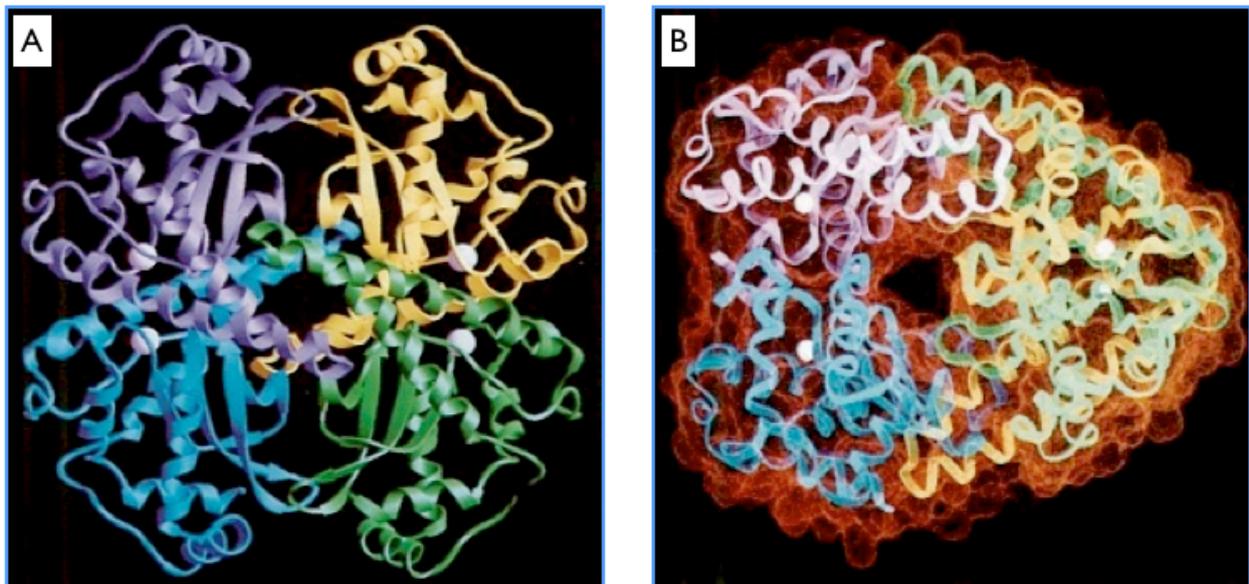


Abbildung 11: Röntgenkristallographisches Modell der Mn-SOD-Quartärstruktur als Homotetramer in zwei Achsen (A und B). Individuelle Untereinheiten sind farblich abgegrenzt: gelb, grün, blau und lila. Manganionen sind als helle Kugeln dargestellt. Die rote Moleküloberfläche in B wurde computertechnisch kalkuliert (aus Borgstahl et al., 1992).

zellen in verminderter LDL-Oxidation resultiert und mit antiatherosklerotischen Eigenschaften einhergeht (Fang et al., 1998). Durch den Schutz des mitochondrialen Genoms sowie Elementen der Atmungskette vor oxidativen Schäden kommt der Mn-SOD daher eine Schlüsselposition in der Atheroprotektion zu.

Genlokus der Mangan-Superoxiddismutase beim Menschen ist Chromosom 6 q25 (Church et al., 1992). Das fertige Protein besteht aus 222 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 24,7 kDa. Vier Proteinketten arrangieren sich zu einer homotetrameren Quartärstruktur. Jede Untereinheit komplexiert Mangan im katalytischen Zentrum. Das Transkript wird zytosolisch als Präkursorprotein translatiert, modifiziert und anschließend, von einer Signalsequenz geleitet, in die mitochondriale Matrix importiert. Die Arbeitsgruppe von Borgstahl (1992) konnte die Tertiär- und Quartärstruktur des Proteins aufdecken und auf dieser Grundlage obiges Modell (Abb. 11) visualisieren. Betrachtet man verschiedene Allele des humanen Mn-SOD-Gens so können unterschiedliche Wahrscheinlichkeiten für Atherosklerose und Folgekrankheiten konstatiert werden. Hintergrund sind am ehesten Diskrepanzen in der Proteintranslokation in die mitochondriale Matrix (Fujimoto et al. 2008; Kakko et al., 2002).

Endothelzellen zeigen allgemein eine starke Expression der Mn-SOD. Das Endothel jedes Gefäßabschnittes ist dabei durch ein ihm charakteristisches Expressionsmuster gekennzeichnet. So lässt sich beispielsweise im Endothel des intrakraniellen Gefäßbettes eine besonders hohe Expression beobachten (Napoli et al., 1999). Durch oxidative Belastung kann die Expression der Mn-SOD deutlich gesteigert werden (Macmillan-Crow und Cruthirds, 2001), wohingegen in manifestem atherosklerotischem Endothel eine Herabregulation registriert werden kann (Ballinger et al., 2002). Die Promotorregion des Mn-SOD-Gens enthält mehrere Sequenzen, die redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren als Bindungsstellen dienen. Hierzu zählen die Transkriptionsfaktoren Sp-1, AP-1 und NF- κ B (St Clair et al., 2002). Die Regulation erfolgt zusätzlich hormonell. So konnte gezeigt werden, dass Estradiol die Expression verstärkt (Strehlow et al., 2003). Die Mn-SOD unterliegt ferner einer altersabhängigen Reduktion in Expression und Aktivität (D'Armiento et al., 2001). Zwei Untersuchungen belegen eine altersabhängige Phosphorylierung des Transkriptionsinduktors FOXO3A als einen molekularen Mechanismus der Transkriptionssuppression (Kops et al., 2002; Li et al., 2006b).

2.4 Zellbiologie endothelialer Progenitorzellen

Die Entstehung des kardiovaskulären Systems ist eines der frühen Ereignisse der Organogenese (Sadler et al., 2003). Beim Menschen, entwickeln sich während der dritten Embryonalwoche aus extra- und intraembryonalem Mesoderm simultan primitive Blutgefäße und Blutzellen aus einer gemeinsamen Ursprungszelle, dem sogenannten „Hämangioblasten“ (Vaskulogenese; Risau und Flamme, 1995). Im Anschluss entsteht daraus durch komplexe vaskuläre Auf- und Umbauprozesse (Angiogenese) nach circa 21 Tagen post conceptionem ein funktionales Herz-Kreislauf-System (Risau, 1997). Stimuliert durch Wachstumsfaktoren gehen aus Hämangioblasten hämatopoietische Zellen, glatte Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen hervor. Die Urzelle der Endothellinie, welche direkt aus dem Hämangioblasten hervorgeht, wird als „vaskuläre Stammzelle“ (Angioblast) bezeichnet. Die Anzahl an Hämangioblasten bzw. vaskulären Stammzellen ist sehr gering und kann nur abgeschätzt werden. Für die hämato-

poietische Stammzelle werden Werte von 1 von 20 Millionen kernhaltigen Zellen des Knochenmarks angegeben (Hoffbrand et al., 2006). Mutmaßlich liegt die Population vaskulärer Stammzellen gleichermaßen in dieser Größenordnung.

Die Vorstellung vom Mechanismus der Endothelregeneration sah ursprünglich die Proliferation plus Integration angrenzender Endothelzellen vor (*Restitutio per continuitatem*). Jedoch wiesen bereits 1976 Schwartz und Benditt darauf hin, dass die durchschnittliche Replikationsrate von Endothelzellen von nur 0,55 % pro Tag dieser Vermutung entgegensteht. Nach Anlage eines Koronarstents konnte zudem beobachtet werden, dass dessen lumenale Oberfläche von Endothelien besiedelt wurde, die keine Verbindung zur Intima des Nativgefäßes aufwiesen (Shi et al., 1998). Im Jahr 1997 konnten Asahara et al. darlegen, dass die Differenzierung mesodermaler Zellen in Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen kein exklusives Phänomen der Embryogenese ist. So konnten Zellen im peripheren Blut von erwachsenen Probanden identifiziert werden, welche wesentliche Charakteristika mit vaskulären Stammzellen teilen und wahrscheinlich direkte Abkömmlinge von diesen sind. Sie werden als „endotheliale Progenitorzellen“ (EPC) bezeichnet. Im humanen Organismus spielen EPC im Wesentlichen in drei Bereichen eine Rolle (Abb. 12): Endothelzellregeneration, Angiogenese (Kapillaraussprossung aus bestehenden Gefäßen) und Vaskulogenese (de-novo-Bildung von Endothelzellen und Gefäßstrukturen) (Carmeliet, 2005; Khakoo und Finkel, 2005). Zahlreiche Untersuchungen *in vitro* et *in vivo* legen ein Konzept nahe, welches die Endothelregeneration als ein Zusammenspiel zwischen der Proliferation residenter Endothelzellen und dem Ersatz durch zirkulierende EPC interpretiert (Gunsilius et al., 2000; Werner et al., 2002). Aktuell schreibt man EPC die Fähigkeit zu, Endothelläsionen zu erkennen, sich in diese zu inkorporieren und somit die Integrität der Endothelschicht zu regenerieren (Fujiyama et al., 2003; Urbich und Dimmeler 2004; Werner, 2007). Wassmann et al. publizierten 2006, wie sich im atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mausmodell systemisch transfundierte Wildtyp-EPC in atherosklerotische Endothelläsionen der Aorta inkorporierten und indessen zu einer Verbesserung der Parameter Reendothelialisierung und ED führten. Außerdem konnte tierexperimentell dargestellt werden, dass eine endogene EPC-Mobilisierung durch Statine in beschleunigter Reendothelialisierung und verminderter Plaqueformierung nach Gefäßverletzung resultierte (Werner et al., 2002). Durch die zellbiologischen

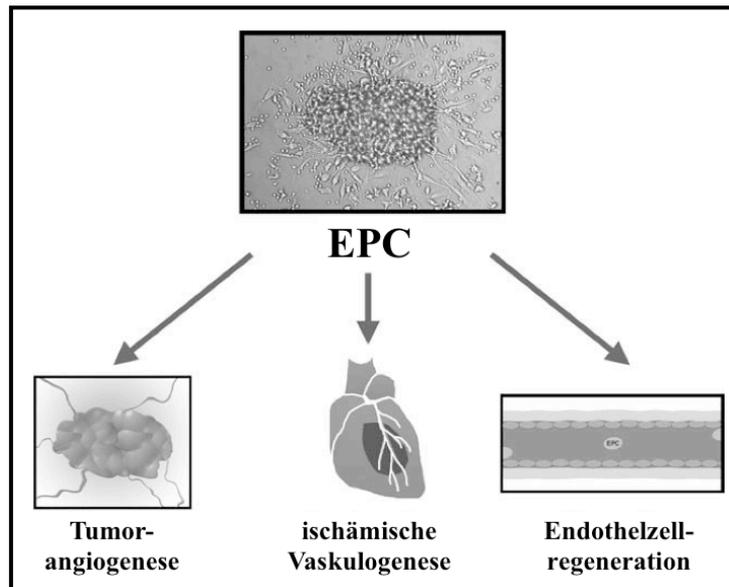


Abbildung 12: Hauptfunktionen endothelialer Progenitorzellen (aus Khakoo und Finkel, 2005).

Eigenschaften von EPC (ausgeprägte Proliferationskapazität und Differenzierungsplastizität) erfährt dieses Konzept weitere Unterstützung. Ergo sind EPC befähigt, der Induktion und dem Progress von Atherosklerose und Folgeerkrankungen entgegenzuwirken. Seit kurzem ist bekannt, dass auch Thrombozyten die Fähigkeit besitzen, Endothelläsionen zu detektieren und sich durch Rekrutierung zirkulierender EPC (chemotaktisch sowie rezeptorassoziiert) an der Reendothelialisierung beteiligen (Hristov et al, 2007; Langer und Gawaz, 2008).

EPC halten sich im adulten Organismus in Stammzellnischen des medullären Endosteums auf. Vermutlich sind Hämangioblasten und deren direkte Derivate nicht auf diese Lokalisation beschränkt. Vielmehr geht man davon aus, dass auch andere Organe eine Stammzellnische für EPC und Hämangioblasten besitzen. So kann unter pathologischen Zuständen eine signifikante extramedulläre Hämatopoiese stattfinden. Im Knochenmark sind EPC über einen CXCR4-SDF-1- sowie VCAM-1-VLA-4-Doppelanker an fibroblastische Retikulum- und Endothelzellen befestigt (Lapidot und Petit, 2002). Diese Bindung hat nutritive, antiapoptotische sowie proliferative Bedeutung und realisiert einen medullär lokalisierten, bei Bedarf schnell mobilisierbaren EPC-Vorrat (Adams et al., 2006). Die Mobilisierung, Ausschwemmung und Anbindung im Zielgewebe (Abb. 13) wird systemisch mittels Hormone und Zytokine gesteuert und

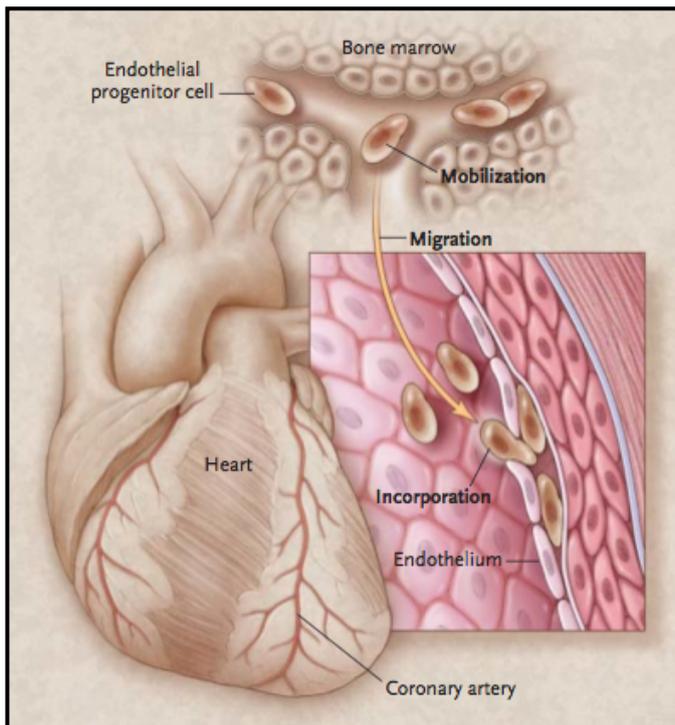


Abbildung 13: Drei Stufen der EPC-Bewegung vom Knochenmark bis zum Endothel: Mobilisierung, Migration und Inkorporation (aus Rosenzweig, 2003).

durch Osteoblasten und Osteoklasten vermittelt (Lapidot et al., 2005). SDF-1, VEGF, Erythropoietin, G-CSF, GM-CSF, Angiopoietin, SCF, PIGF oder Estrogene (Aicher et al., 2005; Asahara et al., 1999b; Heeschen et al., 2003; Strehlow et al., 2003b) führen zu einer signifikanten EPC-Rekrutierung in den systemischen Kreislauf. Nach Ischämiestimulus beteiligen sich EPC aktiv an physiologischen und pathophysiologischen Gefäßneubildungen (Asahara et al., 1999a; Assmus et al., 2006). Ein physiologischer Reiz geht von hypoxischem Gewebe während intensiver körperlicher Aktivität aus

(Adams et al., 2004; Richardson, 1999; Sandri et al., 2005). Die Frühphase eines Myokardinfarktes sei als ein Beispiel pathophysiologischer EPC-Mobilisierung genannt. Hier steigt die EPC-Zahl im peripheren Blut deutlich an. Nach sieben Tagen ist das Maximum dieser Bewegung, nach 60 Tagen die Nivellierung erreicht. Dabei konnte eine positive Korrelation zum zeitlichen VEGF-Spiegel im peripheren Blut herausgearbeitet werden (Massa et al., 2005; Shintani et al., 2001). Nach vaskulärem Trauma (Gill et al., 2001) oder im Rahmen der Tumorneoangiogenese kommt es ebenfalls zu diesem Phänomen (Li et al., 2006a). NO spielt in diesem Regulationsnetzwerk eine zentrale Rolle, indem es die Sekretion proteolytischer Enzyme wie MMP-9 durch Osteoklasten steigert und so EPC-Verankerungen löst (Aicher et al., 2003; Heissig et al., 2002).

Die Morphologie medullärer Progenitorzellen ist nicht eindeutig und erinnert an kleine bis mittelgroße Lymphozyten. Weder existieren spezifische Oberflächenantigene, die exklusiv eine endotheliale Herkunft beweisen, noch gibt es einen EPC-Phänotyp, der zweifellos als Referenz dienen könnte. Die Beschreibung in der Literatur ist

uneinheitlich, jedoch lassen sich folgende Eigenschaften autorenübergreifend festhalten (Asahara et al., 1997; Peichev et al., 2000; Vasa et al., 2001a):

- Zwei konstitutive Oberflächenantigene, CD34 und Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2)
- sowie mit Einschränkung CD133, da dieser nur von EPC-Subpopulationen exprimiert wird.

Nach Kultivierung in endothelzellspezifischem Medium wachsen die Zellen z.T. in Kolonien (monoklonales Proliferat einer gemeinsamen EPC) und zeigen eine spindelzellförmige, stammzellartige Morphologie. Als weitere Endothelzellcharakteristika lassen sich erkennen:

- Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS)
- Weibel-Palade-Körperchen mitsamt von-Willebrand-Faktor,
- die Oberflächenantigene VE-Cadherin, E-Selektin und UEA-1,
- die Fähigkeit zur Aufnahme von diacetyliertem Low density lipoprotein (diLDL)
- sowie die Bindung von Lektin.

Aktuell werden durch Kombination von mikroskopischer Kulturbeobachtung und funktioneller Aspekte zwei wesentliche EPC-Populationen differenziert (Steinmetz et al., 2010). „Early EPC“ fördern parakrin die Vaskulogenese und fungieren in der Frühphase einer Endothelschädigung als Platzhalter (Abb. 14 B, orange). Sie besitzen nicht die Potenz zur eigentlichen de-novo-Gefäßneubildung. „Late EPC“ werden hingegen endotheliale sowie aktiv-vaskulogenetische Eigenschaften zugesprochen. Die definitive Endothelauskleidung geht aus ihnen hervor (Abb. 15 C, grün). Eine Zuordnung zirkulierender EPC zu einem der beiden Subtypen anhand von Oberflächenmarkern bzw. zu kultivierten EPC ist bislang nicht eindeutig möglich. Zu den zwei proklamierten EPC-Subpopulationen gesellen sich im Blut zirkulierende leukozytäre Zellen, welche die Frühphase der Endothelreparatur parakrin beeinflussen sowie als temporäre Platzhalter im geschädigten Endothelverband fungieren können (Abb. 14 B, orange). Sie werden

als „EC-like cells“ subsummiert und sind monozytärer bzw. T-lymphozytärer Abstammung.

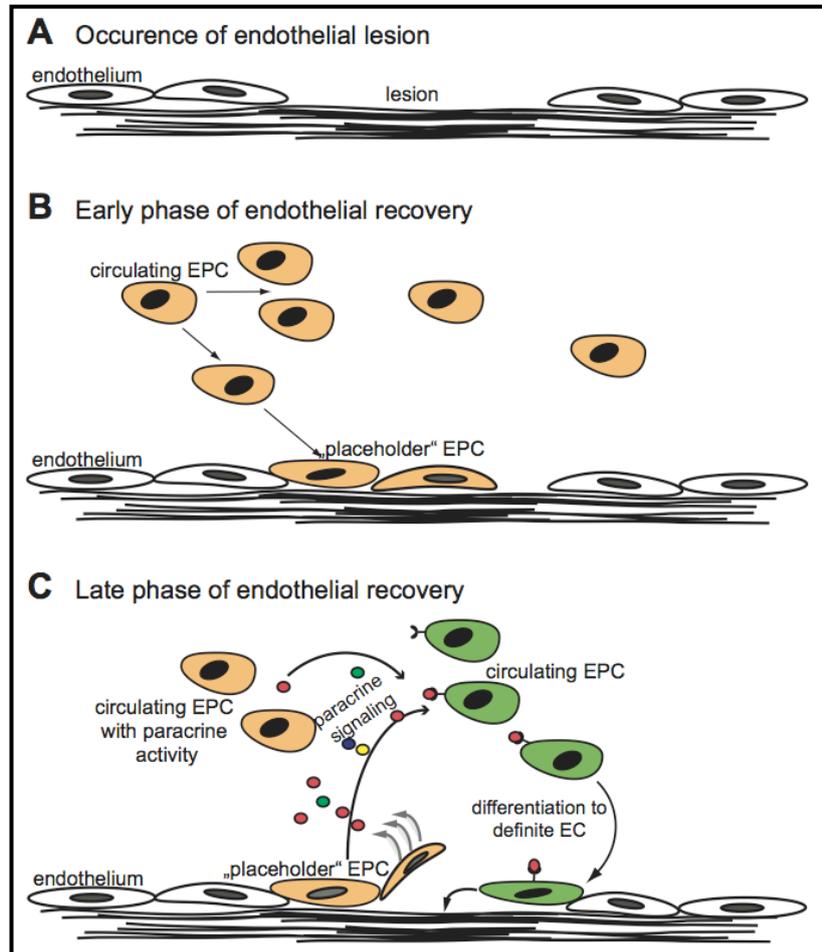


Abbildung 14: Proklamiertes Modell der Endothelzellregeneration, nach Steinmetz et al., 2010. A: Ereignis der Endothelläsion. B: Frühe Phase, C: Spätphase der Endothelreparatur.

