

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
für Angiologie und Kardiologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss des Rauchens auf zirkulierende
Progenitorzellen bei prämenopausalen Frauen

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Andras Kertesz
aus Szeged (Ungarn)

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. V. Stangl

2. Prof. Dr. med. I. Ott

3. Prof. Dr. med. F. Alves

Datum der Promotion: 08.04.2011

1. Inhaltsverzeichnis

1. INHALTSVERZEICHNIS.....	1
2. TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	4
3. EINLEITUNG.....	7
3.1 SPEZIELLE ASPEKTE KARDIOVASKULÄRER ERKRANKUNGEN BEI FRAUEN	7
3.2 ZIRKULIERENDE PROGENITORZELLEN	8
3.2.1 <i>Definition endothelialer Progenitorzellen</i>	8
3.2.2 <i>Verschiedene Ansätze zur Bestimmung endothelialer Progenitorzellen</i>	11
3.2.3 <i>Bedeutung der Progenitorzellen bei Regeneration und Neovaskularisation</i>	14
3.2.4 <i>Progenitorzellen und Endothelfunktion</i>	15
3.2.5 <i>Progenitorzellen und kardiovaskuläre Risikofaktoren</i>	16
3.2.5.1 <i>Rauchen und Progenitorzellen</i>	19
3.2.6 <i>Hormonelle Einflüsse auf Progenitorzellen</i>	20
4. FRAGESTELLUNG.....	22
5. MATERIAL UND METHODEN.....	23
5.1 MATERIALIEN.....	23
5.2 PROBANDENSTUDIE	25
5.2.1 <i>Bestimmung der Anzahl der Progenitorzellen</i>	27
5.2.1.1 <i>Isolierung der Progenitorzellen</i>	27
5.2.1.2 <i>Bestimmung der Anzahl der CFU-EPC</i>	28
5.2.1.3 <i>Bestimmung der Anzahl der CD34+ und CD34+/CD133+ Progenitorzellen mit FACS Analyse</i>	28
5.2.2 <i>Messung der Endothelfunktion</i>	29
5.3 BEOBACHTUNG DER DIFFERENZIERUNG VON PROGENITORZELLEN IN VITRO	30
5.3.1 <i>Zellmaterial</i>	30
5.3.2 <i>Zellkulturmedien</i>	30
5.3.3 <i>Charakterisierung der Progenitorzellen in Zellkultur</i>	31
5.3.3.1 <i>Morphologische Beurteilung</i>	31
5.3.3.2 <i>Bestimmung der RNA-Expression</i>	31
5.3.3.3 <i>Färbung mit Dil-ac-LDL und BS-Lektin</i>	34
5.3.3.4 <i>Testen der Kapillarbildung (Matrigel-Assay)</i>	35
5.4 UNTERSUCHUNG DER CD34+ PROGENITORZELLEN.....	36
5.4.1 <i>Isolierung der CD34+ Progenitorzellen</i>	36
5.4.1.1 <i>Prinzip der MACS-Isolierung</i>	36
5.4.1.2 <i>Selektion der CD34+ Progenitorzellen</i>	37
5.4.2 <i>Zellkultur</i>	38

Inhaltsverzeichnis

5.5 STATISTISCHE ANALYSE.....	38
6. ERGEBNISSE	40
6.1 PROBANDENSTUDIE - EINFLUSS DES RAUCHENS AUF DIE ANZAHL ZIRKULIERENDER PROGENITORZELLEN BEI GESUNDEN PRÄMENOPAUSALEN FRAUEN.....	40
6.1.1 <i>Probandencharakteristika</i>	40
6.1.2 <i>Einfluss des Rauchens auf die Anzahl zirkulierender Progenitorzellen und auf die Endothelfunktion</i>	42
6.1.2.1 Bestimmung der Anzahl der CFU-EPC	42
6.1.2.2 Bestimmung der Anzahl der CD34+ und CD34/CD133+ Progenitorzellen.....	42
6.1.2.3 CFU-EPC	43
6.1.2.4 CD34+ und CD34+/CD133+ Progenitorzellen.....	44
6.1.2.5 Endothelfunktion.....	44
6.1.2.6 Endothelfunktion und CD34+ Progenitorzellen.....	45
6.1.3 <i>Einfluss des Rauchens auf die Anzahl der Progenitorzellen während des Menstruationszyklus</i>	46
6.1.3.1 CFU-EPC	47
6.1.3.2 CD34+ und CD34+/CD133+ Progenitorzellen.....	48
6.1.4 <i>Zusammenfassung der Ergebnisse der Probandenstudie</i>	51
6.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR HERKUNFT UND DIFFERENZIERUNG PUTATIVER ENDOTHELIALER PROGENITORZELLEN.....	53
6.2.1 <i>Morphologische Unterschiede</i>	53
6.2.1.1 Differenzierung im Standard-Zellkulturmedium	53
6.2.1.2 Differenzierung im angiogenen Zellkulturmedium	55
6.2.2 <i>Unterschiede der mRNA Expression</i>	55
6.2.2.1 mRNA Expression der Zellpopulation im Standard-Zellkulturmedium	56
6.2.2.2 mRNA-Expression der Zellpopulation im angiogenen Zellkulturmedium	56
6.2.3 <i>In vitro Matrigel-Assay</i>	58
6.2.4 <i>Zusammenfassung der unterschiedlichen Differenzierung der mononukleären Zellen zu endothelartigen Zellen</i>	59
6.3 UNTERSUCHUNG DER CD34+ PROGENITORZELLEN.....	61
6.3.1 <i>Selektion mit MACS</i>	62
6.3.2 <i>Morphologie der Zellen</i>	62
7. DISKUSSION	64
7.1 SIGNIFIKANT NEGATIVER EINFLUSS DES RAUCHENS AUF DIE ANZAHL ZIRKULIERENDER PROGENITORZELLEN.....	65
7.2 DIE ENDOTHELFUNKTION KORRELIERT MIT DER ANZAHL DER CD34+ PROGENITORZELLEN.....	67
7.3 DIE BEEINTRÄCHTIGUNG DER ZIRKULIERENDEN PROGENITORZELLEN BEI RAUCHERINNEN IST UNABHÄNGIG VOM HORMONELLEN STATUS. ZYKLUSABHÄNGIGE REGULATION DER PROGENITORZELLEN.....	68
7.4 UNTERSCHIEDLICHE DIFFERENZIERUNG VON PROGENITORZELLEN ZU ENDOTHELARTIGEN ZELLEN.....	70

Inhaltsverzeichnis

7.5 AUS ISOLIERTEN CD34+ ZELLEN ENTSTEHEN WEDER CFU-EPC NOCH PROLIFERIERENDE ENDOTHELZELLEN.....	75
8. ZUSAMMENFASSUNG	78
9. LITERATURVERZEICHNIS.....	80
10. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	91
11. DANKSAGUNG	94
12. LEBENSLAUF	96
13. SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	97

2. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

- Tabelle 1:** Übersicht über die wichtigsten Oberflächenmarker der Progenitorzellen, Endothelzellen und monozytären Zellen.
- Tabelle 2:** Einflussfaktoren auf die Anzahl der Progenitorzellen.
- Tabelle 3:** Charakteristika des Studienkollektivs.
- Tabelle 4:** Zusammenfassende Tabelle der untersuchten Parameter (Mittelwert \pm SEM) in der Raucher- und Nichtrauchergruppe in der Menstruationsphase (M+3).
- Tabelle 5:** Zusammenfassende Tabelle der untersuchten Parameter (Mittelwert \pm SEM) zu den drei Zeitpunkten des Menstruationszyklus.
- Tabelle 6:** Zusammenfassende Tabelle über die unterschiedliche Differenzierung der mononukleären Zellen zu endothelartigen Zellen in Abhängigkeit des Zellkulturmediums.
-
- Abbildung 1:** Unterschiedliche Differenzierung einer CD133+ Progenitorzelle in „frühe“ und „späte“ Form der endothelartigen Zellen (nach Shantsila et al. 2008).
- Abbildung 2:** Schema der Probandenstudie.
- Abbildung 3:** Isolierung der mononukleären Zellen mit Hilfe des Ficoll-Gradienten.
- Abbildung 4:** Schema der Zellisolierung mittels MACS.
- Abbildung 5:** Färbung der CFU-EPC mit Dil-ac-LDL und BS-Lektin.
- Abbildung 6:** Bestimmung der CD34+ und CD34+/CD133+ Progenitorzellzahl im peripheren Blut mit FACS.
- Abbildung 7:** Mittelwerte (\pm SEM) der CFU-EPC / 10^6 PBMC bei Raucherinnen und Nichtraucherinnen in der Menstruationsphase (M+3).
- Abbildung 8:** Mittelwerte (\pm SEM) der CD34+ und CD34+ / CD133+ PC (in % der PBMC) bei Raucherinnen und Nichtraucherinnen in der Menstruationsphase (M+3).

- Abbildung 9:** Mittelwerte (\pm SEM) der flussvermittelten (FMD) und nitroinduzierten (NMD) Vasodilatation bei Raucherinnen und Nichtraucherinnen in der Menstruationsphase (M+3).
- Abbildung 10:** Korrelation zwischen flussvermittelter Vasodilatation (FMD) und CD34+ Progenitorzellzahl in der Menstruationsphase (M+3).
- Abbildung 11:** Mittelwerte (\pm SEM) der Östradiolwerte zu drei Zeitpunkten des Menstruationszyklus in der Raucher- und Nichtrauchergruppe.
- Abbildung 12:** Mittelwerte (\pm SEM) der Progesteronwerte zu drei Zeitpunkten des Menstruationszyklus in der Raucher- und Nichtrauchergruppe.
- Abbildung 13:** Mittelwerte (\pm SEM) der CFU-EPC / 10^6 PBMC zu drei Zeitpunkten des Menstruationszyklus in der Raucher- und Nichtrauchergruppe.
- Abbildung 14:** Mittelwerte (\pm SEM) der CD34+ PC (in % der PBMC) zu drei Zeitpunkten des Menstruationszyklus in der Raucher- und Nichtrauchergruppe.
- Abbildung 15:** Mittelwerte (\pm SEM) der CD34+/CD133+ PC (in % der PBMC) zu drei Zeitpunkten des Menstruationszyklus in der Raucher- und Nichtrauchergruppe.
- Abbildung 16:** Unterschiedliche Entwicklung der mononukleären Zellen in Zellkultur.
- Abbildung 17:** RT-PCR zur Darstellung der Unterschiede der mRNA-Expression der von mononukleären Zellen abgeleiteten endothelartigen Zellen in Abhängigkeit des verwendeten Zellkulturmediums.
- Abbildung 18:** Untersuchung der Kapillarbildung in Matrigel.
- Abbildung 19:** Integration der von mononukleären Zellen abgeleiteten endothelartigen Zellen in Netzwerke differenzierter Endothelzellen (HUVEC) in Matrigel.
- Abbildung 20:** Schematische Darstellung der unterschiedlichen Differenzierung der mononukleären Zellen.
- Abbildung 21:** FACS-Analyse der aus Leukapheresat gewonnenen mononukleären Zellen vor (A) und nach (B) Isolierung mit MACS.
- Abbildung 22:** Unterschiedliche Morphologie der Zellen nach der MACS-Isolierung.

Abbildung 23: Schema der Entwicklung der unselektierten, der CD34+ und der CD34- Zellen in Zellkultur.

3. Einleitung

3.1 Spezielle Aspekte kardiovaskulärer Erkrankungen bei Frauen

Kardiovaskuläre Erkrankungen wie die koronare Herzkrankheit (im Weiteren als KHK abgekürzt) mit Manifestationsformen wie dem akuten Myokardinfarkt, stellen die häufigste Todesursache bei Frauen in der industrialisierten Welt dar (Stramba-Badiale et al. 2006). Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes verstarben im Jahr 2008 in Deutschland 363 785 Personen (151 904 Männer und 211 881 Frauen) an einer Erkrankung des Herz-/Kreislaufsystems. An einem Myokardinfarkt starben im Jahr 2008 insgesamt 28 604 Frauen. Dies entspricht 7,8 % der Gesamtmortalität in Deutschland (Statistisches Bundesamt Deutschland).

Rauchen stellt einen atherogenen Risikofaktor erster Ordnung dar, ca. 70 % der prämenopausalen Frauen mit koronarer Herzkrankheit sind chronische Raucherinnen (Khot et al. 2003). Bei Frauen ist das Infarktisiko bei geringem Nikotinabusus 1,7-fach, bei ausgeprägtem Abusus mehr als 4-fach erhöht (Stangl et al. 2003; Hu et al. 2000).

Das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen bei prämenopausalen Frauen ist wesentlich geringer als bei Männern vergleichbaren Alters. Myokardinfarkt tritt bei jungen Frauen selten auf, jedoch wird die Bedeutung der KHK bei Frauen deutlich unterschätzt (Stramba-Badiale et al. 2006; Towfighi et al. 2009). Bei Frauen entwickelt sich die KHK ca. 10-15 Jahre später als beim Mann, das Risiko steigt - vermutlich zum Großteil durch Wegfall der endogenen Steroidhormone - nach der Menopause an. Insgesamt ist die KHK bei Frauen im Vergleich zu Männern durch ein schlechteres outcome gekennzeichnet, da wegen der oft atypischen Symptomatik eine KHK oft erst in fortgeschrittenem Stadium erkannt wird (Stangl et al. 2008).

3.2 Zirkulierende Progenitorzellen

3.2.1 Definition endothelialer Progenitorzellen

Bei den sog. endothelialen Progenitorzellen (EPC) handelt es sich um im Blut zirkulierende Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften, die unter bestimmten Bedingungen zu Endothelzellen differenzieren können. Progenitorzellen verfügen über ein geringeres Differenzierungspotenzial als Stammzellen (Leor und Marber 2006).

Asahara hat als erster Autor über die putativen endothelialen Progenitorzellen aus peripherem Blut berichtet. 1997 hat seine Arbeitsgruppe CD34+ Zellen isoliert, aus denen endothelartige Zellen hervorgegangen sind (Asahara et al. 1997). Vor dieser Entdeckung ging man davon aus, dass Gefäßneubildung durch Differenzierung unreifer Vorläuferzellen (Vaskulogenese) nur während der embryonalen Entwicklung stattfindet. Es wird in den letzten Jahren intensiv diskutiert, dass aus dem Knochenmark stammende Progenitorzellen zur Vaskulogenese ebenso beitragen können.

Die Bedeutung solcher eher nur hypothetischen und aktuell umschrittenen Vorläuferzellen in physiologischen und pathologischen Zuständen ist aktuell Gegenstand der Forschung, ebenso wie ein möglicher Einsatz der Quantifizierung der Progenitorzellzahl zur Diagnostik kardiovaskulärer Erkrankungen.

Obwohl die sog. EPC in zahlreichen experimentellen Ansätzen untersucht wurden, herrscht große Unklarheit über deren exakte Definition und Abstammung und sogar über deren Existenz als eigenständige Subpopulation zirkulierender Progenitorzellen.

Die Schwierigkeit besteht vor allem darin, dass die Progenitorzellen *in vitro* häufig in Anwesenheit weiterer mononukleärer Zellen untersucht werden und dadurch die ursprünglichen Eigenschaften der Progenitorzellen (PC) durch andere Zellen beeinflusst werden. Darüber hinaus sind die Progenitorzellen *in vitro* methodisch nur schwer von reifen Zellen mit der Fähigkeit zur Transdifferenzierung zu unterscheiden (Patterson 2003). Insgesamt ist eine selektive Untersuchung der sog. EPC als einzelne Zelle kaum möglich (Timmermans et al. 2009).

Das wird noch komplizierter dadurch, dass bei der *in vitro* Differenzierung der PC immer eine bestimmte Kombination von Wachstumsfaktoren verwendet wird, damit endothelartige Zellen entstehen.

Die sog. EPC konnten aus diesen Gründen bis jetzt nicht exakt definiert werden. Es erscheint allerdings wahrscheinlich, dass sich bei den als EPC bezeichneten Zellen um eine heterogene Zellgruppe handelt (Ribatti 2007; Leor und Marber 2006; Shantsila et al. 2008). Die uneinheitliche Verwendung des Begriffs „EPC“ macht es schwer, verschiedene Forschungsergebnisse über dieses Thema miteinander zu vergleichen.

Für die sog. EPC existieren nun mehrere Definitionen, die jeweils auf unterschiedlichen Eigenschaften dieser Zellen beruhen. Verschiedene Forschergruppen haben in ihren Arbeiten einige Definitionen erarbeitet. Zu einer allgemeingültigen Einigung ist es in dieser Frage bisher nicht gekommen.

Zur Definition der EPC wird oft eine Kombination von Oberflächenmarkern verwendet. Da diese Marker allein für die sog. EPC nicht spezifisch sind, sondern auch auf Zellen anderer Zelllinien vorkommen (Yoder et al. 2007), ist die Bestimmung von sog. EPC äußerst schwierig.

Die verschiedenen Oberflächenmarker und ihr Vorkommen werden in Tabelle 1 dargestellt.

Hristov et al. (2003) definieren die sog. EPC mit Hilfe der Oberflächenmarker CD133, CD34 und VEGF-Rezeptor-2 (KDR). Diese Kombination von Oberflächenmarkern findet sich auf Progenitorzellen im Knochenmark, während der Differenzierung im peripheren Kreislauf wird die Expression von CD133 wahrscheinlich herunterreguliert. Stattdessen erscheinen auf der Zelloberfläche von Progenitorzellen mutmaßlich andere Marker wie CD31, von Willebrand Faktor (vWF) und VE-Cadherin.

Funktionelle Eigenschaften, wie z. B. die Aufnahme von acetyliertem low density Lipoprotein (acLDL) und die Bindung von Lektinen haben ebenso zu Ungenauigkeiten geführt, da sie auch von einigen nicht-endothelialen Zellen z. B. von Monozyten auch aufgenommen werden können (Rohde et al. 2006). Eine weitere Beschreibung definiert die sog. EPC als mononukleäre Zellen, die unter vascular endothelial growth factor (VEGF) kultiviert wurden und sowohl positiv für die Aufnahme von acetyliertem low density Lipoprotein (acLDL) als auch für Ulex-Lektin sind (Romagnani et al. 2005).

Marker, Synonym	Funktion	Vorkommen	Referenz
KDR (Kinase domain Rezeptor=KDR= VEGFR-2)	• Rezeptor für VEGF	• Angioblast • Hämatopoetische Stammzelle • Endothel	<i>Eichmann et al. 1997</i> <i>Shalaby et al. 1997</i>
CD34	• Zelladhäsion	• Hämatopoetische Stammzelle • Mesenchymale Vorläufer • Endothel	<i>Andrews et al. 1986</i> <i>Krause et al. 1994</i>
CD133 (AC 133)	• Unklar	• Hämatopoetische Stammzelle • Endothelvorläufer	<i>Miraglia et al. 1997</i> <i>Yu et al. 2002</i>
Cadherin (CD144)	• Intrazelluläres Molekül • Zellverbund	• Endothel	<i>Fernandez et al. 2001</i> <i>Böhme 2004</i>
vWF (von Willebrand Faktor)	• Adhäsion zwischen Endothel und Thrombozyten	• Endothel	<i>Fernandez et al. 2001</i> <i>Böhme 2004</i>
CD31 (Platelet endothelial adhesion molecule)	• Zell-Zell-Interaktion	• Endothel • Monozyten	<i>Havemann et al. 2003</i> <i>Böhme 2004</i>
CD14	• Oberflächenprotein • Entzündliche Antwort	• Monozyten • Makrophagen • Thrombozyten	<i>Havemann et al. 2003</i> <i>Böhme 2004</i>
CD45 (Leukocyte common antigen)	• Regulation der Signaltransduktion	• Differenzierte hämatopoetische Zellen	<i>Böhme 2004</i>

Tabelle 1: Übersicht über die wichtigsten Oberflächenmarker der Progenitorzellen, Endothelzellen und monozytären Zellen.

3.2.2 Verschiedene Ansätze zur Bestimmung endothelialer Progenitorzellen

CFU-EPC

Eingeführt wurde der Begriff durch Asahara et al., die 1997 die putativen EPC zum ersten Mal beschrieben haben. Seine Arbeitsgruppe hat demonstriert, dass aus isolierten CD34+ Zellen endothelartige Zellen hervorgehen können. Diese hafteten nach wenigen Tagen *in vitro*-Kultivierung an Fibronectin und bildeten röhrenähnliche Gebilde aus spindelförmigen Zellen oder den embryonalen Blutinseln ähnliche Strukturen (Colony forming units; CFU-EPC). Zusätzlich wird auch behauptet, dass sich die Zellen der CFU-EPC in die Gewebe mit induzierter Ischämie integrieren können. Es gibt Hypothesen darüber, dass die Anzahl der CFU-EPC Auskunft über die *in vitro* funktionelle Aktivität der Progenitorzellen geben kann (Hill et al. 2003; Guven et al. 2006). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass die *in vitro* Bestimmung der Anzahl der CFU-EPC keinen zuverlässigen Parameter für die Quantität der zirkulierenden Progenitorzellen darstellt. Stattdessen soll für die Bestimmung der Progenitorzellzahl eher eine durchflusszytometrische Methode bevorzugt werden (Shantsila et al. 2007).

CD34+ und CD133+ Progenitorzellen

CD34 wird vor allem von frühen hämatopoetischen Stammzellen exprimiert und kommt beim Erwachsenen nur noch in geringem Umfang auf Kapillarendothelzellen vor.

Es wird postuliert, dass aus CD34+ Zellen *in vitro* unter Einfluss von Wachstumsfaktoren wie VEGF, IGF und b-FGF stark proliferierende Endothelzellen hervorgehen können (Shi et al. 1998; Harraz et al. 2001; Kang et al. 2001; Lyden et al. 2001). Da CD34 auch auf reifen Endothelzellen vorkommt, ist die Verwendung dieses Markers allein nicht spezifisch für die Progenitorzellen.

Es gibt Hinweise darauf, dass sich aus CD133+ Zellen Endothelzellen entwickeln können (Asahara et al. 1997; Gehling et al. 2000; Handgretinger et al. 2003). In einem Versuch von Gehling et al. (2000) haben isolierte CD133+ Zellen eine Monolayer mit großem proliferativen Potenzial gebildet. Der Nachweis (mittels Immunofärbung) von endothelspezifischen Markern wie VE-Cadherin, vWF und E-Selektin in den aus CD133+ Zellen hervorgegangenen Zellen spricht für eine Differenzierung zu

Endothelzellen. Gehling et al. legten weiter dar, dass die CD133+ Zellfraktion als möglicher Ursprung von Endothelzellen und der hämatopoetischen Zelllinie zu betrachten sei und vermutlich dem Hämangioblasten entspricht.

Nach einigen Vorstellungen würde die Kombination von CD34, CD133 mit KDR (VEGFR-2) die Zellpopulation der „richtigen“ Progenitorzellen definieren, die Endothelzellen hervorbringen kann (Peichev et al. 2000). CD34+/CD133+/KDR+ ist die heute am meisten benutzte, allerdings nicht unumstrittene Kombination von Oberflächenmarkern zur durchflusszytometrischen Bestimmung sog. EPC.

Zellen, die acLDL und UEA aufnehmen können

Aus mononukleären Zellen können nach ca. 4 Tagen Zellen hervorgehen, die Substanzen wie acetyliertes LDL und ein spezielles Lektin, das *Ulex europaeus* Agglutinin (UEA) binden können (Rehman et al. 2003). Zusätzlich erwiesen sich diese Zellen positiv für den Monozytenmarker CD14, jedoch negativ für die Stammzellmarker CD34 und CD133. Nach Rehman et al. sollten diese, mutmaßlich von Monozyten abstammenden Zellen statt Progenitorzellen als „Circulating angiogenic cells“ bezeichnet werden. Der Begriff „EPC“ sollte nur für nachweislich von Hämangioblasten abstammende Zellen verwendet werden.

Frühe und späte EPC

Hur et al. legten dar, dass die endothelialen Progenitorzellen keine einheitliche Gruppe bilden, sondern aufgrund ihrer Genexpression, Wachstumskinetik und Morphologie in zwei Untergruppen eingeteilt werden können (Hur et al. 2004), wie in Abbildung 1 dargestellt.

Zur ersten Gruppe gehören die Zellen der Colony forming units (CFU-EPC), die durch eine heterogene, überwiegend spindelförmige Zellmorphologie, eine niedrige Proliferationskapazität und eine niedrige Expression endothelspezifischer Oberflächenproteine gekennzeichnet sind (Hur et al 2004). Diese Zellen teilen viele gemeinsame Eigenschaften mit den Monozyten, wie z. B. die Expression von CD14 und werden als „frühe EPC“ bezeichnet (Gulati et al. 2003).

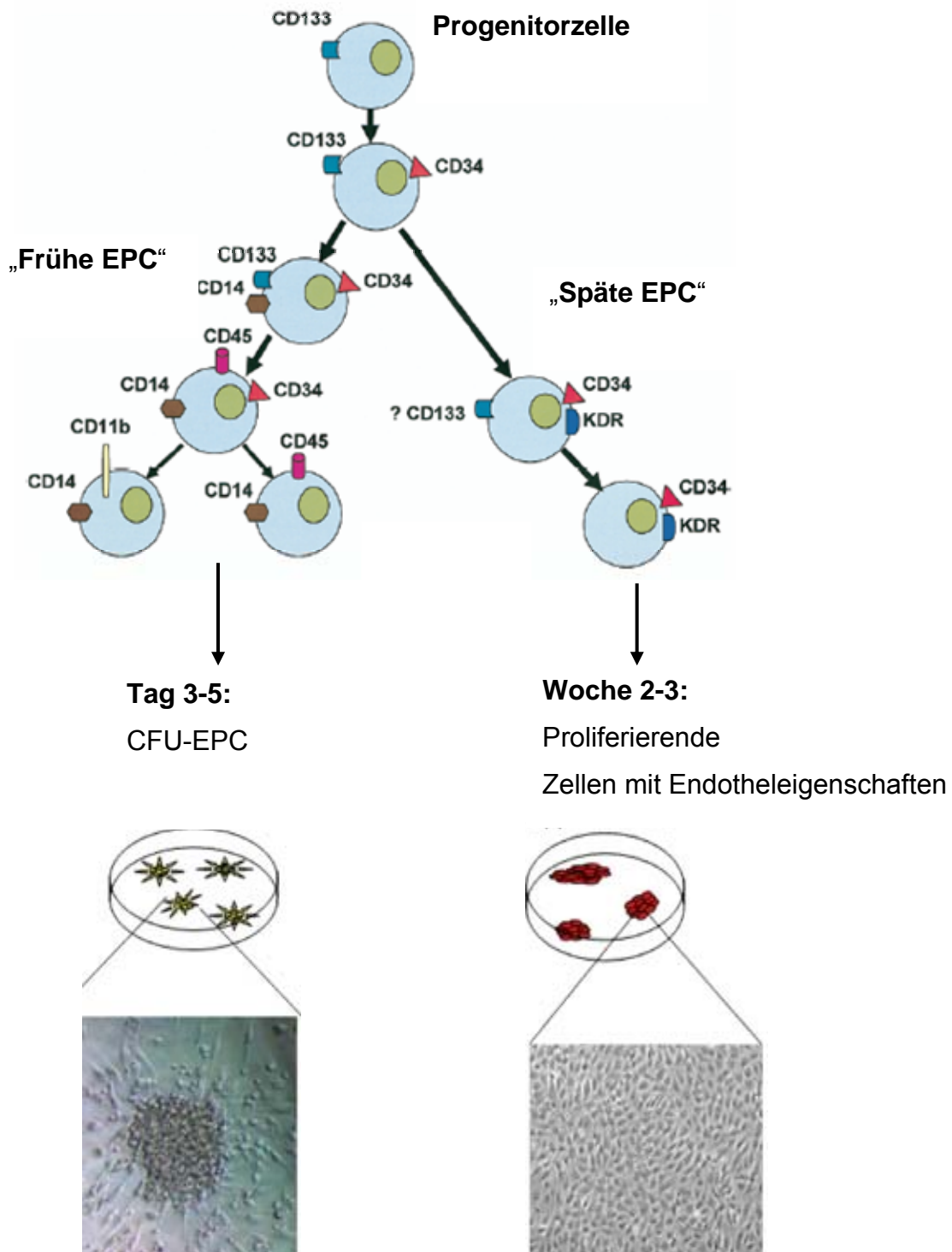


Abbildung 1: Unterschiedliche Differenzierung einer CD133+ Progenitorzelle in „frühe“ und „späte“ Form der endothelartigen Zellen (nach Shantsila et al. 2008).

