

Aus dem Bereich Innere Medizin – Klinisch-Experimentelle Medizin
der medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Prof. Dr. med. U. Laufs

**Differentielle Bedeutung der eNOS des Knochenmarks gegenüber
der eNOS der Gefäßperipherie für die Regulation von kardialer
Fibrose und EPC vermittelter Angiogenese im Modell der
nachlastinduzierten Hypertrophie**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2011

Vorgelegt von: Philippe Jagoda
Geb. am: 11.12.1982 in Viersen

Gewidmet meinen Eltern Brigitte und Dieter Jagoda.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	- 9 -
2 Einleitung	- 11 -
2.1 Hypertrophie des Herzens	- 11 -
2.2 Kardiale Angiogenese und EPC	- 16 -
2.3 Die NO-Synthasen.....	- 20 -
2.4 Fragestellung der Arbeit	- 23 -
3 Material und Methoden	- 24 -
3.1 Versuchstiere	- 24 -
3.2 Verwendete Substanzen und Instrumente	- 24 -
3.2.1 Antikörper	- 24 -
3.2.2 Chemikalien	- 25 -
3.2.3 Medikamente.....	- 26 -
3.2.4 Lösungen.....	- 26 -
3.2.5 Instrumente	- 27 -
3.2.6 Computer Software	- 28 -
3.3 Induktion von kardialer Hypertrophie mittels Aortenligatur.....	- 29 -
3.4 L-NAME - Behandlung.....	- 29 -
3.5 Knochenmarktransplantation.....	- 29 -
3.6 Gruppenaufbau	- 30 -

3.7 Histologie	- 31 -
3.7.1 Entparaffinieren der Paraffinschnitte	- 31 -
3.7.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)	- 32 -
3.7.3 Picro-Sirius-Rot-Färbung.....	- 32 -
3.7.4 Immunfärbung.....	- 32 -
3.7.4.1 Grundprinzip	- 32 -
3.7.4.2 Vorbehandlung (Antigendemaskierung).....	- 33 -
3.7.4.3 Färbemethoden.....	- 33 -
3.7.4.4 Kontrolle der Immunfärbung	- 34 -
3.7.4.5 Schnittuntersuchung und Gewebemorphologie	- 35 -
3.8 Fluorescence-Activated-Cell-Sorter Analysis	- 36 -
3.8.1 FACS- Analyse Blut	- 36 -
3.8.2 FACS- Analyse Knochenmark.....	- 37 -
3.9 Migrationsassay.....	- 37 -
3.10 Auswertung.....	- 38 -
3.10.1 Statistik	- 38 -
4 Ergebnisse	- 39 -
4.1 Effekt der Aortenligatur (TAC) bei nichttransplantierten Mäusen	- 39 -
4.1.1 Hämodynamische Daten und myokardiale Hypertrophie.....	- 39 -
4.1.2 Kardiomyozytäre linksventrikulären Hypertrophie	- 41 -
4.1.3 Kardiale Fibrose.....	- 43 -
4.1.4 Zellproliferation	- 45 -

4.1.5	Endotheliale Progenitorzellen	- 47 -
4.1.6	Druckinduzierte kardiale Neoangiogenese	- 49 -
4.2	Effekt der Aortenligatur (TAC) bei transplantierten Mäusen	- 51 -
4.2.1	Hämodynamische Daten und myokardiale Hypertrophie.....	- 51 -
4.2.2	Kardiomyozytäre linksventrikulären Hypertrophie	- 51 -
4.2.3	Kardiale Fibrose	- 52 -
4.2.4	Zellproliferation	- 54 -
4.2.5	Endotheliale Progenitorzellen	- 56 -
4.2.6	Druckinduzierte kardiale Neoangiogenese	- 58 -
4.2.7	Identifizierung von aus dem Knochenmark stammenden Endothelzellen im Myokard.....	- 60 -
5	Diskussion.....	- 62 -
5.1	Kardiales Remodeling bei der nachlastinduzierten linksventrikulären Hypertrophie bei nichttransplantierten Mäusen.....	- 62 -
5.1.1	Systemische Hemmung der NO-Synthase durch L-NAME	- 62 -
5.1.2	Unterschiede von eNOS ^{-/-} - und Wildtyp- Mäusen	- 64 -
5.2	Kardiales Remodeling bei der nachlastinduzierten linksventrikulären Hypertrophie bei den knochenmarkstransplantierten Mäusen.....	- 69 -
6	Literaturverzeichnis.....	- 73 -
7	Dank.....	- 88 -
8	Lebenslauf	- 89 -
9	Publikationen.....	- 91 -

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AI	Aortenligatur
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
BH 4	Tetrahydrobiopterin
BM	Knochenmark
BMC	Knochenmarkszellen
BSA	Bovine Serum Albumine
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	Diamidino-phenylindole
DiLDL	1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninelabeled-acetylated LDL
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EBM	endotheliales Basalmedium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPC	endotheliale Progenitorzellen
FACS	Fluorescence Aktivated Cell Sorter
FAD	Flavinadenindinukleotid
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FMN	Flavinmononukleotid
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Gy	Gray
kg, g, mg, µg, ng	Kilogramm, Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
h	eine Stunde
i.v.	intravenös
H ₂ O	Wasser
H&E	Hematoxylin-Eosin Färbung
Host	Empfänger

KCL	Kaliumchlorid
kDA	Kilo Dalton
KG	Kilogramm Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogencarbonat
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
L-NAME	NG-nitro-L-argininemethylester
M, mm, µm	Meter, Millimeter, Mikrometer
mm ²	Quadratmillimeter
mm Hg	Millimeter-Quecksilbersäule, Torr
Min	Minute
M, mM	Molar, Millimolar
MNC	Mononukleäre Zellen
n	Fallzahl
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamid-diadenindinukleotiddiphosphat
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NA ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
O ₂	Sauerstoff
OP	Operation
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
pH	ph-Wert
pos	positiv
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
Sca-1	Stem cell antigen 1
SDF-1	stromal cell-derived factor 1
sGC	lösliche Guanylylcyclase
SHAM	Sham operierte Tiere
SSC	Natriumchloridnatriumcitratpuffer

TAC	Transaortale Konstriktion
TRITC	Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate
VEGFR2	Vascular endothelial growth factor R2
vs	versus
WT	Wildtyp
%	Prozent

1 Zusammenfassung

Die Rolle der eNOS für die myokardialen Remodelingprozesse im Rahmen der nachlastinduzierten Hypertrophie

Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) reguliert die Mobilisation und Funktion der endothelialen Progenitorzellen (EPC). Wir untersuchten, ob die eNOS des Knochenmarks die myokardialen Remodelingprozesse im Rahmen der nachlastinduzierten Hypertrophie durch die Regulation der aus dem Knochenmark stammenden vaskulären Progenitorzellen beeinflusst.