2.5 Endotheliale Progenitorzellen und oxidativer Stress

Die funktionelle Auswirkung von oxidativem Stress auf EPC ist bislang nur oberflächlich ergründet. Gefäßpathologische Konditionen wie Ischämie und ED gehen mit einer vermehrten ROS-Generierung (Cai und Harrison, 2000) bei gleichzeitig verminderter ROS-Neutralisierung (Irani, 2000) einher. Der neuroendokrine Status eines Organismus beeinflusst gleichermaßen dessen oxidative Belastung. Für das Renin-Angiotensin-

Aldosteron-System ist belegt, dass dessen Aktivität Einfluss auf die oxidative Belastung ausübt. Überaktivität z.B. im Rahmen der chronischen Herzinsuffizienz ist mit erhöhter vaskulärer ROS-Generierung einerseits, mit reduzierter NO-Bioverfügbarkeit sowie beschleunigter EPC-Seneszenz andererseits vergesellschaftet (Brasier et al., 2002; Imanishi, 2005). Sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen führt oxidativer Stress zu einer numerischen und funktionellen Beeinträchtigung von EPC im peripheren Blut (Tousoulis et al., 2008). Demgegenüber sind EPC gegen oxidativen Stress besser geschützt als ausdifferenzierte Endothelzellen (Dernbach et al., 2004, He et al., 2004). Im Vergleich dazu exprimieren EPC antioxidative Enzymsysteme signifikant höher und zeigen sich resistenter gegen ROS-induzierte Apoptose. Dies ist mit der Beobachtung vereinbar, dass Stammzellen im Allgemeinen eine hohe DNA-Reparaturkapazität und antioxidative Schutzmechanismen aufweisen. Eine zunehmende Differenzierung zur Endothelzelle ist mit einer sukzessiven Abnahme der Mn-SOD-Expression verbunden. Der verbesserte Schutz gegen oxidativen Stress könnte für EPC notwendig sein, um in einer Umgebung hohen ROS-Aufkommens ihre physiologischen Aufgaben von Differenzierung und Reparatur wahrnehmen zu können.

Es ist unklar, welche Rolle antioxidative Enzymsysteme für EPC spielen bzw. ob diese vergleichbar mit der ausdifferenzierten Endothelzellen ist. Untersuchungen von He und Kollegen (2004) lieferten Hinweise, dass die Mangan-Superoxiddismutase einer besonderen Verpflichtung im antioxidativen Stoffwechsel für EPC nachkommt. So konnte demonstriert werden, dass in EPC Mn-SOD-mRNA, nicht jedoch SOD-1/-3-mRNA, siebenfach häufiger zu finden ist als in ausdifferenzierten Endothelzellen oder Monozyten.

2.6 Endotheliale Progenitorzellen und Atherosklerose

Die gesunde Endothelzelle erfüllt zahlreiche atheroprotektive Funktionen. Sie gewährleistet einen turbulenzarmen Blutfluss, steuert den Stoffaustausch, reguliert Leukozytenadhäsion und -migration, Blutgerinnung und Gefäßtonus, koordiniert den Lipoproteinmetabolismus, moduliert das Zellwachstum, synthetisiert EZM-Komponenten und vermittelt die Angiogenese (Abb. 15).

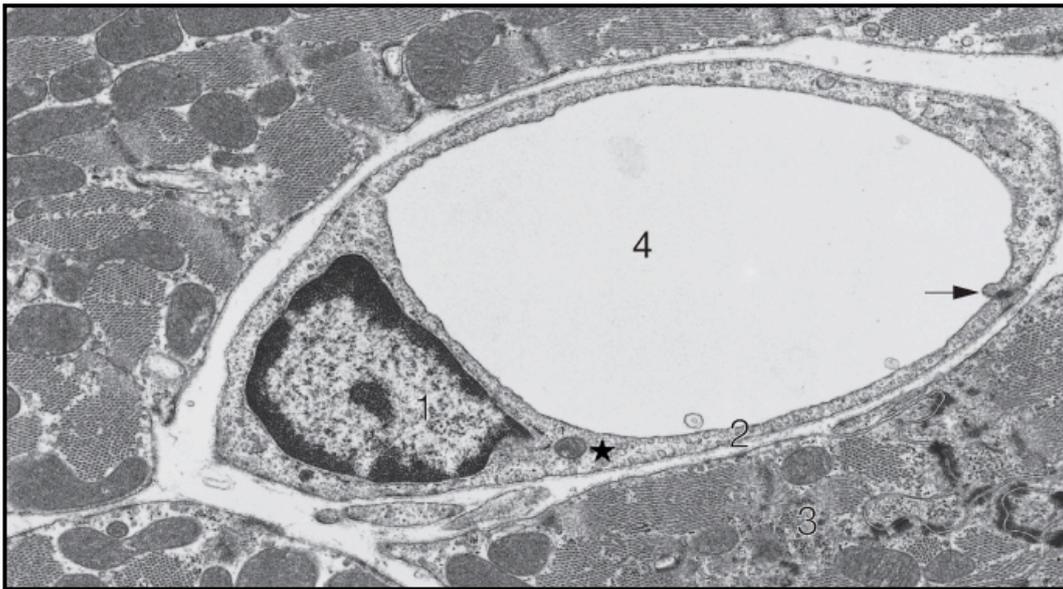


Abbildung 15: Endothelzelle einer Myokardkapillare (Meerschweinchen). 1: Zellkern, 2: Zytoplasma mit Pinozytosevesikeln, 3: Herzmuskelzelle, 4: Kapillarlumen, Stern: Weibel-Palade-Körperchen, Pfeil: Zellkontakt der Endothelzelle. Vergrößerung: 15300-fach (aus Welsch, 2006).

Das derzeitige Verständnis der atherosklerotischen Gefäßschädigung postuliert, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren zu einer strukturellen und funktionellen Beeinträchtigung von Endothelzellen führen. Der dysfunktionale Endothelverband verliert dabei substantielle vasomotorische, antikoagulatorische sowie atheroprotektive Fähigkeiten. Diese Alteration entspricht einer „conditio sine qua non“ der Atherosklerose. Das Ausmaß der ED korreliert linear mit der Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse (Perticone et al., 2001; Schächinger et al., 2000), ergänzt die klassischen Risikofaktoren (Bonetti et al., 2003) und muss als unabhängiger Prädiktor für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse verstanden werden (Landmesser et al., 2004; Widlansky et al., 2003). Zahlreiche Untersuchungen demonstrieren, dass kardioprotektive Interventionen eine Verbesserung der Endothelfunktion bewirken (Hambrecht et al., 2000 und 2003; Ghiadoni et al., 2000; Sasaki et al., 2002; Wolfrum et al., 2003). Gleichwohl beweisen die Ergebnisse, dass die ED ein reversibler Zustand ist. Die Prävention bzw. Reversion der ED ist bedeutsam, da sie die Entstehung atherosklerotischer Gefäßschäden verhindert und Folgeerkrankungen vorbeugt. Sie muss als wichtiges Ziel der Primär- wie auch Sekundärprävention kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität verstanden werden.

Die Funktion des Endothelverbandes ist eng mit dem des EPC-Systems verknüpft. Atherosklerotisches Endothel ist durch einen erhöhten Zellumsatz gekennzeichnet (Davies et al., 1986). Ein gesundes EPC-System ist imstande, Endothellzellumsatz zu unterstützen und Endothelschäden zu reparieren. Die Schädigungen des Endothelverbandes im Rahmen der Atherogenese laufen kontinuierlich ab. Diesen steht ein ebenso kontinuierlicher Regenerationsprozess durch zirkulierende EPC gegenüber. Auf der einen Seite befinden sich die in Abschnitt 3.2 genannten kardiovaskulären Risikofaktoren, welche in inverser Beziehung zu Endothelfunktion und EPC-System stehen (Laufs et al., 2005b, Vasa et al., 2001b). Eine reduzierte Endothelfunktion, gemessen an der Fähigkeit zur endothelvermittelten Vasodilatation, konnte bei kardiovaskulären Risikopatienten übereinstimmend festgestellt werden (Hambrecht et al., 2000; McVeigh et al., 1992; Panza et al., 1990; Zeiher et al., 1993). In gleicher Weise stellt sich das Verhältnis zwischen EPC und kardiovaskulärem Risiko dar (Schmidt-Lucke et al., 2005). So korreliert EPC-Zahl invers mit dem durch Risikokalkulatoren errechnetem kardiovaskulärem Risiko und gibt einen präziseren Aufschluss über das Ausmaß einer ED als klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren (Hill et al., 2003). Zusammenfassend muss betont werden, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren über zahlreiche Mechanismen eine Beeinträchtigung des residenten Endothelverbandes sowie zirkulierender EPC herbeiführen (Urbich und Dimmeler, 2005). Sie schränken die Kapazität der EPC-getragenen Neovaskularisierung im Rahmen einer ischämischen Herzerkrankung stark ein. Die Beantwortung der Frage, mit welchen Mechanismen die Risikofaktoren das EPC-System beeinflussen, ist Gegenstand aktueller Forschung. Auf der anderen Seite sind Mechanismen bekannt, die einen positiven Effekt auf das kardiovaskuläre mitsamt EPC-System aufweisen. Als kostengünstigste, potenteste, langwirksamste und wissenschaftlich fundierteste Intervention muss regelmäßige körperliche Aktivität hervorgehoben werden. Hierfür sind ebenso detaillierte molekularbiologische (Gielen et al., 2010) wie epidemiologische Daten mit hohem Evidenzgrad verfügbar (Hollmann und Strüder, 2009). Hambrecht und Mitarbeiter konnten nachweisen, wie körperliches Training zu verbesserter endothelvermittelter Vasodilatation führt (2003) und bei Patienten mit stabiler Angina pectoris einer perkutanen Koronarintervention überlegen ist (2004). Studienübergreifend konnte belegt werden, dass körperliches Training positiven Einfluss auf EPC-Quantität

und -Qualität ausübt (Laufs et al, 2004 und 2005a; Steiner et al., 2005). Regelmäßige körperliche Aktivität fördert kardiovaskuläre Gesundheit, indem die funktionelle als auch strukturelle Integrität des Endothelverbandes aufrechterhalten werden. Die aktuelle Studienlage zeigt konsistent, dass etablierte atheroprotektive Medikamente wie Statine (Werner et al., 2002; Vasa et al., 2001a) und Antagonisten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (Müller et al., 2009) ebenfalls zu einer EPC-Zunahme führen können. Die unter Abschnitt 3.2 erwähnten pleiotropen vaskuloprotektiven Wirkungen des HDL werden zumindest partiell durch EPC vermittelt (Petoumenos et al., 2009; Tso et al., 2006).

2.7 Zielsetzung

Die Unversehrtheit der Endothelschicht stellt einen entscheidenden antiatherosklerotischen Faktor dar. Umgekehrt üben kardiovaskuläre Risikofaktoren mannigfaltige atherogene Effekte auf die Endothelschicht aus. Dazu gehört die Konsolidierung eines Redoxungleichgewichtes am Endothelverband. Bislang ist das Wissen um die pathophysiologischen Auswirkungen dieser ROS-Belastung auf das EPC-System lückenhaft. Ebenso ist die Funktion antioxidativer Enzymsysteme, insbesondere der Mangan-Superoxiddismutase, für endotheliale Progenitorzellen nicht detailliert untersucht. Durch RNA-Interferenz wurden Mangan-SOD-defiziente EPC generiert und auf die Parameter Radikalhomöostase, Apoptoserate und Migrationspotential hin analysiert. Durch den Vergleich mit Mn-SOD-nativen EPC sollten Rückschlüsse auf die funktionelle Bedeutung dieses Enzyms für EPC gezogen werden. Die Herunterregulation der Mangan-SOD beabsichtigt ferner, ein Milieu erhöhter Radikalgenerierung bzw. verminderten Radikalabbaus zu simulieren. Beide Prozesse sind integraler Bestandteil von Atherosklerose und zellulärer Seneszenz. Zudem wird der Mn-SOD ein Stellenwert beim Differenzierungsprozess von EPC zur adulten Endothelzelle zugeschrieben. Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle der Mangan-Superoxiddismutase für endotheliale Progenitorzellen zu beleuchten, um ein erweitertes zellbiologisches Verständnis von EPC zu gewinnen und daraus alternative antiatherosklerotische Therapieansätze abzuleiten.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsprotokoll

Die Isolierung und siebentägige Kultivierung mononukleärer Zellen aus Buffy Coat standen zu Beginn des Versuchsprotokolls. Am Tag vier erfolgte ein Wechsel des Nährmediums. Am Tag sieben wurden die kultivierten MNC in drei Versuchsbedingungen aufgetrennt. „Mn-SOD-siRNA“ waren EPC, die nach Kultivierung mit 17,5 pmol siRNA, welche sequenzspezifisch mit SOD-2-mRNA interferiert, transfiziert wurden. Die gewählte siRNA-Menge von 17,5 pmol wurde in einem frühen Transfektionsmodell etabliert, in dem sich eine Reduktion der Mangan-SOD-Expression um etwa 70 % gegenüber nativen EPC erreichen ließ (Abschnitt 5.1). Durch den Mechanismus der RNA-Interferenz erfolgte nun ein vermehrter Abbau der Mn-SOD-mRNA-Moleküle bei synchronem Verbrauch bereits produzierter Mn-SOD-Proteine.

Die zweite Bedingung, als „Ns-siRNA“ bezeichnet, repräsentierte EPC, welche mit nicht-sequenzspezifischer siRNA transfiziert wurden. Diese sollte den Einfluss des Transfektionsvorgangs unabhängig von RNA-Interferenzmechanismen aufhellen, um dessen Einfluss auf die Messergebnisse zu relativieren.

„Nativ EPC“ verkörperten nach Schema kultivierte EPC, welche nicht transfiziert wurden. Da die Transfektion per se einen Zellstress mit konsekutiver ROS-Bildung und partieller Apoptose bewirkt (Zellmortalität um 30 %), konzentrierten sich die Funktionsmessung auf den Vergleich zwischen den beiden Bedingungen „Mn-SOD-siRNA“ und „Ns-siRNA“. Nicht transfizierte EPC (Nativ EPC) wurden aus diesem Grund für die Funktionsmessungen nicht berücksichtigt, sondern fanden in der Dokumentation der Mn-SOD-Expressionskontrolle Verwendung. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank wurden Mn-SOD-defiziente EPC im Vergleich mit unspezifisch transfizierten EPC hinsichtlich der Parameter ROS-Menge, Apoptose und Migration analysiert.

Diese Funktionsuntersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, welche Konsequenzen eine Mn-SOD-Defizienz hinsichtlich intrazellulärer Radikalgenerierung, Zellvitalität und Migrationsfunktion für EPC hat. Die Dokumentation der Mangan-SOD-

Expression erfolgte durch Western Blot von „Nativ EPC“ und „Mn-SOD-siRNA“. Abbildung 16 verschafft eine Übersicht über das Versuchsprotokoll.

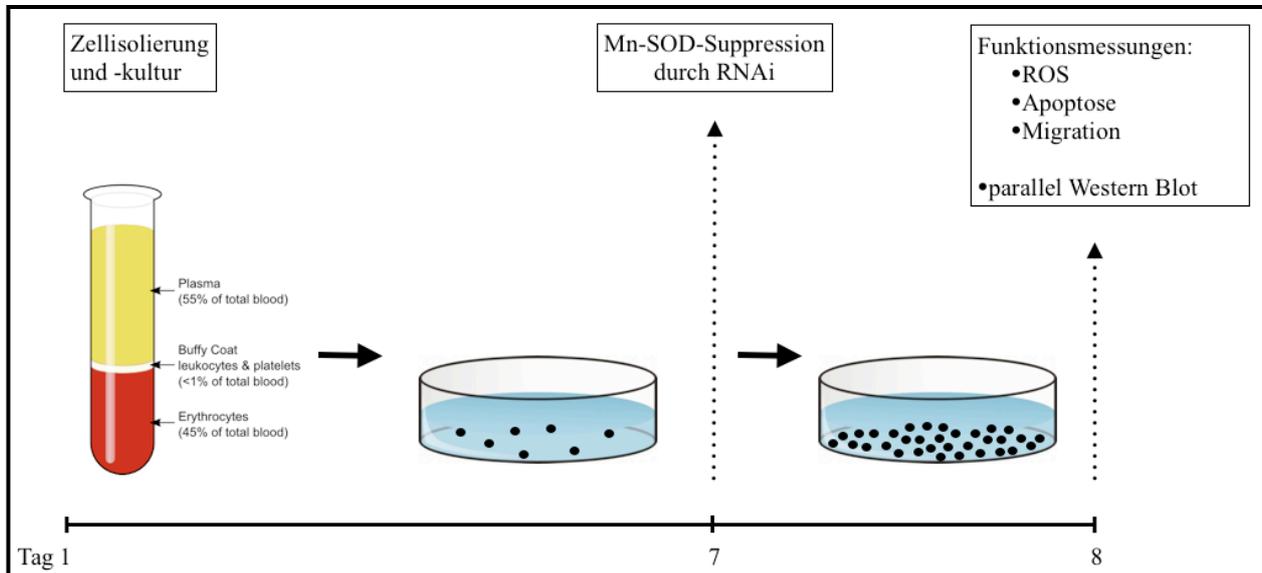


Abbildung 16: Versuchsprotokoll: Der siebentägigen EPC-Kultivierung folgte die Transfektion mit Mn-SOD-spezifischer siRNA. Nach 24 Stunden wurden die Parameter ROS-Menge, Apoptose und Migration untersucht. Die Mn-SOD-Expression wurde mittels Western Blot und Densitometrie kontrolliert.

3.2 Zellisolierung

Zwecks EPC-Isolierung und -Kultivierung stellte das Institut für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin Bonn Buffy-Coat-Beutel zur Verfügung. Isolierung und Kultivierung der mononukleären Zellen (MNC) erfolgte unter sterilen Bedingungen. Physikochemische Grundlage der MNC-Isolierung bildet die Dichtegradientenzentrifugation. Im ersten Schritt wurden in einem 50 ml Falcon-Gefäß 15 ml Buffy-Coat mit sterilem PBS auf 35 ml aufgefüllt („PBS-Blut“). 15 ml Biocoll-Lösung (Biochrom AG, Berlin) wurden in einem zweiten 50 ml Falcon dann mit dem PBS-Blut überschichtet (Gesamtmenge auf 50 ml), anschließend ohne Bremse bei Raumtemperatur und 2400 U/min 20 min lang zentrifugiert (Heraeus megefuge 1.0, DJB Labcare, UK). Dadurch erfolgt eine Trennung der Blutbestandteile. Während Erythro- und Granulozyten rasch mit dem Biocoll-Polymer Polysucrose aggregieren und am Gefäßboden sedimentieren, verbleiben MNC in einem schmalen mittelständigen Teppich und bilden die Interphase.

Diese befindet sich zwischen darüber liegendem Blutplasma und dem darunter liegendem Polysucrose-Zellsediment. Nun wurde die Interphase mit MNC in ein neues 50 ml Falcon überführt und erneut mit sterilem PBS auf 50 ml aufgefüllt. Es erfolgte eine zehn-minütige Zentrifugation mit abschließender Bremsaktivierung bei Raumtemperatur und 2000 U/min. Auf diese Weise sollten Verunreinigungen durch Thrombozyten minimiert werden. Nach Verwerfen des PBS-Überstandes wurde das Zellsediment (Pellet) mit sterilem PBS resuspendiert und auf 50 ml aufgefüllt. Es erfolgte eine dritte Zentrifugation mit gleicher Kalibrierung wie die zweite. Schließlich wurde der Überstand des Falcons verworfen und das Pellet in 2,5 ml EBM-2 resuspendiert und homogen gelöst.

3.3 Zellkultur

Die isolierten MNC wurden zu gleichen Teilen für sieben Tage auf fibronectin-beschichteten (Sigma-Aldrich, USA) Kulturschalen (TPP, Schweiz, Durchmesser 10 cm) in Endothelzellmedium kultiviert. Dafür wurde EBM-2 (Lonza, USA), supplementiert mit EGM-2 MV Singlequots (Lonza, USA), eingesetzt. Letzteres enthielt fetales Rinderserum, Hydrocortison, humanen FGF, VEGF, IGF-1, Ascorbinsäure, humanen EGF sowie Gentamicin. Pro Kulturschale wurden 10 ml EBM-2 (35 °C, Wärmebad) verwendet. Am vierten Tag wurde der Überstand, bestehend aus nicht-adhären Zellen, Zelldetritus und verbrauchtem Medium verworfen und mit neuem EBM-2 (10 ml, 35 °C) aufgefüllt. Die Zuordnung als EPC erfolgte erstens morphologisch (kolonieforme Prolifere, typische Zellcharakteristika), zweitens funktionell (diLDL-Aufnahme). Nach sieben Tagen wurde die Anzahl der isolierten MNC mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Superior, Marienfeld, Deutschland) mikroskopisch ermittelt (Axiovert 40, Zeiss, Deutschland). Abbildung 17 ist eine exemplarische Aufnahme auf diese Weise kultivierter EPC und veranschaulicht die zelltypische Morphologie.