Die zweite Zellgruppe beinhaltet Zellen mit großer Vermehrungskapazität, die über eine starke Expression verschiedener Endothelmarker wie z. B. Cadherin oder CD34 verfügen und „späte EPC“ oder „late outgrowth EPC“ genannt werden. Aufgrund der

fehlenden Expression der monozytären Marker wie z. B. CD14 werden diese Zellen auch als „true EPC“ bezeichnet (Gehling et al. 2000; Shantsila et al. 2008). Beide Zelltypen sind in der Lage, das fluoreszenzmarkierte acetylierte low density Lipoprotein (Dil-ac-LDL) und Lektin von *Bandeiraea simplicifolia* (BS-Lektin) zu binden (Hur et al. 2004), wobei diese Substanzen nicht ausschließlich endothelspezifisch sind.

3.2.3 Bedeutung der Progenitorzellen bei Regeneration und Neovaskularisation

Derzeit werden zwei Formen der postnatalen Gefäßbildung diskutiert, die nicht strikt voneinander zu trennen und für die Entwicklung eines funktionsfähigen vaskulären Systems verantwortlich sind.

Unter dem Begriff der Angiogenese wird die Bildung von Kapillaren aus bereits bestehenden Blutgefäßen verstanden (Simons 2005). Die Angiogenese erfolgt durch eine Sprossung oder longitudinale Teilung der Kapillaren mit Hilfe periendothelialer Zellen (Intussuszeption). Da die im Blut zirkulierenden Endothelzellen schon ausgereift und ausdifferenziert sind, verfügen sie nur über eine eingeschränkte Vermehrungskapazität (Solovey et al. 1997; Carmeliet 2000).

Vaskulogenese bezeichnet dagegen die Neubildung von Kapillaren aus Endothelvorläuferzellen, die bei Bedarf aus dem Knochenmark rekrutiert werden, in zu vaskularisierende Bereiche migrieren und zu Endothelzellen differenzieren können (Simons 2005). Das Dogma, dass die Vaskulogenese auf die Embryogenese beschränkt ist, wird durch die Beobachtung von Asahara et al. (1997) bei Erwachsenen in Frage gestellt. Es gibt Hinweise darauf, dass Progenitorzellen sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Zuständen an der Gefäßneubildung beteiligen können (Gill et al. 2001; Matsumoto et al. 2008; Groger et al. 2010). Es wird sogar diskutiert, dass die Progenitorzellen in ischämischen Zuständen in die entsprechende Region migrieren und zu Gefäßneubildung beitragen (Asahara et al. 1999; Shintani et al. 2001; Eguchi et al. 2007). Ferner sind die Progenitorzellen möglicherweise auch in Wundheilungsprozesse und bei Frauen in die Regeneration des Endometriums im Rahmen des Monatszyklus involviert (Tepler et al. 2005; Mints et al. 2008).

Es wird postuliert, dass die Progenitorzellen mit zwei unterschiedlichen Mechanismen die Gefäßneubildung fördern können: (1) durch die Integration in die Gefäßwand (2) durch Aktivierung bereits bestehender, ausdifferenzierter Endothelzellen durch Sekretion angiogen wirkender Substanzen.

Asahara et al. (1997) behaupteten, dass sich CD34+ Progenitorzellen in Kapillarwände ischämischen Gewebes der Maus eingliedern können. Nach einer induzierten Ischämie haben sich nach ca. 6 Wochen innerhalb der ischämischen Region neue Gefäßsprosse unter Beteiligung der CD34+ Progenitorzellen gebildet.

Mutmaßlich können angiogene Zytokine, welche z. B. durch Hypoxie und durch die Wirkung von Scherkräften in Endothelzellen induziert werden, die Mobilisierung der Progenitorzellen aus dem Knochenmark fördern (Rabelink et al. 2004).

Es ist vorstellbar, dass die vermuteten proangiogenetischen Effekte der Progenitorzellen zusätzlich auf die Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen zurückzuführen sind (Rehman et al. 2003). Nach dieser These würden Progenitorzellen angiogen wirkende Substanzen wie z. B. VEGF sezernieren, welche die Aussprossung neuer Endothelzellen fördern.

Wie zuvor beschrieben, sprachen Hur et al. (2004) über „frühe“ und „späte EPC“, die eine unterschiedlich starke proangiogenetische Wirkung aufweisen. „Frühe EPC“ produzieren Zytokine wie VEGF und IL-8, welche möglicherweise die Proliferation der Progenitorzellen fördern kann (Sieveking et al. 2008).

3.2.4 Progenitorzellen und Endothelfunktion

In der Entwicklung der Atherosklerose werden die Schädigung und die daraus resultierende Dysfunktion des Endothels als wichtiger initialer Schritt angesehen (Hansson 2005). Es gibt Hypothesen, dass in den reparativen Vorgängen des Endothels vermutlich auch Progenitorzellen einbezogen sind (Hu et al. 2003).

In mehreren *in vivo* und *in vitro* Versuchen ergaben sich Hinweise darauf, dass die Anzahl der Progenitorzellen mit der Endothelfunktion positiv korreliert. Demnach ist eine größere Anzahl der *in vitro* bestimmten CFU-EPC mit einer besseren Gefäßreaktivität assoziiert (Hill et al. 2003; Hill et al. 2004).

Auch die Quantität der im peripheren Blut zirkulierenden CD34+/KDR+ Progenitorzellen zeigte eine positive Korrelation mit der Endothelfunktion (Fadini et al. 2010). Eine erniedrigte Anzahl sowohl zirkulierender CD133+ als auch CD34+/KDR+ Zellen und der CFU-EPC weist auf eine verminderte Gefäßreaktivität der Koronararterien hin (Werner et al. 2007). Einer anderen Studie zufolge könnte eine inverse Korrelation zwischen der Quantität der CFU-EPC und Endothelfunktion bei Probanden mit koronarer Herzkrankheit sowie kardialem X Syndrom bestehen (Huang et al. 2007). Ferner wurde eine Abnahme der im peripheren Blut zirkulierenden PC (definiert als CD34+/CD133+/CD45+ Zellen) bei Probanden mit koronarer endothelialer Dysfunktion beobachtet (Boilson et al. 2008).

Es wird behauptet, dass eine verminderte Gefäßreaktivität nicht nur auf eine reduzierte Anzahl zirkulierender CD34+/CD133+ Progenitorzellen, sondern auch auf deren eingeschränkte funktionelle Aktivität wie Migration, Adhäsion und Proliferation zurückzuführen ist (Heiss et al. 2005). Als Folge dieser negativen funktionellen Beeinträchtigung der Progenitorzellen kann eine verminderte Regeneration des Endothels mit initialer Gefäßschädigung auftreten, die sich in einer Endotheldysfunktion widerspiegeln kann (Keymel et al. 2008).

3.2.5 Progenitorzellen und kardiovaskuläre Risikofaktoren

Es ist seit längerer Zeit bekannt, dass die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wie z. B. Rauchen, Hypertonie, Diabetes eine endotheliale Dysfunktion hervorrufen können und dadurch zur Entstehung atherosklerotischer Läsionen beitragen (Deanfield et al. 2007; D'Agostino et al. 2008).

In den letzten Jahren wurde intensiv diskutiert, ob diese Risikofaktoren zusätzlich an einer verminderten Reparatur des Endothels und an einer Schädigung der Progenitorzellen beteiligt sein können.

Da der Begriff „EPC“ uneinheitlich verwendet wird, sind die Daten über die Anzahl von Progenitorzellen im Blut von Menschen mit und ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren teilweise widersprüchlich (Leor und Marber 2006).

In den meisten Publikationen über diese Thematik wurde die Anzahl der Progenitorzellen als CD34+/CD133+/KDR+ Zellen durchflusszytometrisch ermittelt. In

vielen Arbeiten wurden ebenso die *in vitro* Eigenschaften der Progenitorzellen - definiert als Colony forming units (CFU-EPC) - untersucht (Kondo et al. 2004; Hill et al. 2003).

Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Raucheranamnese, Hypertonie, Diabetes sind mit einer verminderten Anzahl zirkulierender CD34+/KDR+ Progenitorzellen verknüpft (Vasa et al. 2001).

Die Arbeitsgruppe von Hill et al. (2003) stellte fest, dass der Framingham Risk Score mit der Quantität der PC (definiert als CFU-EPC) negativ korreliert. Die Probanden mit niedriger Anzahl der CFU-EPC weisen eine verminderte Gefäßreaktivität auf.

In weiteren anderen Studien wurden einzelne kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Hypertonie, Diabetes, Hypercholesterinämie sowie die Auswirkung der KHK, Herzinsuffizienz und des Rauchens auf die Anzahl der PC analysiert.

Tabelle 2 gibt eine Zusammenfassung über die Einflussfaktoren auf zirkulierende PC.

Es konnte gezeigt werden, dass Hypertonie mit einer verminderten Migrationsfähigkeit zirkulierender PC assoziiert ist (Vasa et al. 2001).

Bei Typ II Diabetikern wurde neben einer verminderten Vermehrungskapazität auch eine reduzierte Eingliederung der PC in die Gefäßkapillaren beschrieben (Tepper et al. 2002). Ein ähnliches Resultat wurde auch bei Patienten mit Typ I Diabetes nachgewiesen (Loomans 2004). Korrespondierend zu diesen Ergebnissen konnte in einem *in vitro* Versuch belegt werden, dass Hyperglykämie die Differenzierung zirkulierender PC negativ moduliert (Kränkel et al. 2005).

In anderen Forschungsgruppen ist die Wirkung der Serumlipide auf die Progenitorzellen analysiert worden. Es konnte festgestellt werden, dass Hypercholesterinämie mit einer signifikanten Reduktion der Anzahl der CFU-EPC und einer verminderten Proliferation, Migration und Adhäsion der PC verknüpft ist (Vasa et al. 2001; Chen et al. 2004).

Bei kardialem Syndrom X konnte eine Reduktion sowohl der Anzahl als auch der funktionellen Aktivität zirkulierender CD34+/CD133+ PC gezeigt werden (Shmilovich et al. 2007).

Einflussfaktor	Parameter	Referenz
Physiologische Zustände		
Geschlecht (Östrogene)	CD34+/KDR+: erhöht	Strehlow et al. 2003b
Geschlecht (Östrogene)	CD34+/KDR+: erhöht	Fadini et al. 2008
Geschlecht (Östrogene)	CFU-EPC: erhöht	Hoetzer et al. 2007
Pathologische Zustände		
Framingham Risk Score	CFU-EPC: erniedrigt	Hill et al. 2003
Rauchen	CD34+/CD133+/KDR+: erniedrigt	Kondo et al. 2004
Rauchen	CD34+/CD133+/KDR+: erniedrigt	Wang et al. 2004
Rauchen	Funktionelle Eigenschaften: erniedrigt	Michaud et al. 2006
Hypertonie	Migrationspotenzial: erniedrigt	Vasa et al. 2001
Diabetes Typ I	Funktionelle Eigenschaften: erniedrigt	Loomans et al. 2004
Alter	CD34+/CD133+: erniedrigt	Umemura und Higashi 2008
Hypercholesterinämie	Proliferation: erniedrigt	Zhou et al. 2007
Stabile Angina	Migrationspotenzial: erniedrigt	Heeschen et al. 2004
Instabile Angina	CFU-EPC: erhöht	George at al. 2004
Herzinsuffizienz (NYHA I-II)	CD34+/CD133+/KDR+: erhöht	Valgimigli et al. 2004
	CFU-EPC: erhöht	Valgimigli et al. 2004
Herzinsuffizienz (NYHA III-IV)	CD34+/CD133+/KDR+: erniedrigt	Valgimigli et al. 2004
	CFU-EPC: erniedrigt	Valgimigli et al. 2004
Zytokine		
G-CSF	CD133+/KDR+: erhöht	Peichev et al. 2000
Erythropoetin	CD34+/CD45+: erhöht	Bahlmann et al. 2004

Tabelle 2: Einflussfaktoren auf die Anzahl zirkulierender Progenitorzellen.

In weiteren Studien wurde der Zusammenhang zwischen manifester KHK und Progenitorzellzahl erforscht. In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass bei Patienten mit stabiler Angina die Anzahl der CD34+/CD133+ Progenitorzellen nicht signifikant beeinflusst wird, jedoch die Progenitorzellen solcher Patienten eine eingeschränkte funktionelle Aktivität aufweisen (Massa et al. 2005; Heeschen et al. 2004). Interessanterweise lag ein erhöhter Wert der CFU-EPC bei Patienten mit instabiler Angina vor, möglicherweise infolge einer C-reaktiven Protein (CRP)-induzierten Mobilisierung der PC aus dem Knochenmark (George et al. 2004).

Ferner wird auch diskutiert, dass die Anzahl der Progenitorzellen bei Patienten mit KHK zur Prognoseeinschätzung gut geeignet ist. Bei Patienten mit weniger Progenitorzellen im peripheren Blut treten akute Komplikation einer KHK wie z. B. Myokardinfarkt sowie instabile Angina häufiger auf (Werner et al. 2005; Schmidt-Lucke et al. 2005).

3.2.5.1 Rauchen und Progenitorzellen

Rauchen wird als wichtiger modifizierbarer kardiovaskulärer Risikofaktor bei prämenopausalen Frauen angesehen (Ambrose und Barura 2004). Der Zusammenhang zwischen Rauchen und Atherogenese ist komplex. Neben lokalen, auf die Gefäßwand beschränkten entzündlichen Effekten werden eine negative Beeinträchtigung der Homöostase, der Gerinnung sowie eine Endotheldysfunktion diskutiert (Yanbaeva et al. 2007).

Bislang stehen wenige Angaben bezüglich einer Auswirkung des Rauchens auf die Anzahl zirkulierender Progenitorzellen im peripheren Blut zur Verfügung.

Es wird diskutiert, dass Zigarettenkonsum eine Reduktion zirkulierender Progenitorzellen bewirken kann (Vasa et al. 2001). Die Anzahl zirkulierender CD34+/CD133+/KDR+ Progenitorzellen zeigte eine inverse, dosisabhängige Korrelation mit der Anzahl konsumierter Zigaretten bei Männern: bei starken Rauchern war der Schädigungseffekt wesentlich ausgeprägter, als bei milden Rauchern. Diese negative Wirkung des Rauchens war reversibel, nach Nikotinkarenz wurden bei Exrauchern ähnliche Werte zirkulierender Progenitorzellen detektiert, wie bei Nichtrauchern (Kondo et al. 2004; Kim et al. 2006; Wang et al. 2004).

Diese Hypothese wurde auch von Michaud et al. (2006) bestätigt. Hier konnte bei Rauchern eine reduzierte Anzahl und eine verminderte Migrationsfähigkeit der Dil-ac-LDL+/Ulex-Lektin+ endothelartigen Zellen *in vitro* beobachtet werden.

Es war bislang unbekannt, ob Rauchen die Anzahl der Progenitorzellen bei gesunden prämenopausalen Frauen, bei denen noch zusätzliche hormonelle Wirkungen auf zirkulierende PC vorliegen, beeinflusst.

3.2.6 Hormonelle Einflüsse auf Progenitorzellen

Die unterschiedliche Indizienz kardiovaskulärer Erkrankungen zwischen Männern und prämenopausalen Frauen wurde bislang überwiegend dem günstigen Einfluss der Östrogene auf die Serumkonzentrationen von Lipoproteinen, auf das Blutgerinnungssystem und auf die Endothelfunktion zugeschrieben (Cignarella et al. 2001; Werner et al. 2009).

In den letzten Jahren wurde die Hypothese überprüft, ob Östrogen auf die Progenitorzellen ebenso einen Einfluss hat.

Die Arbeitsgruppe von Hoetzer et al. (2007) legte dar, dass die PC-Zahl (definiert als CFU-EPC) bei Frauen höher ist, als bei Männern. Außerdem verfügen die Progenitorzellen bei Frauen mutmaßlich über bessere funktionelle Eigenschaften wie z. B. höhere Migrationsaktivität.

Es hat sich gezeigt, dass prämenopausale Frauen mehr zirkulierende CD34+/KDR+ Progenitorzellen aufweisen als Männer bzw. postmenopausale Frauen (Fadini et al. 2008). Zusätzlich konnte diese Arbeitsgruppe demonstrieren, dass die Anzahl dieser Progenitorzellen bei prämenopausalen Frauen einer zyklusabhängigen Schwankung unterliegt, wobei der höchste Wert in der ovulatorischen Phase gemessen wurde. Ähnliche Resultate wurden auch von anderen Autoren erhoben (Masuda et al. 2007; Lemieux et al. 2008).

Die Vermutung, dass die Progenitorzellen unter Einfluss von Östrogen stehen, wurde auch in tierexperimentellen Modellen bestätigt. Bei Mäusen konnte nach Ovariectomie eine Reduktion der Bildung von PBMC-abgeleiteten endothelartigen Zellen *in vitro* beobachtet werden. Künstlicher Östrogensatz führte zu einem Anstieg der Anzahl

solcher ac-LDL+/Ulex-Lektin+ endothelartigen Zellen *in vitro* (Iwakura et al. 2006; Strehlow et al. 2003b).

Ferner wird diskutiert, dass Östrogen eine erhöhte Mobilisierung der Progenitorzellen aus dem Knochenmark und eine verzögerte Alterung der Progenitorzellen hervorrufen kann. In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass eine *in vitro* Behandlung der aus menschlichen Blutproben isolierten PC mit Östrogen eine verzögerte Alterung und verbesserte funktionelle Eigenschaften dieser Zellen bewirken kann (Imanishi et al. 2005). In diesem Mechanismus scheint die durch Östrogen modulierte Freisetzung von NO eine Schlüsselrolle zu spielen (Strehlow et al. 2003b, Aicher et al. 2003).

Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass Östrogen nach künstlich induzierter Ischämie bei Mäusen eine verbesserte Durchblutung und Ansiedlung endothelialer Progenitorzellen im ischämischen Bezirk bewirken kann, vor allem durch eine erhöhte Mobilisierung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark (Ruifrok et al. 2009).

4. Fragestellung

Die Fragestellung dieser Arbeit umfasst mehrere Hauptaspekte:

Im Rahmen einer Probandenstudie wurde die Anzahl zirkulierender Progenitorzellen in Blut prämenopausaler Nichtraucherinnen und Raucherinnen bestimmt. Die zirkulierenden Progenitorzellen wurden über die Oberflächenmarker CD34+ und CD133+ definiert. Ferner wurde nach *in vitro* Kultivierung von PBMCs die Anzahl der Colony forming Units (CFU-EPC) bestimmt.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

- Besitzt chronisches Rauchen einen Einfluss auf die Anzahl der Progenitorzellen bei gesunden prämenopausalen Frauen?
- Besteht ein Einfluss endogener Sexualhormone auf die Zahl der Progenitorzellen innerhalb des Monatszyklus?
- Kann die CD34-Zellzahl als Marker für Endothelfunktion verwendet werden?

Eine weitere Zielsetzung war, die im Rahmen der Probandenstudie untersuchten Zellgruppen *in vitro* näher zu charakterisieren. In diesem Teil der Arbeit sollte in erster Linie geklärt werden, ob die CFU-EPC bzw. CD34+ Progenitorzellen tatsächlich endotheliale Progenitorzellen entsprechen. In diesem Abschnitt sollten auch die folgenden Fragen beantwortet werden:

- Was für eine Zellgruppe versteht man unter dem Begriff „EPC“?
- Können aus mononukleären Zellen - isoliert aus peripherem Blut - unter dem Einfluss selektiver endothelialer Wachstumsfaktoren große proliferative Kapazität besitzende Endothelzellen hervorgehen?
- Wenn ja, stammen die Endothelzellen aus CD34+ Progenitorzellen oder aus CFU-EPC?
- Stimmen die Eigenschaften der isolierten CD34+ Progenitorzellen mit der von Asahara et al. beschriebenen „putativen endothelialen Progenitorzellen“ überein?

5. Material und Methoden

5.1 Materialien

Zu den Versuchen wurden die folgenden Materialien verwendet, die von den unten genannten Firmen bezogen wurden:

BSA:	Sigma
BS-Lektin :	Sigma
CD133-PE:	Miltenyi Biotec
CD14-FITC:	Dako Cytomation
CD34-APC:	Becton Dickinson
CD34-Zellisolierungs Kit:	Miltenyi Biotec
CyAn ADP Durchflusszytometer:	Beckmann Coulter
Dil-ac-LDL:	Molecular Probes
DMSO:	GIBCO Invitrogen GmbH
DNA-Polymerase Kit:	Qiagen
dNTP:	Bioline
Easy-Lyse-Lösung:	Dako Cytomation
EBM:	Cambrex, Verviers
ECGS :	Cambrex, Verviers
EGM-2:	Cambrex, Verviers
Ethanol:	Baker, Deventer
FCS:	Biochrome, Berlin
Fibronektin:	Becton Dickinson, Montan View
Ficoll:	Amersam Phamacia
Fluoreszenzmikroskop:	Zeiss
Lichtmikroskop:	Zeiss
M199:	GIBCO Invitrogen GmbH
Matrigel:	Becton Dickinson Biosciences
Nitrolingual:	Pohl-Boskamp GmbH & Co.
Oligo dT Primer:	Invitrogen

PBS:	GIBCO Invitrogen GmbH
Pipette/Pipettenspitze:	Eppendorf
RNasin Ribonuclease Inhibitor:	Promega
Reverse Transcriptase M-MLV:	Invitrogen
Reverse Transcriptase, AMV:	Roche
RothiQuick Kit:	Roth
RPMI:	GIBCO Invitrogen GmbH
Statistica-Programm (7.0):	StatSoft, Palo Alto (USA)
Ultraschallgerät:	Sonoline Antares, Siemens
Auswertung der Ultraschalldaten:	Tom Tec Imaging Systems
Taq 10-fach-Puffer:	Qiagen

5.2 Probandenstudie

In die Studie wurden Probandinnen im Alter von 25-35 Jahren eingeschlossen. Frauen mit positiver Familienanamnese bezüglich koronarer Herzkrankheit oder mit schwerwiegenden Vorerkrankungen wurden ausgeschlossen. Ebenso wurden solche Probandinnen nicht rekrutiert, die neben Rauchen über weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren verfügten, oder 3 Monate vor Studienbeginn Medikamente eingenommen haben. Alle Probandinnen mussten über einen normalen, regelmäßigen Menstruationszyklus verfügen, wobei der Progesteronwert im Serum in der Lutealphase über 18 nmol/l liegen sollte. Es wurden insgesamt 32 Frauen untersucht, davon waren 17 Raucher und 15 Nichtraucher.

Die Testpersonen wurden in zwei Gruppen geteilt, in die Gruppe der Nichtraucherinnen bzw. und die Gruppe der Raucherinnen. Die Nichtraucherinnen durften nie regelmäßig geraucht haben. In die Rauchergruppe wurden Frauen rekrutiert, die seit mindestens einem Jahr mehr als 15 Zigaretten pro Tag konsumiert haben.

In den Blutproben wurden die endokrinen Parameter sowie die Routine-Laborwerte inklusive Lipoproteine bestimmt. Die Blutproben wurden morgens um 8 Uhr abgenommen, die Probandinnen mussten über Nacht nüchtern bleiben. Bis zur Bestimmung der Laborparameter wurden die Blutproben bei -70°C gelagert. Die Endothelfunktion wurde im Anschluss an die Blutabnahme mit hochauflösendem Ultraschallgerät untersucht wie zuvor beschrieben (Lorenz et al. 2007).

Ebenso wurde aus peripherem Blut mittels FACS-Analyse die Quantität der zirkulierenden CD34+ bzw. CD34+/CD133+ Zellen bestimmt. Um die Anzahl der Progenitorzellen zu bestimmen, wurde das EDTA-Blut sofort weiter verarbeitet. Die Bestimmung erfolgte bei 32 Frauen nur in der Menstruationsphase (M+3, wobei M dem 1. Tag des Menstruationszyklus entspricht). Zusätzlich hat man die Messungen bei 20 Frauen auch in der Follikelphase (M+7) und in der Lutealphase (M-7) durchgeführt.

Die Studie wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Charité genehmigt, die Probandinnen haben in die Studie schriftlich eingewilligt.

Zur Quantifizierung der Anzahl zirkulierender PC dienten die folgenden Methoden, wie in Abbildung 2 dargestellt.

1. Messung der im peripheren Blut zirkulierenden CD34+ und CD34+/CD133+ PC mit FACS-Analyse.

2. Bestimmung der Anzahl der CFU-EPC am 7. Tag der Kultivierung.

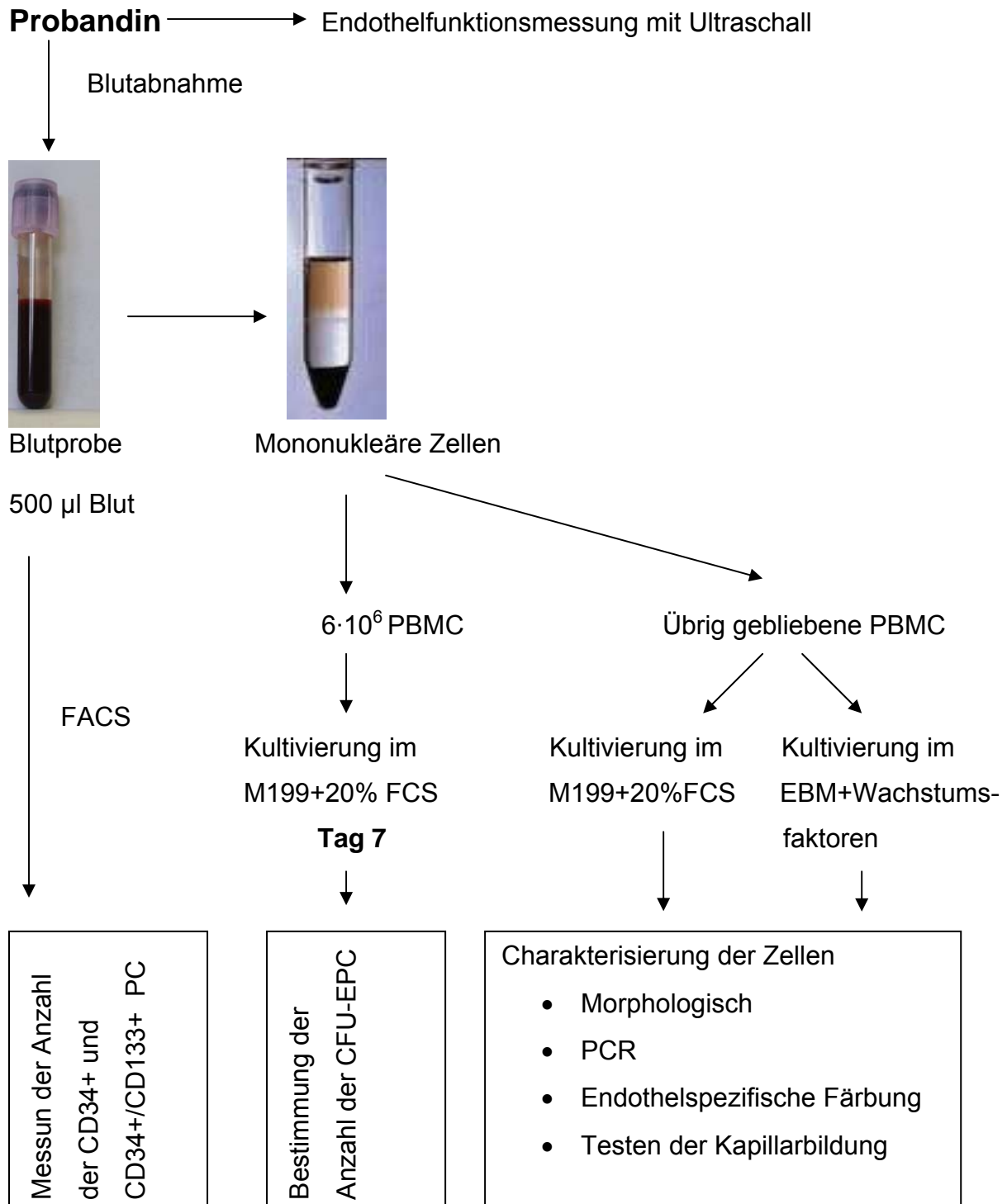


Abbildung 2: Schema der Probandenstudie. Aus den Blutproben erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der CD34+ und CD34+/CD133+ PC. Die Anzahl der PC wurden aus peripherem Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen, am 7. Tag wurde zusätzlich die Anzahl der CFU-EPC bestimmt. Um die *in vitro* Differenzierung der Progenitorzellen zu untersuchen, wurden die PC enthaltenden mononukleären Zellen in zwei verschiedenen Zellkulturmedien aufgeteilt.