Bei zehn Wochen alten männlichen C57/Bl6N Wildtypmäusen (WT) und eNOS Knockout (eNOS^{-/-}) Mäusen wurde einer Aortenligatur (Transaortale Konstriktion, TAC, 360 µm für 35 Tage) bzw. einer SHAM-Operation durchgeführt. Die Aortenligatur induzierte in beiden Gruppen eine kardiale Hypertrophie und einen Anstieg der Ki-67^{pos}-Kardiomyozyten. Die Myokardfibrose war bei eNOS^{-/-}TAC starker ausgeprägt (3.4±0.4% vs 2.0±0.3 % in WT-TAC, p<0.05). Die Aortenligatur führte bei den Wildtypmäusen im Gegensatz zu den eNOS^{-/-}-Mäusen zu einer Hochregulation der EPC im peripheren Blut und im Knochenmark. Die basale Migrationskapazität der EPCs war bei den eNOS^{-/-}-Mäusen geringer und wurde in beiden Gruppen nicht durch die Aortenligatur erhöht.

Um die Rolle der eNOS im Knochenmark zu untersuchen, wurden myeloablativ bestrahlten C57/Bl6N Wildtypmäusen eNOS^{-/-}-Knochenmark (diese Mäuse werden als BM- bezeichnet) und eNOS^{-/-}-Mäusen Wildtypknochenmark (diese Mäuse werden als BM+ bezeichnet) vor der Aortenligatur transplantiert. Bei Wildtypmäusen mit eNOS^{-/-}-Knochenmark induzierte die Aortenligatur im Vergleich zu den eNOS^{-/-}-Mäusen mit Wildtypknochenmark eine stärker ausgeprägte kardiale Hypertrophie und Myokardfibrose. Die Kapillardichte, die Anzahl der EPCs im peripheren Blut und im Knochenmark, sowie die migratorische Kapazität der EPCs war bei den Wildtypmäusen mit eNOS^{-/-}-Knochenmark vermindert. Durch Transplantationen von grün fluoreszierendem Protein (GFP) exprimierendem Knochenmark in Wildtyp- und eNOS^{-/-}-Mäusen konnte nach der Aortenligatur ein ähnlicher Anstieg der aus dem Knochenmark stammenden CD31^{pos}GFP^{pos}- endothelialen Zellen im Myokard beider Gruppen beobachtet werden.

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass die eNOS des Knochenmarks eine Schlüsselrolle für die Verbesserung der kardialen Hypertrophie, der Kapillardichte und Fibrose im Rahmen der erhöhten Nachlast spielt.

Role of the endothelial nitric oxide synthase for cardiac remodeling in pressure overload

The endothelial nitric oxide synthase (eNOS) regulates the mobilisation and function of endothelial progenitor cells (EPC). We hypothesized that eNOS of the bone marrow affects cardiac remodelling during myocardial hypertrophy via the regulation of bone- marrow derived vascular progenitor cells.

Ten-week-old male C57/Bl6N wildtype (WT) and eNOS^{-/-} mice were subjected to transverse aortic constriction (TAC, 360 m, 35d) or sham-operation inducing cardiac hypertrophy and increasing the numbers of Ki67+ cardiomyocytes in both strains. Myocardial fibrosis was more pronounced in eNOS^{-/-}TAC (3.4±0.4% vs 2.1±0.2 % in WT-TAC, p<0.05). TAC upregulated the number of EPCs in the peripheral blood and in the bone marrow in WT but not in eNOS^{-/-}. Baseline migratory capacity of EPCs was lower in eNOS^{-/-} and was not raised by TAC in both strains.

To test the role of eNOS in the bone marrow, irradiated C57/Bl6N mice were transplanted with eNOS^{-/-} bone marrow (WT/eNOS^{-/-}) and eNOS^{-/-} mice received wildtype bone marrow (eNOS^{-/-}/WT) before aortic constriction. In WT/eNOS^{-/-}, TAC-induced cardiac hypertrophy was greater compared to eNOS^{-/-}/WT and fibrosis was increased. Capillary density, number of EPCs in the peripheral blood and in the bone marrow and their migratory capacity were decreased in WT/eNOS^{-/-} mice. Following transplantation of green fluorescent protein (GFP) positive bone marrow, TAC similarly increased the number of bone-marrow derived CD31^{POS}GFP^{POS} endothelial cells in both strains.

eNOS of the bone marrow plays a key role for amelioration of cardiac hypertrophy, capillary density and fibrosis during increased afterload.

2 Einleitung

2.1 Hypertrophie des Herzens

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen weltweit noch immer die häufigste Todesursache dar [1]. Allein in Deutschland machen sie 43,4 % der Todesursachen aus [2], wobei die Herzinsuffizienz einen erheblichen Anteil beiträgt.

Ein starker Prädiktor für das Auftreten einer Herzinsuffizienz ist die linksventrikuläre Hypertrophie [3]. Unabhängig von der Anwesenheit kardiovaskulärer Risikofaktoren geht die linksventrikuläre Hypertrophie mit einer Vielzahl kardiovaskulärer Endpunkte und einer Verdoppelung der Mortalität einher [4]. Trotz ihrer somit sichtbaren klinischen Bedeutung sind die pathologischen Prozesse, die im Rahmen der Hypertrophie ablaufen noch immer nicht vollständig verstanden.

Das Myokard setzt sich aus einer Reihe verschiedener Zelltypen zusammen. Kardiale Myozyten, welche die größten Zellen im Myokard darstellen, nehmen dabei 75% des Volumens im Myokard ein, wobei sie nur ein Drittel der gesamten Zellpopulation ausmachen [5]. Die weiteren im Myokard bestehenden Zellen (Nicht-Myozyten) befinden sich im Interstitium. Sie beinhalten endotheliale Zellen, welche für die Auskleidung und vasomotorische Reaktivität der Blutgefäße verantwortlich sind [6], glatte Gefäßmuskelzellen, die ebenfalls ihren Anteil an der Reaktivität und vasomotorischen Kapazität der Blutgefäße haben, kardiale Fibroblasten, welche den Auf- und Abbau von Kollagen regulieren, sowie Makrophagen und Mastzellen zur Immunabwehr.

Dabei ist es keinesfalls so, dass sich bei der Entwicklung einer Hypertrophie alle Zellen proportional zueinander verhalten. Vielmehr zeigt sich das Myozyten und Nicht-Myozyten unabhängig voneinander wachsen [7, 8]. Ein Beispiel dafür ist die strahleninduzierte Fibrose, bei der es zu einem Wachstum bzw. Remodeling des Kollagennetzwerkes im Myokard kommt, ohne dabei ein begleitendes Myozytenwachstum hervorzurufen [9]. Bleibt bei der Entstehung einer Hypertrophie die Homogenität der Zellen untereinander erhalten, spricht man von einer adaptiven Hypertrophie [10], welche zum Beispiel bei sportlicher Betätigung, Formen von chronischer Anämie oder arteriovenösen Fisteln auftritt. Heterogenität der Zellen durch ein disproportioniertes Wachstum führt zu einer pathologischen Hypertrophie [9].