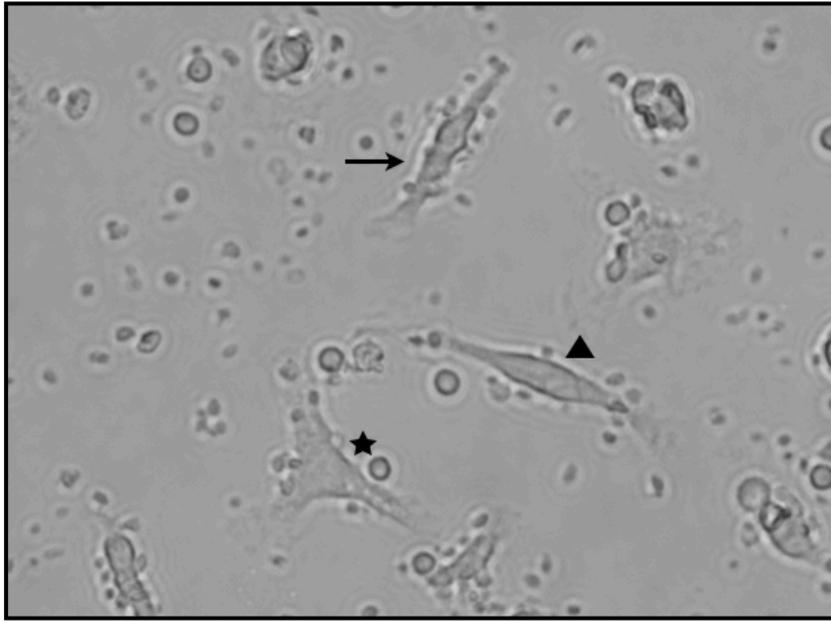


Abbildung 17: Aufnahme von EPC sieben Tage nach Kultur (Axiovert 200M, Zeiss, Deutschland). Hier geben sich typische Wachstumscharakteristika zu erkennen: Spindelzellform (Dreieck), die Bildung von Netzwerkstrukturen (Stern) sowie Zellsäulen (Pfeil).

3.4 Transfektion und RNA-Interferenz

Im Jahre 2006 erhielten Andrew Fire und Craig Mello den Nobelpreis für Medizin und Physiologie für ihre Entdeckung und Entschlüsselung der RNA-Interferenz (RNAi) (Fire et al., 1998). Dabei handelt es sich um einen evolutionsbiologisch früh entstandenen Mechanismus der Abwehr exogener genetischer Elemente (Waterhouse et al., 2001), der auf alle Reiche eukaryoter Organismen, einschließlich Pilze, Pflanzen und Tiere verbreitet ist. Später kam die Funktion für die Genregulation z.B. im Rahmen der Morphogenese hinzu. In Abbildung 18 sind die einzelnen Schritte dieses Regulationsmechanismus veranschaulicht (McManus und Sharp, 2002). Doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA), entweder aus zelleigenen RNA-kodierenden Genen (microRNA) oder zellfremden Quellen (Retrotransposons oder Viren), werden durch die zytoplasmatische Endoribonuklease Dicer gebunden und auf eine Größe von 20 bis 25 Nukleotide gekürzt. An beiden 3'-Enden befindet sich ein Basenüberhang von zwei Nukleotiden. Diese Moleküle werden als „small interfering RNA“ (siRNA) bezeichnet. Die

siRNA-Moleküle sind Substrat eines Multienzymkomplexes, der den Namen „RNA-induced silencing complex“ (RISC) trägt. Von diesem werden sie erkannt, entwunden und mittels Argonaut-Ribonukleasedomäne in zwei Einzelstrang-RNA-Moleküle (ssRNA) separiert. Das freie ssRNA-Molekül wird entweder durch zytosolische Ribonukleasen abgebaut oder trägt in einem Amplifizierungsmechanismus zur Generierung zusätzlicher siRNA-Moleküle bei. Das zweite ssRNA-Molekül integriert sich in RISC und fungiert nun als Gegenstrang für diejenige zytosolische mRNA, welche eine korrespondierende Basensequenz aufweist. Kommt es zu einer Bindung dieser Ziel-mRNA (Hybridisierung), erfolgt, je nach Grad der Sequenzkomplementarität, eine Spaltung der mRNA in

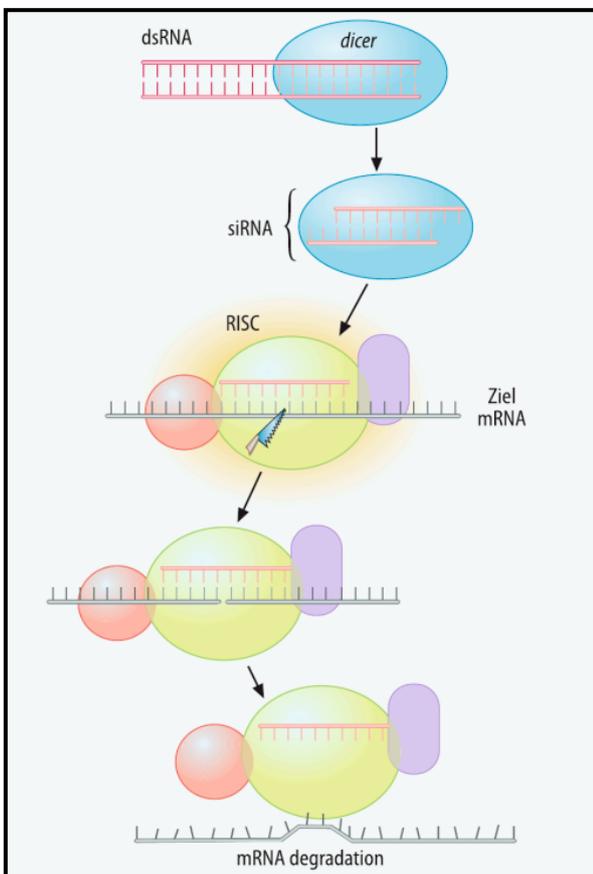


Abbildung 18: Suppression eines Gens durch RNA-Interferenz (nach Montenahr, 2007).

zentraler Position (vollständig komplementäre Sequenz) oder eine Translationsblockade ohne mRNA-Degradation (unvollständige Sequenzkomplementarität). Entstehende mRNA-Fragmente werden als aberrant erkannt und durch unspezifische Ribonukleasen degradiert. Dies verhindert die Proteinsynthese der gespaltenen Ziel-mRNA und unterbricht den Informationsfluss zwischen Transkription und Translation. Die Expression des mRNA-Quellgens ist damit temporär gehemmt. Man spricht von einem „Genknockdown“. Die RNA-Interferenzmaschinerie arbeitet dabei hochspezifisch. Der aktivierte siRNA-RISC-Komplex ist enzymatisch aktiv und wird während der Reaktion nicht verbraucht. Somit kann ein siRNA-RISC-Komplex zahlreiche Ziel-mRNA-Moleküle spalten.

Der Hemmeffekt auf Proteinebene kann dabei unterschiedliche Ausmaße annehmen. Abhängig von der Effizienz der zellulären RNA-Interferenz-Maschinerie und Einfluss anderer Genregulationsfaktoren sind von einer nicht messbaren mRNA-Verringerung

ohne Reduktion der Proteingesamtmenge bis zum vollständigen Proteinsyntheseblock alle Abstufungen möglich. Bereits synthetisiertes Protein wird nicht angegriffen. Um eine effektive Suppression der Proteinfunktion zu erzielen, bedarf es nach Translationshemmung einem Zeitfenster, in dem das entsprechende Protein „aufgebraucht“ wird. Die intrazelluläre Translokation von siRNA wurde mit dem Nucleofector 2 Device und dem Human Monocyte Nucleofector Kit, Version 2.3 (jeweils von Lonza, USA) realisiert. Es verwendet den Mechanismus der Elektroporation, bei dem die Zellmembran durch zelltypspezifische Spannungsimpulse für Ribonukleinsäuren permeabel gemacht wird (Tsong, 1991). Die doppelsträngige siRNA ist spezifisch für MnSOD-mRNA und wurde von Eurofins MWG GmbH (Deutschland; Charge: 9789086) mit nachfolgender Sequenz synthetisiert (Leitstrang): 5' GGC CUG AUU AUC UAA AAG CUU TT 3'. Die unspezifische siRNA als Kontrollbedingung wurde mit folgender Sequenz (Leitstrang) synthetisiert: 5' UAA UGU AUU GGA ACG CAU ATT 3'. In einer Reaktionsküvette fanden sich pro Bedingung je 17,5 pmol siRNA und durchschnittlich $7,55 \times 10^6$ EPC inklusive Transfektionsmedium (Nucleofector solution, Lonza, USA) zu einem Gesamtvolumen von 100 μ l zusammen. Analog zu anderen Arbeiten zum Thema, betrug die siRNA-Konzentration pro Transfektionsküvette 175 nmol/l (Li et al., 2006b). Die Transfektionseffizienz wird vom Hersteller im Mittel mit 55 % bemessen, die Zellvitalität liegt bei durchschnittlich 70 % (Lonza, 2009). Anschließend erfolgte der Transfer der EPC in Zellkulturtestplatten und die weitere Inkubation für 24 Stunden im Brutschrank. Für den Western Blot wurden pro Bedingung jeweils eine Kammer einer 6-Well-Platte verwendet (TPP, Schweiz; fibronektinbeschichtet, 1 ml EBM-2/Kammer), für die Apoptosemessung jeweils eine 96-Well-Platte (TPP, Schweiz; 200 μ l EBM-2/Kammer) und für die Migrationsmessung eine 24-Well-Platte mit einem Mikrofilterkorbchen (BD Falcon HTS Fluoroblok inserts) pro Kammer. Es wurden 1×10^4 EPC pro Bedingung und Kammer für die Apoptosemessung verwendet. Für die ROS-Bestimmung wurden $3-5 \times 10^6$ EPC auf fibronektin-beschichteten (Sigma-Aldrich, USA) Kulturschalen (TPP, Schweiz; Durchmesser 6 cm, 5 ml EBM-2/Schale) ausgesät und entsprechend für 24 Stunden inkubiert.

3.5 Dichlorfluoresceinmessung

Zur Bestimmung der Präsenz intrazellulärer ROS wurde 2',7'-Dichlordihydrofluoresceindiacetat (H2-DCF-DA) eingesetzt. Hydrophobes H2-DCF-DA penetriert die Zellmembran, wird durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert und schließlich durch ROS zum fluoreszierenden 2',7'-Dichlorfluorescein oxidiert. Das Fluoreszenzsignal verhält sich proportional zur intrazellulären ROS-Konzentration (LeBel et al., 1992). Nach Anlegen der Versuchsbedingungen erfolgte eine 24-stündige Inkubation im Brutschrank. Im nächsten Schritt schloss sich das Absaugen des Überstandes und die einmalige Waschung mit 2 ml E1-Puffer an. Daraufhin wurden pro Kulturschale erneut 2 ml E1-Puffer zusammen mit 5 µl H2-DCF-DA zugegeben und für 30 min im Brutschrank inkubiert. Währenddessen wurde auf eine Lichtabdeckung der Kulturschalen geachtet. Nach Inkubation wurde der Überstand abgesaugt, die Schale zweimalig mit 2 ml E1-Puffer gewaschen und letztmalig mit 2 ml E1-Puffer versehen. Schließlich wurde die mikroskopische Messung im FITC-Kanal (10fache Vergrößerung, Aufnahme von drei Gesichtsfeldern; Zeiss Axiovert 200M mit Axio Cam MRM) mit einer Belichtungszeit von zehn Sekunden durchgeführt. Auf diese Weise vollzogen sich nacheinander die DCF-Messungen aller Versuchsbedingungen. E1-Puffer wurde zusammengestellt aus: 7,89 g NaCl, 0,49 g KCl, 0,265 g CaCl₂, 0,203 g MgCl₂, 1,98 g Glucose und 5,21 g Na-Hepes auf 1 l sterilem H₂O (pH auf 7,5 titriert).

3.6 Apoptosemessung

Apoptische Zellen sind durch charakteristische morphologische und biochemische Eigenschaften gekennzeichnet. Dazu gehören die Auflösung des Nukleoskeletts sowie die DNA-Fragmentierung durch caspase-aktivierte Endonukleasen (Kumar et al., 2008). Diese schneiden doppelsträngige DNA internukleosomal und hinterlassen regelmäßige, etwa 180 bp lange Fragmente. Diese bestehen aus histonhaltigen Mono- oder Oligonukleosomen und anhängenden kurzen DNA-Fäden (Arends et al., 1990). Die Anreicherung von Nukleosomstrukturen im Zytoplasma apoptischer Zellen liegt darin begründet, dass sich die apoptose-assoziierte DNA-Degradation mehrere Stunden vor

dem Untergang der Zellmembran ereignet. Zur Apoptosemessung wurde der Cell Death Detection ELISA^{PLUS} von Roche (Version April 2006, Mannheim, Deutschland) mitsamt enthaltener Reagenzien verwendet. Der Test beinhaltet eine enzymgekoppelte Immunoabsorptionsmessung und beruht auf zwei spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen mit anschließender immunfluoreszierender Visualisierung. Anti-Histon-Biotin-Antikörper sowie Anti-DNA-Peroxidase-Antikörper wurden jeder Bedingung zugefügt. Durch den antikörpergetragenen Nachweis von freien Histon- bzw. DNA-Strukturen gelingt ein sensitiver wie auch spezifischer Nachweis apoptotischer Zellen, womit der Validität Rechnung getragen wird. Es schloss sich eine Inkubationsperiode von zwei Stunden bei 37 °C an, in der DNA und nukleosomale Histonproteine mit diesen Antikörpern reagierten. Anschließend wurde der Bindungskomplex an einer streptavidin-beschichteten Innenseite der Mikroplatte durch den Biotinhang gebunden und immobilisiert. Nun folgte die Entfernung ungebundener Komponenten (Antikörper, vitale Zellen und Zelldetritus) durch dreimaliges Waschen mit 250 µl Inkubationspuffer. Durch Zusatz eines Peroxidase-Substrates (ABTS-Lösung) erzeugten anti-DNA-gebundene Peroxidase-Antikörper eine Farbreaktion. Diese Reaktion verhält sich proportional zur enthaltenen DNA- bzw. Nukleosomenmenge und lässt sich photometrisch messen. Auf diese Weise können qualitative und quantitative Aussagen über DNA-Degradation und Apoptoserate getroffen werden. Zusätzlich wurde eine Positiv-Kontrolle durch im Kit mitgelieferte DNA-Histon-Komplexe vorgenommen. Im Kit enthaltener Inkubationspuffer anstelle von Zellen diente als Negativ-Kontrolle. Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden nach Transfektion 1×10^4 EPC jeder Bedingung in jeweils 200 µl EBM-2 pro Kammer in einer 96-Well-Platte (TPP, Schweiz) für 24 Stunden inkubiert. Jede Bedingung wurde doppelt analysiert und der Mittelwert als Ergebnis verwendet. Versuchsreihen, die einen auf ≥ 10 % veranschlagten Grenzwert der Negativkontrolle erreichten, wurden ausgeschlossen.

Das Arbeitsprotokoll sah wie folgt aus:

- Zentrifugation bei 1500 U/min und Raumtemperatur für 10 min; Überstand danach abpipettieren

- Pellet in 200 µl Lysepuffer vorsichtig lösen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Zentrifugation für 10 min, 1500 U/min, Raumtemperatur
- je 20 µl des Überstandes in ein streptavidin-beschichtetes Well der Mikroplatte (im Kit enthalten) geben; Positiv-Kontrolle: 20 µl DNA-Histon-Komplex aus dem Kit; Negativ-Kontrolle: 20 µl Inkubationspuffer
- 80 µl Immunoreagenz (Anti-Histon-Biotin-Antikörper, Anti-DNA-POD-Antikörper) pro Well hinzugeben und mit Adhäsivfolie (Kit) verschließen
- Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur
- Überstand verwerfen und dreimal mit 250 µl Inkubationspuffer pro Well waschen
- 100 µl ABTS-Lösung pro Well hinzugeben und lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 10 bis 15 min inkubieren (bis deutliche Verfärbung eintritt)
- 100 µl ABTS-Stop-Lösung hinzugeben
- Messung bei 405 nm; Referenzmessung bei 490 nm

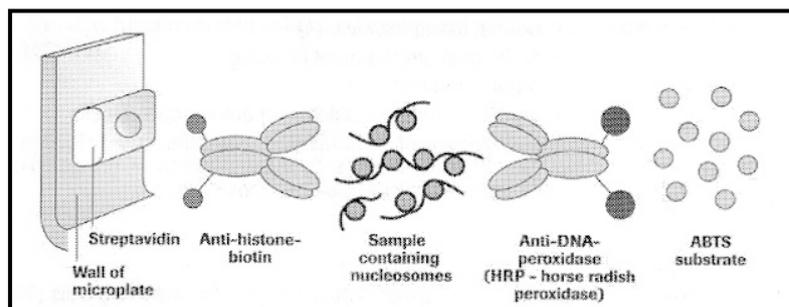


Abbildung 19: Testprinzip des Cell Death Detection ELISA^{Plus}. DNA-Nucleosom-Fragmente werden randständig gebunden (links) und anschließend über eine antikörper-vermittelte Peroxidase-reaktion (rechts) visualisiert (aus Roche, 2006).

3.7 Bestimmung der Migrationsfähigkeit

Zur Analyse des Migrationspotentials wurde ein Boyden-Kammer-Test verwendet. Das Prinzip basiert auf einer chemokingesteuerten Migration durch zwei untereinanderliegende Kompartimente, welche durch eine mikroporöse Membran getrennt sind. Die Zellen werden in das obere Kompartiment ausgesetzt und haben die Möglichkeit durch den Mikrofilter in das untere Kompartiment, welches ein zellspezifisches Chemokin beinhaltet, zu migrieren. Nach einem definierten Zeitfenster erfolgt eine Quantifizierung der nach Kompartiment B gewanderten Zellen mittels Fixierung, Färbung und fluoreszenzmikroskopischer Auszählung. Entscheidende Determinanten des Tests sind Zellzahl, Porengröße, Konzentration der chemoattraktiven Substanz und die Inkubationszeit. Für die Migrationsuntersuchung wurden Körbchen (BD Falcon HTS Fluoroblok, 24-well inserts), Kompartiment A entsprechend, in die Kammern einer 24-Well-Platte (TPP, Schweiz), Kompartiment B, gehängt. Im Boden des Körbchens befand sich der Polyethylenterephthalat-Mikrofilter, der mit einer kreisrunden Oberfläche von 32,17 mm² und einer Porengröße von 8 µm (entspricht einer Porendichte von 1 x 10³ pro mm²) den Zellen eine Transmigration von Kompartiment A nach B mechanisch ermöglichte. Vor Verwendung wurden die Filterunterseite mit Fibronectin (Sigma-Aldrich, USA) beschichtet. Nach Kultivierung und Transfektion wurden im Mittel jeweils 6,16 x 10⁵ EPC jeder Bedingung pro Mikrofilterkörbchen (Kompartiment A) in 300 µl EBM-2 suspendiert. Jede Kammer (Kompartiment B) wurde mit 800 µl EBM-2, gelöst mit 80 ng SDF-1 (rhSDF-1 alpha, Immuno Tools, Deutschland) als chemotaktisch wirksame Substanz (entspricht einer Konzentration von 100 ng/ml), versehen. Nach einer Inkubationsperiode von 24 Stunden schloss sich folgendes Arbeitsschema für jede Kammer an:

- Absaugung des Überstandes in beiden Kompartimenten
- Ausbau der Mikrofilterkörbchen
- Überführung von 300 µl EBM-2 plus 5 µl diacetyliertem LDL in jede Kammer (Cell Systems, Deutschland), anschließend Mikrofilterkörbchen wieder einhängen
- Inkubation für 75 min bei 37 °C

- Absaugung des Überstandes, einmalige Waschung mit PBS
- Fixation mit 2 % Formaldehyd, pro Kammer 300 μ l, 10 min bei 37 °C
- Waschung mit PBS (einmal)
- Beachtung des Lichtschutzes

Als letzter Arbeitsschritt wurde zunächst für jede Bedingung ein Deckgläschen mit einem Tropfen DAPI (Vectashield, USA, Mounting Medium with DAPI) beschickt. Nachdem die fixierten Mikrofilter mit einem Skalpell zirkulär randständig ausgeschnitten worden sind, wurden diese mit der Unterseite zur DAPI-Lösung auf das Deckgläschen gelegt und auf einem Objektträger zur mikroskopischen Begutachtung vorbereitet. Der Mikrofilterunterseite anhaftenden Strukturen wurden auf diese Weise als kernhaltig (DAPI-Reaktion) bzw. diLDL-aufnehmend charakterisiert.