5.2.1 Bestimmung der Anzahl der Progenitorzellen

5.2.1.1 Isolierung der Progenitorzellen

Die Isolierung der Progenitorzellen aus dem peripheren Blut erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation von Vasa et al. (2001). Dabei wurden 4 ml Ficoll mit 9 ml EDTA-Blut überschichtet und bei Raumtemperatur mit 160 g 15 Minuten lang ohne Bremse zentrifugiert. Nach Verwerfen der obersten Phase zum Abtrennen der Thrombozyten wurde die Mischung bei 400 g 15 Minuten lang weiterhin ohne Bremse zentrifugiert.

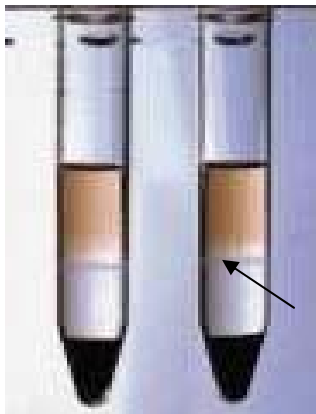


Abbildung 3: Isolierung der mononukleären Zellen mit Hilfe des Ficoll-Gradienten. Nach dem zweiten Zentrifugationsschritt bildet sich eine Interphase (mit Pfeil markiert), welche die mononukleären Zellen beinhaltet.

Nach der Zentrifugation stellen sich die mononukleären Zellen (MNC) als dünne Interphase zwischen den Schichten dar (Abbildung 3).

Die Interphase wurde in 10 ml PBS verdünnt und bei 1500 rpm abzentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde mit 10 ml PBS, dann mit 10 ml serumfreiem M199-Medium gewaschen, die Zentrifugationsschritte erfolgten bei 1300 und 1000 rpm. Die gewaschenen Zellen wurden in 20 % FCS enthaltendem M199-Medium (ergänzt mit 100 U/l Penicillin, 100 µg/ml Streptavidin) aufgenommen. Zur Bestimmung der Zellzahl diente eine Fuchs-Rosenthal-Kammer. Insgesamt wurden $6 \cdot 10^6$ mononukleäre Zellen auf eine mit Fibronectin beschichtete 24-well-Zellkulturschale in 6 well aufgeteilt, in einer Dichte von 10^6 Zellen pro well. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C und

5 % CO₂ kultiviert. Am 3. Tag wurden die nichtadhärenten Zellen entfernt. Der Wechsel des Zellmediums erfolgte jeden zweiten Tag.

Nach 7 Tagen wurden die adhärennten Zellen mit 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanide Perchlorate-konjugiertem acetyliertem low density lipoprotein (Dil-ac-LDL) gefärbt, wie es in Protokoll 5.3.3.3 beschrieben ist. Zur genauen Verifizierung des endothelialen Phänotyps wurden die Zellen zusätzlich mit endothelspezifischem FITC-markiertem BS-Lektin gemeinsam inkubiert.

5.2.1.2 Bestimmung der Anzahl der CFU-EPC

Die Anzahl der CFU-EPC wurde am 7. Tag der Kultivierung unter der größten Vergrößerung (40-fach) im Lichtmikroskop optisch beurteilt und jeweils 6 Sichtfelder pro Vertiefung der Zellkulturschale gezählt. Anschließend wurde davon der Mittelwert der CFU-EPC auf 10⁶ PBMC berechnet.

5.2.1.3 Bestimmung der Anzahl der CD34+ und CD34+/CD133+ Progenitorzellen mit FACS Analyse

Die zirkulierenden Progenitorzellen wurden in unserer Studie als CD34+ und CD34+/CD133+ Zellen definiert, die sich innerhalb der mononukleären Zellfraktion befinden.

Die Expression von Oberflächenproteinen wurde durch die Messung der Fluoreszenz monoklonaler, Fluorochrom-konjugierter Antikörper ermittelt. Zur Identifizierung der PC wurde die Dreifarbenfluoreszenzanalyse eingesetzt, um die Koexpression von CD34 und CD133 zu erfassen. Als Farbstoffe wurden das rot fluoreszierende Allophycocyanin (APC) und das orange fluoreszierende Phycoerythrin (PE) sowie das grün fluoreszierende Fluoresceinisothiocyanat (FITC) kombiniert. Zur Bestimmung unspezifischer Antikörperbindungen kamen Isotypkontrollen zur Verwendung. Dazu erfolgte eine Inkubation mit isotypischen Fluorochrom-konjugierten Immunglobulinen. Die Quantifizierung der PC erfolgte unmittelbar nach der Isolierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (Peripheral blood mononuclear cells, PBMC). Bei jeder Messung wurden mindestens 500.000 Zellen analysiert.

Zu 500 µl EDTA-Blut wurden je 5 µl CD14-FITC-, CD133-PE- und CD34-APC-Antikörper hinzugefügt, gemischt und für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde in jedes der Röhrchen 5 ml Easy-Lyse-Lösung zugegeben und bei Raumtemperatur im Dunkeln für 10 Minuten inkubiert. Dieser Schritt diente zur Lyse der Erythrozyten, die die FACS-Analyse negativ beeinflussen. Die ungebundenen Antikörper und die lysierten Erythrozyten wurden, nach der Zentrifugation bei 200 rpm für 5 Minuten, entfernt. Das Pellet wurde in 1 ml mit 0,5 % BSA versetzter PBS-Lösung aufgenommen und bis zur Messung im Dunkeln auf Eis gelagert.

Alle hier beschriebenen durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden am CyAn-ADP Zytometer durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit der Software Summit 4.1, wobei in der vorliegenden Arbeit die Daten als zweidimensionale „Punktdiagramme“ (Dot-plots) dargestellt sind. Hierbei wurden Trennlinien („Quadrantenmarker“) in die Punktdiagramme gelegt. Durch die Trennlinien entstehen im Dot-plot vier Quadranten. Der sich jeweils im Quadranten befindende Prozentsatz der Zellen lässt sich in der Quadrantenstatistik ablesen. Mehr als 99 % der Zellen der Negativkontrolle sollen sich im linken unteren Quadranten befinden. Die Anzahl der CD34+ und CD34+/CD133+ PC wurde als % der PBMC angegeben.

5.2.2 Messung der Endothelfunktion

Die Endothelfunktion wurde mit Hilfe der endothelabhängigen Dilatation der Arteria brachialis mittels hochauflösenden Ultraschalls quantifiziert wie zuvor beschrieben (Lorenz et al. 2007).

Das Prinzip dieses Untersuchungsverfahrens ist die Bestimmung der Zunahme des Durchmessers der *A. brachialis* entweder nach einer physiologischen Stimulation der endothelialen NO-Synthese durch Steigerung der Fließgeschwindigkeit (flussvermittelte Dilatation, FMD) oder nach Gabe von Nitraten (endothelunabhängige, nitroinduzierte Vasodilatation, NMD).

Kurz zusammengefasst, die endothelabhängige Dilatation wurde nach einer Hyperämie gemessen. Die reaktive Hyperämie wurde durch fünfminütige Insufflation einer am proximalen Unterarm angelegten Blutdruckmanschette induziert wie bereits beschrieben (Corretti et al. 2002).

Die endothelunabhängige Vasodilatation wurde nach sublingualer Gabe von 400 µg Glyceroltrinitrat erfasst. Die maximale Dilatation wurde 2 Minuten nach Gabe von Glyceroltrinitrat bestimmt. Sowohl die endothelabhängige als auch die endothelunabhängige Vasodilatation wurden als prozentuale Zunahme des Durchmessers in Relation zum Ruhedurchmesser angegeben.

Die Daten wurden durch zwei unabhängige Untersucher zum späteren Zeitpunkt ausgewertet.

5.3 Beobachtung der Differenzierung von Progenitorzellen *in vitro*

Ziel der unten beschriebenen Versuche war, die Entwicklung der PC in zwei verschiedenen Zellkulturmedien zu beobachten. Hier wurde untersucht, ob mononukleäre Zellen Progenitorzellen, die zu Endothelzellen differenzieren können, beinhaltet.

5.3.1 Zellmaterial

Zur quantitativen Analyse der PC wurden im Rahmen der Probandenstudie $6 \cdot 10^6$ mononukleäre Zellen verwendet. Die übrig gebliebenen Zellen dienten als Zellmaterial für die weiteren Versuche. Die Isolierung der PC enthaltenden mononukleären Zellen erfolgte nach dem im 5.2.1.1 Punkt beschriebenen Protokoll. Die gewonnenen Zellen wurden auf eine mit Fibronectin beschichtete 24-well-Platte mit einer Zelldichte von 10^6 Zellen/well verteilt.

5.3.2 Zellkulturmedien

Die Hälfte der Zellen wurde in 20 % FCS enthaltendem M199-Medium, die andere Hälfte in einem speziellen Endothelmedium (500 ml EBM Medium mit EGM-2 Bullet Kit, wird im Weiteren als angiogenes Zellkulturmedium bezeichnet), in einer Dichte von 10^6 Zellen/ml Medium aufgeteilt. Der Wechsel des Zellmediums erfolgte jeden zweiten Tag. Das EGM-2 Bullet Kit besteht aus 25 ml fetalem Kälberserum (Fetal calf serum, FCS), 0,2 ml Hydrocortison, 2 ml humanem Fibroblasten Wachstumsfaktor B 10 µg/ml

(Human fibroblast growth factor-basic, HFGF-B), 500 µl vaskulärem endothelialem Wachstumsfaktor (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 10 µg/ml, 500 µl insulinähnlichem Wachstumsfaktor (Insulin-like growth factor, IGF) 10 µg/ml, 500 µl humanem epidermalem Wachstumsfaktor 10 µg/ml (Human epidermal growth factor, hEGF), 500 µl GA-1000 (Gentamycin, Amphotericin) sowie 5 ml einer Mischung von Antibiotika (Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml, Amphotericin-B-25 µg/ml).

5.3.3 Charakterisierung der Progenitorzellen in Zellkultur

5.3.3.1 Morphologische Beurteilung

Die Morphologie der Zellen wurde unter 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung mit einem Lichtmikroskop dokumentiert.

5.3.3.2 Bestimmung der RNA-Expression

Um die Expression endothelspezifischer Marker und Enzyme der kultivierten Zellen zu testen, wurde eine sensitive Reverse-Transkriptase- Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt.

5.3.3.2.1 Isolierung der mRNA

Nach Abnehmen des Mediums wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe des RotherQuick Kits nach den Vorschriften des Herstellers (Roth). Die gewonnen RNA wurde kurz an der Luft getrocknet und in 20 µl Aqua bidest. aufgenommen. Die RNA wurde fotometrisch vermessen und bei -80 °C eingefroren. Für die fotometrische Messung wurde die RNA 1 : 10 in Aqua bidest. verdünnt und die Extinktion bei 260 und 280 nm bestimmt.

5.3.3.2.2 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurde 1 µg Total-RNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Als Transkriptionsenzym wurde M-MLV (Moloney murine leukemia virus) reverse Transkriptase verwendet.

Ansatz 1: 1 µg RNA
 1 µg oligo dT
 Aqua bidest. ad 13 µl

Dieser Ansatz wurde 10 Minuten bei 65 °C inkubiert, um eine möglichst vollständige Anlagerung der Primer zu ermöglichen.

Ansatz 2: 4 µl 5-mal First Strand Buffer
 1 µl 10 mM dNTP
 1 µl RNasin[®] (50 U/µl)
 1 µl RT M-MLV reverse Transkriptase (200 U/µl)

Nach der Mischung des inkubierten Ansatzes 1 mit Ansatz 2 wurde die Probe für 60 Minuten bei 42 °C inkubiert. Um sicherzustellen, dass die Reaktionsbedingungen für alle RT-Ansätze gleich waren, wurde zunächst ein Master-Mix für alle Proben angesetzt und dann davon je 7 µl zu dem jeweiligen RT-Ansatz 1 hinzugegeben. Diese Mischung wurde für eine Stunde bei 42 °C inkubiert, anschließend auf Eis abgekühlt und dazu 20 µl Aqua bidest. hinzugefügt. Die cDNA-Probe wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

5.3.3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine sehr effektive Methode, um *in vitro* große Mengen einer spezifischen DNA-Sequenz zu erzeugen. Diese können anschließend in einer Agarose-Gel-Elektrophorese durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden.

Die gewünschten Sequenzen wurden der Datenbank NCBI Entrez Genome entnommen.

Verwendete Primer (jeweils Sense und Antisense Primer):

CD34 (157 bp)	5'-GCAAGCCACCAGAGCTATTC-3' 5'-GGTCCCAGGTCCTGAGCTAT-3'
CD31 (645 bp)	5'-GCTGTTGGTGGAAAGGAGTGC-3' 5'-GAAGTTGGCTGGAGGTGCTC-3'
eNOS (548 bp)	5'-AAGACATTTTCGGGCTCACGCTGCGCACCC-3' 5'-TGGGGTAGGCACTTTAGTAGTTCTCCTAAC-3'
CD14 (450 bp)	5'-CACACTCGCCTGCCTTTTCC-3' 5'-GATTCCCGTCCAGTGTCAGG-5'
CD45 (485 bp)	5'-TTCAACTTATACCCTTCGTGT-3' 5'-CCTGCTTTACTTTGTCCACTTC-3'
Cadherin (593 bp)	5'-GGATGACCAAGTACAGC-3' 5'-ACACACTTTGGGCTGGTAGG-3'
KDR (619 bp)	5'-GGACCTGGCGGCACGAAATA-3' 5'-AGGCCGGCTCTTTCGCTTAC-3'
RPL 13 (490 bp)	5'-CAACGTGCAGCGGCTGAAGGAGTACC-3' 5'-GATCCGCAGACGTAAGGCCCGGCAAC-3'
vWF (434 bp)	5'-TGGATGAGCTTTTGCAGACC -3' 5'-GTGGGAGCCGTCGTGG -3'

Die Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz erfordert eine Reihe von Zyklen, wobei jeder Zyklus aus drei aufeinander folgenden Schritten besteht.

Der Reaktionsansatz bestand aus folgenden Zutaten:

1 µl cDNA (aus der reversen Transkription)

0,5 µl von jedem Primer

1 µl dNTP-Mix (20 mM je Nukleotid)

5 µl Taq 10-fach-Puffer

10 µl Q vom Qiagen Kit

0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)

Der Reaktionsansatz wurde mit Aqua bidest. auf ein Reaktionsvolumen von 50 µl gebracht. Im Thermocycler von Biometra erfolgte die PCR. Die Proben wurden nach Abkühlen entweder direkt elektrophoretisch aufgetrennt oder bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem Agarosegel. Die Konzentration der Agarose wurde entsprechend der Amplifikatlänge bestimmt. Bei längeren PCR Produkten (>300 bp) wurde eine Konzentration der Agarose von 1 % verwendet, bei kürzeren PCR-Produkten lag die Konzentration der Agarose bei 2 %.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80–100 mA für ca. 1 Stunde. Die optische Analyse wurde mit Hilfe eines UV-Transilluminators durchgeführt, wobei die Bilder anschließend fotografiert wurden.

5.3.3.3 Färbung mit Dil-ac-LDL und BS-Lektin

Dieser Versuch wurde am 7. Tag der Kultivierung der PBMC durchgeführt. Im ersten Schritt wurde das Zellmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Dil-ac-LDL-Lösung wurde in M199-Medium in einer Konzentration von 10 µg/ml verdünnt, 200 µl von der verdünnten Lösung wurden auf die Platte überführt und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Der Farbstoff wurde in zwei nacheinander folgenden Waschschrritten mit PBS entfernt.

Anschließend erfolgte eine Fixierung der Zellen in 5 % Paraformaldehyd in PBS bei 37 °C für 60 Minuten, wonach die Zellen mit PBS gewaschen wurden. Die Fixierung wurde mit einer 5 -prozentigen BSA-PBS-Lösung bei 37 °C für 20 Minuten geblockt. Anschließend wurden die Ansätze dreimal mit PBS gewaschen. Der BS-Lektin-Farbstoff wurde in einer Konzentration von 1 µl/ml in PBS verdünnt, 200 µl auf die

Platte überführt und der Ansatz bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Hinterher folgten zwei Waschschriffe mit PBS, dann wurde die Probe in PBS aufgehoben. Die gefärbten Proben wurden unter einem Zeiss-Fluoreszenz-Mikroskop begutachtet.

5.3.3.4 Testen der Kapillarbildung (Matrigel-Assay)

Der Matrigel-Assay ist eine Möglichkeit *in vitro* das angiogene Potenzial von Endothelzellen zu untersuchen. In diesem Versuch wurde geprüft, ob die in zwei verschiedenen Zellkulturmedien kultivierten PBMC im Matrigel ähnliche Kapillaren bilden können, wie die Nabelschnurendothelzellen (Human umbilical vein endothelial cells; HUVEC). Außerdem wurde getestet, ob sich solche PBMC in Netzwerke differenzierter Endothelzellen eingliedern können.

Das bei -20°C gelagerte Matrigel wurde vor dem Versuchstag über Nacht bei 4°C gelagert. Das Matrigel wurde 1:1 mit HUVEC-Medium (500 ml EBM mit 50 ml FCS und 2 ml Endothelial cell growth supplement=ECGS) verdünnt und bei 20°C für 5 Minuten inkubiert, damit eine vollständige Mischung gewährleistet werden konnte. Die Pipettenspitzen mussten vorher gekühlt werden, damit das Matrigel während des Pipettierens nicht fest wird. Das Matrigel wurde mit HUVEC-Medium überschichtet und für 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Während dessen wurden die kultivierten PBMC und HUVEC gewaschen, trypsinisiert und gezählt. 10^5 Zellen wurden ausgesät und in einer Dichte von 250 μ l/wells auf das Matrigel überführt.

Die folgenden Ansätze wurden durchgeführt:

- Ansatz 1: 10^5 HUVEC-Zellen, die als Kontrolle dienen
- Ansatz 2: 10^5 PBMC kultiviert in angiogenem Endothelmedium (EBM mit EGM-2 Bullet Kits) in der 4. Woche der Kultivierung
- Ansatz 3: 10^5 PBMC kultiviert in M199 mit 20 % FCS, in der 2. Woche der Kultivierung
- Ansatz 4: 10^5 HUVEC-Zellen gemeinsam mit $5 \cdot 10^4$ gefärbten PBMC (kultiviert im M199 + 20 % FCS)

Die Färbung mit Dil-ac-LDL erfolgte am 7. Tag der Kultivierung nach dem im Punkt 5.3.3.3 beschriebenen Protokoll. Die Ansätze wurden über Nacht bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubiert und am nächsten Tag an einem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert.

5.4 Untersuchung der CD34+ Progenitorzellen

5.4.1 Isolierung der CD34+ Progenitorzellen

Die CD34+ Zellen können aus peripherem Blut, Knochenmark und Nabelschnur isoliert werden (Qurici et al. 2001, Peichev et al. 2000). Wenn die CD34+/CD133+ Zellen aus peripherem Blut mit Hilfe magnetischer Partikeln selektiert werden, ist die Menge des gewonnenen Zellmaterials gering. Bei gesunden erwachsenen Personen liegt der Anteil der CD34+/CD133+/KDR+ Zellen an der Gesamtzahl mononukleärer Zellen (MNC) im peripheren Blut unter 0,1 % (Peichev et al. 2000; Vasa et al. 2001). Ein höherer Anteil der CD34+ PC liegt im peripheren Blut nach vorausgegangener Zytokin-induzierter Mobilisierung vor. Dazu wird vor allem G-CSF verwendet, der einen fünffachen Anstieg der CD34+/KDR+ PC bewirken kann (Peichev et al. 2000, Kalka et al. 2000).

Bei unseren Versuchen wurden solche Proben bearbeitet, bei denen die Progenitorzellen zuvor aus dem Knochenmark mit G-CSF und GM-CSF mobilisiert wurden. Aus solchen Proben können die Zellen eingefroren werden (Leukapheresat). Die Isolierung der CD34+ Zellen erfolgte aus Leukapheresat mit Hilfe von magnetischen Partikeln.

5.4.1.1 Prinzip der MACS-Isolierung

Die magnetische Zellseparation (Magnetic cell separation, MACS) ist eine zur Isolierung von definierten Zellen aus einer uneinheitlichen Zellpopulation entwickelte Methode. Ihr Prinzip beruht darauf, dass Zellen über monoklonale Antikörper direkt oder indirekt mit magnetischen Partikeln (Durchmesser kleiner als 100 nm) markiert und die Zellsuspension dann auf eine sich im Magnetfeld (starkes Permanentmagnetsystem) befindende Trennsäule gebracht werden. Die von uns verwendeten Trennsäulen besitzen eine Matrix aus eisenmagnetischen Kugeln. Die markierten Zellen werden durch magnetische Kräfte in der Säule zurückgehalten und nach Entnahme der Säule aus dem Magnetfeld eluiert.

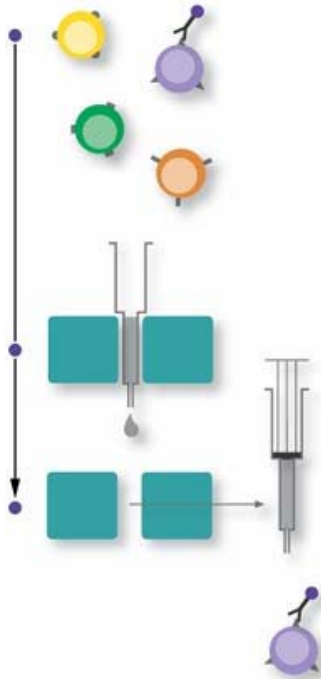


Abbildung 4: Schema der Zellisolierung mittels MACS. Die Zellen wurden mit Hilfe von Magnetpartikeln markiert. Markierte Zellen werden durch magnetische Kräfte in der Säule zurückgehalten und nach Entnahme der Säule aus dem Magnetfeld entfernt.

5.4.1.2 Selektion der CD34+ Progenitorzellen

In unserem Versuch wurden die CD34+ Progenitorzellen aus Leukapheresat gewonnen. Das Leukapheresat war in DMSO eingefroren und wurde zunächst bei 37 °C aufgetaut. 10 ml Leukapheresat wurden in ein 50-ml-Falcon-Röhrchen überführt, mit RPMI wurde das fehlende Volumen ersetzt und bei 800 rpm 6 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen sowie das Pellet zweimal mit MACS-Puffer bei 1300 rpm und anschließend bei 1000 rpm gewaschen.

Die Zellzahl wurde durch Zählen in einer Fuchs-Rosenthal Kammer ermittelt und tote Zellen durch Trypanblaufärbung ausgeschlossen. Zu 10^8 Zellen wurden 300 μ l vom MACS Puffer (PBS mit 0,5% BSA und 2 mM EDTA) gegeben.

Zu 10^8 Zellen wurden 100 μ l FcR Blocking Lösung hinzugefügt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Die Proben wurden mittels Vortex gemischt und dazu 100 μ l CD34-MACS-Antikörper gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten bei 4 °C. Danach wurde die Probe mit MACS-Puffer auf 10 ml verdünnt und bei 4 °C und 200 g für 6 Minuten zentrifugiert. Danach erfolgte eine Resuspendierung das

Pellets in 1000 µl Puffer. Zwei VS⁺-Säulen wurden mit je 2 ml MACS-Puffer gewaschen. Hinterher wurden die Zellsuspensionen über die Säulen getrennt, wobei die negativen Fraktionen jeweils in einem 15-ml-Röhrchen gesammelt wurden. Nach Durchlaufen der Zellsuspension durch die Säule wurde jeweils mit 2 ml MACS-Puffer nachgespült. Danach wurden die Säulen aus dem Magnetfeld entfernt und jeweils auf ein weiteres 15-ml-Röhrchen aufgesetzt. 3 ml PBS/BSA wurden mit Hilfe des Säulenstempels durch die Säule gedrückt und so die magnetisch markierten Zellen in das Röhrchen eluiert. Sowohl von der positiven, als auch von der negativen Fraktion wurde ein kleines Volumen für die durchflusszytometrische Untersuchung entnommen. Die positiven Fraktionen durchliefen jeweils noch eine zweite Säule, um die Reinheit der angereicherten Zellen zu erhöhen. Auch danach wurden Zellen für die durchflusszytometrische Analyse entnommen.

5.4.2 Zellkultur

Das Zellmaterial wurde anschließend in angiogenem Zellkulturmedium in einer Konzentration von 10⁶ Zellen/ml Medium aufgenommen, auf eine mit Fibronectin beschichtete 6-well-Zellkulturplatte aufgeteilt und bei 37° und 5 % CO₂ kultiviert.

Insgesamt wurden drei Zellpopulationen untersucht, nämlich die nicht selektierten PBMC, die isolierten CD34+ und die CD34- Zellen.

Die Entwicklung der oben beschriebenen Zellgruppen wurde unter dem Lichtmikroskop begutachtet und dokumentiert

5.5 Statistische Analyse

Die statistische Datenverarbeitung wurde mit Hilfe des Statistica-Programmes (7.0) durchgeführt. Deskriptive statistische Daten wurden als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. In den Graphiken wurde der Mittelwert und SEM dargestellt. Der Vergleich zwischen der Raucher- und Nichtrauchergruppe wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests geprüft. Die zyklusabhängigen Unterschiede der untersuchten Parameter wurden nach dem Test von Wilcoxon berechnet. Zur

Berechnung des Korrelationskoeffizienten wurde die Rangkorrelation nach Spearman verwendet. Eine statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

6. Ergebnisse

6.1 *Probandenstudie - Einfluss des Rauchens auf die Anzahl zirkulierender Progenitorzellen bei gesunden prämenopausalen Frauen*

6.1.1 Probandencharakteristika

Insgesamt wurden 32 Frauen, nämlich 15 Nichtraucherinnen und 17 Raucherinnen in die Studie eingeschlossen. Das mittlere Alter der Probandinnen lag bei $31,3 \pm 3,2$ Jahren.