Allgemein unterscheidet man zwei Formen kardialer Hypertrophie. Einerseits die druckinduzierte, konzentrische Hypertrophie, die durch Zunahme der ventrikulären

Wanddicke ohne Dilatation der Kammer charakterisiert ist und typischerweise auf dem Boden einer arteriellen Hypertonie oder einer Aortenstenose entsteht. Dem gegenüber steht die unter Volumenbelastung entstehende exzentrische Hypertrophie, die beispielsweise durch insuffiziente Klappen hervorgerufen wird. Diese Hypertrophie ist durch eine Dilatation des Ventrikels mit Zunahme der Wanddicke gekennzeichnet [11, 12].

In der Frühphase sorgt die Hypertrophie für die Aufrechterhaltung oder Zunahme der kardialen Auswurfleistung und wird als kompensiert verstanden. In der Folge kann es jedoch zu einer Dekompensation kommen, die mit der Abnahme der Ejektionsfraktion einhergeht und in einer Herzinsuffizienz münden kann [13].

Die makroskopisch sichtbare Hypertrophie ist unter anderem auf eine Phänotypenveränderung der Kardiomyozyten zurückzuführen. Es kommt zu einem Wachstum dieser Myozyten, welches durch mechanischen Stress, neurohumorale Regulatoren und parakrine Faktoren induziert wird [14]. Dadurch nehmen die Myozyten in ihrer Länge und Breite zu [10, 15-17]. Diese Größenzunahme der Kardiomyozyten erfolgt durch eine Reorganisation ihrer Sarkomere.

Bei Druckbelastungen des Herzens, welche erhöhte systolische Wandbelastungen hervorrufen, wird diese Belastung durch eine Parallelanordnung der Sarkomere normalisiert. Bei einer Volumenbelastung, welche in eine diastolische Wandbelastung mündet, kommt es dagegen zur Normalisierung dieser Missverhältnisse durch eine Serienanordnung der Sarkomere [18]. Kurzfristig stellen diese Veränderungen eine Adaption an die Zunahme der Belastung dar, um eine adäquate Auswurfleistung des Herzens aufrecht zu erhalten. Längerfristig kann sich daraus allerdings ein maladaptives Remodeling ergeben.

Das Verhältnis von Länge zu Breite der Myozyten, welches im normalen menschlichen Myokard etwa 7:1 beträgt, wird im Rahmen eines Hypertrophieprozesses bis auf ein Verhältnis von 11:1 erhöht. Die dabei entstehenden langen und dünnen Myozyten sind in ihrer Fähigkeit zur Kontraktion und adäquaten Kraftgenerierung erheblich eingeschränkt [19]. Der Größen- und Volumenzunahme der Myozyten folgt ein Engpass in ihrer nutritiver Versorgung, welcher wiederum in einem Myozytenverlust bedingt durch Apoptose endet. Dieser apoptosebedingte Verlust an Kardiomyozyten führt zu einer weiteren Einschränkung der kardialen Myozytenfunktion [13]. Ob und wie weit dieser Myozytenverlust durch Erneuerung von Kardiomyozyten ausgeglichen werden kann, wird immer noch kontrovers diskutiert [20].

Hielt man früher die Adaptionsantwort der Kardiomyozyten für die Hauptdeterminante der Umbauprozesse im Rahmen der Hypertrophie, so wird heute immer deutlicher, dass das Kollagennetzwerk dabei entscheidend involviert ist. Dieses Netzwerk setzt sich aus Kollagen, Elastin und Glycosaminoglykanen zusammen, wobei Kollagen den vorherrschenden Bestandteil darstellt. Das menschliche Myokard enthält ungefähr 2%-3% Kollagen [21], wobei man fünf Typen von Kollagen unterscheidet. Im menschlichen Myokard dominiert Typ I Kollagen mit einem Anteil von 85%, gefolgt von Typ III Kollagen mit 10% [22]. Typ I Kollagen übertrifft dabei selbst Stahl in Bezug auf seine Reißfestigkeit. Diese enorme Reißfestigkeit ermöglicht es dem Kollagennetzwerk den strukturellen Aufbau des Myokards zu bewahren, indem es ein für die im Myokard befindlichen Zellen dreidimensionales Stützgewebe bildet. Dieses setzt sich aus Epimysium, Endomysium und Perimysium zusammen [23]. Bedingt durch diesen Aufbau des Kollagengerüsts wird die Ausrichtung der Myozyten während des Herzzyklus durch reversibles Ineinandergreifen der kontrahierenden Myozyten auf der einen Hand ermöglicht sowie ein zu großes Auseinanderweichen dieser limitiert [8].

Ebenfalls ermöglichen Kollagenfasern, die einzelne Myozyten untereinander verbinden, eine erleichterte Kraftübertragung der Myozyten auf den Ventrikel. Weiterhin kann die Energie der Myozytenkontraktion, welche in der der Systole entsteht, in den Kollagenfasern gespeichert werden und nachfolgend einen Beitrag an der Myokardrelaxation in der Diastole leisten. [23].

Kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Kollagenkonzentration oder der Volumenfraktion des Kollagens über normale Werte, so bezeichnet man dies als Fibrose [24]. Der hauptsächliche Stimulus für eine vermehrte Kollagensynthese ist nicht die hämodynamische Belastung des Herzens [25, 26]. Dies konnten Brilla et al. 1990 daran zeigen, dass eine überschießende Fibrosebildung sowohl im hypertensiven, hypertrophierten linken Ventrikel wie auch im normotensiven, nicht hypertrophierten rechten Ventrikel zu finden war [7]. Daraus wird ersichtlich, dass zirkulierende Substanzen einen entscheidenden Beitrag an der Fibrosierung des Myokards leisten. Hervorheben sollte man in diesem Kontext das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Angiotensin II stimuliert das Fibroblastenwachstum und die Kollagensynthese [27, 28]. Weber KT et al. 2000 sehen die Entwicklung einer Fibrose als ein Ungleichgewicht zwischen Stimulatoren und Inhibitoren. Dabei gelten als Stimulatoren Angiotensin II, Aldosteron, Deoxycorticosterone, Endothelin und Katecholamine und als Inhibitoren Stickstoffmonoxid (NO), Bradykinin, natriuretische Peptide und Glukokorticoide [29].

Bei der Fibrosierung des Myokards wird zwischen einer reparativen und reaktiven Fibrose unterschieden [30]. Die reparative Fibrose, welche als sinnvoller Adaptionsprozess angesehen wird [31], spielt eine Rolle bei der Narbenbildung nach Zellverlust, z.B. infolge eines Myokardinfarktes [32]. Die reaktive Fibrose ist primär perivaskulär in der Adventitia von intramyokardialen Koronararterien und Arteriolen lokalisiert und unabhängig vom Zelluntergang. Sie tritt im Rahmen von Entzündungsreaktionen auf und ist mit einer Ausdehnung in das benachbarte Interstitium verbunden [33, 34]. Durch die reaktive Fibrose kommt es zum Aufbau eines gestörten, ungeordneten Kollagengerüsts, in welches die einzelnen Zellen des Myokards unzureichend integriert sind. Dies hat eine verstärkte Steifigkeit des Myokards zur Folge, welche dessen Dehnbarkeit und somit erst die diastolische Funktion und bei weiterem Progress die systolische Kontraktion einschränkt [25, 26, 33].