3.8 Western Blot

Für den Western Blot wurde der Überstand 24 Stunden nach Transfektion verworfen und die adhärennten Zellen mit sterilem PBS einmalig gesäubert. Dann wurden 200 μ l eines Akt-Lysepuffers pro Kammer eingesetzt, um die Zellen in Lösung zu bringen. Der Lysepuffer wurde aus nachstehenden Substanzen zusammengestellt (für 50 ml Gesamtmenge): 0,4925 g Tris-HCL (62,5 mmol, pH 6,8), 10 ml 10 % SDS, 5 ml 10 % Glycerol, 2,5 ml 1 M DTT, 0,005 g Bromphenolblau, 10 μ l/ml Aprotinin, 10 μ l/ml Leupeptin und 10 μ l/ml 100 mmol PMSF, Rest H₂O. Es folgte das Abkratzen mit einem Zellschaber und anschließendes Abpipettieren in Eppendorfgefäße. Nach quantitativer Proteinbestimmung (Spectrophotometer DU-640, Beckman-Coulter, USA) wurden 50 μ g Gesamtprotein mit 15 μ l Ladepuffer in einem 5 %-Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamidsammeln geladen und in einem 12 %-Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamidgel unter Verwendung einer Standard-Elektrophorese-Apparatur (BIO-RAD, Power Pac Basic, USA) bei 120 V und Raumtemperatur aufgetrennt (ca. 90 min; SDS-PAGE). Anschließend wurden die Proteine für 60 min bei 350 mA auf eine Nitrozellulosemembran (Whatman Protran, USA) übertragen (Elektroblot). Zur Vermeidung einer Proteindenaturierung durch Hitze wurde die Apparatur mit Eis gekühlt. Der Transfer

wurde bei 4 °C unter Verwendung einer Tankblot-Apparatur (BIO-RAD, Hercules, USA) mit Blotpuffer durchgeführt. Sodann wurde der Mn-SOD-haltige Membranteil für 60 min bei Raumtemperatur in 5 ml Trockenmilch-TBS-Puffer (5 %) bei kontinuierlicher Durchmischung (Elmi-Intelli-Mixer RM-2M, USA) inkubiert. Dieser Schritt dient der Absättigung von freien Bindungsstellen von Kunststoffoberflächen oder anderen proteinbindenden Oberflächen zur Reduktion von unspezifischen Bindungen an die Oberfläche. In gleicher Weise wurde die zweite Membranhälfte in 2,5 % BSA geblockt. Zwecks Überprüfung des Proteintransfers wurde eine Ponceau-S-Färbung durchgeführt. Als Ladungskontrolle für den Western-Blot wurde die GAPDH ausgewählt, ein Protein der Glykolyse, welches gleichmäßig, konstitutiv sowie in großen Mengen synthetisiert wird (Haushaltsgen). Es soll außerdem transfektionsbedingte Expressionschwankungen identifizieren. Im nächsten Schritt vollzog sich die primäre Antigen-Antikörper-Reaktion. Dafür wurde Mn-SOD-Membran mit 5 µl eines monoklonalen Mn-SOD-Antikörpers (Eurofins, Deutschland; entspricht einer Verdünnung von 1/1000) für zwölf Stunden bei 4 °C unter ständiger Durchmischung inkubiert. Die GAPDH-Membran wurde mit 1,667 µl eines monoklonalen GAPDH-Antikörpers (HyTest Ltd., Finnland, Verdünnung 1/3000) entsprechend inkubiert. Dann folgte das viermalige Waschen der Membran mit TBS-Tween (Mn-SOD-Membran) bzw. PBS-Tween (GAPDH-Membran) für jeweils 10 min. Es schloss sich die Inkubation mit Anti-Maus- (GAPDH) bzw. Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper an (Mn-SOD) (Anti-mouse-IgG, Santa Cruz, USA; Verdünnung 1/4000 in PBS; Anti-rabbit IgG, Sigma-Aldrich, USA; Verdünnung 1/3000 in TBS). Diese wurde unter Raumtemperatur auf dem Schüttler für 60 min durchgeführt. Nun erfolgte eine zweite Waschung analog der ersten (viermal 10 min). Schließlich wurden die Membranen in einer ECL-Lösung (ECL plus western blotting detection system, GE Healthcare, UK) für 60 Sekunden inkubiert, auf einer Röntgenfolie geklebt und entwickelt. Zwecks Quantifizierung der realen Mn-SOD-Reduktion wurde die Signale von GAPDH und Mn-SOD densitometrisch ausgewertet und deren Ratio gebildet. Im Vergleich mit der konstitutiv exprimierten GAPDH konnten hierdurch eine unspezifische Expressionshemmung sowie Unterschiede in Proteinladung aufgedeckt werden.

3.9 Datenverarbeitung und Statistik

Die Datenverarbeitung, deskriptive statistische Beschreibung wie auch die Beurteilung der Signifikanzstufen wurden mithilfe der Software SPSS Statistics (Version 17.0, IBM, USA) vorgenommen. Die Signifikanzniveaus (p) wurden mittels zweiseitigem Einstichproben-t-Test berechnet und nachstehend definiert:

- $p > 0,1$: keine Signifikanz (n.s.)
- $p \leq 0,1$: schwache Signifikanz
- $p \leq 0,05$: Signifikanz
- $p \leq 0,01$: starke Signifikanz
- $p \leq 0,001$: höchste Signifikanz

4 Ergebnisse

4.1 Regulation der Mn-SOD-Expression in EPC durch RNA-Interferenz

Als Grundlage der Versuchsdurchführung musste im ersten Schritt eine effektive Reduktion der Mn-SOD-Expression in EPC erzielt werden. Dazu wurden nach Isolierung und Kultivierung einmalig an Tag sieben folgende fünf EPC-Bedingungen angelegt:

- Die erste EPC-Population wurde nicht transfiziert und diente als Kontrolle (Nativ EPC).
- Um die geeignete siRNA-Konzentration für eine effektive Reduktion der Mangan-SOD-Expression zu finden wurden drei EPC-Kulturen mit 8,75, 17,5 bzw. 35 pmol Mn-SOD-mRNA-sequenzspezifischer siRNA transfiziert.
- Eine zusätzliche EPC-Population wurde mit 17,5 pmol einer nicht-sequenzspezifischen siRNA (Ns-siRNA) transfiziert.

Vom Hersteller wird eine siRNA-Menge von 3 bis 30 pmol bei 3×10^6 bis 1×10^7 Zellen pro Transfektionsvorgang empfohlen (Optimized protocol for human monocytes, Version 2009, Lonza, USA). Jede Bedingung bestand hier und in späteren Versuchreihen im Mittel aus $7,58 \times 10^6$ (SEM = $0,6 \times 10^6$) EPC. Nach einem Zeitfenster von 24 Stunden wurde eine semiquantitative Proteinbestimmung mittels Western Blot und anschließender Densitometrie durchgeführt (Abschnitt 4.8). Der densitometrische Wert der Bedingung „Nativ EPC“ wurde als 100 % festgesetzt und diente als Referenz. EPC, transfiziert mit 8,5 pmol Mn-SOD-spezifischer siRNA, zeigten eine Mn-SOD-Restmenge von 57,16 %. EPC, transfiziert mit 17,5 bzw. 35 pmol, hatten eine Restmenge von 28,90 bzw. 21,29 %. Somit wurde eine dosisabhängige Reduktion der Mangan-SOD-Expression nach 24-stündiger Inkubation erreicht. Mit 17,5 pmol Mn-SOD-spezifischer siRNA konnte demnach eine Reduktion des Mangan-SOD-Gehaltes um etwa 70 % erzielt werden. Der dazugehörigen Western Blot ist in Abbildung 20 abgebildet.

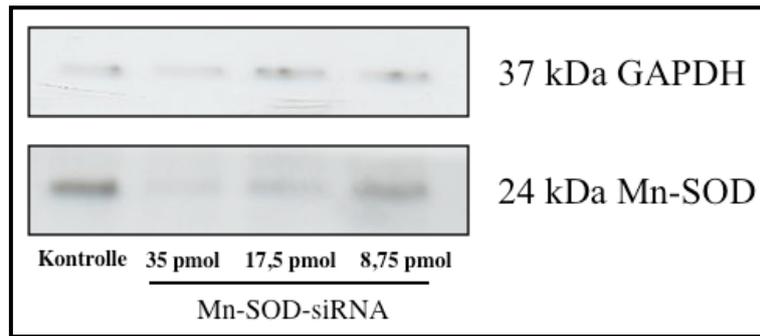


Abbildung 20: Oben: GAPDH-Signal bei 37 kDa. Unten: Mn-SOD-Signal bei 24 kDa. Von links nach rechts: Bande eins: Nativ EPC ohne Transfektion (Kontrolle), Bande zwei bis vier: EPC, transfiziert mit 35, 17,5 bzw. 8,75 pmol Mangan-SOD-siRNA; 24 Stunden nach Transfektion.

Die Transfektion mit unspezifischer siRNA (Ns-siRNA) ergab eine Mn-SOD-Restmenge von 55,92 % (nicht dargestellt). Die densitometrische Auswertung des Mn-SOD-Signals von obigem Western Blot illustriert nachstehendes Diagramm.

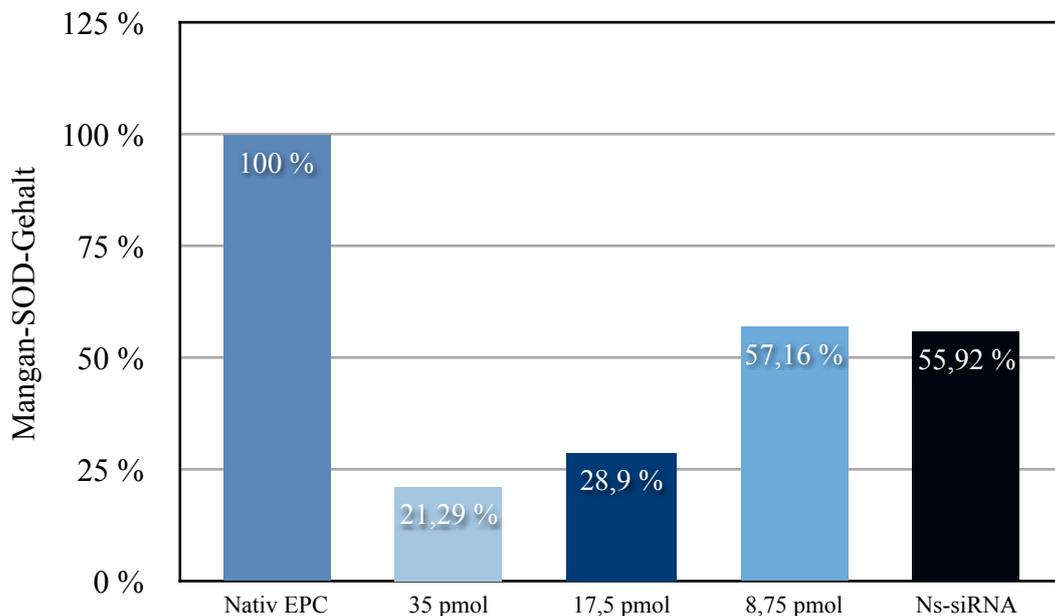


Abbildung 21: Densitometrische Auswertung von Western Blot in Abb. 20 (N=1).

Es deutet auf eine dosisabhängige Expressionsminderung der Mn-SOD 24 Stunden nach Transfektion mit 35, 17,5 und 8,75 pmol spezifischer siRNA hin. Die größte Mn-SOD-Reduktion wurde mit 35 pmol siRNA erreicht, die geringste mit 8,75 pmol. Mit

unspezifischer siRNA behandelte EPC zeigten eine Mn-SOD-Restmenge von etwa 56 %. Auf Grundlage dieser Ergebnisse und unter Berücksichtigung des vom Hersteller empfohlenen Mengenbereiches wurden alle folgenden Transfektionen mit einer siRNA-Menge von 17,5 pmol pro Bedingung durchgeführt (inklusive der unspezifischen siRNA). Der Gehalt der Mangan-SOD wurde für die Funktionsmessungen von ROS, Apoptose und Migration parallel mittels Western Blot und Densitometrie entsprechend dokumentiert. Die Reduktion der Mn-SOD-Menge der Bedingungen „Nativ EPC“ und „Mn-SOD-siRNA“ für alle nachfolgenden Versuchsreihen veranschaulicht Abbildung 22.

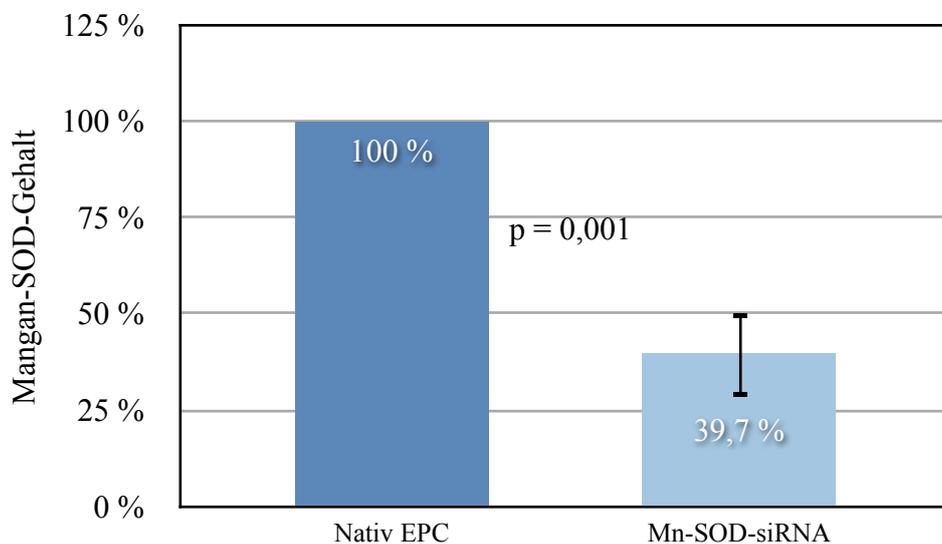


Abbildung 22: Der durchschnittliche Mangan-SOD-Gehalt in untransfizierten (Nativ EPC) und mit spezifischer siRNA-transfizierten EPC (Mn-SOD-siRNA) für alle Versuchsreihen (N=8). Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Gemessen mittels Western Blot-Analyse.

Mit diesem erarbeiteten Versuchsprotokoll (Abschnitt 4.1 - 4.4; Abb. 16) gelang es durch RNAi den Mn-SOD-Gehalt in EPC auf durchschnittlich 39,70 % (SEM = 11,00 %) des Ausgangswertes höchst signifikant zu vermindern ($p = 0,001$). Das entspricht einer Proteinreduktion um etwa 60 %.

4.2 ROS-Generierung in Mn-SOD-defizienten EPC

Durch die vergleichende DCF-Untersuchung zwischen „Mn-SOD-siRNA“ und „Ns-siRNA“ konnte die Auswirkung einer isolierten Mn-SOD-Defizienz auf die intrazelluläre ROS-Generierung unter ansonsten gleichen Ausgangsbedingungen analysiert werden (Abschnitt 4.5). Die Bedingung „Ns-siRNA“ wurde als 100 % definiert. Das ROS-Aufkommen Mn-SOD-defizienter EPC (Mn-SOD-siRNA) überstieg diesen Wert im Mittel um 57,95 % (SEM = 19,48 %) (Abb. 23). Die Messwerte befanden sich in schwach signifikanter Kohärenz ($p = 0,059$).

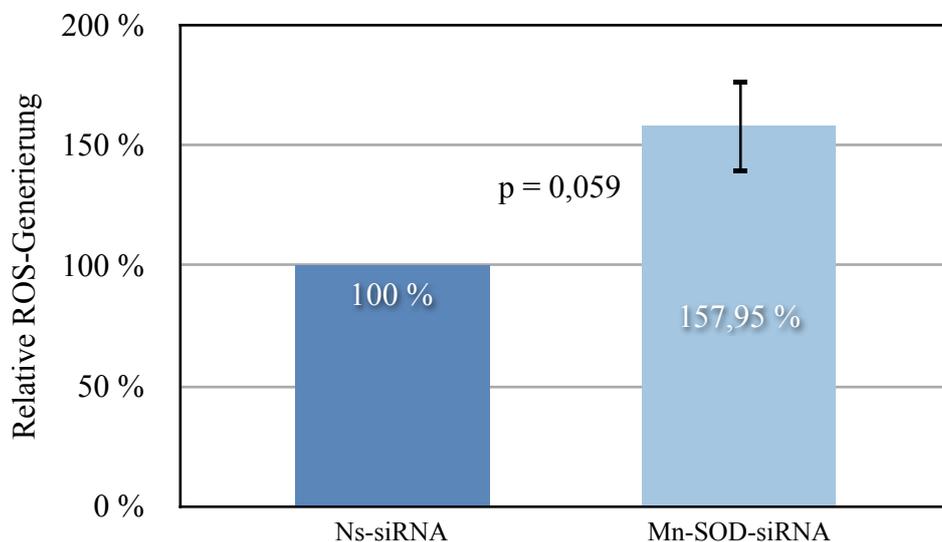


Abbildung 23: Das ROS-Vorkommen Mn-SOD-defizienter EPC (Mn-SOD-siRNA) im Vergleich zu unspezifisch transfizierten EPC (Ns-siRNA). Der Fehlerbalken repräsentiert den SEM (N=4).

Die Effektivität der Transfektion auf die Mn-SOD-Expression während dieser Messungen, im Vergleich zu nativen EPC, demonstriert Abbildung 24. Der Mn-SOD-Gehalt in untransfizierten EPC (Nativ EPC) wurde als 100 % definiert. Es gelang eine spezifische Reduktion der Mn-SOD auf durchschnittlich 55,89 % (SEM = 18,34 %) in schwach signifikanter Weise ($p = 0,095$) umzusetzen. Dies entspricht einer Verminderung des Ausgangswertes um etwa 44 %.

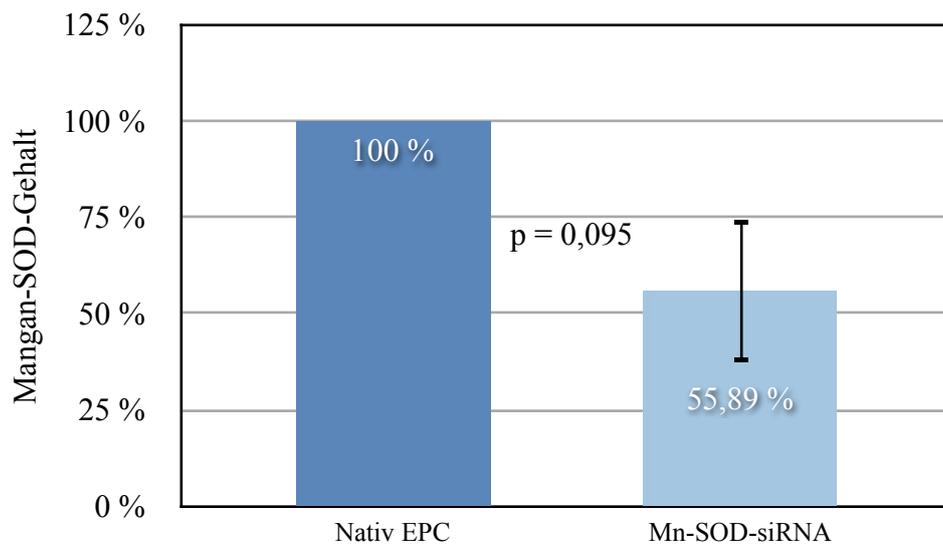


Abbildung 24: Der Mn-SOD-Gehalt während der ROS-Messungen. Der Fehlerbalken repräsentiert den SEM (N=4).

4.3 Apoptose in Mn-SOD-defizienten EPC

Mn-SOD-defiziente EPC (Mn-SOD-siRNA) wurden hinsichtlich ihres Apoptoseverhaltens mit unspezifisch transfizierten EPC (Ns-siRNA) verglichen (Abb. 25). Deren Apoptoserate wurden als 100 % festgelegt. In Relation dazu zeigte die Mn-SOD-defiziente EPC-Population eine Apoptoserate von 92,52 % (SEM = 13,53 %). Die erhobenen Messwerte standen in keinem signifikantem Zusammenhang ($p = 0,61$). Somit konnte kein Unterschied hinsichtlich Vitalität zwischen unspezifisch (Ns-siRNA) und spezifisch transfizierten EPC (Mn-SOD-siRNA) herausgearbeitet werden. Zwecks testinterner Plausibilitätsprüfung erfolgte zusätzlich die Bestimmung einer Positiv- und Negativ-Kontrolle (Abschnitt 4.6). Diese ergab die Werte 113,63 % (SEM = 38,54 %; nicht dargestellt) bzw. 4,91 % (SEM = 0,89 %). Parallel erfolgte die Dokumentation der Mn-SOD-Menge via Western Blot und Densitometrie (Abb. 26).

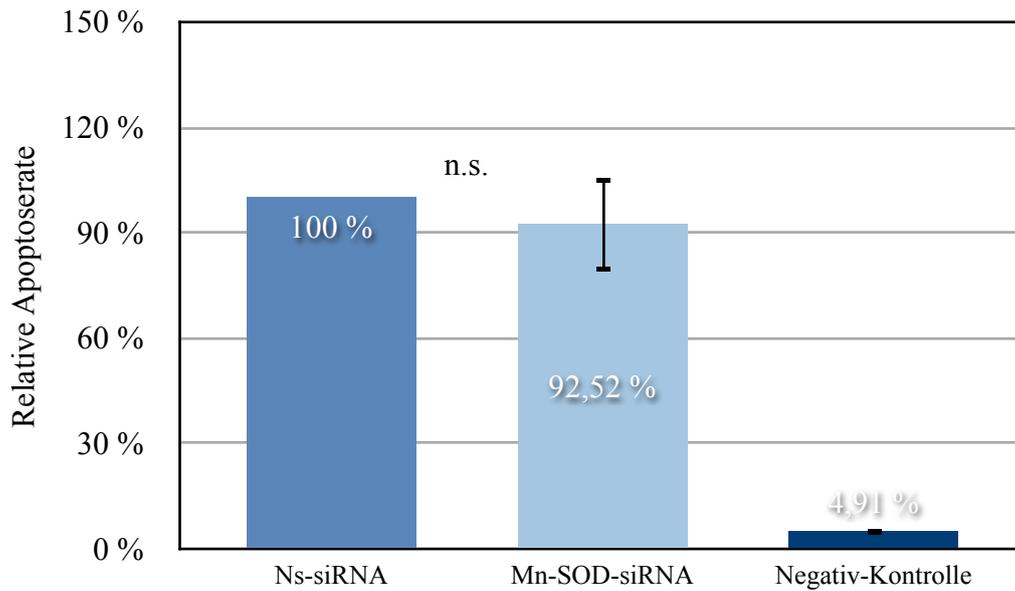


Abbildung 25: Die prozentuale Apoptoserate unspezifisch (Ns-siRNA) und spezifisch transfizierter EPC (Mn-SOD-siRNA). Dazu ist die Bedingung „Negativ-Kontrolle“ dargestellt, die zusammen mit einer Positiv-Kontrolle der Plausibilitätsprüfung der Messwerte dient. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM (N=5).