Einschlusskriterien waren ein Alter zwischen 25-35 Jahren sowie Normalgewicht und eine regelmäßige Länge des Menstruationszyklus, die vollständig erfüllt wurden (s. Tabelle 3).

Zu den Ausschlusskriterien gehörten die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypertonie, Dyslipidämie, Diabetes Mellitus und Hyperhomozysteinämie, die bei keiner der untersuchten Probandinnen vorlagen. Keine der Probandinnen verfügte über eine positive Familienanamnese bezüglich koronarer Herzkrankheit. Hormonelle Kontrazeption erfolgte bei keiner Probandin.

Rauchen war der einzige kardiovaskuläre Risikofaktor in der Rauchergruppe. Die Raucherinnen haben durchschnittlich $14,8 \pm 4,6$ Packungsjahre geraucht. Von den Nichtraucherinnen hat niemand regelmäßig geraucht.

Die Raucherinnen waren etwas älter ($32,4 \pm 2,9$ vs. $29,7 \pm 2,9$ Jahre, $p < 0,05$). Keine der anderen untersuchten Parameter zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Um zyklusbedingte hormonelle Einflüsse auf die Anzahl zirkulierender Progenitorzellen zu untersuchen, erfolgten in einer Untergruppe der Probandinnen zusätzliche Messungen in der Follikel (M+7) und Lutealphase (M-7).

Der Menstruationszyklus hatte in beiden Gruppen eine normale Länge ($29 \pm 2,2$ vs. $28,5 \pm 1,5$ Tage). Bei den Probandinnen ($n=20$), bei denen zusätzliche Messungen auch in der Follikel- und in der Lutealphase erfolgten, waren die Sexualhormone im physiologischen Normbereich (Progesteronspiegel > 18 nmol/l in der Lutealphase).

Ergebnisse

	Gesamt (n=32)	Nichtraucher (n=15)	Raucher (n=17)
Alter (Jahre)	31,3±3,2	29,7±2,9*	32,4±2,9*
Body mass index (kg/m ²)	21,3±1,5	21,3±1,7	21,3±1,4
Länge des Menstruationszyklus (Tage)	28,7±2,1	29±2,2	28,5±1,5
Nikotinabusus (Packungsjahre)	0	0	14,8±4,6
Systolischer Blutdruck (mmHg)	98±33	102±30	94±36
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	65±22	67±20	63±25
Cholesterol gesamt (mg/dl)	164±23	158±17	168±27
HDL (mg/dl)	64,4±10,1	66,9±9,1	62,2±10,7
LDL (mg/dl)	85,8±24,5	79,9±16,5	91,1±29,4
Triglyceride (mg/dl)	67,7±28,4	57,5±13,4	76,7±35,0
Lipoprotein(a) (mg/dl)	7,0±4,0	7,4±4,2	6,6±3,8
hsCrP (mg/dl)	0,08±0,07	0,09±0,08	0,08±0,06
Insulin (mIU/l)	5,6±2,2	5,2±2,1	6,0±2,3
Glukose (mg/dl)	87,7±7,2	87,0±4,9	88,4±8,8
Homozystein (µmol/l)	8,5±1,7	8,2±1,7	8,7±1,8
Folsäure (µg/l)	8,8±4,5	10,2±5,6	7,6±2,8
Harnsäure (µmol/l)	3,9±0,9	3,7±0,9	4,1±0,8
Östradiol (pmol/l)	613±194	598±191	626±201
Progesteron (nmol/l)	51,4±17,6	51,2±16,4	51,5±19,2
LH (IU/l)	4,7±2,9	4,5±3,8	4,9±2,0
FSH (IU/l)	2,7±1,2	2,8±1,5	2,7±0,7

Tabelle 3: Charakteristika des Studienkollektivs (Mittelwert±SEM; *=p<0,05). BMI = Body mass index; LH = Luteinisierendes Hormon FSH = Follikelstimulierendes Hormon; HDL = High-density lipoprotein; LDL = Low density lipoprotein; hsCrP = High-sensitivity C-reaktive protein.

6.1.2 Einfluss des Rauchens auf die Anzahl zirkulierender Progenitorzellen und auf die Endothelfunktion

Die Anzahl zirkulierender Progenitorzellen wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden bestimmt. Erstens wurde analog zum „Asahara“ Test die Anzahl der CFU-EPC am 7. Tag der Zellkultur *in vitro* bestimmt.

Zweitens wurde mittels FACS Analyse die Anzahl der im peripheren Blut zirkulierenden CD34+ und CD34+/CD133+ Progenitorzellen ermittelt.

6.1.2.1 Bestimmung der Anzahl der CFU-EPC

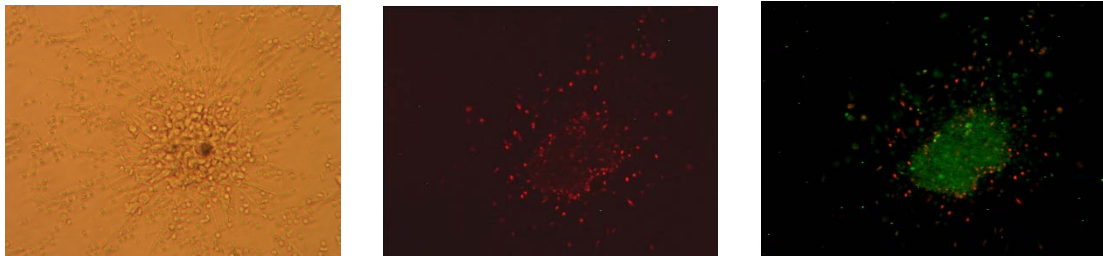


Abbildung 5: Färbung der CFU-EPC mit Dil-ac-LDL und BS-Lektin.

A: Typische CFU-EPC B: Färbung mit Dil-ac-LDL, C: Doppelte Färbung mit Dil-ac-LDL und BS-Lektin.

In der Zellkultur entwickelten sich nach 2-3 Tagen typische CFU-EPC mit endothelartigen, länglichen Zellen. Es konnte in diesen Zellen am 7. Tag der Kultivierung die Aufnahme von Dil-ac-LDL und BS-Lektin beobachtet werden (Abbildung 5).

6.1.2.2 Bestimmung der Anzahl der CD34+ und CD34/CD133+ Progenitorzellen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lassen sich im peripheren Blut anhand der Größe und Granularität drei große Zellgruppen der zellulären Bestandteile des peripheren Blutes, nämlich die Granulozyten, die Monozyten und die Lymphozyten unterscheiden, wie in Abbildung 6 dargestellt. Die Bestimmung der zirkulierenden CD34+ und CD34+/CD133+ PC erfolgte aus der mononukleären Zellfraktion, welche die Lymphozyten und Monozyten (R1 in Abbildung 6) beinhaltet. Nur ein geringer

Prozentsatz der mononukleären Zellen gehörte zu den CD34+ Zellen (Abbildung 6 B). Der größte Teil der CD34+ Zellen war auch für CD133 positiv (Abbildung 6 C). Insgesamt wurden 500 000 mononukleäre Zellen (PBMC) gemessen. Die Anzahl zirkulierender PC wurde in % der PBMC angegeben.

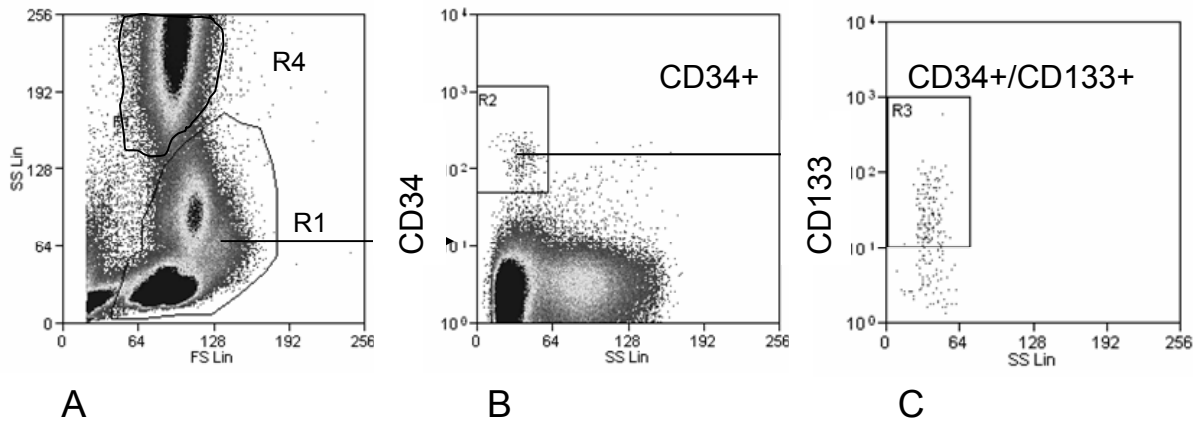


Abbildung 6: Bestimmung der CD34+ und CD34+/CD133+ Progenitorzellzahl im peripheren Blut mit FACS. A: Mononukleäre Zellen mit Lymphozyten und Monozyten (entspricht Zellfraktion R1). B: Mit CD34-APC markierte CD34+ Zellen (Zellfraktion R2) C: CD133+ und CD34+ Zellen (Zellfraktion R3).

6.1.2.3 CFU-EPC

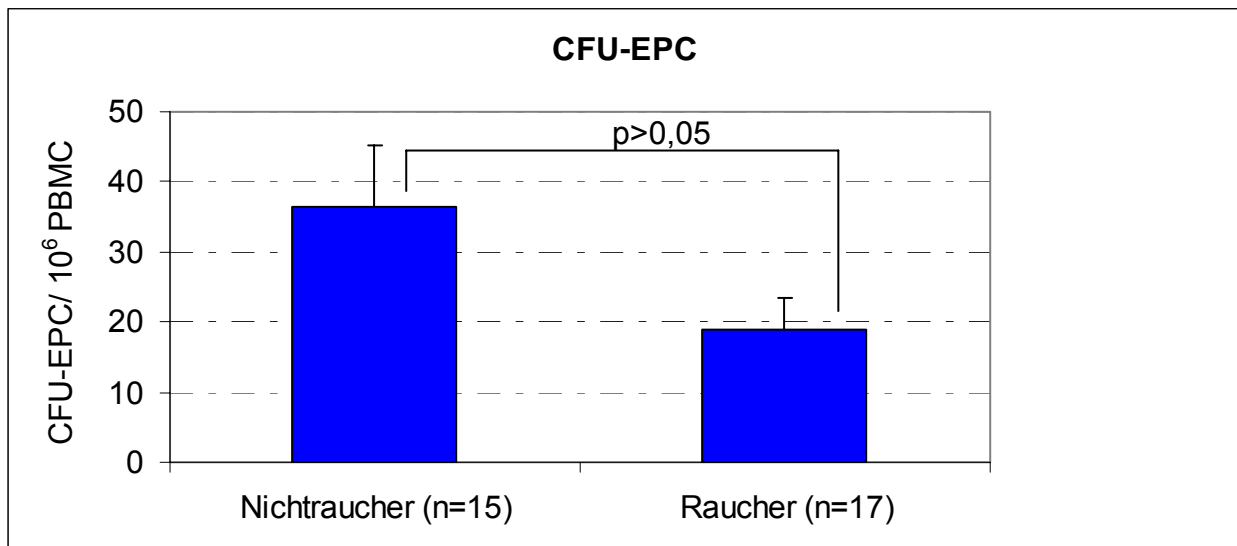


Abbildung 7: Mittelwerte (\pm SEM) der CFU-EPC / 10⁶ PBMC bei Raucherinnen und Nichtraucherinnen in der Menstruationsphase (M+3).

Die Anzahl der CFU-EPC lag in der Menstruationsphase (M+3) bei den Nichtraucherinnen mit $36,5 \pm 8,7 / 10^6$ PBMC deutlich über dem Wert der Raucherinnen

($18,8 \pm 4,5 / 10^6$ PBMC). Insgesamt konnten große individuelle Unterschiede der CFU-EPC beobachtet werden. Mutmaßlich aus diesem Grund fielen die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen statistisch nicht signifikant aus.

6.1.2.4 CD34+ und CD34+/CD133+ Progenitorzellen

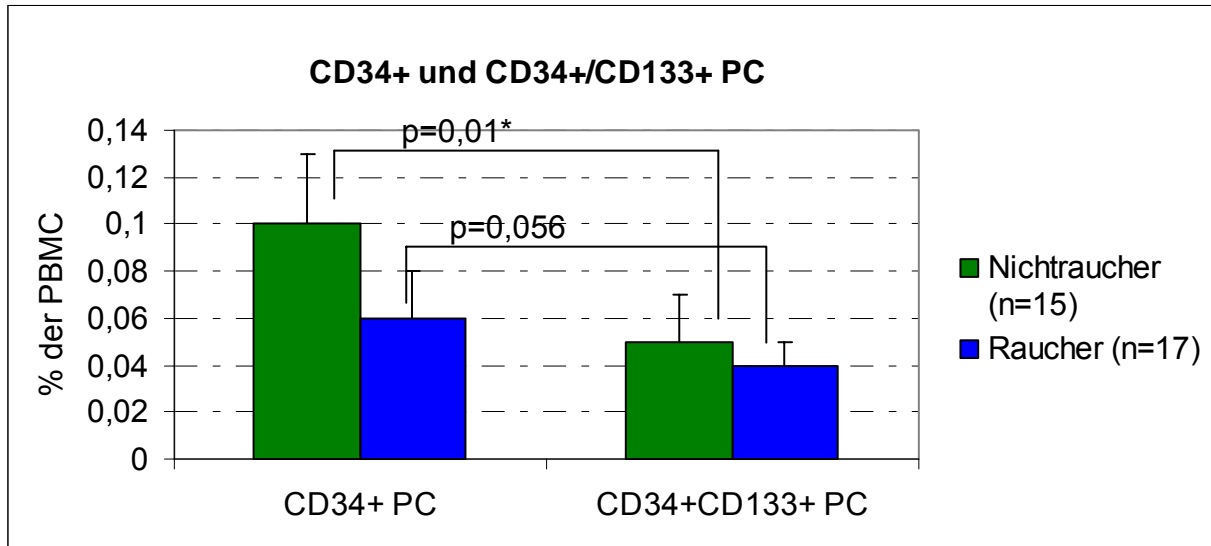


Abbildung 8: Mittelwerte (\pm SEM) der CD34+ und CD34+ / CD133+ PC (in % der PBMC) bei Raucherinnen und Nichtraucherinnen in der Menstruationsphase (M+3).

Der Mittelwert der CD34+ PC lag in der Menstruationsphase (M+3) bei Nichtraucherinnen ($0,10 \pm 0,03$ % der PBMC) deutlich höher als bei Raucherinnen ($0,06 \pm 0,02$ der PBMC). Der Unterschied war mit einem p-Wert von 0,01 statistisch signifikant.

Die Anzahl der CD34+/CD133+ PC belief sich in der Menstruationsphase (M+3) bei Nichtraucherinnen auf $0,05 \pm 0,02$ % der PBMC, bei Raucherinnen auf $0,04 \pm 0,01$ % der PBMC. Hier konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0,056$).

6.1.2.5 Endothelfunktion

Bei Raucherinnen zeigte sich mit $8,7 \pm 3,7$ % keine signifikante Reduktion der flussvermittelten, endothelabhängigen Vasodilatation (FMD) gegenüber Nichtraucherinnen ($9,9 \pm 4,5$ %).

Die nitroinduzierte, endothelunabhängige Dilatation (NMD) der Arteria brachialis zeigte ebenso keine nennenswerten Unterschiede zwischen der Nichtraucher-($24,3 \pm 7,2\%$) und Rauchergruppe ($25,7 \pm 7,5\%$).

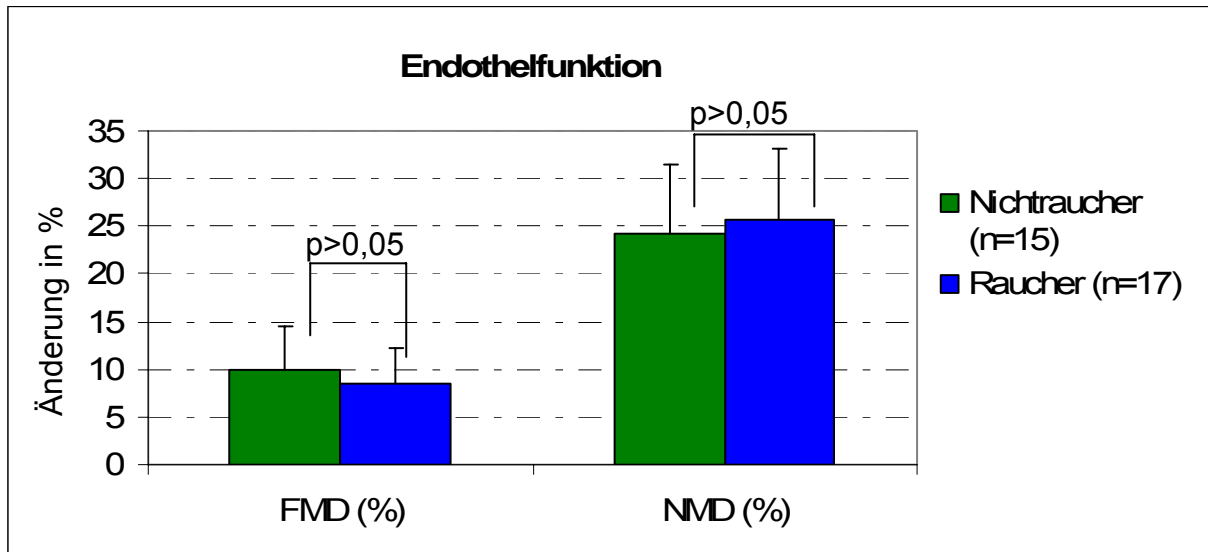


Abbildung 9: Mittelwerte (\pm SEM) der flussvermittelten (FMD) und nitroinduzierten (NMD) Vasodilatation bei Raucherinnen und Nichtraucherinnen in der Menstruationsphase (M+3).

6.1.2.6 Endothelfunktion und CD34+ Progenitorzellen

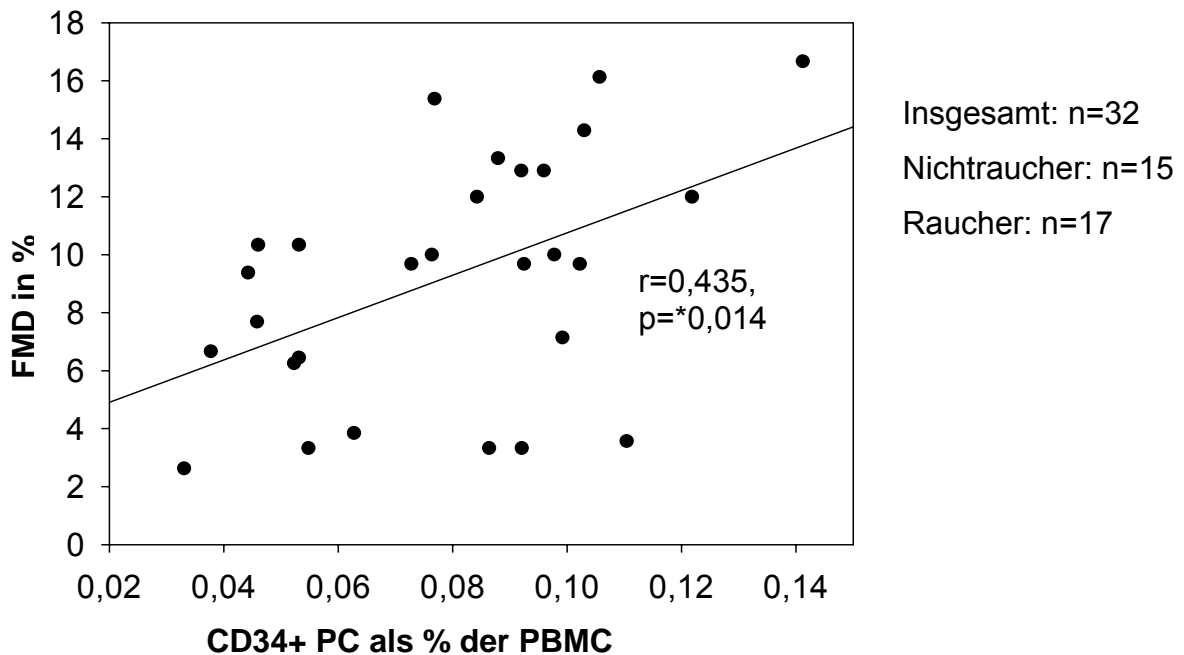


Abbildung 10: Korrelation zwischen flussvermittelter Vasodilatation (FMD) und CD34+ Progenitorzellzahl in der Menstruationsphase (M+3).

Es konnte eine statistisch signifikante Korrelation ($r=0,435$, $p=0,014$) zwischen der Anzahl der CD34+ PC (gemessen in der Menstruationsphase; M+3) und flussvermittelter Dilatation (FMD) festgestellt werden. Die Anzahl der CFU-EPC und der CD34+/CD133+ PC korrelierte nicht mit der flussvermittelten Dilatation (FMD).

Die nitroinduzierte Dilatation (NMD) zeigte keine nennenswerte Korrelation mit den untersuchten Parametern.

6.1.3 Einfluss des Rauchens auf die Anzahl der Progenitorzellen während des Menstruationszyklus

Um den Einfluss des Rauchens auch unter stärkerem Einfluss endogener Sexualhormone zu untersuchen, wurde die Anzahl der PC bei 20 Probandinnen auch in der Follikel-(M+7) und Lutealphase (M-7) ermittelt. Diese Messungen erfolgten insgesamt bei 8 Nichtraucherinnen und 12 Raucherinnen.

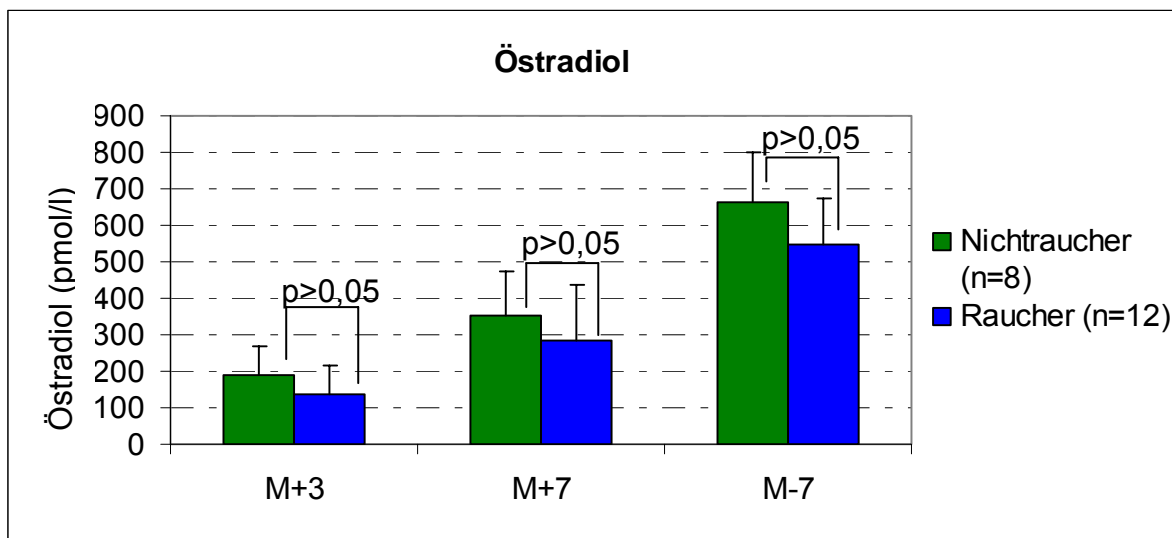


Abbildung 11: Mittelwerte (\pm SEM) der Östradiolwerte zu drei Zeitpunkten des Menstruationszyklus in der Raucher- und Nichtrauchergruppe. M+3: 3. Tag des Menstruationszyklus (Menstruationsphase; M=Beginn der Regelblutung); M+7: 7. Tag des Menstruationszyklus (Follikelphase); M-7: 7. Tag vor dem Beginn der Regelblutung (Lutealphase).

Der Östradiolspiegel betrug in der Follikelphase 353 ± 119 pmol/l bei Nichtraucherinnen bzw. 285 ± 150 pmol/l bei Raucherinnen und war damit etwa doppelt so hoch wie in der Menstruationsphase (188 ± 79 pmol/l in der Nichtrauchergruppe bzw. 138 ± 78 pmol/l in

der Rauchergruppe). Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen an den jeweils untersuchten Zeitpunkten waren statistisch nicht signifikant.

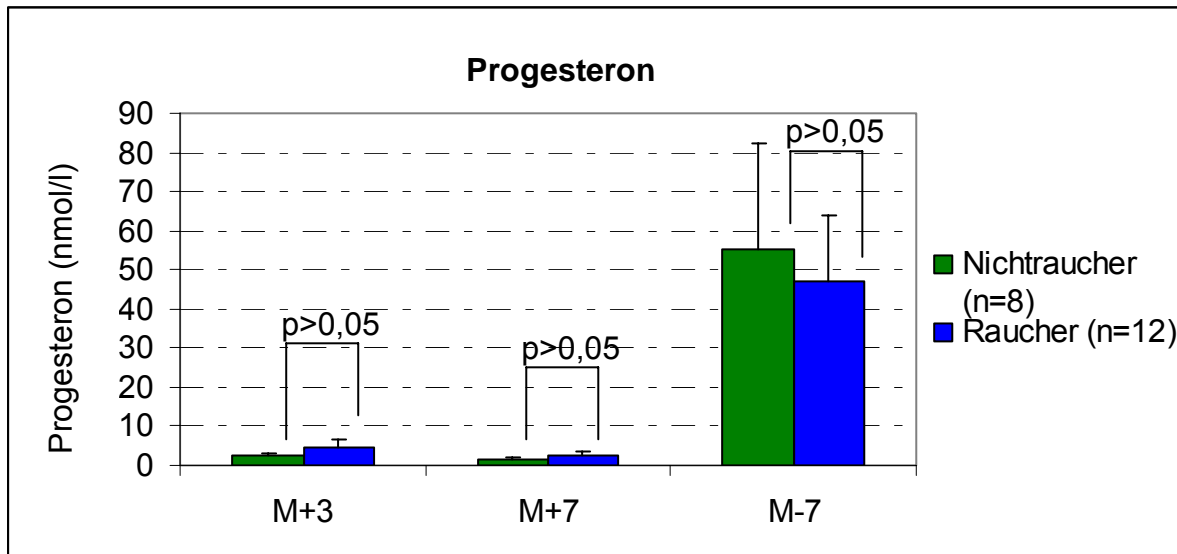


Abbildung 12: Mittelwerte (\pm SEM) der Progesteronwerte zu drei Zeitpunkten des Menstruationszyklus in der Raucher- und Nichtrauchergruppe. M+3: 3. Tag des Menstruationszyklus (Menstruationsphase; M=Beginn der Regelblutung); M+7: 7. Tag des Menstruationszyklus (Follikelphase); M-7: 7. Tag vor dem Beginn der Regelblutung (Lutealphase).