Im Rahmen des Hypertrophieprozesses kommt es weiterhin zu strukturellen Veränderungen der myokardialen Gefäße [12]. Diese sind nicht in der Lage proportional zum Ausmaß der Myozytenvergrößerung zu wachsen [35-38]. Dieses disproportionale Wachstum ist bei der druckinduzierten Hypertrophie am ausgeprägtesten. Somit nimmt das Myokardgewebe, welches nur von einer Kapillare versorgt wird, zu. Der daraus folgende Anstieg der Diffusionsdistanz zwischen Kapillaren und Myozyten führt zu einem Versorgungsdefizit des Myokards [37].

Dieses Versorgungsdefizit wird weiterhin durch eine Wandverdickung der Gefäße, welche aufgrund einer Hypertrophie der glatten Gefäßmuskelzellen, einem Anstieg des Kollagengehalts im Sinne einer perivaskulären Fibrose und einer Mediaverdickung [39] entsteht, verschlechtert [40-42]. Aus dieser Wandverdickung kann ein erhöhtes Wand zu Lumen Verhältnis der Gefäße resultieren [43], welches in einer erhöhten Resistenz der kleinen myokardialen Gefäße mündet und somit die Koronarreserve vermindert [44]. Neben strukturellen Veränderungen spielen auch funktionelle Faktoren, wie eine Dysfunktion des Endothels, welches als wichtigster Regulator des mikrovaskulären Tonus gilt, eine Rolle bei der Beeinträchtigung der Koronarreserve [45, 46].

Die Beeinträchtigung der Koronarreserve durch eben genannte Mechanismen endet zusammen mit einer inadäquaten Proliferation der Gefäße, welche wiederum in einer Gefäßrarifizierung resultiert [47], in einer deutlich eingeschränkten Myokardperfusion.

Allerdings führt nicht zwangsläufig jede Myokardhypertrophie zu abnormalen Perfusionsverhältnisse. Ein Wachstum von Arteriolen kann durch sportliche Betätigung erreicht werden [48]. Ein Kapillarwachstum welches mit dem Muskelwachstum Schritt hält, konnte unter anderem bei langzeitinduzierter Hypertrophie nachgewiesen werden [49]. Anversa et. al konnten 1991 sogar ein Kapillarwachstum nachweisen, welches zu einer Verkleinerung der Diffusionsdistanz führt [50]. Des Weiteren ist es heutzutage durch pharmakologische Therapien möglich, die Angiogenese anzuregen. Unter anderem sind ACE-Hemmer und Statine dazu in der Lage [51-53].

All diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die Regulation der Angiogenese eine entscheidende Rolle bei der Myokardhypertrophie spielt.

2.2 Kardiale Angiogenese und EPC

Der Begriff Angiogenese beschreibt die Bildung und Ausweitung eines Gefäßnetzes durch differenzierte Endothelzellen. Dies kann durch Aussprossen von Kapillaren aus bestehenden Gefäßen oder durch Einstülpung von Gefäßen erfolgen [54, 55]. Der Ablauf der Angiogenese erfolgt in einer charakteristischen Kaskade, welche die Phasen der Migration, Proliferation und Differenzierung der vaskulären Endothelzellen, sowie die Bildung eines Lumens, umfasst [56].

Die Annahme, dass die kardiovaskuläre Angiogenese auf präformierte vaskuläre Strukturen angewiesen ist, konnte durch den Nachweis zirkulierender, aus dem Knochenmark stammender Zellen, welche einen signifikanten Anteil an der Funktion und Wachstum des Gefäßendothels beitragen [57], widerlegt werden. Dieser von bereits vorbestehenden Gefäßen unabhängige Prozess wird als Vaskulogenese beschrieben [54, 55]. Die Migration von Zellen aus dem Knochenmark im Rahmen der Vaskulogenese aufgrund eines pathologischen Prozesses (z.B. Ischämie und Hochdruckbelastung des Herzens) wird als Homing bezeichnet. Dieser Vorgang vollzieht sich in verschiedenen Stufen: die Mobilisation der Stammzellen aus ihren Knochenmarksnischen in das Blut [58, 59], den Transfer der Zellen zum Ort der Neovaskularisation, die Transdifferenzierung der Zellen auf ihrem Weg dorthin [60], sowie die abschließende Adhäsion und Transmigration durch das Endothel [61].

Eine Untergruppe dieser aus dem Knochenmark stammender Zellen sind die endothelialen Progenitorzellen (EPC). Sie stammen von den hämatopoetischen Stammzellen ab und exprimieren die Oberflächenmarker CD 34, CD 133 und VEGF, welcher auch als Kinase Insert Domain Receptor (KDR) oder Flk-1 bezeichnet wird [62]. Während ihrer Differenzierung verlieren sie den frühen hämatopoetischen Stammzellmarker CD 133 und beginnen die Expression endothelspezifischer Oberflächenmarker, welche CD 146, VE-cadherin, von Willebrand Faktor, endotheliale NO-Synthase, E-Selektin sowie Pecam-1 (CD31) beinhalten [63, 64].

In den Untersuchungen dieser Arbeit wurde Pecam-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule/ CD 31), ein 130 kDA großes integrales Membranprotein, welches endotheliale Zell-Zell Ädhäsionen vermittelt und entscheidend an der Formation neuer Gefäße beteiligt ist, verwendet [65].

Die EPC-Populationen weisen morphologische und funktionelle Differenzen auf. Auf der einen Seite gibt es die zur Gefäßformation befähigten „late-EPC“, die keine hämatopoetischen Marker exprimieren [66], eine hohe Proliferationskapazität besitzen und

„kopfsteinpflasterartige“ Zelle bilden. Auf der anderen Seite die „Early-EPC, welchen die Neoangiogenese eher mit parakrinen Effekten fördern, eine niedrige Proliferationskapazität haben und „spindelzellartige“ Zellen ausbilden.

Erstmals wurden die EPC von Asahara et. al 1997 aufgrund ihrer Fähigkeit die Neoangiogenese zu fördern bzw. die Ausbildung von Kollateralkreisläufen zu begünstigen, nachgewiesen [63]. Weiterhin konnten Crosby et. al 2000 und Murayama et. al 2002 nachweisen, dass EPC einen signifikanten Anteil an der Gefäßneubildung ausmachen [67, 68]. Die Neoangiogenese wird dabei, wie oben erwähnt, auch indirekt über parakrine Mechanismen der EPC, wie beispielsweise die Sekretion proangiogenetischer Zytokine, gefördert [69, 70].

Neben der Gefäßneubildung sind die EPC auch an der Wiederherstellung einer intakten Endothelschicht, der so genannten Reendothelialisierung, sowie einer verminderten Neointimabildung beteiligt [71, 72]. Diese Eigenschaft der EPC hat insbesondere im Zusammenhang mit Gefäßverschlüssen eine entscheidende Bedeutung. Walter et al. 2002 und Kong et al. 2004 konnten mittels verschiedener Methoden eine signifikant geminderte Restenoserate, welche auf die Effekte der EPC zurückzuführen waren, nach PTA (perkutane transluminale Angioplastie) und Stenting nachweisen [71, 73].