Der Mn-SOD-Gehalt untransfizierter EPC (Nativ EPC) wurde wiederum als 100 % definiert. Durch Transfektion wurde eine stark signifikante Mn-SOD-Reduktion auf 23,52 % (SEM = 7,34 %; $p = 0,002$), entsprechend einer Verminderung um etwa 76 %, erreicht.

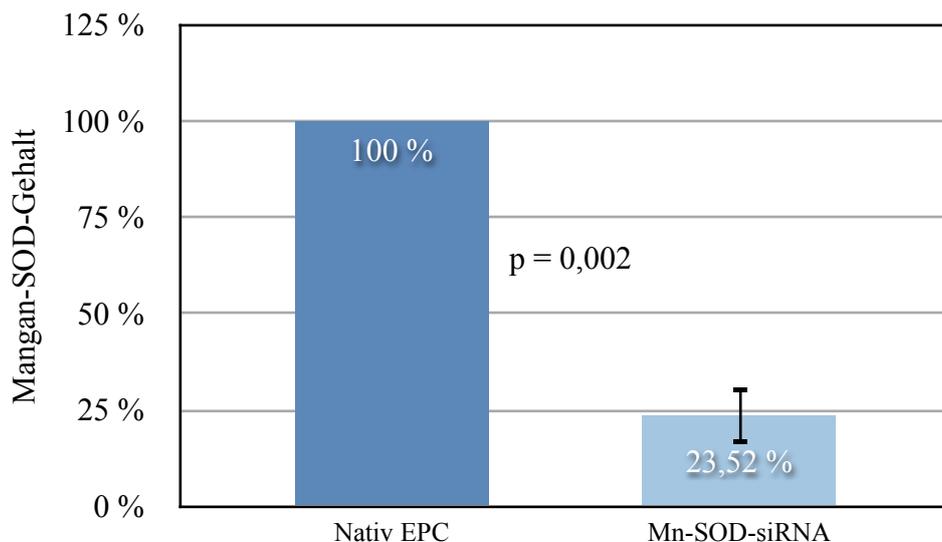


Abbildung 26: Der Mn-SOD-Gehalt während der Apoptosemessungen. Der Fehlerbalken repräsentiert den SEM (N=4).

4.4 Migrationsfähigkeit von Mn-SOD-defizienten EPC

Unspezifisch (Ns-siRNA) und spezifisch transfizierte EPC (Mn-SOD-siRNA) wurden hinsichtlich ihrer Migrationsfähigkeit mit Hilfe einer SDF-1-Chemotaxis in der Boyden-Kammer analysiert (Abschnitt 4.7). Die Migrationsfähigkeit unspezifisch transfizierter EPC (Ns-siRNA), gemessen an der Zellzahl, die sich nach Ablauf von 24 Stunden in Kompartiment B wiederfanden, wurde als 100 % definiert. Mit diesen verglichen ließ sich beobachten, dass Mn-SOD-defiziente EPC (Mn-SOD-siRNA) eine schwach signifikante Einschränkung ihrer Migrationsfähigkeit aufwiesen ($p = 0,074$). Im chemokinenthaltenden Kompartiment B ließen sich nur 43,84 % (SEM = 16,14 %) der Menge an Mn-SOD-defizienten EPC nachweisen, die sich in Mn-SOD-naiven EPC (Ns-siRNA) in Kompartiment B fanden (Abb. 27). Dies entsprach einer Minderung des Migrationspotentials um etwa 56 %.

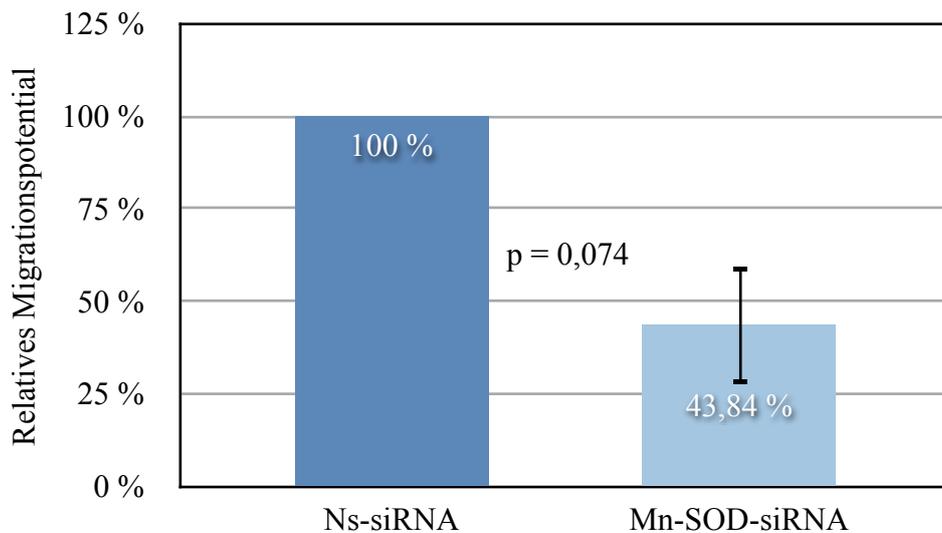


Abbildung 27: Das relative Migrationspotential unspezifisch (Ns-siRNA) und spezifisch transfizierter EPC (Mn-SOD-siRNA) in der Boyden-Kammer. Der Fehlerbalken repräsentiert den SEM (N=3).

Die Migrationsfähigkeit wurde ebenfalls für untransfizierte EPC (Nativ EPC) und für EPC, welche ohne siRNA transfiziert (- siRNA) wurden, untersucht (nicht dargestellt). Die Werte betragen, wieder in Relation zur Bedingung „Ns-siRNA“ (= 100 %), 227,00 % (SEM = 64,37 %; $p = 0,187$) respektive 96,13 % (SEM = 20,28 %; $p = 0,866$),

offenbarten damit keine statistische Signifikanz. Untransfizierte EPC (Nativ EPC) transmigrierten mehr als zweimal so viel durch die Kompartimente. Die Migrationsfähigkeit von leertransfizierten EPC (- siRNA) und unspezifisch transfizierten EPC war annähernd identisch. In gleicher Weise wie zuvor erfolgten parallel die Dokumentation der Mn-SOD-Menge via Western Blot und Densitometrie, wobei jene untransfizierter EPC (Nativ EPC) als 100 % definiert wurde. Durch Transfektion wurde eine stark signifikante Mn-SOD-Reduktion auf 29,48 % (SEM = 6,05 %; $p = 0,007$) desjenigen Wertes, untransfizierter EPC (Nativ EPC) erreicht (Abb. 28). Dies entsprach einer Verminderung des Ausgangswertes um etwa 70 %.

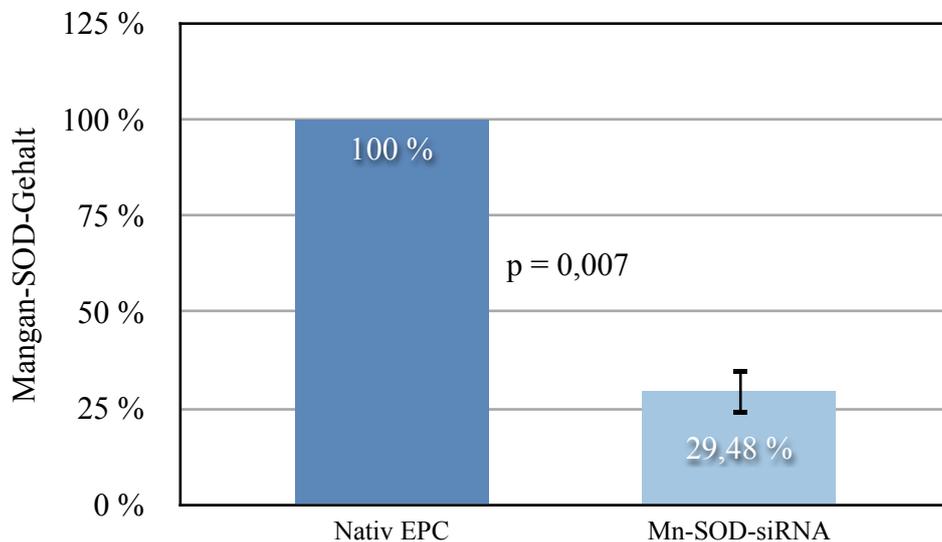


Abbildung 28: Der Mn-SOD-Gehalt während der Migrationsmessungen. Der Fehlerbalken repräsentiert den SEM (N=3).

In Abbildung 29 ist ein repräsentativer Western Blot einer Versuchsreihe zur Migrationsuntersuchung zu sehen. Während untransfizierte EPC (Kontrolle) ein starkes, unspezifisch transfizierte EPC (Ns-siRNA) eine mittelgradiges Mn-SOD-Signal aufwiesen, präsentierten Mn-SOD-siRNA-transfizierte EPC die geringste Mn-SOD-Menge.

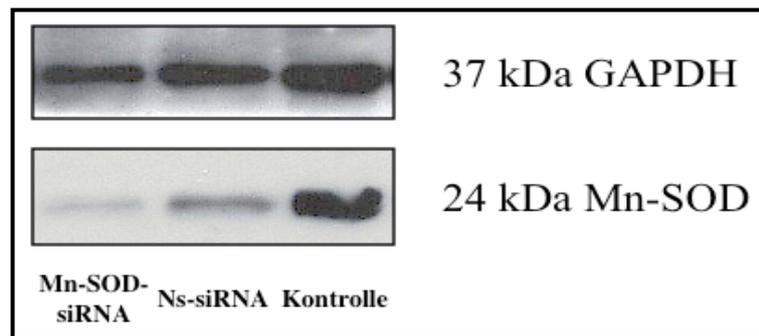


Abbildung 29: Repräsentativer Western Blot aus der Versuchsreihe der Migrationsmessungen. Oben: GAPDH- Signal bei 37 kDa. Unten: Mn-SOD-Signal bei 24 kDa. Von links nach rechts: Spezifisch transfizierte EPC, unspezifisch transfizierte EPC, untransfizierte EPC.

Die nachfolgende Abbildung 30 präsentiert repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von EPC in der Boyden-Kammer nach SDF-1-Chemotaxis. In Konkordanz mit den übrigen Messreihen ließ sich auch hier Folgendes beobachten: Gegenüber untransfizierten (Nativ EPC) und unspezifisch transfizierten EPC (Ns-siRNA) zeigten Mn-SOD-defiziente EPC eine signifikante Hemmung ihrer Migrationsfähigkeit. Die Auswertung dieser Bilder erbrachte die nachstehenden relativen Messwerte für das migratorische Potential: „Ns-siRNA“ = 100 % (per definitionem), „Nativ EPC“ = 205,97 % und „Mn-SOD-siRNA“ = 40,30 %.

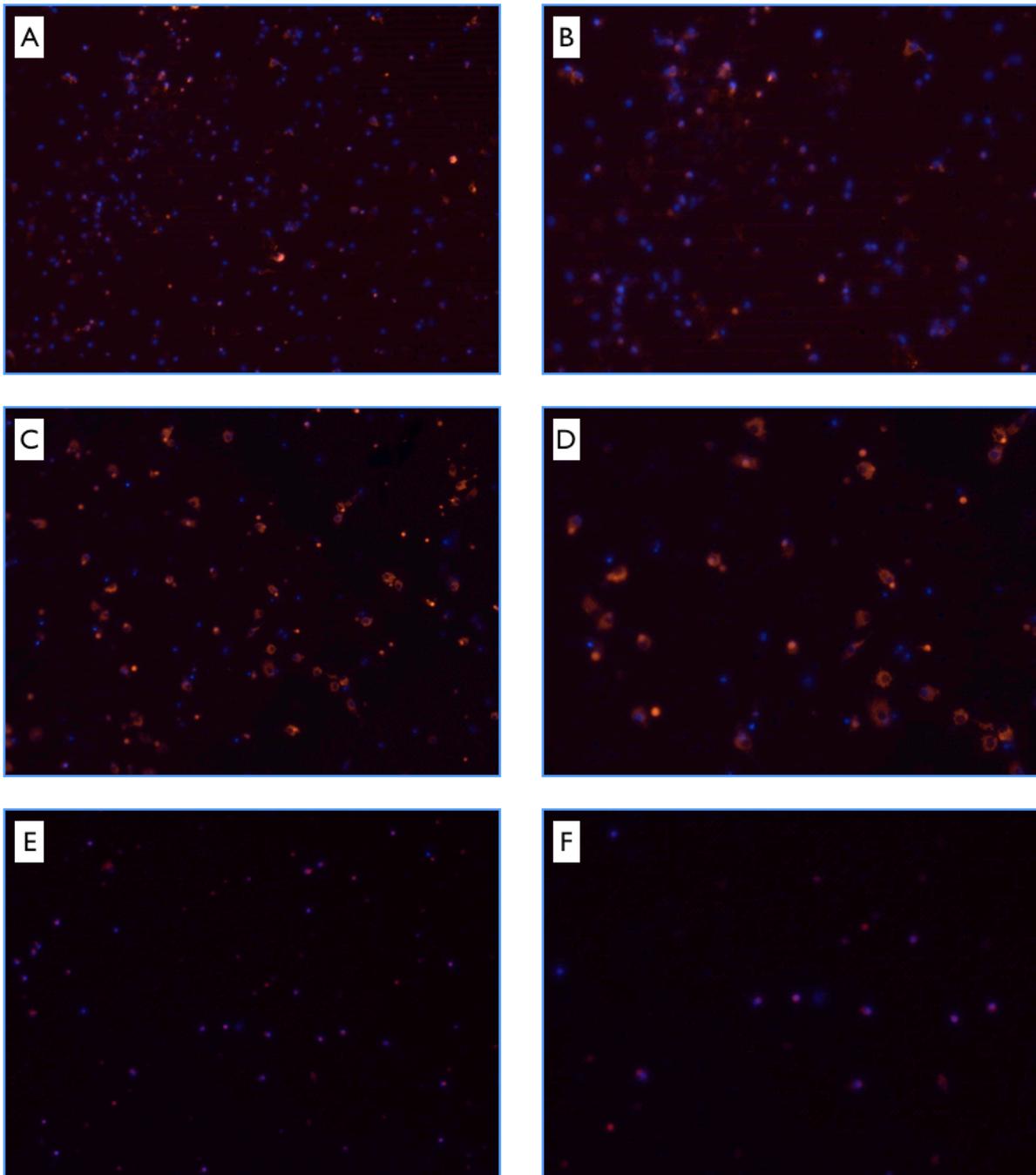


Abbildung 30: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von EPC in der Boyden-Kammer, 24 Stunden nach SDF-1-Chemotaxis (Zeiss Axiovert 200M mit Axio Cam MRM, Rot: diLDL-Anfärbung, Blau: DAPI-Kernfärbung). Linke Seite: Aufnahme bei 40-facher Vergrößerung, Rechte Seite: Vergrößerung aus zugehöriger linker Seite. A und B: Untransfizierte EPC (Nativ EPC), C und D: EPC, transfiziert mit unspezifischer siRNA (Ns-siRNA), E und F: Mn-SOD-defiziente EPC (Mn-SOD-siRNA).

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit analysiert die Auswirkungen einer Mn-SOD-Defizienz in humanen endothelialen Progenitorzellen auf die Parameter ROS-Generierung, Apoptose und Migrationspotential. Im Wesentlichen lassen sich folgende Ergebnisse festhalten:

Mn-SOD-defiziente EPC

- zeigen einen signifikanten Anstieg des intrazellulären ROS-Aufkommens;
- zeigen eine signifikante Einschränkung ihrer migratorischen Fähigkeit.

Ein signifikanter Einfluss auf die Apoptoserate konnte nicht gezeigt werden.

5.1 Methodendiskussion

5.1.1 Kritische Betrachtung der EPC-Identifikation

Bei genauer Betrachtung des verwendeten Protokolls zur Zellkultivierung wird verständlich, dass keine eindeutige Zuordnung zu den in Abschnitt 3.4 umschriebenen EPC-Subpopulationen vorgenommen werden kann. Nach Zellisolierung erfolgte eine siebentägige Kultivierung der MNC in endothelzellspezifischem Medium. Am vierten Tag wurde der Überstand der Kulturschale, inklusive verbrauchtem Medium, Zelldetritus und nicht-adhärenter Zellen verworfen und frisches Medium zugeführt. Unter Berücksichtigung einschlägiger Literatur müssen die verwendeten EPC formal mindestens zwei Subpopulationen, nämlich „Circulating angiogenic cells“ (Early EPC) und „Endothelial colony-forming cells“ (Late outgrowth EPC) zugerechnet werden (Steinmetz et al., 2009 und 2010). Aufgrund gleicher physikochemischer Eigenschaften im Rahmen der Dichtegradientenzentrifugation und ähnlicher adhäsiver Fähigkeiten in der Kulturschale ist davon auszugehen, dass sich ebenso Mono- und Lymphozyten in der kultivierten und

später untersuchten Zellpopulation befanden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit müssen daher auf eine heterogene Zellpopulation bezogen werden. Wie Steinmetz und Kollegen (2010) erläuterten, ist die Endothelregeneration aus zirkulierenden Vorläuferzellen kein Vorgang, welcher ausschließlich durch einen einzelnen Zelltyp getragen wird. In ihrem theoretischen Modell wird die Endothelreparatur in eine frühe und eine späte Phase eingeteilt (Abb. 14). Während zirkulierende leukozytäre Zellen und EPC die Endothelläsion zunächst erkennen, binden und gewissermaßen „abdichten“, werden diese in der späten Reparaturphase durch zirkulierende EPC ersetzt. Durch die Differenzierung in Endothelzellen gelingt erst durch diese eine definitive Reparatur der Endothelschicht im Sinne einer Restitutio ad integrum. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit finden dahingehend eine Einschränkung, als dass sie nur auf die Gesamtheit aller beteiligten Zelltypen anwendbar sind. Eine Untersuchung der Oberflächenantigene CD34, CD133 oder VEGFR-2 mittels FACS wurde nicht durchgeführt. Diese hätte eine Zuordnung zu einem gewünschten Oberflächenantigenmuster ermöglicht und die Interpretation der Ergebnisse präzisiert. Eine sichere Abgrenzung zu Progenitorzellen anderer Zellreihen wie z.B. der hämatopoietischen Linie gelänge hierdurch allerdings nicht. Schließlich sollte festgehalten werden, dass die vorliegenden Messergebnisse für EPC, kultiviert nach einem etablierten Schema (Dernbach et al., 2004; Passacuale et al., 2008), gültig sind. Trotz ihrer zellbiologischen Heterogenität ist die untersuchte Zellpopulation in allen Phasen der Endothelregeneration direkt oder indirekt involviert und kann in diesem Sinne wiederum als Einheit verstanden werden. Das bedeutet, dass die erhobenen Ergebnisse grundsätzliche Bedeutung für Endothelregeneration durch zirkulierende Vorläuferzellen haben. Die verwendeten EPC stammten von Blutspendern unterschiedlichen Alters, Geschlechts, Nationalität und körperlichen Zustands. Es ist davon auszugehen, dass sich die EPC primär, also unabhängig von RNAi-gesteuerter Mn-SOD-Aktivität, in ihrer Qualität unterscheiden. Das Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren bei den Spendern würde Konsequenzen auf ihr EPC-System erwarten lassen (Vasa et al., 2001b). Diese umfassen auch die Parameter Migration und Apoptose. So konnten Heiss und Mitarbeiter (2005) nachweisen, wie EPC von älteren Erwachsenen stark von solchen junger Erwachsener hinsichtlich Vitalität und migratorischem Verhalten in der Boyden-Kammer differierten. Zudem wirkt sich das

Freizeitverhalten der Spender wie z.B. der Umfang körperlicher Aktivität auf Zahl und Funktion ihrer EPC aus (Laufs et al., 2004 und 2005a). Um diesem Umstand gerecht zu werden, wurden daher innerhalb einer Versuchsreihe stets EPC eines Spenders kultiviert, funktionell analysiert und zueinander in Verhältnis gesetzt. Dadurch, dass die erhobenen Messdaten prozentual ausgewertet wurden, dürfte der Einfluss Spenderbedingter EPC-Unterschiede ausgeschlossen worden sein.