Die Progesteronwerte zeigten physiologische Schwankungen mit deutlich höheren Werten in der Lutealphase als in der ersten Zyklushälfte. Die Mittelwerte der Progesteronwerte unterschieden sich nicht wesentlich zwischen den beiden Gruppen (exemplarisch in der Lutealphase $55,3 \pm 26,9$ nmol/l in der Nichtrauchergruppe bzw. $47,1 \pm 16,8$ nmol/l in der Rauchergruppe).

6.1.3.1 CFU-EPC

Nicht nur in der Menstruationsphase (M+3), sondern auch in der Follikel- (M+7) und Lutealphase waren bei Nichtraucherinnen deutlich mehr CFU-EPC zu beobachten als bei Raucherinnen.

Der größte Unterschied bestand in der Follikelphase mit $49,3 \pm 7,7$ CFU-EPC/ 10^6 PBMC bei Nichtraucherinnen und mit $14,5 \pm 6,1$ CFU-EPC/ 10^6 PBMC bei Raucherinnen. Insgesamt lagen große individuelle Schwankungen vor. Mutmaßlich aufgrund dieser

großen Schwankungen fiel der Unterschied zwischen den beiden Gruppen statistisch nicht signifikant aus.

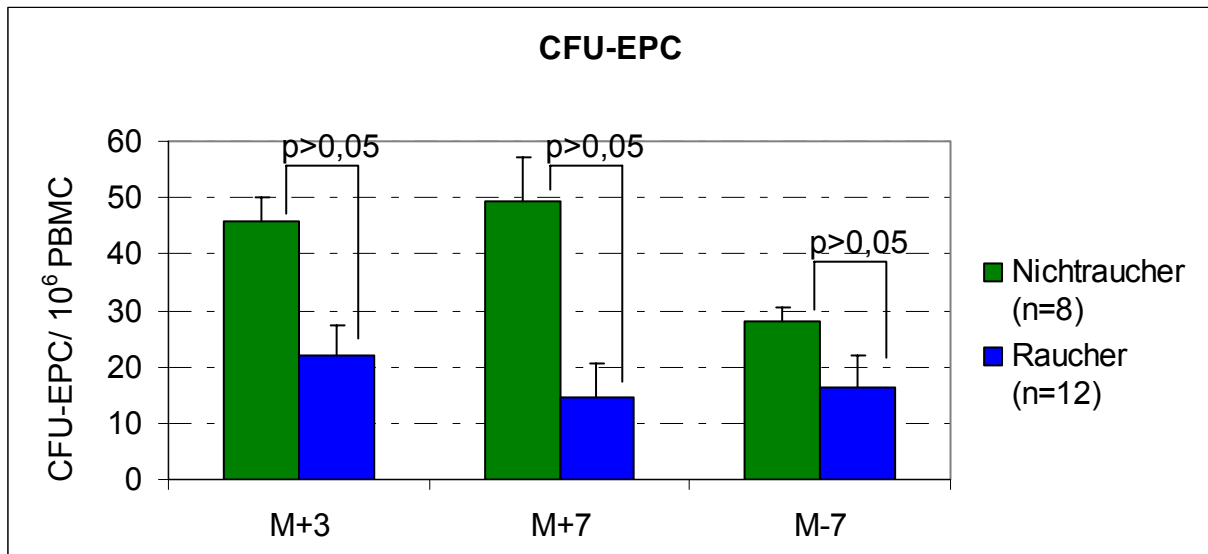


Abbildung 13: Mittelwerte (\pm SEM) der CFU-EPC / 10^6 PBMC zu drei Zeitpunkten des Menstruationszyklus in der Raucher- und Nichtrauchergruppe. M+3: 3. Tag des Menstruationszyklus (Menstruationsphase; M=Beginn der Regelblutung); M+7: 7. Tag des Menstruationszyklus (Follikelphase); M-7: 7. Tag vor dem Beginn der Regelblutung (Lutealphase).

Auch der Unterschied zwischen den untersuchten Zeitpunkten lag in beiden Gruppen unter statistisch signifikantem Niveau.

Bei Nichtraucherinnen konnte ein deutlicher, jedoch statistisch nicht signifikanter Anstieg der CFU-EPC-Zahl in der Follikelphase beobachtet werden.

Die Anzahl der CFU-EPC war bei Raucherinnen zu den drei Zeitpunkten weitgehend identisch.

6.1.3.2 CD34+ und CD34+/CD133+ Progenitorzellen

Eine signifikant reduzierte Anzahl zirkulierender CD34+ Progenitorzellen bei Raucherinnen konnte nicht nur in der Menstruationsphase, sondern auch in der Follikel- und Lutealphase nachgewiesen werden. Der Unterschied war in der Follikelphase mit einem Anteil der CD34+ Progenitorzellen von $0,09 \pm 0,03$ % der PBMC bei Nichtraucherinnen und mit $0,06 \pm 0,02$ % der PBMC bei Raucherinnen am größten.

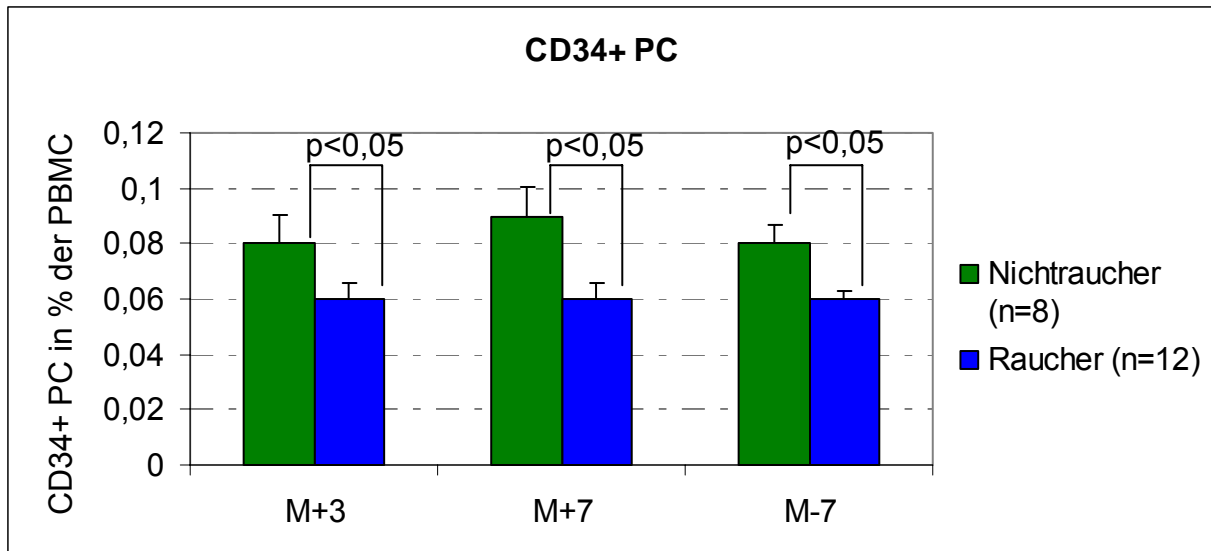


Abbildung 14: Mittelwerte (\pm SEM) der CD34+ PC (in % der PBMC) zu drei Zeitpunkten des Menstruationszyklus in der Raucher- und Nichtrauchergruppe. M+3: 3. Tag des Menstruationszyklus (Menstruationsphase); M=Beginn der Regelblutung; M+7: 7. Tag des Menstruationszyklus (Follikelphase); M-7: 7. Tag vor dem Beginn der Regelblutung (Lutealphase).

Die Anzahl der CD34+ PC zeigte bei Nichtraucherinnen eine leichte Schwankung innerhalb des Menstruationszyklus mit dem größten Wert in der Follikelphase ($0,09 \pm 0,03$ % der PBMC). Die Zahl der CD34+ PC war bei Nichtraucherinnen in der Menstruations- und in der Lutealphase nahezu identisch ($0,08 \pm 0,03$ % der PBMC in der Follikel- und $0,08 \pm 0,02$ % der PBMC in der Lutealphase).

Bei Raucherinnen konnten zu den drei Zeitpunkten weitgehend identische Werte der CD34+ PC gemessen werden ($0,06 \pm 0,02$ % der PBMC in der Menstruationsphase und $0,06 \pm 0,02$ bzw. $0,06 \pm 0,01$ % der PBMC in der Follikel- bzw. Lutealphase).

Die leichten Unterschiede in der Anzahl zirkulierender CD34+ Progenitorzellen zwischen den einzelnen untersuchten Zeitpunkten des Menstruationszyklus waren weder bei Raucherinnen noch bei Nichtraucherinnen statistisch signifikant.

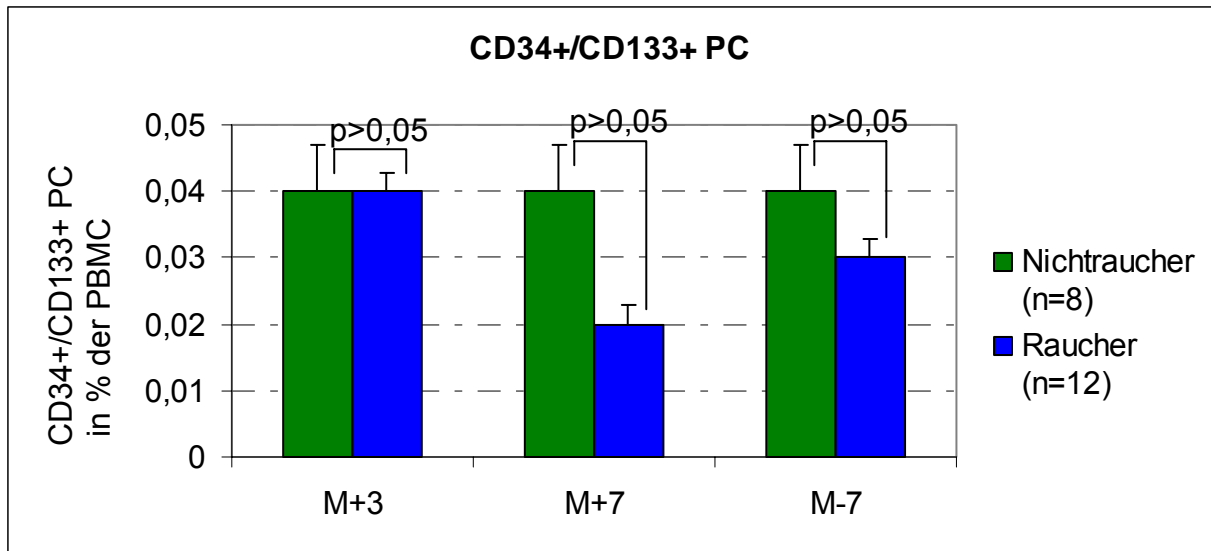


Abbildung 15: Mittelwerte (\pm SEM) der CD34+/CD133+ PC (in % der PBMC) zu drei Zeitpunkten des Menstruationszyklus in der Raucher- und Nichtrauchergruppe. M+3: 3. Tag des Menstruationszyklus (Menstruationsphase); M=Beginn der Regelblutung; M+7: 7. Tag des Menstruationszyklus (Follikelphase); M-7: 7. Tag vor dem Beginn der Regelblutung (Lutealphase).

Die Anzahl zirkulierender CD34+/CD133+ PC war in der Menstruationsphase in den untersuchten Nichtraucherinnen und Raucherinnen fast gleich. In der Lutealphase wiesen die Nichtraucherinnen im Vergleich zur Raucherinnen etwas mehr CD34+/CD133+ PC auf. In der Follikelphase konnte bei Nichtraucherinnen eine deutlich höhere Anzahl zirkulierender CD34+/CD133+ PC ($0,04 \pm 0,02\%$ der PBMC) gegenüber Raucherinnen ($0,02 \pm 0,01\%$ der PBMC) beobachtet werden, jedoch waren die Unterschiede in der Anzahl der CD34+/CD133+ PC zwischen den beiden Gruppen zu keinen der untersuchten Zeitpunkten statistisch signifikant.

In der Nichtrauchergruppe lagen zu allen drei Zeitpunkten des Menstruationszyklus die gleichen Werte ($0,04 \pm 0,02\%$ der PBMC) der CD34+/CD133+ PC vor.

In der Rauchergruppe waren im Verlauf des Zyklus nichtsignifikante Schwankungen in der Anzahl der CD34+/CD133+ PC zu beobachten ($0,02 \pm 0,01\%$ der PBMC in der Follikelphase; $0,04 \pm 0,01\%$ der PBMC in der Menstruationsphase bzw. $0,03 \pm 0,01\%$ der PBMC in der Lutealphase).

6.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Probandenstudie

Bei Raucherinnen war im Vergleich zu Nichtraucherinnen die Anzahl sowohl der CFU-EPC als auch der CD34+ und CD34+/CD133+ PC zum Zeitpunkt M+3 erniedrigt, wobei lediglich die erniedrigte Anzahl der CD34+ PC statistisch signifikant war.

		Gesamtes Kollektiv	Nichtraucher	Raucher
	Einheit	(n=32)	(n=15)	(n=17)
CD34+	% der PMBC	0,08±0,03	0,10±0,03	0,06±0,02*
CD34+CD133+	% der PMBC	0,04±0,02	0,05±0,02	0,04±0,01
CFU-EPC	per 10 ⁶ PBMC	27,1±28,0	36,5±34,0	18,8±18,6
FMD	%	9,2±4,1	9,9±4,5 %	8,5±3,7
NMD	%	25,0±7,3	24,3±7,2	25,7±7,5

Tabelle 4: Zusammenfassende Tabelle der untersuchten Parameter (Mittelwert±SEM) in der Raucher- und Nichtrauchergruppe in der Menstruationsphase (M+3). (FMD: flussvermittelte Vasodilatation; NMD: nitroinduzierte Vasodilatation; *=p<0,05).

Die signifikante Abnahme der Anzahl der CD34+ PC war nicht nur in der Menstruationsphase, sondern auch in der Follikel- und Lutealphase zu beobachten. Darüber hinaus konnte eine Korrelation zwischen der Anzahl der CD34+PC und Endothelfunktion festgestellt werden.

Weder bei Raucherinnen noch bei Nichtraucherinnen zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der zirkulierenden Progenitorzellen zwischen den untersuchten Zeitpunkten des Menstruationszyklus, wie in Tabelle 5 zusammengefasst.

		Nichtraucher (n=8)			Raucher (n=12)		
	Einheit	M+3	M+7	M-7	M+3	M+7	M-7
CD34+	% der PMBC	0,08±	0,09±	0,08±	0,06±	0,06±	0,06±
		0,03	0,03	0,02	0,02*	0,02*	0,01*
CD34+/CD133+	% der PMBC	0,04±	0,04±	0,04±	0,04±	0,02±	0,03±
		0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01
EPC-CFU	per 10 ⁶ PBMC	45,8±	49,3±	28,2±	21,9±	14,5±	16,4±
		12,5	22	6,4	18,8	21,3	19,1

Tabelle 5: Zusammenfassende Tabelle der untersuchten Parameter (Mittelwert ± SEM) zu den drei Zeitpunkten des Menstruationszyklus (*p=<0,05; M+3: 3. Tag des Menstruationszyklus; M+7: 7. Tag des Menstruationszyklus; M-7: 7 Tag vor dem Beginn der Regelblutung).

6.2 Untersuchungen zur Herkunft und Differenzierung putativer endothelialer Progenitorzellen

Die Ergebnisse der Probandenstudie weisen darauf hin, dass Rauchen eine signifikante Reduktion der Anzahl zirkulierender CD34+ PC und eine deutliche, jedoch nicht signifikante Abnahme der CFU-EPC bewirkt.

In den *in vitro* Versuchen sollte geklärt werden, ob die CFU-EPC bzw. CD34+ Zellen tatsächlich endothelialen Progenitorzellen entsprechen. Unter diesem Begriff würde man eine Zellgruppe verstehen, deren Zellen unter bestimmten Bedingungen zu Endothelzellen differenzieren können.

Um zu untersuchen, ob die mononukleäre Zellfraktion tatsächlich Progenitorzellen, die sich zu Endothelzellen entwickeln können, beinhaltet, wurden die mononukleären Zellen in zwei verschiedenen Medien aufgeteilt. Die Hälfte der untersuchten Zellen wurde in Standard-Zellkulturmedium (M199+20% FCS), die andere Hälfte in mit Wachstumsfaktoren angereichertem Endothelzellmedium (EBM mit EGM-2 Bullet Kit, im Folgenden als angiogenes Zellkulturmedium bezeichnet) kultiviert.

6.2.1 Morphologische Unterschiede

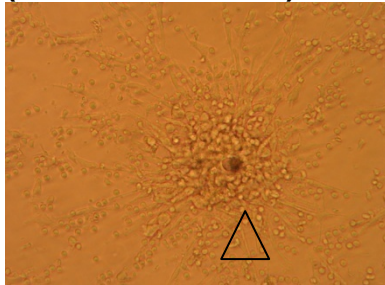
6.2.1.1 Differenzierung im Standard-Zellkulturmedium

Die mittels Dichtegradientenzentrifugation isolierten mononukleären Zellen wurden auf Fibronectin-beschichteten Zellkulturplatten im Standard-Zellkulturmedium nach 24 Stunden teilweise adhärent. Diese Zellfraktion bestand am Anfang überwiegend aus ovalen Zellen. Nach 48 Stunden erschienen Zellgruppen, die CFU-EPC bildeten. Die Größe der CFU-EPC zeigte große individuelle Unterschiede, die kleinsten umfassten ca. 50, die größten ca. 200 Zellen.

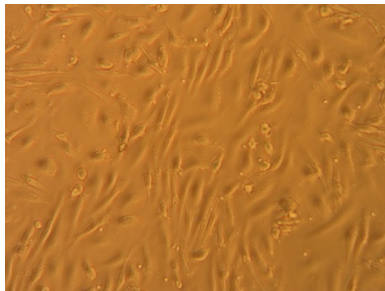
Am 5. Tag haben sich längliche, spindelförmige Zellen gebildet, die überwiegend am Rand der CFU-EPC zu beobachten waren. Die Morphologie der länglichen Zellen war relativ ähnlich, jedoch nicht identisch zu differenzierten Endothelzellen (HUVEC und HAEC). Die Zellen der CFU-EPC nahmen im Laufe der Zeit an Größe deutlich zu. Am 10. Tag bestanden die CFU-EPC überwiegend aus aufgeblähten, großen Zellen, die im Vergleich zu den ursprünglichen Zellen über eine zehn- bis zwanzigfache Größe

verfügten. Nach der 3. Woche war das Zytoplasma der Zellen der CFU-EPC aufgelockert, anschließend starben die Zellen.

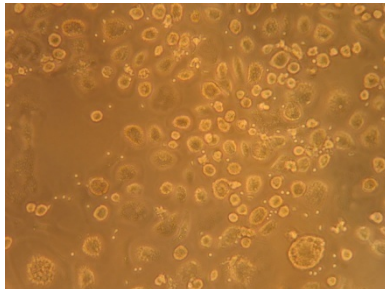
**Mononukleäre Zellen
(Standard-Medium)**



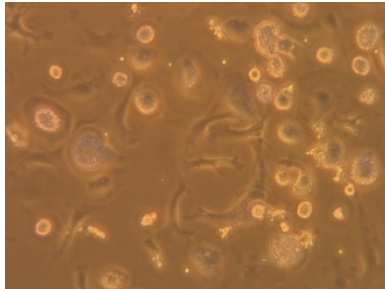
Woche 1



Woche 2

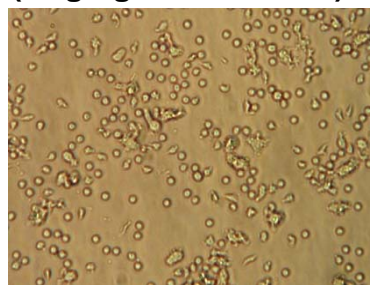


Woche 3

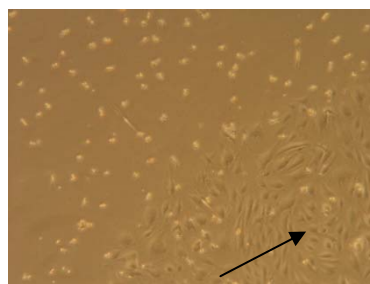


Woche 4

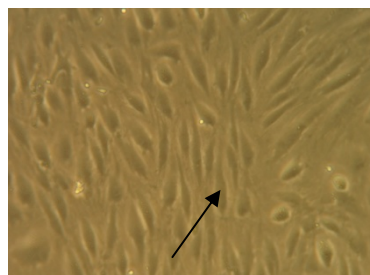
**Mononukleäre Zellen
(Angiogenes Medium)**



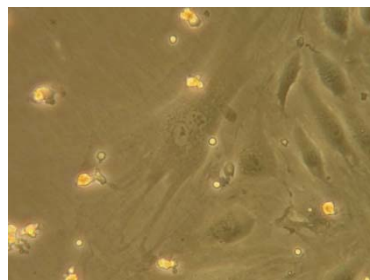
Woche 1



Woche 2

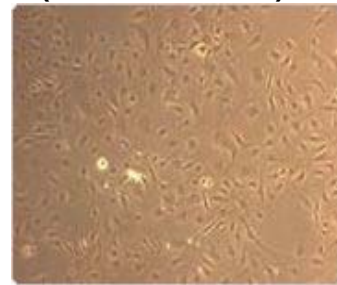


Woche 3

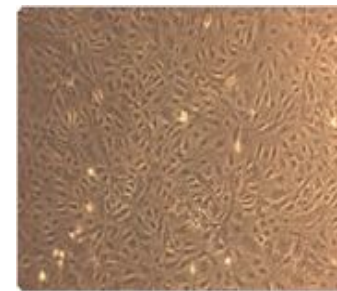


Woche 4

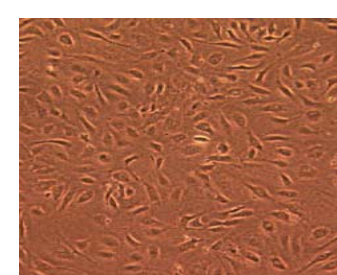
**Positivkontrolle
(Endothelzellen)**



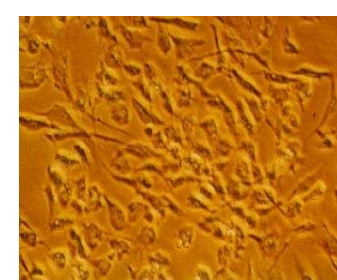
HUVEC



HUVEC



HAEC



Endothelzellen aus
Lungengefäßen

Abbildung 16: Unterschiedliche Entwicklung der mononukleären Zellen in Zellkultur. Das angiogene Zellkulturmedium (EBM+EGM-2) förderte die Proliferation sich rasch vermehrender Zellkolonien (mit Pfeil markiert), die aus mit Endothelzellen identischen Zellen bestanden. Pfeilkopf: CFU-EPC.

6.2.1.2 Differenzierung im angiogenen Zellkulturmedium

Nach 24 Stunden haben sich die mononukleären Zellen am Boden der Kulturschale angeheftet. Die ursprünglich runden Zellen haben überwiegend ihre Form erhalten. Es war auffällig, dass sich im Vergleich zu den im Standardmedium kultivierten Zellen nur sehr wenige CFU-EPC entwickelt haben. Nach der 2. Woche erschienen Zellkolonien, die eine andere Morphologie aufwiesen. Diese Zellpopulation verfügte über eine große Vermehrungskapazität und bildete ausgedehnte runde Zellkolonien, die sich vom Zentrum zur Peripherie verbreiteten. Die neu gebildeten Zellen deckten die Zellkulturschale in Form einer kopfsteinpflasterartigen Zellpopulation in großer Dichte ab und waren zueinander parallel angeordnet. Diese Zellen waren durch eine längliche Form gekennzeichnet und verfügten über ein helles, homogenes Zytoplasma, und einen prominenten Zellkern. Die Morphologie der neu entstandenen Zellen war mit der von humanen aortalen Endothelzellen (HAEC)- und Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) identisch. Bis zur 12. Woche haben sich die Zellen rasch vermehrt, anschließend sind die Zellen abgestorben.

Die morphologischen Unterschiede der aus mononukleären Zellen hervorgegangenen Zellen in Abhängigkeit des verwendeten Zellkulturmediums sind in Abbildung 16 dargestellt.

6.2.2 Unterschiede der mRNA Expression

In diesem Versuch sollte geklärt werden, ob die unterschiedliche Differenzierung und Morphologie der mononukleären Zellen auch mit Abweichungen in der mRNA Expression endothelspezifischer Markerproteine einhergehen.

Dementsprechend wurde aus den in zwei verschiedenen Medien aufgeteilten Zellmaterialien unmittelbar nach der Isolierung, danach im weiteren Verlauf der Differenzierung (zwischen Woche 1 und Woche 4) mRNA isoliert und anschließend eine RT-PCR-Reaktion durchgeführt.

6.2.2.1 mRNA Expression der Zellpopulation im Standard-Zellkulturmedium

Die im Standard-Zellkulturmedium (M199 + 20 % FCS) kultivierten Zellen (CFU-EPC) zeigten keine Expression von endothelspezifischen Markern wie Cadherin oder KDR. Es ist jedoch gelungen, die mRNA anderer endothelzelltypischer Marker wie CD31, eNOS und vWF nachzuweisen. Der von uns durchgeführte RT-PCR-Test erlaubte eine semiquantitative Analyse. Das Ausmaß der CD31-Expression hat sich im Laufe der Zeit verstärkt, war aber trotzdem niedriger als in differenzierten Endothelzellen (HAEC). Die mRNA des vWF-Faktors konnte in der untersuchten Zellpopulation erst in der 3. Woche nachgewiesen werden. Das Ausmaß der eNOS-Expression hat sich nach 3 Wochen im Vergleich zum Tag 0 nicht wesentlich verändert. Es ist beachtenswert, dass die monozytäre Zelllinie THP-1, ebenso über eine Expression von eNOS verfügten. Die Expression des Leukozytenmarkers CD45 und des Monozytenmarkers CD14 war in den endothelartigen Zellen ebenso positiv.

6.2.2.2 mRNA-Expression der Zellpopulation im angiogenen Zellkulturmedium

Die sich rasch vermehrenden Zellen mit Endothelmorphologie zeigten nach 4 Wochen die Expression endothelspezifischer Marker wie KDR und Cadherin, die in im Standard-Zellkulturmedium gezüchteten Zellen nicht nachzuweisen waren. Darüber hinaus konnte die mRNA weiterer endothelspezifischer Proteine wie vWF, eNOS und CD31 ebenso nachgewiesen werden. Das Ausmaß der CD31-Expression war in der 4. Woche sogar stärker als in der 2. Woche.

Die Expression von eNOS hat sich zwischen den untersuchten Zeitpunkten nicht relevant geändert. Die Signalintensität von CD31, Cadherin und vWF war in den stark proliferierenden endothelartigen Zellen sogar etwas stärker als in den humanen aortalen Endothelzellen (HAEC). Es ist bemerkenswert, dass die Expression des Leukozytenmarkers CD45 und des Monozytenmarkers CD14 nach der 2. und 4. Woche ebenso in relativ starkem Ausmaß nachzuweisen waren.

Die Unterschiede der mRNA Expression in Abhängigkeit des verwendeten Zellkulturmediums werden in Abbildung 17 dargestellt.