Überdies sind EPC an der Rekanalisierung eines formierten Thrombus beteiligt [74] und lagern sich an der Oberfläche eingebrachter Gefäßprothesen an, womit wiederum deren Verschlussrate gesenkt wird [75]. Dem entgegengesetzt wurden auch negative Auswirkungen der EPC entdeckt. Der EPC Transplantation in ApoE- Knockout- Mäusen folgte zwar eine gesteigerte Neovaskularisation in einem Modell der Hinterlaufischämie, allerdings auch eine vermehrte atherosklerotische Plaquebildung [76].

Das regenerative Potential der EPC konnte in verschiedenen tierexperimentellen Modellen gezeigt werden. In einem Hinterlaufischämiemodell wurde mittels EPC-Transplantation die Nekroserate gegenüber den Kontrolltieren signifikant gemindert [77, 78]. Dieses Ergebnis lässt sich dabei auf eine erhöhte Kapillardichte, sowie einen gesteigerten Blutfluss zurückführen.

In Herzinfarktmodellen zeigte sich nach der Transplantation von EPC eine erhöhte Kapillardichte und ein vermindertes ventrikuläres Remodeling, welches eine Reduktion der Myokardfibrose und eine bessere linksventrikuläre Herzfunktion im Vergleich zu den

Kontrolltieren aufzeigte [79, 80]. Taguchi et al. berichteten gleichfalls von der Effektivität einer EPC- Transfusion bei zerebralen Infarkten[81].

Insgesamt lässt sich feststellen, dass EPC als vaskulogenetische Komponente an der physiologischen und pathologischen Gefäßneubildung beteiligt sind. Dies beinhaltet Wundheilung [82] , ischämische Prozesse [77, 79, 80, 83], Endothelialisierung von Gefäßprothesen [75] oder geschädigten Gefäßarealen [84] und Tumorwachstum [82].

Auf der Basis dieser vielversprechenden präklinischen Studien gelang es unterschiedlichen klinischen Arbeitsgruppen einen positiven Effekt (unter anderem eine verbesserte linksventrikuläre Ejektionsfraktion) bei EPC- Transplantationen nach Myokardinfarkt [85-87] sowie chronisch ischämischer Kardiomyopathie [88] nachzuweisen.

Die klinische Bedeutung der EPC wird ebenfalls daraus ersichtlich, dass eine numerische Verminderung zirkulierender EPC ein Prädiktor für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität ist [57]. Die Anzahl der EPC ist zudem bei frühen Stadien der Herzinsuffizienz erhöht und fällt in höheren Stadien ab [89].

Die Mobilisierung der EPC erfolgt durch eine Vielzahl von endogenen und exogenen Faktoren. Zu diesen gehören beispielsweise Wachstumsfaktoren, Medikamente, sowie der persönliche Lebensstil [90].

Zu einer vermehrten EPC – Mobilisation führen unter anderem die durch Ischämie bedingt, und dabei hochregulierten, chemotaktischen Wachstumsfaktoren wie VEGF und SDF-1 [83, 91-93]. Weitere endogene Faktoren, die zu einer Hochregulation der EPC führen sind G-CSF [94], GM-CSF [95], Erythropoietin [96, 97], Angiopoietin [98, 99] und Östrogene [100]. Exogene Faktoren die zu einer Hochregulation der EPC führen sind körperliches Training [101, 102], die gemäßigte Einnahme niedriger Dosen von Rotwein [103], HMG-CoA-Reduktasehemmer [104, 105] sowie die exogene Zufuhr von VEGF [83].

Dagegen können kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Hypertonie [106], Hyperlipidämie [107], Rauchen [108], Diabetes [109] und Adipositas [110] ihre Anzahl und Funktion vermindern.

Zudem wurde nachgewiesen, dass es bei druckinduzierter Hypertrophie zu einer Hochregulation der EPC kommt [111]. Allerdings bleibt der genaue Mechanismus dieser druckinduzierten Hochregulation weiterhin unklar und benötigt weiterer Untersuchungen.

Zentraler Mediator der EPC als Antwort auf verschiedene Stimuli (z.B. VEGF) ist die endotheliale NO-Synthase. Die Osteoblasten, Fibroblasten und endothelialen Zellen des Knochenmarks exprimieren die eNOS und setzen somit NO frei, wodurch eine Mobilisation der EPC ermöglicht wird. Neben der essentiellen Rolle der eNOS für die Mobilisation der EPC aus dem Knochenmark ist sie darüber hinaus entscheidend an der Angiogenese ischämischer Gewebe beteiligt [112-114].

2.3 Die NO-Synthasen

Im Jahr 1980 entdeckten Furchgott et al. eine aus Endothelzellen freigesetzte Substanz, die zu einer Vasodilatation führt [115]. Anfänglich als „endothelium derived relaxing factor“ (ERDF) bezeichnet, konnte Ignarro et al. ERDF 1988 als NO (Stickstoffmonoxid) identifizieren [116]. Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro und Ferid Murad verlieh man für ihre bedeutsamen Forschungsarbeiten auf dem Gebiet des Stickstoffmonoxids 1998 den Nobelpreis für Medizin.

NO wird aus der Aminosäure L-Arginin unter Zuhilfenahme von Kofaktoren (FAD, FMN, NADPH, Tetrahydrobiopterin) und molekularem Sauerstoff zu NO und L-Citrullin umgesetzt [117]. Diese Reaktion wird durch die Stickstoffmonoxidsynthasen katalysiert, von denen drei Isoformen bekannt sind: die neuronale NOS (nNOS, NOS I), die induzierbare NOS (iNOS, NOS II) und die endotheliale NOS (eNOS, NOS III). Der Name der jeweiligen Isoform ist auf die Gewebe zurückzuführen, in denen sie zuerst entdeckt wurde (nNOS in Nervengewebe, iNOS in einer Zelllinie immunaktivierter Makrophagen und eNOS in vaskulärem Endothel). Inzwischen wurden die drei Isoformen aber auch in anderen Geweben nachgewiesen [118, 119].

Funktionell gesehen werden die NOS in konstitutive und induzierbare Enzyme unterteilt. Die iNOS wird calciumunabhängig über Entzündungsmediatoren (z.B. Interleukine), Bakterien und deren Endotoxine (z.B. Lipopolysaccharide) induziert [120, 121]. Nach einer Induktionszeit von 4-6 Stunden kann die iNOS über Stunden bis Tage NO produzieren. Damit übertrifft die iNOS sowohl in der Menge als auch der Dauer der Synthese von NO die beiden konstitutiven Enzyme [122, 123]. Diese sind die eNOS und nNOS, welche Ca^{2+} /Calmodulin-abhängig sind und nach Stimulation geringe Mengen an NO freisetzen. Beide Synthasen werden konstitutiv im Myokard exprimiert. Die nNOS ist hier unter anderem an der Transmission von Norepinephrin in den Nervenendigungen beteiligt [124].