5.1.2 Diskussion der Mn-SOD-Regulation durch RNA-Interferenz

Eine essenzielle Problematik für die Interpretation der Ergebnisse bildet die Frage nach der Suppression der Mangan-SOD in den spezifisch transfizierten Zellpopulationen (Mn-SOD-siRNA). Im Folgenden soll daher die Effektivität der erwünschten Mn-SOD-Expressionshemmung diskutiert werden. Die systemimmanente Transfektionseffizienz schwankt laut Hersteller um einen durchschnittlichen Wert von 55 % (Lonza, 2009). Um diesem Umstand einer inkonsequenten RNA-Interferenzregulation Rechnung zu tragen, wurden parallel zu den Funktionsmessungen eine Analyse der Mn-SOD-Menge vorgenommen. Auf diese Weise konnten Transfektionen identifiziert werden, welche keinen Einfluss auf die Expression der Mn-SOD nahmen. Es wurden nur Versuchsreihen für die Auswertung verwendet, bei denen eine relevante Suppression der Mn-SOD in den spezifisch transfizierten Zellen im Western Blot erkennbar war. Zunächst konnte demonstriert werden, dass die Hemmung der Mn-SOD-Expression in konzentrationsabhängiger Weise zur eingesetzten Mn-SOD-spezifischen siRNA gelang (Abb. 20 und 21). Im Vergleich zu untransfizierten EPC (Nativ EPC) betrug die Mn-SOD-Menge der Bedingung „Mn-SOD-siRNA“ zwischen 21,29 % und 57,16 %, abhängig von der Konzentration eingesetzter siRNA-Moleküle (8,75, 17,5 und 37,5 pmol). Der siRNA-Bereich wurde aufgrund der Herstellerempfehlung von 3 bis 30 pmol siRNA pro Bedingung gewählt (Lonza, 2009). Mit 17,5 pmol Mn-SOD-spezifischer siRNA konnte eine initiale Proteinreduktion auf 28,9 % des Ausgangswertes erreicht werden. Gleichmaßen ließ sich in den darauf aufbauenden Funktionsmessungen grundsätzlich feststellen, dass mit 17,5 pmol Mn-SOD-spezifischer siRNA eine robuste Mn-SOD-Suppression in den transfizierten EPC (Mn-SOD-siRNA) im Vergleich zur untransfizierten

Kontrolle (Nativ EPC) realisiert werden konnte. Der zusammengefassten Auswertung aller Versuchsreihen (Abb. 22) ist zu entnehmen, dass die durchschnittliche Restmenge der Bedingung „Mn-SOD-siRNA“ 40 % des Wertes untransfizierter EPC (Nativ EPC) entsprach. Diese Transfektionseffizienz deckt sich mit den laut Hersteller erreichbaren Werten. Die Kontrolle der Mn-SOD-Menge erfolgte stets im Vergleich von untransfizierten (Nativ EPC) mit spezifisch transfizierten EPC (Mn-SOD-siRNA). Zur Interpretation der Ergebnisse soll eine weitere Erörterung zur Mn-SOD-Expression in unspezifisch transfizierten EPC (Ns-siRNA) erfolgen. Abbildung 21 verweist auf das nun zu diskutierende Phänomen. Hier ist eine Reduktion der Mn-SOD-Menge in unspezifisch transfizierten EPC (Ns-siRNA) auf 55,92 % in Relation zu untransfizierten EPC (Nativ EPC) zu erkennen. Die Untersuchungen zur Migrationsfähigkeit haben gezeigt, dass die Auswirkungen einer Transfektion ohne siRNA (-siRNA; 96,13 %) annähernd identisch mit denen von unspezifisch transfizierten EPC sind (100 %). Gleichzeitig migrierten nachweislich Mn-SOD-defiziente EPC nur etwa halb soviel (43,84 %). In Zusammenschau wird dies als Hinweis darauf gewertet, dass die als unspezifisch verwendete siRNA der Bedingung Ns-siRNA tatsächlich keinen spezifischen Effekt auf die Mn-SOD-Expression im Sinne eines RNAi-Mechanismus ausübt. Es lässt sich aber vermuten, dass ein RNA-Interferenz-unabhängiger Hemmeffekt auf die Mn-SOD-Expression existiert. Dieser könnte durch den Transfektionsvorgang per se und einem damit verbundenen Zellstress ausgelöst sein. Auf die Menge konstitutiv exprimierter Gene wie der GAPDH scheint dieser Effekt nur einen marginalen Einfluss genommen zu haben (Abb. 20 und 29). Die GAPDH präsentierte sich daher als ein geeignetes Protein, um als Ladungskontrolle zu fungieren, was zudem globale Expressionsschwankungen aufzudecken vermag. Es ist bekannt, dass die Elektroporation zu Veränderungen der Zellmembranstabilität und Zellstress führt und möglicherweise kurzfristig erhöhte intrazelluläre ROS-Aufkommen hervorrufen kann. Über eine Modulation redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren könnte damit eine temporäre Suppression der Mn-SOD-Expression einhergehen. Kandidaten dafür sind Sp-1, NF- κ B sowie AP-2, welche stimulierende bzw. dämpfende Wirkung auf die Mn-SOD-Transkription entfalten können (Xu et al., 2002). Die Vermutung der transfektionsbedingten, indes RNA-Interferenz-unabhängigen Expressionsregulation der Mn-SOD wird durch den Western Blot in Abbildung 29 weiter erhärtet. Während spezifisch transfizierte EPC (Mn-SOD-siRNA)

eine deutliche Mn-SOD-Suppression zeigen, kann man in unspezifisch transfizierten EPC (Ns-siRNA) eine mittelgradige Hemmung des Mn-SOD-Signals erkennen. Unter Berücksichtigung nicht dargestellter Messungen zum Mn-SOD-Gehalt in unspezifisch transfizierten Zellen (Ns-siRNA) von durchschnittlich 80,33 % lässt sich folgende Hypothese aufstellen: Der Transfektionsvorgang per se ist imstande, eine Reduktion der Mn-SOD-Expression zu bewirken. Dieser Expressionshemmung liegt wahrscheinlich kein RNA-Interferenzmechanismus zugrunde. In konsequenter Weise wurde jedoch während der Funktionsmessungen diese Mn-SOD-Expressionshemmung von der spezifisch transfizierten Zellpopulation (Mn-SOD-siRNA) überschritten (Abb. 29). Dies ist damit erklärbar, dass sich zum geschilderten transfektionsbedingten Effekt die gewünschte hochspezifische RNA-Interferenzregulation der Mn-SOD-mRNA hinzuaddierte. Ein wichtiger Aspekt dabei ist, dass sich mit dem Grad der Mn-SOD-Suppression konsistent einhergehend, signifikante Unterschiede in den Parametern ROS-Generierung und Migrationsfähigkeit messen ließen. Diese Diskrepanzen sind mit einer stärkeren Mn-SOD-Expressionshemmung in der spezifisch transfizierten Bedingung kausal vereinbar. Trotz einer relevanten Beeinflussung der Mn-SOD-Expression in unspezifisch transfizierten EPC (Ns-siRNA) ist das verwendete Versuchskonstrukt geeignet, Aussagen über die Auswirkungen einer Mn-SOD-Defizienz in EPC zu treffen. Ein letzter Einwand bezüglich der Mn-SOD-Expression im Rahmen der präsentierten Ergebnisse soll hier genannt sein. Die dargestellten Mn-SOD-Quantitäten sind parallel zu den jeweiligen Funktionsmessungen erhoben worden. Beispielsweise ist die Zellpopulation „Mn-SOD-siRNA“ nach ihrer Kultivierung separiert worden. Die erste Gruppe wurden hinsichtlich ihres migratorischen Potentials in der Boyden-Kammer untersucht, die zweite diente dem quantitativen Mn-SOD-Nachweis im Western Blot. Die densitometrisch ermittelte Mn-SOD-Menge der zweiten Gruppe wurde mit demjenigen der ersten Gruppe gleichgesetzt. Mit den übrigen Bedingungen wurde entsprechend verfahren. Theoretisch ist es nicht auszuschließen, dass, trotz identischem Kultivierungsprotokoll, divergierende Mn-SOD-Mengen zwischen den Zellen der Western-Blot-Analyse und jener der Funktionsuntersuchungen aufgetreten sind. Komplizierend kommt hinzu, dass die Aktivität der Mn-SOD als Produkt aus dessen Menge sowie Funktion betrachtet werden kann. Ein physiologischer Mn-SOD-Gehalt könnte während der Funktionsuntersuchungen mit einem funktionellem Defekt der Mn-

SOD-Moleküle verbunden gewesen sein (Macmillan-Crow et al., 1996). Die Gesamtaktivität des Enzyms wäre demnach weit mehr gedämpft als es Western Blot und Densitometrie erahnen ließen. Die Möglichkeiten und Umstände des Versuchsaufbaus dieser Fehlerquelle entgegenzuwirken, stoßen an dieser Stelle an ihre Grenzen.

5.2 Ergebnisdiskussion

5.2.1 Diskussion der ROS-Generierung in Mn-SOD-defizienten EPC

Die Messung intrazellulärer ROS konnte demonstrieren, dass Mn-SOD-defiziente EPC (Mn-SOD-siRNA) einen um 57,95 % höheren Wert verglichen mit unspezifisch transfizierten EPC (Ns-siRNA) besitzen. Eine Mn-SOD-Defizienz führte in den untersuchten EPC zu einem erhöhtem intrazellulärem ROS-Vorkommen. Interessanterweise entsprachen hier einem Prozent verminderter Mn-SOD, einem Prozent vermehrte intrazelluläre ROS-Menge. Offensichtlich besitzt die Mn-SOD in EPC Relevanz für deren ROS-Metabolismus. Die gleichen Resultate konnten Richters und Kollegen (2011) in Kardiomyozyten feststellen. Die ROS-Erhöhung bei Mn-SOD-Defizienz konnte dabei, trotz Überexpression antioxidativ-wirkender Peroxiredoxine, nicht vollständig kompensiert werden. Um welche ROS es sich in den EPC handelte ist mit der durchgeführten DCF-Messung nicht greifbar. Die Vermutung liegt nahe, dass sich in Folge des erhöhten Mn-SOD-mRNA-Abbaus Superoxidanionen angesammelt haben (Sasaki et al., 2011). Zudem muss darauf hingewiesen werden, dass wahrscheinlich weniger Wasserstoffperoxidmoleküle aus Superoxid generiert worden sind (Abb. 10). Entsprechend führt eine Mn-SOD-Defizienz zu einer erhöhten intrazellulären ROS-Gesamtbelastung in EPC. Mechanistisch kann davon ausgegangen werden, dass sich Superoxidmoleküle intrazellulär anreicherten und komplexe strukturelle und funktionelle Auswirkungen auf EPC verursachten. Indessen kann die Mn-SOD-Defizienz weitreichende Konsequenzen für den Stoffwechsel von ROS und deren Derivaten nach sich ziehen. So ist bekannt, dass Superoxidmoleküle zur Bildung von hochreaktiven

Hydroxylradikalen beitragen (Halliwell, 1996). Es wird zudem spekuliert, dass entsprechend den Untersuchungen von Reiter und Kollegen (2000) eine toxische Peroxinitritbildung stattgefunden haben könnte. Die noch zur Verfügung stehenden Mn-SOD-Moleküle könnten durch das veränderte intrazelluläre ROS-Muster eine relevante Funktionseinschränkung erfahren haben (Macmillan-Crow et al., 1996). Speziell mitochondriale Strukturen bieten sich als Angriffsziel einer solchen oxidativen Belastung an, weil sie topographisch sowie biochemisch eine sensible Position im ROS-Stoffwechsel bekleiden (Ballinger et al., 2002). Potentiell sind dabei sämtliche mitochondriale Molekülklassen, insbesondere Nukleinsäuren sowie Komponenten der Atmungskette, gefährdet. Über eine Schädigung der mitochondrialen Membranintegrität kann sich eine Beeinträchtigung des aeroben Energiestoffwechsels einstellen und über proapoptische Signalmoleküle der Zelltod eingeleitet werden (Cadenas und Davies, 2000). Letztlich muss auf eine Einschränkung der Validität der durchgeführten Messmethodik eingegangen werden. ROS verfügen über ein unterschiedliches Potential zur Oxidierung von H₂-DCF-DA. Untersuchungen über die Fähigkeit von Superoxid und Hydroxylradikalen zur H₂-DCF-DA-Oxidation lieferten dazu ein widersprüchliches Bild (LeBel et al., 1992). Komplizierend tritt hinzu, dass auch eine ROS-unabhängige Oxidation, beispielsweise durch Peroxidasen, stattfinden kann. Deswegen sollte die Interpretation der vorliegenden ROS-Messungen mit leichter Vorsicht zur Kenntnis genommen werden (Bonini et al., 2006). Die Ergebnisse sind dennoch dazu in der Lage, eine ungefähre Dimension der oxidativen Belastung in Mn-SOD-defizienten EPC aufzuzeigen.

5.2.2 Diskussion der Apoptose in Mn-SOD-defizienten EPC

Die Proteinanalysen haben gezeigt, dass eine sowohl effektive als auch konsequente Mn-SOD-Expressionshemmung in EPC (Mn-SOD-siRNA) erzielt worden ist. Der durchschnittliche Mn-SOD-Gehalt spezifisch transfizierter EPC (Mn-SOD-siRNA) betrug 23,52 % (Abb. 26) in Relation zur untransfizierten Kontrolle (Nativ EPC). In parallelen Untersuchungen zum Apoptoseverhalten konnte kein damit einhergehender Unterschied in signifikantem Ausmaß herausgestellt werden (Abb. 25). Die Apoptoserate Mn-SOD-

defizienter EPC (Mn-SOD-siRNA) erwies sich vergleichbar mit derer unspezifisch transfizierter EPC (Ns-siRNA). Zwecks testinterner Plausibilitätsprüfung erfolgte die Bestimmung einer Positiv- und Negativ-Kontrolle. Die ermittelten Werte erlauben, die Ergebnisse der Apoptosemessungen als valide anzunehmen. Die unveränderte Apoptoserate Mn-SOD-defizienter EPC war insofern überraschend, als dass zuvor erarbeitet werden konnte, dass diese einer erhöhten intrazellulären ROS-Belastung ausgesetzt sind. Aufgrund der Nähe zur Hauptquelle intrazellulärer ROS-Bildung, der Abwesenheit von Histonproteinen und dem Mangel an DNA-Reparatursystemen sind mitochondriale DNA- und Proteinstrukturen besonders sensibel gegenüber oxidativer Schädigung (Richter et al., 1988). Folglich wird zunächst in Erwägung gezogen, dass eine relevante Beeinträchtigung mitochondrialer Funktion in den ROS-belasteten EPC (Mn-SOD-siRNA) stattgefunden haben könnte. Offensichtlich hat die aufgetretene ROS-Belastung bzw. eine mitochondriale Dysfunktion die Schwelle zur Induktion der Apoptose jedoch nicht überschritten. Dies kann damit erklärt werden, dass EPC durch ihren Stammzellcharakter eine deutlich erhöhte Resistenz gegen ROS-induzierte Apoptose aufweisen. Diese verdanken sie einer exklusiv hohen Ausstattung mit antioxidativen Enzymen (Dernbach et al., 2004). Obwohl die Mn-SOD für EPC dabei eine herausragende Rolle spielt (He et al., 2004), könnte die Mn-SOD-defiziente EPC-Population (Mn-SOD-siRNA) auf das erhöhte ROS-Aufkommen mit einer Überexpression alternativer antioxidativer Systeme reagiert haben. Ein solches Adaptionsphänomen im Sinne einer Hormesis ist auf zelluläre Ebene speziesübergreifend nachgewiesen worden (Calabrese und Baldwin, 2003). Intermittierende „subapoptotische“ ROS-Belastungen können demzufolge adaptive Reaktionen induzieren, welche langfristig zu einer verbesserten zellulären bzw. mitochondrialen Resilienz gegenüber oxidativer Belastung führen. Dies kann sogar in einer Verlängerung der Lebensspanne resultieren (Gems und Partridge, 2008; Schulz et al., 2007). Wasserstoffperoxid gilt als starker Stimulator der Apoptose (Simon et al., 2000). Dies wurde auch für EPC belegt (Dernbach et al., 2004). Die Signaltransduktionskaskade über die Molekülachse Akt, FOXO4 und dem apoptoseinduzierendem Protein Bim vermittelt dabei anti- bzw. proapoptotische Reize (Urbich et al., 2005). Demgegenüber verfügen Superoxidanionen isoliert betrachtet nur über ein diskretes zytotoxisches Potential und üben, je nach Zielmolekül, oxidierenden oder reduzierenden Einfluss aus (Fridovich,

1995). Wie bereits erwähnt, liegt die Toxizität der Superoxidanionen zumal in ihrer Fähigkeit begründet, in Reaktion mit Wasserstoffperoxid eine Oxidationskaskade mit Generierung hochreaktiver Hydroxylradikale zu initiieren (Halliwell, 1996). Unter der Annahme einer verminderten Wasserstoffperoxidgenerierung durch die Mn-SOD-Suppression könnte dieser Mechanismus gedämpft worden sein. Zusätzlich könnte die erhöhte ROS-Gesamtbelastung in Mn-SOD-defizienten EPC durch eine Inaktivierung von FOXO4 und einer daraus folgenden Expressionshemmung von Bim kompensiert worden sein. In summa würde dies die nahezu unveränderte Apoptoserate der Mn-SOD-defizienten EPC erklären.

5.2.3 Diskussion der Migrationsfähigkeit von Mn-SOD-defizienten EPC

Die Analysen zum migratorischen Potential haben aufgezeigt, dass Mn-SOD-defiziente EPC eine Migrationseinschränkung von 56 %, verglichen mit unspezifisch transfizierten EPC, erfahren haben. Parallele Untersuchungen zur Messung des relativen Mn-SOD-Gehaltes haben ergeben, dass diese Einschränkung unter dem Umstand einer deutlichen Mn-SOD-Defizienz von 29,48 % zustande kam (Abb. 28). Ohne siRNA transfizierte EPC verhielten sich migratorisch fast identisch mit unspezifisch transfizierten EPC (96,13 versus 100 %), wohingegen das migratorische Potential der untransfizierten Population beide um den Faktor Zwei überstieg, in Bezug zu Mn-SOD-defizienten EPC sogar um den Faktor Fünf. Zweierlei lässt sich nun folgern. Die Ergebnisse demonstrieren zum einen, dass der Transfektionsvorgang per se eine Migrationseinschränkung bewirkt, welche um die Größenordnung von etwa 100 % anzusiedeln ist. Zum anderen geben sie einen deutlichen Hinweis darauf, dass die als unspezifisch verwendete siRNA der Bedingung Ns-siRNA einen Effekt ausübt, welcher vergleichbar mit dem einer siRNA-fehlenden Transfektion ist. Es wird vermutet, dass die Mn-SOD-Suppression sowohl zu einer Erhöhung der intrazellulären ROS-Belastung führte, als auch eine Veränderung des ROS-Musters zur Folge hatte. Dies wäre durch niedrige Spiegel von Wasserstoffperoxid und hohen Spiegeln von Superoxidanionen charakterisiert und war offensichtlich mit einer relevanten Beeinträchtigung des migratorischen Potentials von EPC verbunden. In Einklang dazu steht die Erkenntnis,

dass Wasserstoffperoxide essenziell für die Adhäsion an und Kommunikation mit EZM sind. Exemplarisch dafür sei die oxidative Inhibition der FAK-Tyrosinphosphatase durch Wasserstoffperoxide genannt. Diese werden durch den beschriebenen Mechanismus dazu befähigt, eine Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts sowie die Ausprägung von Fokalkontakten zu stimulieren (Chiarugi et al., 2003). Die erhöhte ROS-Gesamtbelastung im Allgemeinen, die verminderte, Mn-SOD-Defizienz-bedingte, Wasserstoffperoxidgenerierung im Besonderen, haben demnach eine substantielle Einschränkung der migratorischen Fähigkeit für EPC nach sich gezogen.

5.3 Conclusio: Schlussfolgerung und klinische Bedeutung

Unter Berücksichtigung der Analysen zur ROS-Generierung und Apoptose einerseits, zur Migrationsfähigkeit Mn-SOD-defizienter EPC andererseits, lässt sich Folgendes resümieren: Ein Mangel der Mn-SOD führt zu einem kumulativ erhöhtem intrazellulärem ROS-Aufkommen in EPC. Diese war in der vorliegenden Untersuchung nicht mit einer signifikanten Veränderung der EPC-Vitalität verbunden. Es wird vermutet, dass sich das intrazelluläre ROS-Muster durch die Mn-SOD-Suppression zu Gunsten von Superoxid-anionen und zu Ungunsten von Wasserstoffperoxid gewandelt hat. Der Grund für das nahezu unveränderte Apoptoseverhalten könnte in einer Überexpression alternativer antioxidativer Systeme bzw. in einer Dämpfung proapoptotischer Signalwege liegen. Eine Mn-SOD-Defizienz war in EPC mit einer signifikanten Einschränkung der migratorischen Fähigkeit vergesellschaftet. Die Mn-SOD-Defizienz führte in den untersuchten EPC zu einer signifikanten und relevanten funktionellen Beeinträchtigung. Es lässt sich ein hypothetisches Modell konstruieren, in welchem der Mn-SOD Bedeutung für Adhäsion und Differenzierung von EPC zukommt. Demzufolge schützt die Mn-SOD junge EPC vor oxidativem Stress und ist notwendig für Migration sowie interzelluläre bzw. Zell-Matrix-Adhäsion. Dies würde zu der Arbeit von Passacuale und Mitarbeitern (2008) an EPC passen, bei der eine Migrationsverbesserung durch den Calciumantagonisten Nifedipin auf eine Expressionssteigerung der Mn-SOD zurückgeführt werden konnte. Durch Interaktion mit dem Aktinzytoskelett wird die Ausreifung von Adhäsionsstrukturen in Gestalt von Tight Junctions und Fokalkontakten stimuliert.