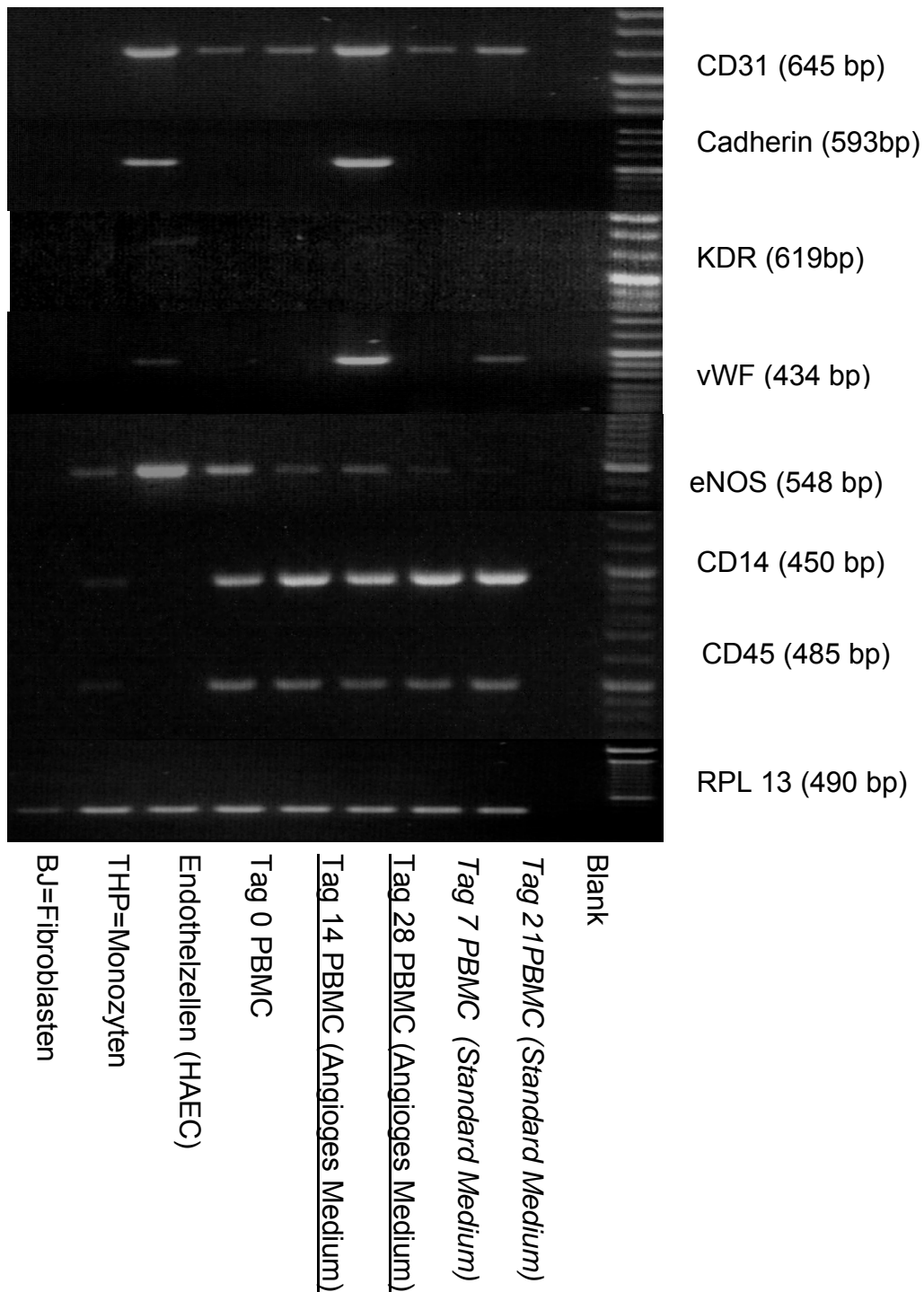


Abbildung 17: RT-PCR zur Darstellung der Unterschiede der mRNA-Expression der von mononukleären Zellen (PBMC) abgeleiteten endothelartigen Zellen in Abhängigkeit des verwendeten Zellkulturmediums. Die stark proliferierenden Zellen mit Endothelmorphologie, gezüchtet in angiogenem Zellkulturmedium (EBM+EGM-2), verfügten über die mRNA Expression aller untersuchten endothelspezifischen Marker. Als Positivkontrolle wurden Endothelzellen (HAEC), als Negativkontrolle Monozyten (THP) und Fibroblasten (BJ) verwendet.

6.2.3 *In vitro* Matrigel-Assay

Zur Klärung der Frage, ob die unterschiedlich differenzierten mononukleären Zellen *in vitro* gleiche Kapillaren bilden können, wie Endothelzellen, wurde ein Versuch in einer speziellen Gelmatrix durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) verwendet.

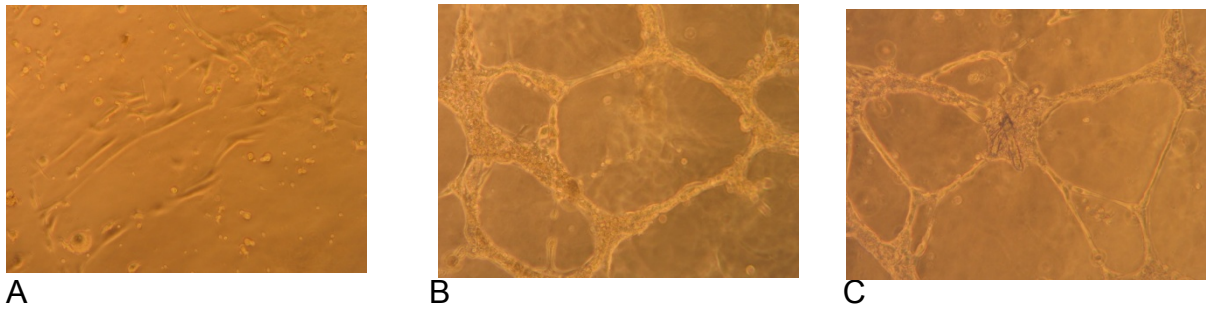


Abbildung 18: Untersuchung der Kapillarbildung in Matrigel. A: Endothelartige Zellen mit CFU-EPC (Standard-Zellkulturmedium); B: Proliferierende Zellen mit Endothelmorphologie (Angiogenes Zellkulturmedium); C: Positivkontrolle (HUVEC)

Die sich im Standard-Zellkulturmedium entwickelten CFU-EPC bildeten nach Aussaat auf Matrigel-beschichteten Zellkulturschalen parallel angeordnete Strukturen, jedoch keine richtigen kapillarähnlichen Formationen (Abbildung 18 A). Allerdings besaßen diese Zellen die Fähigkeit, in Netzwerke differenzierter Endothelzellen zu integrieren: Die mit Dil-ac-LDL gefärbten Zellen der CFU-EPC wurden gemeinsam mit HUVEC in Matrigel inkubiert. Bereits nach wenigen Stunden konnte eine Integration der gefärbten Zellen in die Netzwerke der HUVEC beobachtet werden (Abbildung 19).

Im Gegensatz dazu waren die im angiogenen Zellkulturmedium entstandenen Zellen mit Endotheleigenschaften in der Lage, tubuläre bzw. kapillarähnliche Strukturen zu bilden. Diese Strukturen waren mit den von HUVEC in Matrigel gebildeten Strukturen identisch (Abbildung 18 B und C).

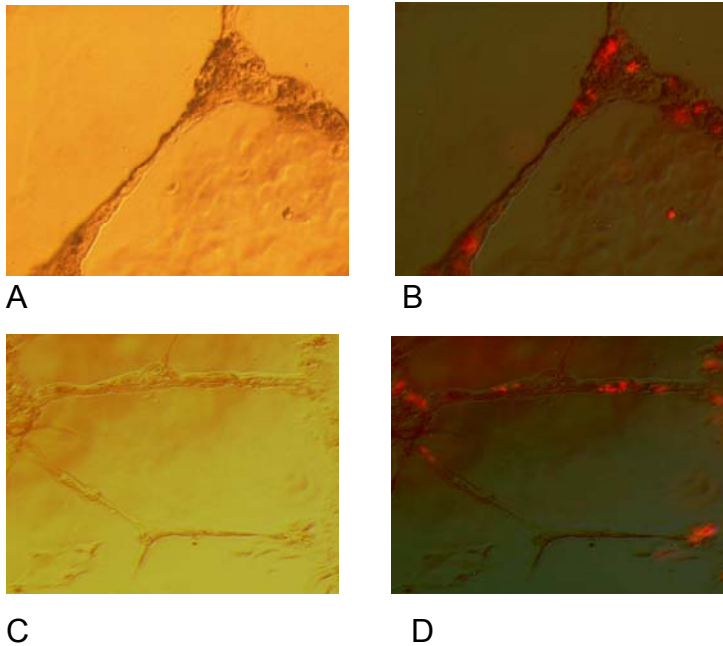


Abbildung 19: Integration der von mononukleären Zellen abgeleiteten endothelartigen Zellen in Netzwerke differenzierter Endothelzellen (HUVEC) in Matrigel. A, C: HUVEC ohne endothelartige Zellen; B,D: HUVEC gemeinsam mit gefärbten (Dil-ac-LDL) endothelartigen Zellen.

6.2.4 Zusammenfassung der unterschiedlichen Differenzierung der mononukleären Zellen zu endothelartigen Zellen

Die in Standard-Zellkulturmedium gezüchteten mononukleären Zellen konnten CFU-EPC und spindelförmige, endothelartige Zellen hervorbringen. Die Lebensdauer dieser Zellen lag bei 4 Wochen. Es konnte die Expression von Endothel-Markern wie CD31, eNOS und vWF nachgewiesen werden. Solche Zellen besitzen die Fähigkeit, in die Netzwerke differenzierter Endothelzellen (HUVEC) zu integrieren, können jedoch selbst keine Kapillaren bilden.

In angiogenem Zellkulturmedium konnten aus mononukleären Zellen große proliferative Kapazität besitzende Zellen mit Endothel-eigenschaften hervorgehen, die über eine Lebensdauer von ca. 12 Wochen verfügten. Es konnten mittels RT-PCR die gleichen endothelspezifischen Marker nachgewiesen werden, wie in den als Positivkontrolle verwendeten HAEC-Zellen. Solche proliferierenden Zellen formten in Matrigel kapillarähnliche Strukturen.

Die Unterschiede zwischen den untersuchten Zellgruppen werden in Tabelle 6 und Abbildung 20 zusammenfassend dargestellt.

	Mononukleäre Zellen <i>Standard Zellkulturmedium</i> (M199+20% FCS)	Mononukleäre Zellen <i>Angiogenes Zellkulturmedium</i> (EBM+EGM-2)	Positivkontrolle Endothelzellen (HAEC, HUVEC)
Lebensdauer	ca. 4 Wochen	ca. 12 Wochen	mehrere Wochen (12-16 Wochen)
Morphologie	viele CFU-EPC keine typischen Endothelzellen nur endothelartige Zellen	sehr wenig CFU-EPC dichte Zellkolonie mit typischen Endothelzellen	keine CFU-EPC dichte Zellkolonie mit Endothelzellen
Zellproliferation	keine	stark	stark
RNA-Expression			
CD31	+	++	+++
Cadherin	-	+++	+++
vWF	++	+++	+++
KDR	-	+	+
eNOS	+	++	+++
CD14	+++	+++	-
CD45	+++	+++	-
Kapillarbildung	-	+++	+++

Tabelle 6: Zusammenfassende Tabelle über die unterschiedliche Differenzierung der mononukleären Zellen zu endothelartigen Zellen in Abhängigkeit des Zellkulturmediums.

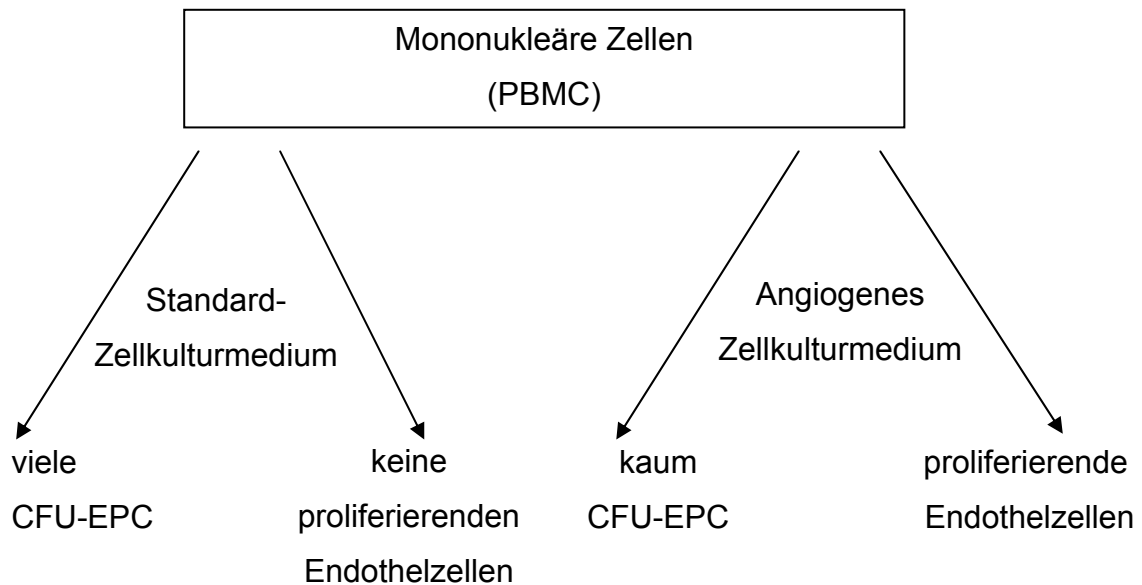


Abbildung 20: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Differenzierung der mononukleären Zellen.

6.3 Untersuchung der CD34+ Progenitorzellen

Unsere Zellkulturergebnisse weisen darauf hin, dass Subpopulationen mononukleärer Zellen unter dem Einfluss von selektiven Wachstumsfaktoren proliferierende Zellen mit Endotheleigenschaften bilden können. Es bleibt jedoch unklar, aus welcher Zellfraktion diese Zellen hervorgehen. Wie in der Einleitung beschrieben, gehen viele Autoren davon aus, dass der Oberflächenmarker CD34 charakteristisch für die sogenannten endothelialen Progenitorzellen ist (Asahara et al. 1997, Kang et al. 2001).

In diesem Teil der Arbeit wurden CD34+ Progenitorzellen hochrein isoliert und deren Entwicklung unter angiogenen Zellkulturbedingungen beobachtet. In unserem Versuch wurden die CD34+ Progenitorzellen aus Leukapheresat von Patienten gewonnen, bei denen die Freisetzung von CD34+ Progenitorzellen aus dem Knochenmark durch Zytokine (vor allem durch GM-CSF) gefördert wurde. Dadurch ist die Anzahl der CD34+ Progenitorzellen in diesen Proben deutlich höher als im peripheren Blut normaler Probanden.

6.3.1 Selektion mit MACS

Im ersten Schritt wurden die mononukleären Zellen aus Leukapheresat isoliert und mittels Durchflusszytometrie der Anteil der CD34+ Zellen bestimmt. Wie in Abbildung 21 dargestellt, erscheint das Leukapheresematerial deutlich reicher an CD34+ Stammzellen als das periphere Blut von Erwachsenen. Der größere Teil der CD34+ Zellen war auch positiv für CD133.

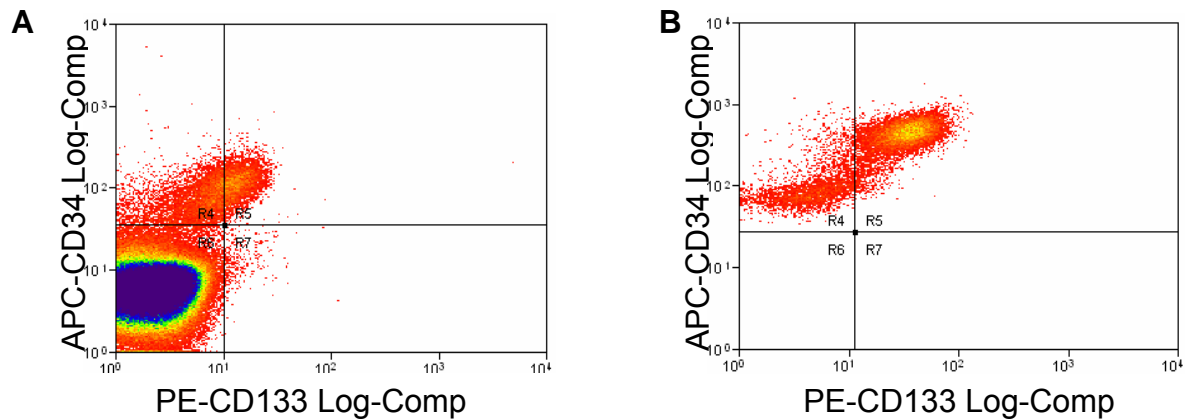


Abbildung 21: FACS-Analyse der aus Leukapheresat gewonnenen mononukleären Zellen vor (A) und nach (B) Isolierung mit MACS.

Nach der Isolierung mit MACS ist es gelungen, CD34+Zellen in sehr großer Reinheit zu gewinnen. Mehr als 95 % der gewonnenen Zellen gehörte zu der CD34+ Zellgruppe. Der größte Teil der CD34+ Zellen war auch positiv für CD133 (s. Abbildung). Anschließend wurden insgesamt drei Zellfraktionen, nämlich die unselektierten Zellen, die CD34+ Progenitorzellen und die CD34- Zellfraktion in Zellkultur beobachtet.

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass zur Differenzierung der große Vermehrungskapazität besitzenden Zellen mit Endothel Eigenschaften an Wachstumsfaktoren reiches Zellmedium am besten geeignet ist. Aus diesem Grund wurden die untersuchten Zellfraktionen in angiogenem Zellkulturmedium kultiviert.

6.3.2 Morphologie der Zellen

Die unselektierten mononukleären Zellen entwickelten nach der 2. Woche Kultivierung auf Fibronectin-beschichteten Zellkulturschalen Zellkolonien, die eine große proliferative Kapazität zeigten und die Zellkulturplatte in Form von zueinander parallel

angeordneten Zellen in großer Dichte bedeckte, wie in Abbildung 22 dargestellt. Die Zellen vermehrten sich bis zur 12. Woche und zeigten eine identische Morphologie wie die Positivkontrolle (HUVEC).

Aus den CD34+ oder CD34- Zellen bildeten sich weder CFU-EPC noch dichte Zellkolonien mit proliferierenden Endothelzellen.

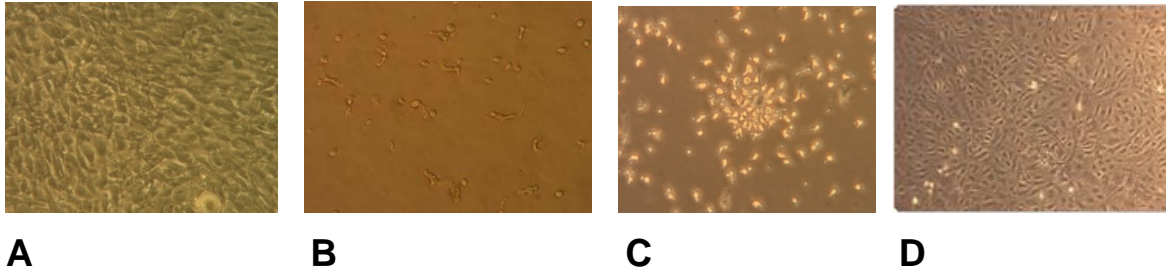


Abbildung 22: Unterschiedliche Morphologie der Zellen nach der MACS-Isolierung. A: für CD34 nicht selektierten Zellen; B: CD34+ Zellen, C: CD34- Zellen. D: Positivkontrolle (HUVEC).

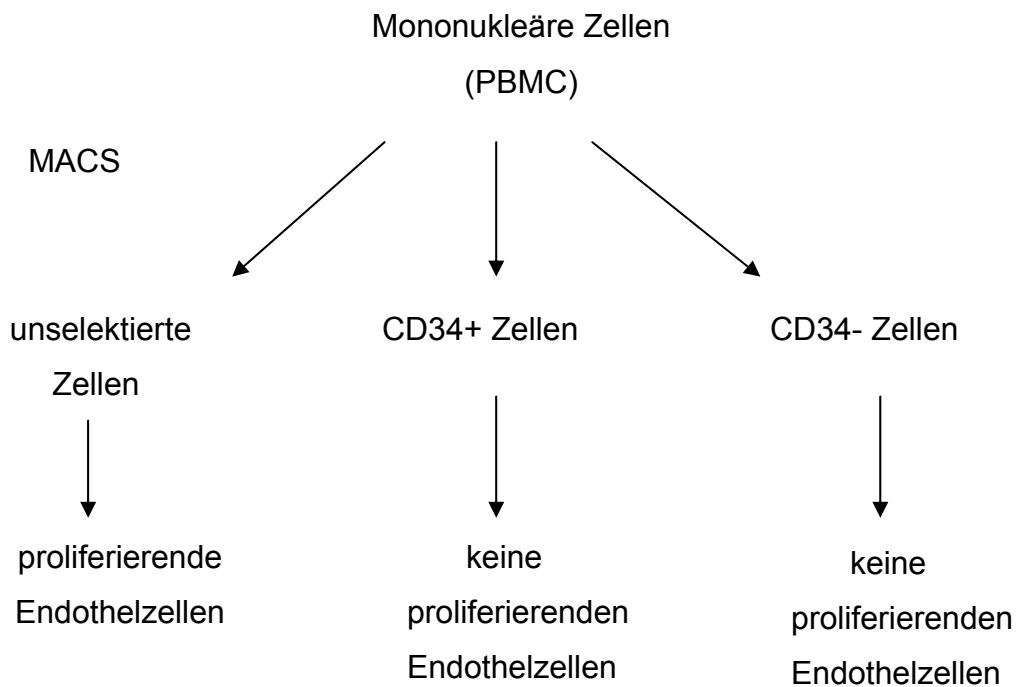


Abbildung 23: Schema der Entwicklung der unselektierten, der CD34+ und der CD34- Zellen in Zellkultur.

7. Diskussion

Kardiovaskuläre Erkrankungen wie die koronare Herzkrankheit gelten seit Jahren als wichtigste Todesursache von Männern und Frauen in der westlichen Welt, wobei Rauchen einen der wichtigsten modifizierbaren Risikofaktoren für diese Erkrankung darstellt (Ambrose und Barura 2004). KHK wird bei Frauen oft zu spät, im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, das outcome ist im Vergleich zu Männern insgesamt schlechter (Stangl et al. 2008). Aus diesem Grund ist eine genaue Risikostratifizierung von Frauen mit Hilfe eines diagnostischen Markers von besonderer Bedeutung.

Es wird vermutet, dass die Anzahl zirkulierender Progenitorzellen einen Marker für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellt (Umemura und Higashi 2008). Die Anzahl der im peripheren Blut zirkulierenden Progenitorzellen wird durch kardiovaskuläre Risikofaktoren, besonders durch Rauchen mutmaßlich negativ beeinflusst (Kondo et al. 2004). Andererseits werden die Progenitorzellen über Östrogen positiv moduliert (Iwakura et al. 2003), der Östrogenspiegel im peripheren Blut korreliert mit der Zahl zirkulierender Progenitorzellen (Fadini et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Rauchen die Anzahl zirkulierender Progenitorzellen (definiert als CFU-EPC, CD34+ und CD34+/CD133+ Progenitorzellen) und die Endothelfunktion bei gesunden prämenopausalen Frauen beeinflusst. Um zu untersuchen, ob sich der Einfluss des Rauchens neben gleichzeitigen hormonellen Einflüssen ändert, wurde die Anzahl der Progenitorzellen insgesamt zu drei Zeitpunkten des Menstruationszyklus bestimmt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde kritisch untersucht, ob die im Rahmen der Probandenstudie untersuchten CFU-EPC und CD34+ Progenitorzellen tatsächlich als endotheliale Progenitorzellen gewertet werden können. Es wurde geprüft, ob aus CFU-EPC bzw. aus CD34+ Progenitorzellen unter bestimmten Bedingungen Endothelzellen mit proliferativer Kapazität entstehen können.

Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Bei gesunden prämenopausalen Frauen führt chronisches Rauchen zu einer signifikanten Erniedrigung der Anzahl zirkulierender CD34+ Progenitorzellen.
2. Die durch Rauchen verursachte Erniedrigung der Anzahl der CD34+ Progenitorzellen ist auch bei zyklusbedingten Schwankungen des Östrogenspiegels nachweisbar. Es konnten keine relevanten zyklusabhängigen Unterschiede der CFU-EPC, CD34+ und CD34+/CD133+ Progenitorzellen festgestellt werden.
3. Die Endothelfunktion (gemessen als endothelabhängige Vasodilatation; FMD) korreliert mit der Anzahl zirkulierender CD34+ Progenitorzellen.
4. CFU-EPC stellt eine Zellgruppe mit gemischtem Phänotyp von Monozyten und Endothelzellen dar.
5. Vom peripheren Blut gewonnene mononukleäre Zellen können unter Einfluss von angiogenen Wachstumsfaktoren Zellen mit Endotheleigenschaften hervorbringen, deren Herkunft in dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden konnte.
6. Aus hochgereinigten isolierten CD34+ Progenitorzellen können weder CFU-EPC noch proliferierende Zellen mit Endotheleigenschaften entstehen.

7.1 Signifikant negativer Einfluss des Rauchens auf die Anzahl zirkulierender Progenitorzellen

In dieser Studie wurde zum ersten Mal der Einfluss des Rauchens auf die Anzahl zirkulierender Progenitorzellen bei prämenopausalen Frauen untersucht.

Es wird diskutiert, dass Östrogen im peripheren Blut die Anzahl der Progenitorzellen erhöhen kann (Strehlow et al. 2003b), vor allem durch eine Induktion der NO-Synthase und der daraus resultierenden erhöhten Mobilisierung aus dem Knochenmark (Iwakura et al. 2003) sowie durch antiapoptotische Wirkung (Imanishi et al. 2005).

Um die Auswirkung des Rauchens auf Progenitorzellen ohne den Einfluss des Östrogens zu untersuchen, haben wir einen Zeitpunkt in der Menstruationsphase (M+3) ausgewählt, wo der Östrogeneinfluss am niedrigsten ist. Zu diesem Zeitpunkt konnte bei Raucherinnen eine signifikante Reduktion der Anzahl der CD34+ Progenitorzellen

festgestellt werden. Die Anzahl der CD34+/CD133+ Progenitorzellen wird ebenso negativ beeinflusst, jedoch nicht signifikant.

Auch die Anzahl der CFU-EPC war bei Raucherinnen im Vergleich zu Nichtraucherinnen niedriger. Eine signifikante Abweichung zwischen den beiden Gruppen konnte wahrscheinlich aufgrund der ausgeprägten individuellen Unterschiede nicht festgestellt werden.

Bereits in anderen Studien konnte eine starke Reduktion zirkulierender CD34+/CD133+ und CD34+/CD133+/KDR+ Progenitorzellen bei Rauchern beobachtet werden, wobei in die Studie von Kondo et al. nur Männer eingeschlossen wurden und das untersuchte Kollektiv in beiden Studien klein war (Kondo et al. 2004; Michaud et al. 2006).

Die in unserer Studie erhobenen Ergebnisse bestätigen Daten von Vasa et al. (2001), wobei der Anteil der untersuchten Frauen in dieser Studie nur bei 25 % lag. Hier wurde gezeigt, dass von den kardiovaskulären Risikofaktoren wie Rauchen, Übergewicht, Hypertonie und Dyslipidämie das Rauchen besonders stark mit einer Reduktion der CD34+ Progenitorzellen assoziiert ist. Fadini et al. (2006) zeigten, dass von den unterschiedlich definierten Progenitorzellen (unterschiedliche Kombination von CD34, CD133 und KDR) insbesondere die Anzahl zirkulierender CD34+ Progenitorzellen mit kardiovaskulären Risikofaktoren invers korreliert.