Die eNOS ist die, abgesehen von pathologischen Zuständen in denen die iNOS Aktivität ansteigen kann, führende NOS Isoform, welche im Herz exprimiert wird. Ihre Expression vollzieht sich in endothelialen Zellen [125], endokardialen Zellen und Kardiomyozyten [126].

Abgesehen von der basalen NO-Produktion kann die eNOS durch Scherkräfte, Pulsationskräfte oder rezeptorgebundene Agonisten wie Acetylcholin, Bradykinin, Serotonin, Substanz P oder Thrombin zu einer erhöhten NO-Produktion angeregt werden [127, 128].

Das fertige Substrat der eNOS, Stickstoffmonoxid, ist als freies Radikal ein extrem reaktionsfreudiges Molekül mit einer nur sehr geringen Halbwertszeit [129]. Aufgrund seiner Eigenschaft der problemlosen Diffusion in alle Richtungen, inklusive der Überwindung biologischer Membranen, stellt NO ein gutes Signalmolekül dar, welches die meisten seiner physiologischen Effekte durch das zyklische Nukleotid cGMP vermittelt [130, 131]. NO aktiviert die lösliche Guanylylcyclase (sGC), woraus eine Konformationsänderung zu cGMP resultiert, die unter anderem über die Reduktion von intrazellulärem Ca^{2+} -Konzentration zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führt.

Über diesen vasodilatorischen Mechanismus der Gefäße nimmt NO eine zentrale Rolle in der Blutdruckregulation ein [45]. Von der Reduktion des Gefäßtonus abgesehen ist NO noch an zahlreichen anderen Vorgängen im Herzkreislauf-System beteiligt. Es hemmt die Thrombozytenaggregation und ihre Adhäsion an die Gefäßwand [132-135], die Leukozytenadhäsion ans Endothel sowie die Leukozytenmigration in die Gefäßwand [136-138]. Weiterhin erfolgt eine Proliferationshemmung glatter Gefäßmuskelzellen durch NO [139, 140].

Angesichts dieser gefäßprotektiven Mechanismen der eNOS im kardiovaskulären System, kann die Annahme gestellt werden, dass viele kardiovaskuläre Erkrankungen mit einer Störung der eNOS einhergehen. Tatsächlich konnte bei Patienten mit kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Hypertonie, Diabetes mellitus, Rauchen und Hyperlipidämie eine reduzierte NO-Produktion oder auch verringerte NO-Bioverfügbarkeit nachgewiesen werden [141].

Der Mechanismus, der dabei eine entscheidende Rolle spielt ist die Entkoppelung der eNOS. Dazu muss man wissen, dass die kardiovaskulären Risikofaktoren über eine Hochregulation der NADPH-Oxidase, welche eine der Hauptquellen für ROS repräsentiert, zu einer erhöhten Bildung von ROS führen. Die dadurch gebildeten Superoxidanionen (O_2^-) reagieren stark mit dem von der eNOS gebildeten NO zu Peroxynitrit (ONOO^-), welches wiederum fähig ist ein wichtiges Kosubstrat der eNOS, BH_4 , zu inaktivieren sowie durch eine Schädigung des Zink-Thiols der eNOS zu einer Entkoppelung dieser zu führen. Im entkoppelten Zustand produziert die eNOS selber Superoxide und vermindert im Gegenzug ihre NO-Produktion. Dadurch wandelt sich die eNOS von einem protektiv wirkenden Enzym zu einem Enzym um, welches den oxidativen Stress im kardiovaskulären Gewebe fördert [142].

Daraus wird ersichtlich, dass die eNOS nicht nur positive Effekte vermittelt. Wobei hier ergänzend hinzugefügt werden sollte, dass die Rolle des NO in Bezug auf protektive oder toxische Funktionen auch auf seine Konzentration ankommt. So wirkt NO als bifunktionaler Regulator der Apoptose. Physiologisch relevante Mengen von NO scheinen die Apoptose zu unterdrücken. Dagegen wirken höhere Dosen von NO, welche die protektiven Mechanismen überansprechen, proapoptotisch und zytotoxisch [143, 144]. Ähnliche entgegengesetzte Wirkungen des von der eNOS gebildeten NO sieht man z.B. auch in Bezug auf die β -adrenergen Wirkung, sowie die Kontraktilität des Myokard [126, 145].

Diese Vielseitigkeit der eNOS spiegelt sich auch in ihrem Einfluss als wichtiger Modulator des linksventrikulären Remodeling infolge verschiedener pathologischer Situationen, wie unter anderem auch, einer Nachlast induzierten Hypertrophie wieder. Welche Rolle die eNOS dabei genau spielt, wird immer noch kontrovers diskutiert und Bedarf zur Klärung weiterer Untersuchungen [146].

Unbestritten ist, dass die eNOS Effekte auf die Angiogenese ausübt. So stellt die durch NO induzierte Vasodilatation der Gefäße alleine schon einen initialen Schritt der Angiogenese dar. Der durch die Relaxation der Gefäße erhöhte Blutfluss kann so zu einer erhöhten Zellproliferation führen [147]. Aber auch NO an sich sorgt für eine erhöhte Endothelzellproliferation, -mobilisation sowie -migration [114], wobei es diese Effekte vermutlich als Antwort auf die Einwirkung einiger angiogener Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF, auf Endothelzellen vermittelt [148, 149].

Ein weiteres Zusammenspiel von angiogenen Wachstumsfaktoren und der eNOS ist die unter 2.2 dargestellte Mobilisation von EPC aus dem Knochenmark. Die Bedeutung der eNOS im Knochenmark ist dabei noch ungenügend erforscht.

In Tierversuchen konnte man ebenfalls weitere Hinweise für eine proangiogene Funktion der eNOS darstellen [113, 150].

Ob diese durch die eNOS vermittelten angiogenesefördernden Effekte einen Einfluss auf das kardiale Remodeling bei druckinduzierte Hypertrophie haben, ist bislang nicht untersucht worden.

2.4 Fragestellung der Arbeit

1. Welchen Einfluss hat die systemische Hemmung der eNOS durch L-NAME auf das linksventrikuläre Myokard im Rahmen der Hypertrophie nach Aortenligatur?
2. Stehen die myokardialen Veränderungen im Rahmen einer Hypertrophie mittels Aortenligatur im Zusammenhang mit dem Einfluss der eNOS auf
 - die Angiogenese
 - die Zelldifferenzierung bzw. Zellproliferation
 - EPC – Anzahl bzw. Rekrutierung aus dem Knochenmark
3. Welche Bedeutung hat die Knochenmark-eNOS für die kardiale Angiogenese und die Remodelingprozesse im Rahmen einer mittels Aortenligatur induzierten Hypertrophie?