Der vollendete Adhäsionsvorgang endothelialer Progenitorzellen könnte mit einer Mn-SOD-Expressionsdämpfung und der Differenzierung zur Endothelzelle einhergehen. Diese ist durch ein vermindertes antioxidatives sowie migratorisches Potential gekennzeichnet, gewinnt indes endothelzellspezifische Eigenschaften hinzu. Weiter kann angenommen werden, dass die endotheliale Reifung neben einer Mn-SOD-Expressionsdämpfung die Erhöhung intrazellulärer ROS-Konzentrationen einschließt. Die Mn-SOD würde folglich an der Koordination der Differenzierung einer EPC zur adulten Endothelzelle aktiv involviert sein. Untersuchungen zum endothelialen Differenzierungsprozess haben einen Redox-Regulationsmechanismus durch das Protein MRP-1 aufgedeckt, welches für den Efflux des oxidierten Glutathiondisulfids insbesondere in Endothelzellen verantwortlich ist (Mueller et al., 2005 und 2010). Der Suppression von MRP-1 folgte tierexperimentell eine Verminderung intrazellulärer ROS-Spiegel sowie die Verbesserung von EPC-Funktion und -Vitalität. Es erscheint denkbar, dass die Mn-SOD gegenläufig zu MRP-1 exprimiert wird und dieses Zusammenspiel die Funktion und Differenzierung von EPC koordiniert. Eine quantitative bzw. qualitative Stimulation der Mn-SOD könnte positiven Einfluss auf EPC-Funktion und -Differenzierung nehmen und auf diese Weise neue antiatherogene bzw. atheroprotektive Therapieoptionen erschließen. Voraussetzung hierfür sind weitere Untersuchungen zur Beleuchtung des Differenzierungsprozesses von EPC sowie die genaue Bedeutung der verschiedenen ROS in diesem Rahmen.

6 Zusammenfassung

Durch ihre Befähigung zur Endothelregeneration erfüllen endotheliale Progenitorzellen einen wichtigen Beitrag zur Gefäßhomöostase. Ihnen kommt daher eine wesentliche Bedeutung in der Primär- sowie Sekundärprophylaxe der Atherosklerose und Folgekrankheiten zu. Nachdem die Identifizierung dieser Zellentität im Jahre 1997 gelang, wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, welche die zellbiologischen Merkmale wie auch die (patho-) physiologische Bedeutung von endothelialen Progenitorzellen klären sollten.

Bislang ist hierbei die genaue Funktion des antioxidativen Enzyms Mangan-Superoxiddismutase (Mn-SOD) für endotheliale Progenitorzellen unzureichend geklärt. Die vorliegende Arbeit hat sich zum Ziel gesetzt, diesen Sachverhalt zu beleuchten. Dazu wurden via RNA-Interferenz Mn-SOD-defiziente Progenitorzellpopulationen generiert und auf die Parameter intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies, Apoptose sowie Migrationspotential untersucht. Die Analytik erfolgte mittels Dichlorfluoresceinmessung, einem Apoptose- und Migrationsassay. Als Kontrollen dienten nicht- sowie unspezifisch-transfizierte endotheliale Progenitorzellen.

In Zusammenschau aller durchgeführten Versuche konnte der Mn-SOD-Gehalt in Progenitorzellen auf durchschnittlich 39,7 % (Standard error of the mean [SEM] = 11,00 %; $p = 0,001$) gedrosselt werden. Die Mn-SOD-Defizienz war mit einem schwach signifikanten Anstieg intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies um 57,95 % vergesellschaftet (SEM = 19,48 %; $p = 0,059$), wobei die Mn-SOD-Menge hier 55,89 % (SEM = 18,34 %; $p = 0,095$) betrug. Eine Differenzierung der reaktiven Sauerstoffspezies wurde nicht durchgeführt. Es wird gemutmaßt, dass in erster Linie Superoxidanionen für den globalen Anstieg verantwortlich zu machen sind. Um den transfektionsbedingten Apoptosestimulus auszugleichen, wurde die Vitalität mit einer unspezifisch transfizierten Kontrolle verglichen. In Relation dazu konnten in Mn-SOD-defizienten Progenitoren (Mn-SOD-Gehalt 23,52 %; SEM 7,34; $p = 0,002$) eine Apoptoserate von 92,52 % (SEM = 13,53 %; $p = 0,61$) gemessen werden. Demnach ließ sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich Apoptose nachweisen.

Indessen präsentierten endotheliale Progenitorzellen mit supprimierter Mn-SOD von 29,48 % (SEM = 6,05 %; $p = 0,007$) eine schwach signifikante Migrationseinschränkung auf 43,84 % (SEM = 16,14 %; $p = 0,074$) in Relation zur unspezifisch-transfizierten Population.

Es wird spekuliert, dass die Mn-SOD in juvenilen endothelialen Progenitorzellen eine Funktion im Redoxhomöostasesystem bekleidet und Migrations- bzw. Adhäsionsvorgänge im Rahmen des Differenzierungsprozesses zur adulten Endothelzelle koordiniert. Als Steuerelemente dieses Prozesses bieten sich reaktive Sauerstoffspezies an. Redox-Regulationsmechanismen sind am Beispiel des Multidrug resistance protein 1 beschrieben. Es erscheint denkbar, dass die Mn-SOD gegenläufig zu diesem Protein exprimiert wird und dieses Zusammenspiel Quantität und Qualität intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies beeinflusst, worüber die Differenzierung von endothelialer Progenitorzelle zur Endothelzelle koordiniert wird. Demnach würde dieser Differenzierungsprozess mit einer Mn-SOD-Expressionsdämpfung einhergehen. Die vollzogene experimentelle Mn-SOD-Suppression könnte somit einen physiologischen Reifungsvorgang imitiert haben.

Ob sich hieraus neue atheroprotektive bzw. antiatherogene Therapiemöglichkeiten ergeben, erscheint zum jetzigen Zeitpunkt unklar. Weitere Untersuchungen zu Eigenschaften und Differenzierungsprozess in physiologischer und pathophysiologischer Umgebung sowie Aufschlüsselung der Bedeutung der verschiedenen reaktiven Sauerstoffspezies sind hierfür notwendig.

7 Literaturverzeichnis

Abe J, Berk BC. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 1998; 8: 59-64

Adams GB, Scadden DT. The hematopoietic stem cell in its place. *Nat Immunol* 2006; 7: 333-337

Adams MR, Kinlay S, Blake GJ, Orford JL, Ganz P, Selwyn AP. Atherogenic lipids and endothelial dysfunction: Mechanisms in the genesis of ischemic syndromes. *Annu Rev Med* 2000; 51: 149-167

Adams V, Lenk K, Linke A, Lenz D, Erbs S, Sandri M, Tarnok A, Gielen S, Emmrich F, Schuler G, Hambrecht R. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 684-690

Adelman R, Saul RL, Ames BN. Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2706-2708

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

Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension* 2005; 45: 321-325

Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 463-499

Ando J, Yamamoto K. Vascular mechanobiology: endothelial cell response to fluid shear

stress. *Circ J* 2009; 73: 1983-1992

Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 2004; 55: 373-399

Ardissino D, Merlini PA, Ariens R, Coppola R, Bramucci E, Mannucci PM. Tissue-factor antigen and activity in human coronary atherosclerotic plaques. *Lancet* 1997; 349: 769-771

Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990; 136: 593-608

Arnett EN, Isner JM, Redwood DR, Kent KM, Baker WP, Ackerstein H, Roberts WC. Coronary artery narrowing in coronary heart disease: comparison of cineangiographic and necropsy findings. *Ann Intern Med* 1979; 91 : 350-356

Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85: 221-228

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-967

Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 1999; 18: 3964-3972

Asikainen TM, Huang TT, Taskinen E, Levonen AL, Carlson E, Lapatto R, Epstein CJ, Raivio KO. Increased sensitivity of homozygous *sod2* mutant mice to oxygen toxicity. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 175-186

Assmus B, Hornold J, Schächinger B, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, Teupe C, Pistorius K, Martin H, Abolmaali ND, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Transcatheter transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355: 1222-1232

Ballinger SW, Patterson C, Knight-Lozano CA, Burow DL, Conklin CA, Hu Z, Reuf J, Horaist C, Lebovitz R, Hunter GC, McIntyre K, Runge MS. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. *Circulation* 2002; 106: 544-549

Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004; 95: 764-772

Bekker A, Holland HD, Wang PL, Rumble D 3rd, Stein HJ, Hannah JL, Coetzee LL, Beukes NJ. Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature* 2004; 427: 117-120

Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP 3rd, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The bogalusa heart study. *N Engl J Med* 1998; 338: 1650-1656

Berenson GS, Srinivasan SR, Nicklas TA. Atherosclerosis: a nutritional disease of childhood. *Am J Cardiol* 1998; 82: 22T-29T

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Die oxidative Phosphorylierung. In: Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, HRSG. *Biochemie*, 5. Auflage. Heidelberg - Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2003: 551-553

Binder CJ, Hartvigsen K, Chang MK, Miller M, Broide D, Palinski W, Curtiss LK, Corr M, Witztum JL. IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis. 2004; 114: 427-437

Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic

review and meta-analysis. *JAMA* 2007; 297: 842-857

Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 168-175

Bonini MG, Rota C, Tomasi A, Mason RP. The oxidation of 2', 7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: a self-fulfilling prophesy ?. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 968-975

Boon RA, Horrevoets AJ. Key transcriptional regulators of the vasoprotective effects of shear stress. *Hamostaseologie* 2009; 29: 39-40, 41-43

Borgstahl GE, Parge HE, Hickey MJ, Beyer WF Jr, Hallewell RA, Tainer JA. The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. *Cell* 1992; 71: 107-118

Borissoff JI, Spronk HMH, ten Cate H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N Engl J Med* 2011; 364: 1746-1760

Brandes RP, Schröder K. Differential vascular functions of Nox family NADPH oxidases. *Curr Opin Lipidol* 2008; 19: 513-518

Brasier AR, Recinos III A, Eledrisi MS. Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1257-1266

Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, 2008: Nationale Verzehrs Studie 2 - Ergebnisbericht, Teil 1. http://www.bmelv.de/SharedDocs/Downloads/Ernaehrung/NVS_Ergebnisbericht.pdf?__blob=publicationFile (14.08.2011)

Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med* 1995; 18: 775-794

Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang YH, Smialek J, Virmani R. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med* 1997; 336: 1276-1282

Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang YH, Smialek J, Virmani R. Plaque rupture and sudden death related to exertion in men with coronary artery disease. *JAMA* 1999; 281: 921-926

Busciglio J, Yankner BA. Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature* 1995; 378: 776-779

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87: 840-844

Calabrese EJ, Baldwin LA. Hormesis: the dose-response revolution. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43: 175-197

Caldenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 222-230

Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438: 932-936

Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605

Chiarugi P, Pani G, Giannoni E, Taddei L, Colavitti R, Raugei G, Borrello S, Galeotti T, Ramponi G. Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: the oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for cell adhesion. *J Cell Biol* 2003; 161: 933-944

Chiesa G, Sirtori CR. Recombinant apolipoprotein A-1 (Milano): a novel agent for the induction of regression of atherosclerotic plaques. *Ann Med* 2003; 35: 267-273

Church SL, Grant JW, Meese EU, Trent JM. Sublocalization of the gene encoding manganese superoxide dismutase (MnSOD/SOD2) to 6q25 by fluorescence in situ hybridization and somatic cell hybrid mapping. *Genomics* 1992; 14: 823-825

Cottler-Fox MH, Lapidot T, Petit I, Kollet O, DiPersio JF, Link D, Devine S. Stem cell mobilization. *Hematolgy Am Soc Hematol Educ Program* 2003: 419-437

Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991; 251: 788-791

Dai G, Kaazempur-Mofrad MR, Natarajan S, Zhang Y, Vaughn S, Blackman BR, Kamm RD, Garcia-Cardena G, Gimbrone MA Jr. Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 14871-14876

D'Armiento FP, Bianchi A, Nigris F de, Capuzzi DM, D'Armiento M, Crimi G, Abete P, Palinski W, Condorelli M, Napoli C. Age-related effects on atherogenesis and scavenger enzymes of intracranial and extracranial arteries in men without classic risk factors for atherosclerosis. *Stroke* 2001; 32: 2472-2480

Davies MJ. A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. *Circulation* 1990; 82: 1138-46

Davies PF, Remuzzi A, Gordon EJ, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr. Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial turnover in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2114-2117

Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109: 27-32

Dernbach E, Urbich C, Brandes RP, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S. Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance

against oxidative stress. *Blood* 2004; 104: 3591-3597

Després JP, Bouchard C, Malina RM. Physical activity and coronary artery disease risk factors during childhood and adolescence. *Exerc Sport Sci Rev* 1990; 18: 243-261

DeStefano F, Anda RF, Kahn HS, Williamson DF, Russel CM. Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality. *BMJ* 1993; 306: 688-691

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95

Dzau VJ. Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: A unifying hypothesis (Theodore Cooper Lecture). *Hypertension* 2001; 37: 1047-1052

Eitzmann DT, Westrick RJ, Shen Y, Bodary PF, Gu S, Manning SL, Dobies SL, Ginsburg D. Homozygosity for factor V Leiden leads to enhanced thrombosis and atherosclerosis in mice. *Circulation* 2005; 111: 1822-1825

Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine & pharmacotherapy* 2004; 58: 39-46

Fan J, Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2003; 10: 63-71

Fang X, Weintraub NL, Rios CD, Chappel DA, Zwacka RM, Engelhardt JF, Oberley LW, Yan T, Heistad DD, Spector AA. Overexpression of human superoxide dismutase inhibits oxidation of low-density lipoprotein by endothelial cells. *Circ Res* 1998; 82: 1289-1297

Faraci FM, Didion SP. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1367-1373

Finkel T. Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 248-253

Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408: 239-247

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811

Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 2006; 113: 1708-1714

Frei R, Gaucher C, Poulton SW, Canfield DE. Fluctuations in precambrian atmospheric oxygenation recorded by chromium isotopes. *Nature* 2009; 461: 250-253

Fruehauf JP, Meyskens FL Jr. Reactive oxygen species: a breath of life or death?. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 789-794

Fujimoto H, Taguchi J, Imai Y, Ayabe S, Hashimoto H, Kobayashi H, Ogasawara K, Aizawa T, Yamakado M, Nagai R, Ohno M. Manganese superoxide dismutase polymorphism affects the oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis of macrophages and coronary artery disease. *Eur Heart J* 2008; 29: 1267-1274

Fujiyama S, Amano K, Uehira K, Yoshida M, Nishiwaki Y, Nozawa Y, Jin D, Takai S, Miyazaki M, Egashira K, Imada T, Iwasaka T, Matsubara H. Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circ Res* 2003; 93: 980-989

Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994; 94: 2493-2503

Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*

2005; 115: 3378-3384

Gems D, Partridge L. Stress-response hormesis and aging: “that which does not kill us makes us stronger“. *Cell Metab* 2008; 7: 200-203

Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA Jr., Luster AD, Luscinskas FW, Rosenzweig A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 1999; 398: 718-723

Ghiadoni L, Virdis A, Magagna A, Taddei S, Salvetti A. Effect of the angiotensin II type 1 receptor blocker candesartan on endothelial function in patients with essential hypertension. *Hypertension* 2000; 35: 501-506

Gielen S, Schuler G, Adams V. Cardiovascular effects of exercise training: molecular mechanisms. *Circulation* 2010; 122: 1221-1238

Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res* 2001; 88: 167-174

Gimbrone MA Jr, Topper JN, Nagel T, Anerson KR, Garcia-Cardena G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Annals of the new york academy of sciences* 2000; 902: 230-239

Gram TE. Chemically reactive intermediates and pulmonary xenobiotic toxicity. *Pharmacol Rev* 1997; 49: 297-341

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured smooth muscle cells. *Circulation Research* 1994; 74: 1141–1148

Gunsilius E, Duba HC, Petzer AL, Kähler CM, Grünwald K, Stockhammer G, Gabi C,

Dirnhofer S, Clausen J, Gastl G. Evidence from a leukaemia model for maintenance vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet* 2000; 355: 1688-1691

Halliwel B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 1996; 16: 33-50

Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Kränkel N, Shu Y, Baither Y, Gielen S, Thiele H, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2003; 107: 3152-3158

Hambrecht R, Walther C, Möbius-Winkler S, Gielen S, Linke A, Conradi K, Erbs S, Kluge R, Kendziorra K, Sabri O, Sick P, Schuler G. Percutaneous coronary angioplasty compared with exercise training in patients with stable coronary artery disease: a randomized trial. *Circulation* 2004; 109: 1371-1378

Hambrecht R, Wolf A, Gilen S, Linke A, Hofer J, Erbs S, Schoene N, Schuler G. Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000; 342: 454-460

Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1876-1890

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The new england journal of medicine* 2005; 352: 1685-1695

Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature reviews immunology* 2006; 6: 508-519

Harfouche R, Malak NA, Brandes RP, Karsan A, Irani K, Hussain SN. Roles of reactive oxygen species in angiopoietin-1/tie-2 receptor signaling. *FASEB J* 2005; 19: 1728-1730

Hamilton KL, Quindry JC, French JP, Staib J, Hughes J, Mehta JL, Powers SK. MnSOD antisense treatment and exercise-induced protection against arrhythmias. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1360-1368

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 11: 298-300

Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor mobilization. *Blood* 2003; 102: 1340-1346

Heiss C, Keymel S, Niesler U, Ziemann J, Kelm M, Kalka C. Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1441-1448

Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 2002; 109: 625-637

Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; 104: 2673-2678

He T, Peterson TE, Holmuhamedov EL, Terzic A, Caplice NM, Oberley LW, Katusic ZS. Human endothelial progenitor cells tolerate oxidative stress due to intrinsically high expression of manganese superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 2021-2027

Herold G, Oette K. Lipidstoffwechselstörungen. In: Herold G, HRSG. *Innere Medizin*. Köln: Herold, 2008: 645-652

Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 2009; 73: 411-418

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

Hoffbrand AV, Moss PAH, Pettit JE. Haemopoiesis. In: Hoffbrand AV, Moss PAH, Pettit JE, HRSG. *Essential Haematology*, 5. Edition. Oxford: Blackwell publishing, 2006: 1-12

Hollmann W, Strüder HK. Zusammengefasste Darstellung der präventiven Bedeutung von körperlicher Aktivität. In: Hollmann W, Strüder HK, HRSG. *Sportmedizin*, 5. Auflage. Stuttgart - New York: Schattauer, 2009: 646-651

Honda Y, Honda S. Oxidative stress and life span determination in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 959: 466-474

Hristov M, Zerneck A, Liehn EA, Weber C. Regulation of endothelial progenitor cell homing after arterial injury. *Thromb Haemost* 2007; 98: 274-277

Imanishi T, Hano T, Nishio I. Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. *Journal of Hypertension* 2005; 23: 97-104

Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res* 2000; 87: 179-183

Ishii N, Fuji M, Hartmann PS, Tsuda M, Yasuda K, Senoo-Matsuda N, Yanase S, Ayusawa D, Suzuki K. A mutation in succinate dehydrogenase cytochrom b cases oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature* 1998; 394: 694-697

Jackson LA, Campbell LA, Schmidt RA, Kuo CC, Cappuccio AL, Lee MJ, Graystone JT. Specificity of *Chlamydia pneumoniae* in cardiovascular atheroma: evaluation of the innocent bystander hypothesis. *Am J Pathol* 1997; 150: 1785-1790

Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222: 283-292

Jönsson TJ, Lowther WT. The peroxiredoxin repair protein. *Subcell Biochem* 2007; 44: 115-141

Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 812-823

Kakko S, Päivänsalo M, Koistinen P, Kesäniemi YA, Kinnula VL, Savolainen MJ. The signal sequence polymorphism of the MnSOD gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2002; 168:147-152

Kaliora AC, Dedoussis GV, Schmidt H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis* 2006; 187: 1-17

Kaneto H, Katakami N, Matsuhisa M, Matsuoka TA. Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators Inflamm* 2010; 2010: 453892

Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stokes J. Factors of risk in the development of coronary heart disease - Six-year follow-up experience. The framingham study. *Annals of internal medicine* 1961; 55: 33-50

Keil U. Coronary artery disease: the role of lipids, hypertension and smoking. *Basic Res Cardiol* 2000; 95: I52-I58

Khakoo AY, Finkel T. Endothelial progenitor cells. *Annu Rev Med* 2005; 56: 79-101

Koenig W, Khuseyinova N. Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology* 2007; 27: 15-26

Kondo T, Hirose M, Kageyama K. Roles of oxidative stress and redox regulation in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2009; 16: 532-538

Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KWA, Coffey PJ, T Huang, Bos JL, Medema RH, Burgering BMT. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 2002; 419:316-321

Kriegel T, Schellenberger W. Bioenergetik und Enzymologie. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC, HRSG. *Biochemie & Pathobiochemie*. Heidelberg: Springer, 2007: 99-140