Es gibt zwei verschiedene Theorien darüber, wie es bei Rauchern zu einer Beeinträchtigung der Progenitorzellen kommen kann.

Einerseits können freie Radikale und zytotoxische Substanzen bei Rauchern (Yanbaeva et al. 2007) zu einer direkten Schädigung und Reduktion der zirkulierenden CD34+ und CD34+/CD133+ Progenitorzellen beitragen. Diese Hypothese wurde von der Tatsache unterstützt, dass die isolierten CD34+Progenitorzellen von Rauchern in Zellkultur wesentlich kürzer leben, als die von Nichtrauchern (Kondo et al. 2004).

Andererseits können Sauerstoffradikale (ROS; reactive oxygen species) die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) vermindern (Aicher et al. 2003; Umemura und Higashi 2008). Da Progenitorzellen aus dem Knochenmark durch einen NO-vermittelten Signalweg mobilisiert werden, kann es bei Rauchern zu einer reduzierten Freisetzung der Progenitorzellen und dadurch zu einer Abnahme der zirkulierenden Progenitorzellen kommen.

Als Schlussfolgerung können wir sagen, dass von untersuchten Parametern nur die CD34+, und nicht die anders definierten Progenitorzellen bei Raucherinnen signifikant beeinträchtigt werden.

7.2 Die Endothelfunktion korreliert mit der Anzahl der CD34+ Progenitorzellen

Ähnlich wie in anderen Studien (Hill et al. 2003; Fadini et al. 2008; Fadini et al. 2009) konnte auch in unserer Arbeit eine Korrelation zwischen Endothelfunktion und der Anzahl der CD34+ Progenitorzellen belegt werden. Zwar war in unserer Studie kein signifikanter Unterschied in der Endothelfunktion zwischen Raucherinnen und Nichtraucherinnen messbar, jedoch war die Anzahl zirkulierender CD34+ Progenitorzellen signifikant unterschiedlich. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Anzahl zirkulierender CD34+ Progenitorzellen bei chronischen prämenopausalen Raucherinnen früher beeinträchtigt wird, als die Endothelfunktion. Die Bestätigung dieser These bedarf allerdings weiterer Untersuchungen.

Die Beobachtungen lassen vermuten, dass die zwei Parameter Endothelfunktion und Anzahl zirkulierender CD34+ Progenitorzellen miteinander verknüpft sind und in der vaskulären Homöostase eine essentielle Rolle besitzen.

Es wird postuliert, dass die CD34+ Progenitorzellen nicht nur an der Bildung neuer Gefäße, sondern auch an reparativen Vorgängen und dadurch an der Homöostase / Selbstregulation des Endothels beteiligt sind (Rosenzweig et al. 2005). Andere zeigten, dass die Endothelfunktion nicht primär mit der Anzahl, sondern mit den funktionellen Eigenschaften wie z.B. Migration der CD34+ Progenitorzellen korreliert (Heiss et al. 2005).

Der enge Zusammenhang zwischen Endothelfunktion und CD34+ Zellzahl könnte durch die folgende Theorie erklärt werden: Es wird diskutiert, dass Rauchen durch oxidativen Stress und eine verminderte Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) eine Endotheldysfunktion hervorrufen kann (Tsuchiya et al. 2002). Stickstoffmonoxid spielt daneben auch eine Schlüsselrolle bei der Mobilisierung der Progenitorzellen aus dem

Knochenmark (Umemura und Higashi 2008). Durch eine Reduktion der NO-Verfügbarkeit bei Rauchern kann eine Abnahme der zirkulierenden CD34+ Progenitorzellen auftreten.

Es gibt Hypothesen darüber, dass sich bei Rauchern für die Reparatur der beschädigten Endothelschicht zirkulierende CD34+ Progenitorzellen in die Gefäßwand integrieren können (Kondo et al. 2004). Die Diskrepanz zwischen aus dem Knochenmark mobilisierten und ins Endothel aufgenommenen Progenitorzellen könnte eine Abnahme der zirkulierenden CD34+ Progenitorzellen bewirken, was sich in unseren Ergebnissen widerspiegelte.

Ausgehend von der postulierten Funktion der CD34+ Progenitorzellen in der Gefäßneubildung lässt sich die folgende Hypothese ableiten: Die Abnahme der zirkulierenden CD34+ Progenitorzellen kann eine verminderte Regeneration von geschädigten Endothelzellen bewirken. Anschließend können messbare Änderungen der Endothelfunktion auftreten.

Nach der Meinung des Autors könnte eine Reduktion der Anzahl zirkulierender CD34+ Progenitorzellen als wichtiger und sensitiver Marker für die Endotheldysfunktion bei Raucherinnen verwendet werden.

Das könnte zu einer verbesserten Risikostratifizierung von prämenopausalen Frauen mit höherem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen beitragen, damit präventive Maßnahmen noch rechtzeitig eingeleitet werden können.

7.3 Die Beeinträchtigung der zirkulierenden Progenitorzellen bei Raucherinnen ist unabhängig vom hormonellen Status. Zyklusabhängige Regulation der Progenitorzellen

In unserer Studie wurde zum ersten Mal der Einfluss des Rauchens auf Progenitorzellen bei prämenopausalen Frauen mit gleichzeitigen hormonellen Einflüssen untersucht. Die Ergebnisse des vorigen Abschnittes weisen darauf hin, dass bei Raucherinnen die Anzahl der CD34+ Progenitorzellen in der Menstruationsphase, ohne starken Einfluss des Östrogens, signifikant negativ beeinflusst wird.

Anhand unserer Ergebnisse war eine signifikant reduzierte Anzahl zirkulierender CD34+ Progenitorzellen auch in der Follikel- und Lutealphase festzustellen, in denen der endogene Hormonspiegel deutlich höher als in der Menstruationsphase war. In allen Zyklusphasen war die Anzahl zirkulierender CD34+ Progenitorzellen in Raucherinnen signifikant erniedrigt.

Ferner weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass die Abweichung der Quantität der zirkulierenden Progenitorzellen zwischen den untersuchten Zyklusphasen weder bei Raucherinnen noch bei Nichtraucherinnen signifikant ausgefallen ist.

Es stehen insgesamt wenige Daten über die zyklusabhängige Regulation der Progenitorzellen bei Frauen zur Verfügung.

Ähnlich wie in unserer Studie konnte in anderen Arbeiten kein relevanter Unterschied der CD34+, CD34+/CD133+ Progenitorzellen und CFU-EPC zwischen Follikel- und Lutealphase gezeigt werden (Masuda et al. 2007; Fadini et al. 2008; Lemieux et al. 2009; Robb et al. 2009). Es ist wichtig darauf hinzuweisen, dass in diesen Studien das untersuchte Kollektiv relativ klein war, z.B. in die Studie von Robb et al. wurden nur 10 Probandinnen eingeschlossen.

Bei Frauen ohne Hormonstimulation konnte ein deutlicher Anstieg der Anzahl zirkulierender Progenitorzellen ausschließlich in der periovulatorischen Phase, der Zyklusphase mit dem höchsten endogenen Östrogenspiegel, gemessen werden. (Masuda et al. 2007; Fadini et al. 2008). Hier war eine hormoninduzierte Änderung der Anzahl zirkulierender CD34+ und CD133+ Progenitorzellen zu verzeichnen. Die Anzahl der untersuchten Zellen war unmittelbar nach der Ovulation ca. doppelt so hoch wie am Anfang des Zyklus. Zu diesem Zeitpunkt lag ein signifikanter, ca. dreifacher Anstieg des Östrogenspiegels im Vergleich zum Ursprungswert vor. Die Erhöhung des Östrogenspiegels in der Follikelphase im Vergleich zur Menstruationsphase ist in unserer Studie deutlich niedriger und offensichtlich nicht ausreichend, die Anzahl zirkulierender Progenitorzellen zu erhöhen.

Fadini et al. vermuten, dass die Erhöhung der Anzahl der CD34+/KDR+ Progenitorzellen in der Ovulationsphase, auf eine durch Östrogen stimulierte Mobilisierung aus dem Knochenmark zurückzuführen ist (Fadini et al. 2008).

Strehlow konnte einen ca. vierfachen Anstieg der CD34+/KDR+ Zellen bei den Frauen zeigen, bei denen eine Hormontherapie im Rahmen der in vitro Fertilisation durchgeführt wurde (Strehlow et al. 2003b). Die Hormonsubstitution bewirkte im

Vergleich zum Ausgangswert einen deutlichen, ca. achtfachen Anstieg des Östrogenspiegels.

In unserer Studie war der Östrogenspiegel in der Follikelphase nur ca. zweifach höher als in der Menstruationsphase. Dies kann eine Erklärung für die diskrete Änderung der Anzahl von zirkulierenden Progenitorzellen innerhalb des Zyklus in unserer Studie sein. Auch in verschiedenen tierexperimentellen Studien konnte ein fördernder Einfluss von Östrogenen auf die Mobilisierung der Progenitorzellen aus dem Knochenmark belegt werden (Strehlow et al. 2003b; Iwakura et al. 2006). Es werden verschiedene Effekte diskutiert. So könnte die Erhöhung der Anzahl zirkulierender Progenitorzellen sowohl auf Inhibition der Apoptose, als auch auf die vermehrte Mobilisierung aus dem Knochenmark zurückzuführen sein. Ferner trägt Östrogen durch eine Aktivierung der NO-Synthase zu einer Mobilisierung der PC aus dem Knochenmark bei (Chambliss und Shaul 2002; Imanishi et al. 2005; Strehlow et al. 2003a).

Als Schlussfolgerung können wir sagen, dass der Grad des Anstiegs von Östrogen in den untersuchten Phasen in unserer Studie nicht ausreicht, um die Anzahl von Progenitorzellen zu erhöhen.

Es ist von einer mit Rauchen assoziierten Schädigung der zirkulierenden Progenitorzellen auch neben gleichzeitigem Einfluss des Östrogens auszugehen.

7.4 Unterschiedliche Differenzierung von Progenitorzellen zu endothelartigen Zellen

In diesem experimentellen Teil der Arbeit wurden die im Rahmen der Probandenstudie untersuchten CFU-EPC und CD34+ PC *in vitro* analysiert. Hier sollte geklärt werden, ob diese Zellpopulationen tatsächlich Zellen beinhalten, die unter bestimmten Bedingungen zu Endothelzellen differenzieren können.

Analog zu unseren Ergebnissen wurde bereits diskutiert, dass sich aus mononukleären Zellen hauptsächlich zwei unterschiedliche Zellgruppen endothelartiger Zellen entwickeln können (Hur et al. 2004; Shantsila et al. 2008).

Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass die erste Gruppe Zellen der CFU-EPC mit gemischtem Phänotyp zwischen Endothelzellen und Monozyten beinhaltet. Diese

Hypothese wurde in anderen Arbeiten auch bestätigt (Yoder et al. 2007; Timmermans et al. 2007).

Die zweite Gruppe beinhaltet proliferierende Zellen mit typischen Endothel-eigenschaften, in Übereinstimmung mit bereits publizierten Ergebnissen (Bompais et al. 2004; Griese et al. 2003).

Obwohl die Bedeutung der sogenannten EPC in der Vaskulogenese in vielen Experimenten analysiert wird, stellt diese Zellpopulation *in vivo* eine eher hypothetische Zellgruppe dar (Timmermans et al. 2009). Es fehlt an typischen Markern, welche die EPC eindeutig definieren.

Da CD34+ Progenitorzellen im peripheren Blut in äußerst geringer Konzentration vorliegen, ist zur Charakterisierung der Zellen eine *in vitro* Kultivierung und eine starke Expansion notwendig. Ähnlich wie in unserer Studie wurde in den meisten publizierten Arbeiten zur Untersuchung der sogenannten EPC von der mononukleären Zellfraktion ausgegangen, welche die putativen Progenitorzellen beinhalten (Bompais et al. 2004; Friedrich et al. 2006; Romagnani et al. 2005).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass ohne den Einfluss spezieller Wachstumsfaktoren aus mononukleären Zellen nur CFU-EPC, jedoch keine sich vermehrenden endothelartigen Zellen hervorgehen können. Die phänotypischen Eigenschaften dieser Zellpopulation stimmten mit den Endothelzellen nur partiell überein. Es konnte zwar in Zellen der CFU-EPC die Expression typischer Endothelmarker wie vWF, CD31, eNOS gezeigt werden, andere endothelspezifische Marker wie KDR und VE-Cadherin waren nicht nachweisbar. Die Zellen waren durch eine Aufnahme des Dil-LDL und BS-Lektin gekennzeichnet, ähnlich zu den Ergebnissen von Asahara et al. (1997). Es muss betont werden, dass Aufnahme dieser Substanzen nicht als ausschließlich endothelspezifisch angesehen werden kann, weil sie auch für andere Zellen, z.B. Monozyten charakteristisch ist (Rohde et al. 2006). Außerdem konnte in unserem Versuch gezeigt werden, dass die Zellen der CFU-EPC selbst keine netzartigen Strukturen bilden können, jedoch können solche Zellen in tubuläre Strukturen differenzierter Endothelzellen integrieren.

Analog zu unseren Ergebnissen haben auch andere gezeigt, dass sich die Zellen der CFU-EPC nicht relevant vermehren können (Rehman et al. 2003). Diese Zellgruppe

weist eher ähnliche Zellkultureigenschaften auf, wie der von Hur et al. (2004) beschriebene „frühe Typ“ der EPC.

Asahara et al. haben als erste Autoren die CFU-EPC als putative endotheliale Progenitorzellen beschrieben, welche bis auf die KDR-Expression ähnliche Eigenschaften aufwiesen wie die endothelartigen, nicht proliferierenden Zellen in unserem Standard-Zellkulturmedium (Asahara et al. 1997). Nach seiner These sind die CFU-EPC aus CD34⁺ PC entstanden, welche mit der mononukleären Zellfraktion (PBMC) aus Vollblut aufgereinigt wurden, wobei allerdings nur ca. 16 % des aufgereinigten Zellmaterials zur CD34⁺ Zellfraktion gehörte.

Einige Arbeitsgruppen, die die Herkunft putativer EPC experimentell untersucht haben, sind zu dem Ergebnis gekommen, dass die CFU-EPC nicht aus CD34⁺, sondern eher aus Monozyten entstehen. Diese Zellen sind nicht in der Lage, *in vivo* Kapillaren zu bilden (Yoder et al. 2007).

Es ist vorstellbar, dass sich die CFU-EPC durch einen Transdifferenzierungsprozess aus Monozyten entwickeln, resultierend in einer Zellpopulation mit einem gemischten Phänotyp von Monozyten und Endothelzellen. Dafür sprechen die von uns erhobenen Daten, dass außer der Expression endothelspezifischer Marker auch monozytäre Marker bzw. Marker, die für beide gemeinsam kennzeichnend sind, nachweisbar waren. Es wurde bereits von Havemann et al. (2003) beschrieben, dass CD14⁺ Monozyten in der Lage sind, abhängig von den Stimulierungsfaktoren Makrophagen, dendritische Zellen oder endothelartige Zellen zu bilden. Solche Zellen sind durch eine Markerexpression gekennzeichnet, die für die Monozyten und für die Endothelzellen charakteristisch ist (Eggermann et al. 2003).

Auch Schmeisser et al. (2001) und Zhao et al. (2003) fanden Hinweise darauf, dass Monozyten endothelartige Zellen mit gemischtem Phänotyp zwischen Makrophagen und Endothelzellen generieren können.

Es wird diskutiert, dass die Monozyten in der Lage sind, nicht nur LDL und Lektin zu binden, sondern in Zellkultur auch vermeintliche CFU-EPC zu bilden. Mittels RT-PCR konnte bei so kultivierten Monozyten die Expression von Endothelmarkern Cadherin und CD31 nachgewiesen werden (Rohde et al. 2006).

In vielen Studien werden die „putativen EPC“ durch die Aufnahme von Dil-LDL und Lektin, sowie durch die Expression von CD31 und Cadherin definiert. Außerdem ähneln die Monozyten auch morphologisch den Endothelzellen, da auch bei Monozyten die typischen Weibel-Palade-Körper nachgewiesen werden können (Rohde et al. 2006). Es

wird sogar vermutet, dass die Monozyten die Angiogenese imitieren können, ebenso wie mutmaßlich auch die sogenannten putativen EPC in experimentellen Ansätzen (Asahara et al. 1997). Die aus CD14+ Monozyten hervorgegangenen endothelartigen Zellen besitzen das Potenzial, nach künstlich induzierten ischämischen Bedingungen ins ischämische Gewebe zu migrieren und eine verbesserte Blutströmung zu gewährleisten (Urbich et al. 2003).

Nach der Meinung des Autors ist aus diesem Grund eine sichere Unterscheidung der Monozyten von putativen EPC nicht möglich. Es ist vorstellbar, dass die Eigenschaften der Monozyten in den vielen experimentellen Ansätzen die Eigenschaften von sog. EPC imitieren. Dementsprechend sollte die vermutete zentrale Funktion der CFU-EPC in der postnatalen Vaskulogenese in Frage gestellt werden, da diese Zellen die Merkmale endothelialer Progenitorzellen meiner Meinung nach nicht erfüllen.

Im Gegensatz dazu sind in unserer Zellkultur in angiogenem Zellkulturmedium sehr wenig CFU-EPC hervorgegangen. Nach ca. 4 Wochen konnte eine proliferierende Zellgruppe beobachtet werden, die Zellen mit Endothelzellen hervorbringen konnte. Die Morphologie der stark proliferierenden Zellen stimmte mit den Endothelzellen überein.

Es konnte die Expression sämtlicher untersuchter endothelspezifischer Marker wie CD31, vWF, eNOS, KDR und Cadherin nachgewiesen werden. Ein weiteres Merkmal für Endothelzellen, die *in vitro* Kapillarbildung der *in vitro* expandierten Zellen konnte in unseren Versuchen beobachtet werden. Die Eigenschaften dieser Zellen entspricht dem von Hur et al. beschriebenen „späten Typ“ der EPC (Hur et al. 2004).

Eine mögliche Ursache für die Proliferation unserer Zellgruppe mit Endothelzellen kann sein, dass von den Wachstumsfaktoren besonders VEGF für die Proliferation der Progenitorzellen essentiell ist (Gehling et al. 2000; Shalaby et al. 1997; Asahara et al. 1999; Kalka et al. 2000).

Es ist wichtig, darauf hinzuweisen, dass in angiogenem Zellkulturmedium nur wenig CFU-EPC gebildet wurden. Die stark proliferierenden Endothelzellkolonien sind nicht aus den von Asahara beschriebenen CFU-EPC entstanden.

Es gibt hauptsächlich zwei Theorien darüber, welche Zellgruppe diese proliferierenden Endothelzellen hervorbringt.

Einigen Arbeiten zufolge (Gehling et al. 2000; Salven et al. 2003) entstehen die stark proliferierenden Endothelzellen *in vitro* aus CD34+ Progenitorzellen.

Unsere experimentellen Versuche belegten, dass die Proliferation der endothelialen Zellkolonien ca. nach der 3. Woche beginnt. In der 4. Woche kann die Expression von KDR und Cadherin beobachtet werden. Die These unterstützend konnte in *in vivo* Arbeiten demonstriert werden, dass die Proliferation der Progenitorzellen zu Endothelzellen erst nach der 3-4. Woche einsetzt (Lin et al. 2000; Quirici et al. 2001).

Da CD34 auch einen Marker reifer Endothelzellen darstellt, werden die „richtigen EPC“ als CD34+/CD133+/KDR+ Progenitorzellen definiert (Peichev et al. 2000). Allerdings konnten *in vitro* aus CD34+/CD133+/KDR+ Zellen keine stark proliferierenden Endothelzellen gewonnen werden (Case et al. 2007; Timmermans et al. 2007).

Aus diesem Grund stellt sich die Frage, ob die *in vitro* expandierten Zellen mit Endothel-eigenschaften überhaupt auf einen bestimmten *in vivo* Progenitorzelltyp zurückzuführen sind.

Alternativ wird diskutiert, dass die stark proliferierenden endothelartigen Zellen in Zellkultur aus Endothelzellen der Gefäßwand hervorgehen.

Zwar ist die Vermehrungskapazität der zirkulierenden, von der Gefäßwand abgeschilferten Endothelzellen eingeschränkt (Lin et al. 2000), aber sie können sich immerhin bis zu 20-40mal teilen (Ingram et al. 2004). Die Anzahl der Endothelzellen ist in peripherem Blut gering (1-2 Zellen/ml), kann aber bei pathologischen Zuständen auch erhöht sein.

Eine Unterscheidung zwischen abgelösten Endothelzellen der Gefäßwand und putativen EPC ist *in vitro* kaum möglich, da z.B. die Kapillarbildung der Endothelzellen und der expandierten Zellen (late outgrowth Zellen) nahezu gleich ist (Yoder et al. 2007; Melero-Martin et al. 2007). Eventuell könnte man anhand der Proliferationskapazität differenzieren, da die Vermehrungskapazität der expandierten Progenitorzellen mit Endothel-eigenschaften höher vermutet wird, als die der Zellen des Gefäßendothels (He et al. 2004).

Es wird vermutet, dass die Progenitorzellen in eine stark- und niedrig proliferierende Gruppe unterteilt werden können. Es wird diskutiert, dass der größte Teil der zirkulierenden endothelartigen Zellen aus von der Gefäßwand abgeschilferten Zellen besteht (Ingram et al. 2004). Nur ein kleiner Teil sind vom Knochenmark stammende

Zellen, die über eine Vermehrungskapazität von ca. 1000 Teilungen verfügen (Lin et al. 2000). Die Anzahl solcher CD34+/CD133+/KDR+ Zellen ist im peripheren Blut sehr gering, liegt bei 3-5 Zellen/ml Blut.

Nach der Meinung des Autors scheint die Frage berechtigt, ob eine solch kleine Zellpopulation überhaupt einen entscheidenden Einfluss auf den Zustand des Gefäßsystems haben kann. Es ist sehr fraglich, ob Zellen mit den gleichen Eigenschaften *in vivo* überhaupt vorkommen oder ob sie ein reines *in vitro*-Phänomen darstellen und daher methodisch beeinflusst sind.

7.5 Aus isolierten CD34+ Zellen entstehen weder CFU-EPC noch proliferierende Endothelzellen

Ausgehend von den Beobachtungen von Asahara et al. und im vorigen Abschnitt beschriebenen Ergebnissen haben wir die These geprüft, ob sich aus hochgereinigten zirkulierenden CD34+ Zellen *in vitro* CFU-EPC bzw. stark proliferierende Zellen mit Endothelcharakter entwickeln können.

Unsere Versuche zeigten jedoch, dass aus CD34+ Zellen keine der beschriebenen Zellgruppen entstehen kann, trotz der Anwesenheit von angiogenen Wachstumsfaktoren. Außerdem konnten sich aus den zuvor für CD34 nicht selektierten, jedoch an CD34+ Zellen reichen Proben stark vermehrende Zellen mit Endothelmorphologie bilden.

Dieses Ergebnis steht scheinbar mit den Daten von Asahara et al. im Widerspruch. Seine Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass die CD34+ Zellen schon nach ca. 12 Stunden CFU-EPC bilden (Asahara et al. 1997). Der Widerspruch zwischen seinen und unseren Ergebnissen ist wahrscheinlich darin begründet, dass in seinem Versuch nur ca. 16% der isolierten Zellen tatsächlich CD34+ Progenitorzellen waren und der Rest zu den mononukleären Zellen gehörte. Im Gegensatz dazu war ca. 95% der untersuchten Zellfraktion in unserem Versuch positiv für den Marker CD34.

In Korrelation zum vorigen Kapitel kann man schlussfolgern, dass CFU-EPC nicht allein aus CD34+ Progenitorzellen gebildet werden, sondern die Anwesenheit mononukleärer

Zellen für die Bildung notwendig ist. Nach der Meinung des Autors ist die Entstehung von CFU-EPC zum Teil auch vom Zellkulturmedium beeinflusst. Dafür spricht die Beobachtung in unserer Zellkultur, dass sich aus PBMC im Standardmedium deutlich mehr CFU-EPC bildeten als im angiogenen Zellmedium.

Wir können die postulierte These nicht bestätigen, dass aus CD34+ Progenitorzellen Endothelzellen entstehen können (Peichev et al. 2000; Gehling et al. 2000).

Diese Diskrepanz kann der Autor durch zwei verschiedene Theorien erklären.

Es wird vermutet, dass die Progenitorzellen durch eine asymmetrische Teilung eine adhärenz und eine nichtadhärenz Zelle generieren können (Grskovic et al. 2004; Peichev et al. 2000; Morrison et al. 1997). Die stark proliferierenden Endothelzellen werden wohl erst im weiteren Verlauf der Differenzierung adhärenz (Shi et al. 1998). In unserem Versuch wurden die CD34+ Progenitorzellen am Anfang der Kultivierung nicht nach adhärenz und nichtadhärenz Zellfraktionen sortiert. Nach der Meinung des Autors ist vorstellbar, dass die nichtadhärenz proliferierenden CD34+ Zellen dadurch nicht adäquat untersucht werden konnten.

Nach der zweiten Theorie könnte das Fehlen der durch Monozyten freigesetzte Zytokine die Ursache für das Ausbleiben der proliferierenden Zellen mit Endothelmorphologie (late outgrowth) in der hochgereinigten CD34+ Zellfraktion sein.

Es wird vermutet, dass die angiogenen Wachstumsfaktoren und mutmaßlich auch ein enger Zell-Zell-Kontakt für die Proliferation der Progenitorzellen eine wichtige Rolle spielen (Kang et al. 2001; Harraz et al. 2001). Es ist davon auszugehen, dass sich in unseren nicht selektierten, jedoch an CD34+ Zellen reichen Proben viele monozytäre Zellen befanden. Es ergaben sich Hinweise darauf, dass die Monozyten an der Gefäßneubildung durch ihre starke Sekretion angiogen wirkender Zytokine (VEGF, G-CSF, GM-CSF) beteiligen können (Sieveking et al. 2008; Gulati et al. 2003). Es ist vorstellbar, dass die Monozyten durch die Freisetzung dieser Zytokine die Proliferation der CD34+/CD133+ Progenitorzellen fördern können (Sieveking et al. 2008; Rehman et al. 2003).

Als Schlussfolgerung unserer *in vitro* Versuche können wir sagen, dass aus mononukleären Zellen insgesamt zwei Subpopulationen endothelartiger Zellen entstehen können.

Die erste Gruppe beinhaltet Zellen der CFU-EPC mit gemischtem Phänotyp, die vermutlich transdifferenzierten Monozyten entsprechen.

Die zweite Gruppe entspricht proliferierenden Zellen mit Endothelmorphologie, die möglicherweise aus CD34+ Progenitorzellen, jedoch auch aus von Gefäßen abgeschilferten zirkulierenden Endothelzellen hervorgegangen sein könnte. Die Anwesenheit von Monozyten scheint für die Proliferation dieser Zellen notwendige Voraussetzung zu sein.

Viele Beobachtungen, inklusive der vorliegenden eigenen Studie, belegen, dass eine erniedrigte Anzahl zirkulierender CD34+ Progenitorzellen bzw. Subtypen dieser Progenitorzellpopulation mit einer Erhöhung des kardiovaskulären Risikos korreliert. Die vorliegenden *in vitro*-Experimente unterstützen jedoch nicht die These, dass CD34+ Progenitorzellen direkt zu Endothelzellen differenzieren und dadurch geschädigte Gefäße reparieren können. Vielmehr favorisiert der Autor die These, dass diese Progenitorzellen in geschädigten Gefäßen durch Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen Reparatur- und Regenerationsprozesse unterstützen und dadurch im Zusammenspiel mit anderen Zellen des peripheren Blutes und der Gefäßwand die vaskuläre Funktion positiv beeinflussen.