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Zehn Wochen alte männliche Wildtypmäuse (C57/Bl6N) und endotheliale NO-Synthase Knockout (eNOS)^{-/-} Mäuse (B6129/P2-Nos3), erworben von den Charles River Laboratorien, Sulzfeld, Deutschland, wurden in den Experimenten genutzt. GFP-exprimierende Knochenmarkszellen wurden von sechs Wochen alten C57Bl/6-Tg(ACTbEGFP)1OBS Mäusen (exprimieren GFP ubiquitär) gewonnen (Jackson Laboratorien). Eine separate Gruppe von Wildtypmäusen wurde mit NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (Sigma) behandelt, welches dem Trinkwasser hinzugefügt wurde (Tagesdosis: 50 mg/kg Körpergewicht; Konzentration im Trinkwasser: 1,5 mg /ml). Die Studie wurde von dem Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz des Saarlandes, Abt. Lebensmittel und Veterinärmedizin genehmigt. Die Mäuse wurden unter Standardbedingungen gehalten.

3.2 Verwendete Substanzen und Instrumente

3.2.1 Antikörper

Die in der Studie verwendeten Antikörper sind in den beiden folgenden Tabellen aufgelistet.

Primärantikörper Tabelle 1

Nr.	Antikörper	hergestellt in(Tier)	Ig-Fraktion	Ig-Konzentration	Ig-Verdünnung	Herstellernummer	Katalognummer
1	monoclonal anti-alpha-sarcomeric actin	Maus, clon 5c5	IgM	1.00 mg/ml	1:100	Sigma-Aldrich, Germany	A2172
2	polyclonal anti-PECAM (CD31)	Ziege	IgG	0.2 mg/ml	1:15	Santa-Cruz Biotechnology, USA	sc-1506
3	polyclonal anti-Ki67	Kaninchen	IgG	12.0-30.0 g/l	1:150	Novocastra Laboratories LTD, UK	NCL-Ki67p
4	polyclonal anti-GFP	Kaninchen	IgG	whole serum	1:300	abcam, UK	ab290
5	anti-Sca-1-FITC	Ratte	IgG2a, k	0.5 mg/ml	1:20	BD Bioscience, Germany	553335
6	anti-VEGFR-2	Ratte	IgG2a, k	0.2 mg/ml	1:20	BD Bioscience, Germany	555308
7	Anti-CD16/CD32 Mouse BD Fc Block™	Ratte	IgG2b	0.5 mg/ml	2:1	BD Bioscience, Germany	553142
8	PE Rat IgG2a, k Isotype Control	Ratte	IgG2a, k	0.2 mg/ml	1:20	BD Bioscience, Germany	553930
9	PE Rat IgG2a, k Isotype Control	Ratte	IgG2a, k	0.5 mg/ml	1:20	BD Bioscience, Germany	553929

Sekundärantikörper Tabelle 2

Nr.	Antikörper	konjugiert mit	Hergestellt in (Tier)	Herstellerrfirma	Konzentration	Katalognummer
1	anti-mouse IgM	FITC	Ziege	Dianova, Germany	1.5 mg/ml	115-095-020
2	anti-rabbit IgG	FITC	Esel	Dianova, Germany	1.5 mg/ml	711-095-152
3	anti-goat IgG	Meerrettich-peroxidase	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Germany	7.6 mg/ml	A5420
4	anti-rabbit IgG	Biotin	Esel	Dianova, Germany	1.2 mg/ml	711-065-152

3.2.2 Chemikalien

Amplific Diluent; PerkinElmer Life Sciences, Inc., USA
 Ampuwa, destilliertes steriles Wasser; Fresenius Kabi, Germany
 Bovines Serum-Albumin (BSA);Sigma-Alddrich, Germany
 Citraconsäureanhydrid; Sigma-Aldrich, Germany
 DAPI; Calbiochem, Germany
 di-Natriumhydrogenphosphat; Merck, Germany
 DiLDL; Cell Systems, Germany
 Dimethylsulfoxid (DMSO); Sigma-Aldrich, Germany
 Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); Sigma-Aldrich, Germany
 EBM- Endothelial Cell Basal Medium; Lonza, USA
 EGM- Endothelial Cell Medium; Lonza, USA
 Enthellan; Merck, Germany
 Eosin; Merck, Germany
 Ethanol; Merck, Germany
 Ficoll ($\rho= 1.077 \text{ g/ml}$); Biochrom, Germany
 Fötale Bovines Serum; PAA Laboratories, Germany
 Goat Serum; Sigma-Aldrich, Germany
 Hematoxilin; Merck, Germany
 Hydrogenperoxid; Merck, Germany
 Immersionsöl; Merck, Germany
 Isotonische Natriumchloridlösung; B.Braun, Germany
 Kaliumchlorid; Merk, Germany
 Kaliumdihydrogenphosphat; Merk, Germany
 Kliniplast Medium for tissue embedding; Klinika Medical, Germany
 Kaninchenserum; Sigma-Aldrich, Germany
 L-NAME; Sigma-Aldrich, Germany
 Lysepuffer für FACS; BD Bioscience, Germany
 Natriumazid; Sigma-Aldrich, Germany
 Natriumchlorid; Merk, Germany
 Natriumhydroxid; Merk, Germany
 Normales Mausserum; Dianova, Germany
 Normales Rattenserum; Dianova, Germany

Paraformaldehyd; Merck, Germany
 Pikrinsäure; Sigma-Aldrich, Germany
 Salzsäure, rauchend 37%; Merck, Germany
 Sirius Red; Polysciences Inc., Germany
 Streptavidin-TRITC; Dianova, Germany
 Tri-Natriumcitrat-Dihydrat; Merck, Germany
 Trockenmilchpulver; TSI, Germany
 Triton X-100; Sigma-Aldrich, Germany
 Tyramide biotinyliert; PerkinElmer Life Sciences, Inc., USA
 Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan); Sigma-Aldrich, Germany
 Vectashield Mounting Medium for Fluorescence; Linaris, Germany
 Xylol; Merck, Germany

3.2.3 Medikamente

Ketamin; Pfizer, USA
 Xylazin; Bayer, Germany

3.2.4 Lösungen

10x PBS: (pH 7,4)	80,0 g NaCl 2,0 g KCl 2,0 g KH_2PO_4 6,149 g Na_2HPO_4 pro 1 Liter Ampuwa
1xPBS (pH 7,4)	100 ml 10xPBS 900 ml Ampuwa
20x SSC: (pH 7,0)	175,32 g NaCl 100,5 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat pro 1 Liter Ampuwa
4xSSC (pH 7,0)	200 ml 20xSSC 800 ml Ampuwa
0,05% Citraconsäureanhydrid- puffer: (pH 7,4)	50 μl Citraconsäureanhydrid pro 100 ml Ampuwa
4% Bovine Serum-Albumin Blocklösung:	4,0g Bovines Serum-Albumin (BSA) pro 100 ml 4xSSC
5% Milchblocklösung:	5,0 g Trockenmilchpulver pro 100 ml 4xSSC