Kühnel W. Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie, 11. Auflage. Stuttgart - New York: Thieme, 2002

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J. Apoptosis. In: Robbins SL, Cotran RS, HRSG. *Robbins and Cotran - Pathologic basis of disease*, 8. edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2009: 25-28

Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* 1997; 11: 118-124

Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis ?. *Circulation* 2004; 109: II27-II33

Langer HF, Gawaz M. Platelet-vessel wall interactions in atherosclerotic disease. *Thromb Haemost* 2008; 99: 480-486

Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home?. *Blood* 2005; 106: 1901-1910

Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol* 2002; 30: 973-981

Laufs U, Urhausen A, Werner N, Scharhag J, Heitz A, Kissner G, Böhm M, Kindermann W, Nickenig G. Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2005; 12: 407-414

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

Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, Miche E, Böhm M, Nickenig G. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 2004; 109: 220-226

Laurindo FR, da Luz PL, Uint L, Rocha TF, Jaeger RG, Lopes EA. Evidence for superoxide radical-dependent coronary vasospasm after angioplasty in intact dogs. *Circulation* 1991; 83: 1705-1715

Lazzerini G, Del Turco S, Basta G, O'Loghlen A, Zampolli A, Caterina RD. Prominent role of NF-kappaB in the induction of endothelial activation by endogenous nitric oxide inhibition. *Nitric oxide* 2009; 21: 184-191

LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 1992; 5: 227-231

Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J Jr, Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9782-9787

Leitinger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14: 421-430

Levine GN, Keaney JF Jr, Vita JA. Cholesterol reduction in cardiovascular disease. Clinical benefits and possible mechanisms. *N Engl J Med* 1995; 332: 512-521

Li B, Sharpe EE, Maupin AB, Teleron AA, Pyle AL, Carmeliet P, Young PP. VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB J* 2006; 20: 1495-1497

Li M, Chiu J, Mossman BT, Fukagawa NK. Down-regulation of manganese-superoxide dismutase through phosphorylation of foxo3a by akt in explanted vascular smooth muscle cells from old rats. *J Biol Chem* 2006; 281: 40429-40439

Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nature genetics* 1995; 11: 376-381

Li YS, Haga JH, Chien S. Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *J Biochem* 2005; 38: 1949-1971

Libby P. Current Concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 2001; 104: 365-372

Libby P. Atherosclerosis: disease biology affecting the coronary vasculature. *Am J Cardiol* 2006; 98: 3Q-9Q

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868-874

Libby P, Egan D, Skarlatos S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation*

1997; 96: 4095-4103

Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: 2129-2138

Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 2005; 111: 3481-3488

Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000; 343: 1139-1147

Liu J, Sukhova GK, Sun JS, Xu WH, Libby P, Shi GP. Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1359-1366

Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuffi AG, Pepys MB, Maseri A. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994; 331: 417-424

Loguercio C, Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 1-10

Lonza, 2009. Amaxa Human monocyte nucleofector kit - optimized protocol for human monocytes. http://www.lonzabio.com/fileadmin/groups/marketing/Downloads/Protocols/Generated/Optimized_Protocol_75.pdf (13.09.2011)

Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1986; 315: 1046-1051

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407: 233-241

Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1015-1022

Macmillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckmann JS, Thompson JA. Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 11853-11858

Macmillan-Crow LA, Cruthirds DL. Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free radical research* 2001; 34: 325-336

Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000; 21: 361-370

Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, De Ferrari GM, Ferlini M, Goffredo L, Bertolotti A, Klersy C, Moratti R, Tavazzi L. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood* 2005; 105: 199-206

Massberg S, Brand K, Grüner S, Page S, Müller E, Müller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med* 2002; 196: 887-896

McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 737-747

McMillan DE. Blood flow and the localization of atherosclerotic plaques. *Stroke* 1985; 16: 582-587

McVeigh GE, Brennan GM, Johnston GD, McDermott BJ, McGrath LT, Henry WR, Andrews JW, Hayes JR. Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1992; 35: 771-776

Miller YI, Chang MK, Binder CJ, Shaw PX, Witztum JL. Oxidized low density lipoprotein and innate immune receptors. *Current opinion in lipidology* 2003, 14: 437-445

Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res* 2006; 98: 1352-1364

Mitchell ME, Sidawy AN. The pathophysiology of atherosclerosis. *Seminars in vascular surgery* 1998; 11: 134-141

Montenarh M. Replikation und Gentechnik. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC, HRSG. *Biochemie & Pathobiochemie*. Heidelberg: Springer, 2007: 219-254

Montuschi P, Toni GC, Paredi P, Pantelidis P, du Bois RM, Khritinov SA, Barnes PJ. 8-Isoprostane as a biomarker of oxidative stress in interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1524-1527

Moreno PR, Bernardi VH, Lopez-Cuellar J, Murcia AM, Palacios IF, Gold HK, Mehran R, Sharma SK, Nemerson Y, Fuster V, Fallon JT. Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina. Implications for cell-mediated thrombogenicity in acute coronary syndromes. *Circulation* 1996; 94: 3090-3097

Mueller CF, Widder JD, McNally JS, McCann L, Jones DP, Harrison DG. The role of the multidrug resistance protein-1 in modulation of endothelial cell oxidative stress. *Circ Res* 2005; 97: 637-644

Mueller CF, Afzai S, Becher UM, Wassmann S, Nickenig G, Wassmann K. Role of the multidrug resistance protein-1 (MRP1) for endothelial progenitor cell function and survival. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 49: 482-489

Müller P, Kazakov A, Jagoda P, Semenov A, Böhm M, Laufs U. ACE inhibition promotes upregulation of endothelial progenitor cells and neoangiogenesis in cardiac pressure overload. *Cardiovasc Res* 2009; 83: 106-114

Müller-Riemenschneider F, Nocon M, Willich SN. Prevalence of modifiable cardiovascular risk factors in german adolescents. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2010; 17: 204-210

Mussa FF, Chai H, Wang X, Yao Q, Lumsden AB, Chen C. Chlamydia pneumoniae and vascular disease: an update. *J Vasc Surg* 2006; 43: 1301-1307

Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1994; 94: 885-891

Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension ?. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 10045-10048

Napoli C, Witztum JL, de Nigris F, Palumbo G, D'Armiento FP, Palinski W. Intracranial arteries of human fetuses are more resistant to hypercholesterolemia-induced fatty streak formation than extracranial arteries. *Circulation* 1999; 99: 2003-2010

Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Cooper CJ, Yasin M, Eaton GM, Lauer MA, Sheldon WS, Grines CL, Halpern S, Crowe T, Blankenship JC, Kerensky R. Effect of recombinant apo a-1 milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003; 290: 2292-2300

O'Donnell CJ, Kannel WB. Cardiovascular risks of hypertension: lessons from observational studies. *J Hypertens Suppl* 1998; 16: S3-7

Orr WC, Sohal RS. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 1994; 262: 1128-1130

Owusu-Ansah E, Banerjee U. Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature* 2009; 461: 537-541

Pan S. Molecular mechanisms responsible for the atheroprotective effects of laminar shear stress. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11: 1669-1682

Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990; 323: 22-27

Passacquale G, Desideri G, Croce G, Murgio S, Mancarelli MM, Zazzeroni F, Alesse E, Ferri C. Nifedipine improves the migratory ability of circulating endothelial cells depending on manganese superoxide dismutase upregulation. *J Hypertens* 2008; 26: 737-746

Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafi S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95: 952-958

Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Current opinion in immunology* 2002; 14: 123-128

Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroberto P, Verdecchia P, Schillaci G. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 2001; 104: 191-196

Petoumenos V, Nickenig G, Werner N. High-density lipoprotein exerts vasculoprotection via endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 4623-4635

Petrof BJ. Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex. *Am J Phys Med Rehabil* 2002; 81: 162-174

Pepine CJ. The impact of nitric oxide in cardiovascular medicine: untapped potential utility. *Am J Med* 2009; 122: S10-S15

Pohl U. Der Sauerstoff im Gewebe: Substrat, Signal und Noxe. In: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M, HRSG. Physiologie des Menschen. Heidelberg: Springer, 2011: 764-777

Pschyrembel W. Klinisches Wörterbuch, 261. Auflage. Berlin - New York: Walter de Gruyter, 2007

Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. Trends Biochem Sci 2000; 25: 502-508

Raines EW, Ross R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. Br Heart J 1993; 69: 30-37

Reid MB. Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. J Appl Physiol 2001; 90: 724-731

Reiter CD, Teng RJ, Beckman JS. Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite. J Biol Chem 2000; 275: 32460-32466

Rhee SG, Chae HZ, Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signalling. Free Radic Biol Med 2005; 38: 1543-1552

Richardson RS, Wagner H, Mudallal SR, Henry R, Noyszewski EA, Wagner PD. Human VEGF gene expression in skeletal muscle: effect of acute normoxic and hypoxic exercise. Am J Physiol 1999; 277: H2247-H2252

Richter C, Park JW, Armes BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. Proc Natl Acad Sci U S A 1988, 85: 6465-6467

Richters LK, Lange N, Renner R, Treiber N, Ghanem A, Tiemann K, Scharffetter-Kochanek K, Bloch W, Brixius K. Exercise-induced adaptations of cardiac redox homeostasis and remodelling in heterozygous SOD2-knockout mice. J Appl Physiol

2011; published online before print (15.09.2011)

Ridker PM, Buring JE, Rifai N, Cook NR. Development and validation of improved algorithms for the assessment of global cardiovascular risk in women: the Reynolds Risk Score. *JAMA* 2007; 297: 611-619

Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM Jr, Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med* 2008; 359: 2195-2207

Riede UN und Freudenberg N. Arterien - Fibrodestruktives Muster. In: Riede UN, Werner M, Freudenberg N, HRSG. Basiswissen allgemeine und spezielle Pathologie. Heidelberg: Springer, 2009: 203-206

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-674

Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 73-91

Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehntopf M, Stumvoll M, Kahn CR, Blüher M. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 8665-8670

Roche. Cell death detection ELISA^{Plus}. Version April 2006

Robertson AK, Hansson GK. T cells in atherogenesis: for better or for worse? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2006; 26: 2421-2432

Rosenzweig A. Endothelial progenitor cells. *N Engl J Med* 2003; 348: 581-582

Ross R. Atherosclerosis – An inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine* 1999; 340: 115-126

Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med* 1976; 295: 369-377

Rossi L, Arciello M, Capo C, Rotilio G. Copper imbalance and oxidative stress in neurodegeneration. *Ital J Biochem* 2006; 55: 212-221

Sadler TW, Langmann J, Drews U. Herz und Gefäße. In: Sadler TW, Langmann J, Drews U, HRSG. *Medizinische Embryologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2003: 189-237

Sandri M, Adams V, Gielen S, Linke A, Lenk K, Kränkel N, Lenz D, Erbs S, Scheinert D, Mohr FW, Schuler G, Hambrecht R. Effects of exercise and ischemia on mobilization and functional activation of blood-derived progenitor cells in patients with ischemic syndromes: results of 3 randomized studies. *Circulation* 2005; 111: 3391-3399

Sasaki S, Higashi Y, Nakagawa K, Kimura M, Noma K, Sasaki S, Hara K, Matsuura H, Goto C, Oshima T, Chayama K. A low-calorie diet improves endothelium-dependent vasodilation in obese patients with essential hypertension. *Am J Hypertens* 2002; 15: 302-309

Sasaki T, Shimizu T, Koyama T, Sakai M, Uchiyama S, Kawakami S, Noda Y, Shirasawa T, Kojima S. Superoxide dismutase deficiency enhances superoxide levels in brain tissues during oxygenation and hypoxia-reoxygenation. *J Neurosci Res* 2011; 89: 601-610

Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000; 101: 1899-1906

Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kämper U, Dimmeler S, Zeiher AM. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous

vascular repair. *Circulation* 2005; 111: 2981-2987

Schmidt-Trucksäss A, Huonker M, Halle M, Dickhuth HH, Sandrock M. Einfluss der körperlichen Aktivität auf die Arterienwand. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 2008; 59: 200-205

Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer N, Ristow M. Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab* 2007; 6: 280-293

Schunkert H, Erdmann J, Samani NJ. Genetics of myocardial infarction: a progress report. *Eur Heart J* 2010; 31: 918-925

Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA, Kelley JL, Nerem RM. The pathogenesis of atherosclerosis: an overview. *Clin Cardiol* 1991; 14: 11-16

Schwartz SM, Benditt EP. Clustering of replicating cells in aortic endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; 73: 651-653

Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998; 92: 362-367

Shimizu T, Shirasawa T. Anti-aging research using Mn-SOD conditional knockout mice. *Yakugaku Zasshi* 2010; 130: 19-24

Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103: 2776-2779

Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 2000; 5: 415-418

Skâlén K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hultén LM, Wiklund O, Innerarity TL, Borén J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 2002; 417: 750-754

Sluimer JC, Daemen MJ. Novel concepts in atherogenesis: angiogenesis and hypoxia in atherosclerosis. *J Pathol* 2009; 218: 7-29

Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld MR, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the committee on vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994; 14: 840-856

Statistisches Bundesamt, Robert Koch Institut. Heft 48 Krankheitskosten. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Berlin, 2009

Statistisches Bundesamt. Gesundheit - Todesursachen in Deutschland 2009. Fachserie 12 Reihe 4 . Wiesbaden, 2010

St Clair DK, Porntadavity S, Xu Y, Kinningham K. Transcription regulation of human manganese superoxide dismutase gene. *Methods Enzymol* 2002; 349: 306-312

Steiner S, Niessner A, Ziegler S, Richter B, Seidinger D, Pleiner J, Penka M, Wolzt M, Huber K, Wojta J, Minar E, Kopp CW. Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2005; 181: 305-310

Steinmetz M, Nickenig G, Werner N. Perspektiven regenerativer Mechanismen bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen am Beispiel endothelialer Progenitorzellen. *Medizinische Klinik* 2009; 104: 287-295

Steinmetz M, Nickenig G, Werner N. Endothelial-regenerating cells: an expanding

universe. *Hypertension* 2010; 55: 593-599

Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis: Novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke* 2006; 37: 1923-1932

Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Grohé C, Laufs K, Böhm M, Nickenig G. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circulation research* 2003; 93: 170-177

Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Böhm M, Nickenig G. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation* 2003; 107: 3059-3065

Strong JP, Malcom GT, McMahan CA, Tracy RE, Newman WP 3rd, Herderick EE, Cornhill JF. Prevalence and extent of atherosclerosis in adolescents and young adults: Implications of prevention from pathobiological determinants of atherosclerosis in youth study. *JAMA* 1999; 281: 727-735

Thomas C. *Histopathologie*, 14. Auflage. Stuttgart: Schattauer, 2006

Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *N Engl J Med* 1995; 332: 635-641

Tojo T, Ushio-Fukai M, Yamaoka-Tojo M, Ikeda S, Patrushev N, Alexander RW. Role of gp91phox (Nox2)-containing NAD(P)H oxidase in angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Circulation* 2005; 111: 2347-2355

Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fellon JT, Gertz SD, Fernández-Ortiz A, Chesebro JH, Badimon L, Nemerson Y, Fuster V, Badimon JJ. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1997; 95: 594-599

Tousoulis D, Andreou I, Antoniadis C, Tentolouris C, Stefanadis C. Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: therapeutic implications for cardiovascular diseases. *Atherosclerosis* 2008; 201: 236-247

Toyoda T., Hayashi T, Miyamoto L, Yonemitsu S, Nakano M, Tanaka S, Ebihara K, Masuzaki H, Hosoda K, Inoue G, Otaka A, Sato K, Fushiki T, Nakao K. Possible involvement of the alpha1 isoform of 5'AMP-activated gilltein kinase in oxidative stress-stimulated glucose transport in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: E166-E173

Tso C, Martinic G, Fan WH, Rogers C, Rye KA, Barter PJ. High-density lipoproteins enhance progenitor-mediated endothelium repair in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1144-1149

Tsong TY. Electroporation of cell membranes. *Biophys J* 1991; 60: 297-306

Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance?. *Hypertension* 2004; 44: 248-252

Tuzcu EM, Kapadia SR, Tutar E, Ziada KM, Hobbs RE, McCarthy PM, Young JB, Nissen SE. High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound. *Circulation* 2001; 103: 2705-2710

Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 2004; 95: 343-353

Urbich C, Dimmeler S. Risk factors for coronary artery disease, circulating endothelial progenitor cells, and the role of HMG-CoA reductase inhibitors. *Kidney Int* 2005; 67: 1672-1676

Urbich C, Knau A, Fichtlscherer S, Walter DH, Brühl T, Potente M, Hofmann WK, de Vos S, Zeiher AM, Dimmeler S. FOXO-dependent expression of the proapoptotic

protein Bim: pivotal role for apoptosis signaling in endothelial progenitor cells. *FASEB J* 2005; 19: 974-976

Ushio-Fukai M, Tang Y, Fukai T, Dikalov SI, Ma Y, Fujimoto M, Quinn MT, Pagano PJ, Johnson C, Alexander RW. Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res* 2002; 91: 1160-1167

Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103: 2885-2890

Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001; 89: E1-E7

Vollaard NB, Shearman JP, Cooper CE. Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. *Sports Med* 2005; 35: 1045-1062

van der Wal AC, Becker AE, van der Loos, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994; 89: 36-44

Waterhouse PM, Wang MB, Lough T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 2001; 411: 834-842

Weber C. Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ Res* 2005; 96: 612-616

Wei YH, Lee HC. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in ageing. *Exp Biol Med* 2002; 227: 671-682

Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 1973; 248: 4793-4796

Welsch U. Kreislauforgane und Lymphgefäße. In: Welsch U, HRSG. Lehrbuch der Histologie, 2. Auflage. München: Urban & Fischer, 2006: 235-258 (modifiziert nach Kühnel, 2002)

Werner N. Endotheliale Progenitorzellen und Atherogenese: Vaskuloprotektion durch Endothelzellregeneration. Habilitationsschrift der Medizinischen Klinik und Poliklinik 2 des Universitätsklinikums. Bonn: 2007

Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Böhm M, Dimagl 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

Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 1149-1160

Wingler K, Schmidt HH. Guter Stress, schlechter Stress - die feine Balance in Blutgefäßen. *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106: 677-684

Wolfrum S, Jensen KS, Liao JK. Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 729-736

World economic forum, 2010: Global risks 2010 - A global risk network report. http://www.weforum.org/reports-results?fq=report%5Ereport_type%3A%22Risks%20Reports%22 (14.08.2011)

World health organization, 2008: Global burden of disease - 2004 update. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf (14.08.2011)

World health organization, 2011: Prevalence of insufficient physical activity, ages 15+, age standardized, both sexes, 2008. http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_InsufficientActivity_BothSexes_2008.png (20.08.2011)

World health organization, 2011: World prevalence of overweight, ages 20+, age standardized, both sexes, 2008. http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Overweight_BothSexes_2008.png (14.08.2011)

Wray GA, Levinton JS, Shapiro LH. Molecular evidence for deep precambrian divergences among metazoan phyla. *Science* 1996; 274: 568-573

Xu Y, Porntadavity S, St Clair DK. Transcriptional regulation of the human manganese superoxide dismutase gene: the role of specificity protein 1 (Sp1) and activating protein-2 (AP-2). *Biochem J* 2002; 362: 306-312

Yamashita N, Hoshida S, Otsu K, Asahi M, Kuzuya T, Hori M. Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation. *J Exp Med* 1999; 189: 1699-1706

Yan ZQ, Hansson GK. Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis. *Immunological reviews* 2007; 219: 187-203

Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 2007; 357: 1121-1135

Zeicher AM, Drexler H, Saubier, Just H. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest* 1993; 92: 652-662

Ziegler T, Bouzourene K, Harrison VJ, Brunner HR, Hayoz D. Influence of oscillatory and unidirectional flow environments on the expression of endothelin and nitric oxide synthase in cultured endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 686-692

von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. Trends Biochem Sci 2002; 27:
339-344

8 Danksagung

Für diese Dissertation schulde ich vielen Menschen Dank.

Ich möchte mich aufrichtig bei meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. Cornelius Müller für die Überlassung dieses Themas, die hervorragende fachliche Betreuung, seine uneingeschränkte Hilfsbereitschaft, kollegiale Offenheit und nicht zuletzt für sein Vertrauen bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Georg Nickenig sowie allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulare Kardiologie bedanke ich mich für die Aufnahme und Kooperation.

Besonderen Dank schulde ich Frau BTA Isabel Paez-Maletz. Sie hat mich freundschaftlich in das Laborleben eingeführt und mir alle relevanten labortechnischen Methoden geduldig beigebracht.

Frau Jennifer Nadal aus dem Institut für medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie bin ich für ihre rasche und zuverlässige Hilfe bei der statistischen Auswertung der Messdaten verbunden.

Viele inspirierende Augenblicke verdanke ich meinen Freunden Flavio Pinna und André Steinert, wie auch der wunderbaren Wohngemeinschaft im Babette-Koch-Weg 2 (22X) in Bonn-Endenich.

Den tiefsten Dank schulde ich meiner Familie, meinen Eltern Dres. med. Heinz und Elisabeth Mugrauer und meinen Brüdern Johannes und Max Mugrauer. Ich bedanke mich bei ihnen für ihre unschätzbare Unterstützung im Laufe meines gesamten Studiums und während der Abfassung dieser Arbeit. Nur im Leben mit ihnen konnte sie entstehen.