8. Zusammenfassung

Hintergrund: Es wird vermutet, dass die Anzahl zirkulierender Progenitorzellen (PC), insbesondere sogenannter endothelialer Progenitorzellen (EPC), durch Rauchen und weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren negativ moduliert wird. Bei prämenopausalen Frauen besteht andererseits ein positiver Einfluss auf die sog. EPC seitens des Östrogens.

Zielsetzung: Im Rahmen einer Probandenstudie sollte die Frage beantwortet werden, ob die Anzahl zirkulierender PC bei gesunden prämenopausalen Frauen durch chronisches inhalatives Rauchen unter geringem bzw. starkem Einfluss endogener weiblicher Hormone innerhalb des Menstruationszyklus beeinflusst wird. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Quantität der PC innerhalb des Menstruationszyklus einer Schwankung unterliegt.

Im experimentellen Teil der Arbeit sollte geklärt werden, ob aus CFU-EPC bzw. aus CD34+ PC proliferierende Endothelzellen entstehen können.

Materialien und Methoden: Im Rahmen der *Probandenstudie* wurden die Endothelfunktion sowie die Anzahl der CD34+ und CD34+/CD133+ PC im peripheren Blut mittels FACS Analyse bestimmt. Zusätzlich wurde die Zahl der Colony forming units (CFU-EPC) in Zellkultur ermittelt. Bei 32 Frauen (17 Raucherinnen und 15 Nichtraucherinnen) erfolgten Messungen nur in der Menstruationsphase (3. Tag des Menstruationszyklus). Zusätzlich haben Untersuchungen bei 20 Frauen auch zu Zeitpunkten, wo deutlich stärkerer hormoneller Einfluss besteht, nämlich in der Follikelphase (7. Tag des Menstruationszyklus) und in der Lutealphase (7. Tag vor Beginn der Regelblutung), stattgefunden.

Im experimentellen Teil der Arbeit wurden aus peripherem Blut gewonnene mononukleäre Zellen im Standard-Zellkulturmedium (M199+20% FCS) bzw. in angiogenem Zellkulturmedium (EBM mit EGM-2 Bullet Kits) kultiviert. Ferner wurde nach MACS Isolation die Differenzierung der CD34+, CD34- und der unselektierten mononukleären Zellen analysiert.

Ergebnisse: Die Zahl der CD34+ PC war in der Rauchergruppe signifikant reduziert, sowohl in der Menstruationsphase als auch in der Follikel- und Lutealphase. Es lag kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der untersuchten zirkulierenden PC zwischen

den untersuchten Zeitpunkten des Menstruationszyklus vor. Nur die Anzahl der CD34+ PC zeigte eine Korrelation mit der endothelabhängigen Vasodilatation.

Aus mononukleären Zellen können zwei Typen endothelartiger Zellen entstehen. Zu der ersten Zellgruppe gehören die Zellen der CFU-EPC, die eher transdifferenzierten Monozyten entsprechen. Die zweite Zellgruppe beinhaltet stark proliferierende Zellen mit Endothel-eigenschaften, die mutmaßlich aus CD34+ PC oder abgeschilferten vaskulären Endothelzellen unter Einfluss von Zytokinen und weiteren mononukleären Zellen hervorgehen.

Schlussfolgerung: Die Anzahl der CD34+ PC wird bei chronischen Raucherinnen beeinträchtigt, unabhängig von zusätzlichen endogenen hormonellen Einflüssen.

Das Ausmaß des Anstiegs von Östrogen reicht in den untersuchten Phasen des Menstruationszyklus nicht aus, um die Anzahl von PC relevant zu beeinflussen.

Die CD34+Zellzahl könnte bei gesunden prämenopausalen Frauen einen zusätzlichen Marker für die Endothelfunktion darstellen. Die sogenannten EPC stellen eine heterogene Zellgruppe dar.

9. Literaturverzeichnis

1. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, et al.: Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med.* 2003 Nov; 9 (11): 1370–6.
2. Ambrose JA, Barua RS.: The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol.* 2004 May 19;43(10):1731-7.
3. Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID, et al.: Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood.* 1986 Mar;67(3):842-5
4. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al.: Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999 Aug 6; 85 (3): 221–8.
5. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al.: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997 Feb 14; 275 (5302): 964–7.
6. Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, et al.: Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood.* 2004 Feb 1; 103 (3): 921–6.
7. Böhme B: Funktionelle Bedeutung des endothelialenen P-Selektins und der VEGF-Rezeptoren VEGFR1 und VEGFR2 bei der hämatogenen Metastasierung im Lungenmelanom-Modell der Maus. Inagurual Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Veterinärmedizin durch die Tierärztliche Hochschule Hannover 2004.
8. Boilson BA, Kiernan TJ, Harbuzariu A: Circulating CD34+ cell subsets in patients with coronary endothelial dysfunction. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2008 Aug;5(8):489-96.
9. Bompais H, Chagraoui J, Canron X et al.: Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood.* 2004 Apr 1;103(7):2577-84.
10. Carmeliet P: Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6:389-95

11. Case J, Mead LE, Bessler WK: Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp Hematol.* 2007 Jul;35(7):1109-18.
12. Chambliss KL, Shaul PW: Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev.* 2002 Oct; 23 (5): 665–86.
13. Chen JZ, Zhang FR, Tao QM, et al.: Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond).* 2004 Sep;107(3):273-80.
14. Chironi G, Walch L, Pernollet MG, et al.: Decreased number of circulating CD34+KDR+ cells in asymptomatic subjects with preclinical atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2007 Mar;191(1):115-20.
15. Cignarella A, Paoletti R, Puglisi L: Direct effects of estrogen on the vessel wall. *Med Res Rev.* 2001 Mar;21(2):171-84.
16. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ: Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol.* 2002 Jan 16;39(2):257-65.
17. D'Agostino RB, Vasan RS, Pencina MJ, et al.: General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2008 Feb 12;117(6):743-53.
18. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ: Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation.* 2007 Mar 13;115(10):1285-95.
19. Eggermann J, Kliche S, Jarmy G, et al.: Endothelial progenitor cell culture and differentiation in vitro: a methodological comparison using human umbilical cord blood. *Cardiovasc Res.* 2003 May 1; 58 (2): 478–86.
20. Eguchi M, Masuda H, Asahara T: Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Clin Exp Nephrol.* 2007 Mar;11(1):18-25.
21. Eichmann A, Corbel C, Nataf V, et al.: Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 May 13;94(10):5141-6.
22. Fadini GP, de Kreutzenberg S, Albiero M, et al.: Gender differences in endothelial progenitor cells and cardiovascular risk profile: the role of female estrogens. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 May;28(5):997-1004.

23. Fadini GP, de Kreutzenberg SV, Coracina A, et al.: Circulating CD34+ cells, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *Eur Heart J.* 2006 Sep;27(18):2247-55.
24. Fadini GP, Pagano C, Baesso I, et al.: Reduced endothelial progenitor cells and brachial artery flow-mediated dilation as evidence of endothelial dysfunction in ocular hypertension and primary open-angle glaucoma. *Acta Ophthalmol.* 2009 Jun 22.
25. Fernandez Pujol B, Lucibello FC, Zuzarte M, et al.: Dendritic cells derived from peripheral monocytes express endothelial markers and in the presence of angiogenic growth factors differentiate into endothelial-like cells. *Eur J Cell Biol.* 2001 Jan;80(1):99-110.
26. Friedrich EB, Walenta K, Scharlau J, Nickenig G, Werner N.: CD34-/CD133+/VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. *Circ Res.* 2006 Feb 17;98(3):e20-5
27. Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, et al.: In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood.* 2000 May 15; 95(10): 3106–12.
28. George J, Goldstein E, Abashidze S, et al.: Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation. *Eur Heart J.* 2004 Jun;25(12):1003-8.
29. Gill M, Dias S, Hattori K, et al.: Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2 (+)AC133 (+) endothelial precursor cells. *Circ Res.* 2001 Feb 2; 88 (2): 167–74.
30. Griese DP, Ehsan A, Melo LG, et al.: Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation.* 2003 Nov 25;108(21):2710-5
31. Groger A, Piatkowski A, Grieb G, et al.: The mobilisation of mononuclear cells and endothelial progenitor cells after burn injury in a porcine model. *Burns.* 2010 Jun;36(4):545-51
32. Grskovic B, Ruzicka K, Karimi A, Qujeq D, Müller MM: Cell cycle analysis of the CD133+ and CD133- cells isolated from umbilical cord blood. *Clin Chim Acta.* 2004 May;343(1-2):173-8.

33. Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, et al.: Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res.* 2003 Nov 28;93(11):1023-5.
34. Güven H, Shepherd RM, Bach RG, Capoccia BJ, Link DC: The number of endothelial progenitor cell colonies in the blood is increased in patients with angiographically significant coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Oct 17; 48 (8): 1579–87.
35. Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T et al.: Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann NY Acad Sci.* 2003; 996: 141–151.
36. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005; 352: 1685–1695.
37. Harraz M, Jiao C, Hanlon HD, Hartley RS, Schatteman GC: CD34- blood-derived human endothelial cell progenitors. *Stem Cells.* 2001; 19 (4): 304–12.
38. Havemann K, Pujol BF, Adamkiewicz J: In vitro transformation of monocytes and dendritic cells into endothelial like cells. *Adv Exp Med Biol.* 2003; 522: 47–57.
39. He T, Peterson TE, Holmuhamedov EL: Human endothelial progenitor cells tolerate oxidative stress due to intrinsically high expression of manganese superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Nov;24(11):2021-7
40. Heeschen C, Lehmann R, Honold J, et al.: Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation.* 2004 Apr 6;109(13):1615-22.
41. Heiss C, Keymel S, Niesler U, et al.: Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2005 May 3;45(9):1441-8.
42. 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 May 3;45(9):1441-8.
43. Hill JM, Finkel T, Quyyumi AA: Endothelial progenitor cells and endothelial dysfunction. *Vox Sang.* 2004 Jul;87 Suppl 2:31-7.
44. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al.: Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003 Feb 13; 348 (7): 593–600.

45. Hoetzer GL, MacEneaney OJ, Irmiger HM, et al.: Gender differences in circulating endothelial progenitor cell colony-forming capacity and migratory activity in middle-aged adults. *Am J Cardiol.* 2007 Jan 1;99(1):46-8.
46. Hristov M, Erl W, Weber PC: Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Jul 1; 23 (7): 1185–9.
47. Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, et al. Trends in the incidence of coronary heart disease and changes in diet and lifestyle in women. *N Engl J Med* 2000; 343: 530-537.
48. Hu Y, Davison F, Zang Z, Xu Q: Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells. *Circulation* 2003, 108:3122-3127.
49. Huang PH, Chen YH, Chen YL, et al.: Vascular endothelial function and circulating endothelial progenitor cells in patients with cardiac syndrome X. *Heart.* 2007 Sep;93(9):1064-70.
50. Hur J, Yoon CH, Kim HS, et al.: Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Feb; 24 (2): 288–93.
51. Imanishi T, Hano T, Nishio I: Estrogen reduces endothelial progenitor cell senescence through augmentation of telomerase activity. *J Hypertens.* 2005 Sep; 23 (9): 1699–706.
52. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H: Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* (2004) 104:2752–2760.
53. Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, et al.: Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation.* 2003 Dec 23; 108 (25): 3115-21.
54. Iwakura A, Shastry S, Luedemann C, et al.: Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9. *Circulation.* 2006 Mar 28; 113 (12): 1605–14.

55. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al: *Vascular endothelial growth factor (165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. Circ Res. 2000 Jun 23; 86 (12): 1198–202.*
56. Kang HJ, Kim SC, Kim YJ, et al.: *Short-term phytohaemagglutinin-activated mononuclear cells induce endothelial progenitor cells from cord blood CD34+ cells. Br J Haematol. 2001 Jun; 113 (4): 962–9.*
57. Keymel S, Kalka C, Rassaf T, et al.: *Basic Res Cardiol. 2008 Nov;103(6):582-6: Impaired endothelial progenitor cell function predicts age-dependent carotid intimal thickening.*
58. Khot UN, Khot MB, Bajzer CT, et al.: *Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease. JAMA. 2003 Aug 20;290(7):898-904.*
59. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, et al.: *Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004 Aug; 24 (8): 1442–7.*
60. Kränkel N, Adams V, Linke A, et al.: *Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 Apr;25(4):698-703).*
61. Krause DS, Ito T, Fackler MJ, et al.: *Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. Blood. 1994 Aug 1;84(3):691-701.*
62. Lemieux C, Cloutier I, Tanguay JF: *Menstrual cycle influences endothelial progenitor cell regulation: A link to gender differences in vascular protection? Int J Cardiol. 2009 Aug 14;136(2):200-10.*
63. Leor J, Marber M: *Endothelial progenitors: a new Tower of Babel. J Am Coll Cardiol. 2006 Oct 17;48(8):1588-90.*
64. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP: *Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. J Clin Invest. 2000 Jan; 105 (1): 71–7.*
65. Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, et al.: *Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. Diabetes. 2004 Jan; 53 (1): 195–9.*
66. Lorenz M, Jochmann N, von Krosigk A, et al.: *Addition of milk prevents vascular protective effects of tea. Eur Heart J. 2007 Jan;28(2):219-23.*

67. Lyden D, Hattori K, Dias S, et al.: *Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth.* *Nat Med.* 2001 Nov; 7 (11): 1194–201.
68. Massa M, Rosti V, Ferrario M, et al.: *Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction.* *Blood.* 2005 Jan 1;105(1):199-206.
69. Masuda H, Kalka C, Takahashi T, et al.: *Estrogen-Mediated Endothelial Progenitor Cell Biology and Kinetics For Physiological Postnatal Vasculogenesis.* 2007 Sep 14;101(6):598-606.
70. Matsumoto T, Mifune Y, Kawamoto A: *Fracture induced mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for bone healing.* *J Cell Physiol.* 2008 Apr;215(1):234-42.
71. Melero-Martin JM, Khan ZA, Picard A, Wu X, Paruchuri S, Bischoff J.: *In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells.* *Blood.* 2007 Jun 1;109(11):4761-8.
72. Michaud SE, Dussault S, Haddad P, Groleau J, Rivard A. *Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities.* *Atherosclerosis.* 2006 Aug;187(2):423-32.
73. Mints M, Jansson M, Sadeghi B, et al.: *Endometrial endothelial cells are derived from donor stem cells in a bone marrow transplant recipient.* *Hum Reprod.* 2008 Jan;23(1):139-43.
74. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, et al.: *A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning.* *Blood.* 1997 Dec 15;90(12):5013-21.
75. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ, et al.: *Regulatory mechanisms in stem cell biology.* *Cell.* 1997 Feb 7; 88 (3): 287–98.
76. Patterson C. *The Ponzio effect: endothelial progenitor cells appear on the horizon.* *Circulation* 2003 Jun 24; 107(24): 2995-7
77. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira, et al.: *Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34 (+) cells identifies a population of functional endothelial precursors.* *Blood.* 2000 Feb 1; 95 (3): 952–8.
78. Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Delilieri GL: *Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133 (+) cells.* *Br J Haematol.* 2001 Oct; 115 (1): 186–94.

79. *Rabelink TJ, de Boer HC, de Koning EJ, van Zonneveld AJ: Endothelial progenitor cells: more than an inflammatory response. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004 May;24(5):834-8.*
80. *Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL: Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. Circulation. 2003 Mar 4; 107 (8): 1164–9.*
81. *Ribatti D: The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review. Leuk Res. 2007 Apr;31(4):439-44.*
82. *Robb AO, Mills NL, Smith IB, et al.: Influence of menstrual cycle on circulating endothelial progenitor cells. Hum Reprod. 2009 1(1): 1-7.*
83. *Rohde E, Malischnik C, Thaler, et al.: Blood monocytes mimic endothelial progenitor cells. Stem Cells. 2006 Feb;24(2):357-67.*
84. *Romagnani P, Annunziato F, Liotta F, et al.: CD14+CD34low cells with stem cell phenotypic and functional features are the major source of circulating endothelial progenitors. Circ Res. 2005 Aug 19;97(4):314-22.*
85. *Rosenzweig A: Circulating endothelial progenitors--cells as biomarkers. N Engl J Med. 2005; 353: 1055–1057.*
86. *Ruifrok WP, de Boer RA, Iwakura A, et al.: Estradiol-induced, endothelial progenitor cell-mediated neovascularization in male mice with hind-limb ischemia. Vasc Med. 2009 Feb;14(1):29-36.*
87. *Salven P, Mustjoki S, Alitalo R, Alitalo K, Rafii S: VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. Blood. 2003 Jan 1; 101 (1): 168–72.*
88. *Schmeisser A, Garlich CD, Zhang H, et al.: Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. Cardiovasc Res. 2001 Feb 16; 49 (3): 671–80.*
89. *Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, et al.: Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. Circulation. 2005 Jun 7;111(22):2981-7.*
90. *Shalaby F, Ho J, Stanford WL, Fischer KD, et al.: A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. Cell. 1997 Jun 13; 89 (6): 981–90.*

91. Shantsila E, Watson T, Tse HF, et al.: Endothelial colony forming units: Are they a reliable marker of endothelial progenitor cell numbers? 2007, Vol. 39, No. 6, Pages 474-479
92. Shantsila E, Watson T, Tse HF, et al.: New insights on endothelial progenitor cell subpopulations and their angiogenic properties. *J Am Coll Cardiol.* 2008 Feb 12;51(6):669-71.
93. Shi Q, Rafii S, Wu MH, et al.: Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood.* 1998 Jul 15; 92 (2): 362–7.
94. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al.: Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 2001 Jun 12; 103 (23): 2776–9.
95. Shmilovich H, Deutsch V, Roth A, Miller H, Keren G, George J: Circulating endothelial progenitor cells in patients with cardiac syndrome X. *Heart.* 2007 Sep;93(9):1071-6.
96. Sieveking DP, Buckle A, Celermajer D, et al.: Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay. *J Am Coll Cardiol.* 2008 Feb 12;51(6):660-8.
97. Simons M. : Angiogenesis: where do we stand now? *Circulation.* 2005 Mar 29;111(12):1556-66
98. Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP: Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med.* 1997 Nov 27;337(22):1584-90.
99. Stangl V, Baumann G, Stangl K: Cardiovascular risk factors in women. *Dtsch Med Wochenschr.* 2003 Aug 1;128(31-32):1659-64.
100. Stangl V, Witzel V, Baumann G, Stangl K: Current diagnostic concepts to detect coronary artery disease in women. *Eur Heart J.* 2008 Mar;29(6):707-17.
101. Statistisches Bundesamt Deutschland: www.destatis.de
102. Stramba-Badiale M, Fox KM, Priori SG, et al.: Cardiovascular diseases in women: a statement from the policy conference of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 2006 Apr;27(8):994-1005.
103. Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, et al.: Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res.* 2003 Jul 25;93(2):170-7.

104. Strehlow K, Werner N, Berweiler J, et al.: Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation*. 2003 Jun 24; 107 (24): 3059–65.
105. Tepper OM, Capla JM, Galiano RD, et al.: Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood*. 2005 Feb 1;105(3):1068-77.
106. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, et al.: Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*. 2002 Nov 26; 106 (22): 2781–6.
107. Timmermans F, Plum J, Yöder MC, Ingram DA, Vandekerckhove B, Case J: Endothelial progenitor cells: identity defined? *J Cell Mol Med*. 2009 Jan;13(1):87-102.
108. Timmermans F, Van Hauwermeiren F, De Smedt M: Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Jul;27(7):1572-9.
109. Towfighi A, Zheng L, Ovbiagele B. Sex-specific trends in midlife coronary heart disease risk and prevalence. *Arch Intern Med*. 2009 Oct 26;169(19):1762-6.
110. Tsuchiya M, Asada A, Kasahara E, Sato EF, Shindo M, Inoue M: Smoking a single cigarette rapidly reduces combined concentrations of nitrate and nitrite and concentrations of antioxidants in plasma. *Circulation*. 2002 Mar 12; 105 (10): 1155–7.
111. Umemura T, Higashi Y: Endothelial progenitor cells: therapeutic target for cardiovascular diseases. *J Pharmacol Sci*. 2008 Sep;108(1):1-6.
112. Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S: Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2003 Nov 18; 108 (20): 2511–6.
113. Valgimigli M, Rigoli GM, Fucili A, et al.: CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation*. 2004 Sep 7; 110 (10): 1209–12.
114. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al.: Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*. 2001 Jul 6; 89 (1): E1–7.
115. Wang X, Zhu J, Chen J, et al.: Effects of nicotine on the number and activity of circulating endothelial progenitor cells. *Clin Pharmacol*. 2004 Aug;44(8):881-9

116. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al.: *Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. N Engl J Med. 2005 Sep 8;353(10):999-1000.*
117. Werner N, Nickenig G.: *Sex hormones save our skin: the vascular networking of estrogen. Circ Res. 2009 Jan 30;104(2):135-7.*
118. Werner N, Wassmann S, Ahlers P, et al.: *Endothelial progenitor cells correlate with endothelial function in patients with coronary artery disease. Basic Res Cardiol. 2007 Nov;102(6):565-71.*
119. Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EF: *Systemic effects of smoking. Chest. 2007 May;131(5):1557-66.*
120. Yoder MC, Mead LE, Prater D, et al.: *Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. Blood. 2007 Mar 1;109(5):1801-9.*
121. Yu Y, Flint A, Dvorin EL, Bischoff J: *AC133-2, a novel isoform of human AC133 stem cell antigen. J Biol Chem. 2002 Jun 7;277(23):20711-6.*
122. Zhao Y, Glesne D, Huberman E: *A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Mar 4;100(5):2426-31.*
123. Zhou B, Ma FX, Liu PX, et al.: *Impaired therapeutic vasculogenesis by transplantation of OxLDL-treated endothelial progenitor cells. J Lipid Res. 2007 Mar;48(3):518-27*

10. Abkürzungsverzeichnis

°C:	Grad Celcius
Abb.:	Abbildung
ACD-A:	2-amino-1-cyclopentene-1-dithiocarboxylic acid
ADP:	Adenosindiphosphat
Akt-Kinase:	Proteinkinase B
AMV:	Avian myeloblastosis virus
APC:	Allophycocyanin
Aqua. bidest.:	Deionisiertes und bidestilliertes Wasser
AT:	Angiotensin
BJ:	Zelllinie der Fibroblasten
BMI:	Body mass Index
bp:	Basenpaar
BSA:	Bovine serum albumin
BS-Lektin:	Lektin von <i>Bandeiraea simplicifolia</i>
bzw.:	beziehungsweise
CFU:	Colony forming units
CO ₂ :	Kohlendioxid
Dil-ac-LDL:	Fluoreszenzmarkiertes acetyliertes low density lipoprotein
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
dNTP:	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EBM:	Endothelial basal medium
ECGS:	Endothelial cell growth supplement
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
EGM:	Endothelial growth medium
eNOS:	Endothelial NO-Synthase
EPC:	Endothelial progenitor cells
E-Selektin:	Endotheliales Selektin
et al.:	Et alii (und andere)
FACS:	Fluorescence activated cell sorting
FcR:	Fc-Rezeptor

FCS:	Fetal calf serum
FGF:	Fibroblast growth factor
FITC:	Fluoresceinisothiocyanat
FL:	Fluoreszenzkanal
Flk:	Fetal liver kinase
FSC:	Forward scatter, Vorwärtsstreulicht
FSH:	Follikelstimulierendes Hormon
g:	Erdbeschleunigung
G+C:	Guanin und Cytosin
G-CSF:	Granulocyte-colony stimulation factor
GM-CSF:	Granulocyte-monocyte colony stimulating factor
HAEC:	Humane Aortenendothelzellen
HDL:	High density lipoprotein
HFGF:	Human fibroblast growth factor
HsCRP:	High sensitivity C-reactive protein
HUVEC:	Human umbilical vein endothelial cells
IGF:	Insulin like growth factor
IL:	Interleukin
kDa:	Kilodalton
KDR:	Kinase domain receptor
KHK:	Koronare Herzkrankheit
LDL:	Low density lipoprotein
LH:	Luteinisierendes hormon
MACS:	Magnetic-activated cell sorting
MAP-Kinase:	Mitogen-activated protein-kinase
MLV:	Moloney murine leukemia virus
mmHG:	Millimeter Quecksilbersäule
mM:	Millimol
MNC:	Mononukleäre Zellen
mRNA:	Messenger-RNA
n:	Anzahl
NO:	Stickstoffmonoxid
NYHA:	New York Heart Association
p:	p-Wert

Abkürzungsverzeichnis

PBMC:	Peripheral blood mononuclear cells
PC:	Progenitor cells
PBS:	Phosphate buffered saline
PCR:	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PE:	Phycoerythrin
RNA:	Ribonukleinsäure
ROS:	Reactive oxygen species
RPL:	Murine ribosomal protein 13A, ein „housekeeping“-Gen
Rpm:	Rotationen pro Minute
RT:	Reverse transcription
SEM:	Standard error of the mean
SSC:	Side scatter, Seitwärtsstreuung
TBE:	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
THP-1:	Humane monozytäre Zelllinie
Tris/HCl:	Chlorwasserstoff
u.a.:	unter anderem
VE-Cadherin:	Vascular endothelial cadherin
VEGF:	Vascular endothelial growth factor
VEGFR:	VEGF-Rezeptor
vs:	Versus
vWF:	von Willebrand Faktor

11. Danksagung

Frau Prof. Dr. med. V. Stangl und Herrn Prof. Dr. med. K. Stangl danke ich für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe die wissenschaftlichen Methoden zu erlernen. Mein besonderer Dank gilt für die Überlassung der Materialien, insbesondere des FACS-Gerätes.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. A. Ludwig für ihre wertvolle und verlässliche Unterstützung in vielen Situationen, für Hilfe bei allen anliegenden Fragen und Problemen. Ich danke für das entgegengebrachte Vertrauen und insgesamt für die freundlichste und netteste Betreuung, die ich mir vorstellen kann, gerade zu Beginn meiner akademischen Einarbeitung.

Frau Dr. rer. nat. S. Meiners, Herrn Dr. rer. nat. M. Lorenz, Frau A. Weller MTA, Frau A. Vietzke MTA, Frau A. Zepp BTA danke ich herzlich für ihre zahlreichen Anregungen und Tipps sowie für ihre Hilfe und konstruktive Kritik bei der Durchführung meiner Doktorarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau S. Metzkow MTA, die über ihre tatkräftige Hilfe bei den experimentellen Arbeiten hinaus mir jederzeit mit Rat und Tat zu Seite stand.

Den Mitarbeitern der Klinik für Angiologie und Kardiologie der Charité, Campus Mitte danke ich für die Kooperation über viele Monate.

Dem Institut für Medizinische Biometrie danke ich für die statistische Beratung bei der Datenbearbeitung.

Dem gesamten Doktorandenkollektiv in der Arbeitsgruppe von Herrn und Frau Prof. Dr. med. Stangl, die an verschiedenen Projekten beteiligt waren, danke ich für ihre außerordentlich freundschaftliche Zusammenarbeit.

Danksagung

Den größten Dank bin ich meiner Frau, Dr. med. Tereza Kertesz, schuldig; ohne ihre Unterstützung und ihr fortwährendes Verständnis hätte diese Dissertationsschrift nicht entstehen können.

12. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

13. Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Andras Kertesz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Einfluss des Rauchens auf zirkulierende Progenitorzellen bei prämenopausalen Frauen selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“