4%PBS-gepuffertes Formalin:	4,0 g Paraformaldehyd pro 100 ml 1xPBS
1mM EDTA –Lösung: (pH7,4)	0,29 g EDTA für 1 Liter 1xPBS
Milz-EDTA-Puffer:	100 ml 10xPBS 10 ml Fötale Bovines Serum 40 µl 0,5M EDTA Mit Ampuwa auf einen Liter auffüllen
FACS-Puffer- BSA:	500 ml 1xPBS 25 ml gefiltertes Fötale Bovines Serum (gefiltert durch einen 70 µm großen Zellfilter) 2.5 g Bovines Serum-Albumin 3.5 ml NaN ₃
Sirius Rot	12 g Pikrinsäure in einem Liter Ampuwa lösen und gut mischen 0.5 g Sirius Rot in 500 ml Pikrinsäurelösung für 1-4 Stunden gut durchmischen Lösung für eine Woche bei Raumtemperatur reifen lassen

3.2.5 Instrumente

Analytical balance ALC-110.4; Acculab Sartorius group, Germany
 Cell counter; The Denominator Company, USA
 Cell incubator; Heraeus, Germany
 Cell strainer, 70 µm; BD Bioscience, USA
 Cell strainer, 100 µm; BD Bioscience, USA
 Centrifuge 5415C; Eppendorf, Germany
 Centrifuge; Heraeus, Germany
 Counting chamber Neubauer improved, depth 0.1 mm; Roth, Germany
 Cover Glass; WVR, Germany
 FACS Calibur; BD Bioscience, Germany
 FACS tubes; BD Bioscience, Germany
 Hellendahl staining troughs; Roth, Germany
 Hot plate; Labotech, Germany
 Ice machine MF22; Scotsman Ice Systems, USA
 Inverted microscope; Olympus, Japan
 Laminar-flow hood; Heraeus, Germany
 Magnetic stirrer Ikamag RCT; Ika-Labortechnik, Germany
 Microcentrifuge tubes 0.5; 1.5; 2.0 ml; Greiner bio-one, Germany
 Micropipettes; Eppendorf, Germany
 Microscope Nikon E600; Nikon, Japan
 Microtom; Leica, Germany
 Migration Assay Cell Culture Inserts for 24-well plates, 8.0 µm; BD Bioscience, USA

Millar Mikro-Tip 1.4 Fr Pressure Transducer Catheters; Millar instruments, USA
Needles for injections; BD Drogheda, Ireland
pH-meter 526; WTW, Germany
Pipettes tips; Greiner bio-one, Germany
Polysine microscope slides; Menzel-Glaser, Germany
PP-Test tubes, 15 ml; Greiner bio-one, Germany
PP-Test tubes, 50 ml; Greiner bio-one, Germany
Precision balance VIC-212; Acculab Sartorius group, Germany
Prolene 7-0; Ethicon, Germany
Refrigerator; Liebherr, Germany
Serological pipettes for cell cultures; Sarstedt, Germany
Slide boxes; Roth, Germany
Stericup Vacuum driven disposable filtration system; Millipore, Germany
Surgical instruments for aortic banding; Braun, Germany
Syringe; Dispomed, Germany
Thermostat; Heraeus, Germany
TC-plates 6-well culture; Greiner bio-one, Germany
Volume cycled rodent ventilator; Harvard Apparatus, USA
Vortex Mixer; neoLab, Germany
Water bath; GFL, Germany
24 Well cell culture plate; Greiner bio-one, Germany

3.2.6 Computer Software

Lucia G Software, Version 4.81; Nikon, Japan

3.3 Induktion von kardialer Hypertrophie mittels Aortenligatur

Die Tiere wurden mit Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht, i.v.) und Xylazin (10 mg/kg, i.v.) für die Aortenligatur (TAC; Transaortale Konstriktion) narkotisiert. Nach orotrachealer Intubation mit einer 20 Gauge großen Kanüle wurden die Mäuse über den gesamten Zeitraum der Operation an der Beatmungsmaschine (Harvard Apparatus, USA) beatmet. Das Atemzugvolumen betrug 0,2 ml bei einer Frequenz von 110 Atemzügen/min. Die Thoraxhöhle wurde durch einen schmalen Einschnitt im zweiten Interkostalraum an der linken oberen Sternumgrenze eröffnet. Die Ligatur der Aorta erfolgte durch einen 7-0 Nylonfaden an eine 27 Gauge Kanüle (Prolene; Ethicon, Germany), um eine Verengung der Aorta auf einen Diameter von 360 µm und eine transaortale Konstriktion von 65-70% zu erreichen. Bei den Kontrollgruppen wurde unter identischem operativem Vorgehen die Aorta dargestellt und präpariert, es erfolgte jedoch keine Ligatur (SHAM-OP).

Nach fünf Wochen wurden die Tiere, wie oben beschrieben, narkotisiert und linksventrikuläre Druckmessungen mit einem Millar-Tip-Katheter (1.4 French) (Millar instruments, USA) durchgeführt. Nach der linksventrikulären Druckmessung wurden die Herzen schnellstmöglich entnommen, in Formalin (4%, gepuffert in PBS) fixiert und 2 Tage später in Paraffin eingebettet. Blut- und Knochenmarkproben, sowie die Milz wurden für weitere Untersuchungen eingesetzt.

3.4 L-NAME - Behandlung

Eine separate Gruppe von Wildtyptieren wurde nach den in 3.3 beschriebenen operativen Eingriffen (TAC und SHAM-OP) für einen Zeitraum von 5 Wochen mit dem NOS-Hemmer NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (Sigma) behandelt, welches dem Trinkwasser hinzugefügt wurde (Tagesdosis: 50 mg/kg Körpergewicht; Konzentration im Trinkwasser: 1,5 mg/ml).

Anschließend erfolgte auch bei diesen Tieren die linksventrikuläre Druckmessung und Herzentnahme wie in 3.3 beschrieben.

3.5 Knochenmarktransplantation

GFP exprimierende sechs Wochen alte C57Bl/6-Tg(ACTbEGFP)10sb Mäuse wurden getötet und Knochenmark aus ihren Femurknochen entnommen. Die zehn Wochen alten, männliche Empfänger waren eine Gruppe von Wildtypmäusen (C57/Bl6N) und eine Gruppe von eNOS^{-/-} Mäusen (B6129/P2-Nos3). Die Empfängergruppen wurden myeloablativ bestrahlt (3

min mit insgesamt 9 Gy; Bestrahlungsgerät Typ OB 29/4966-18, STS Steuerungstechnik und Strahlenschutz GmbH; Braunschweig). Fünf Stunden nach Radiatio erfolgte die Transplantation des GFP exprimierenden Knochenmark durch intravasale Applikation von ca. $1-2 \times 10^7$ Knochenmarkszellen in die Schwanzvene.

Weiterhin erfolgte die Transplantation von Wildtypknochenmark (C57/Bl6N) in eNOS^{-/-} Mäuse (B6129/P2-Nos3) sowie die Transplantation von eNOS^{-/-} Knochenmark (B6129/P2-Nos3) in Wildtypmäuse (C57/Bl6N). Die Spendermäuse waren am Tag ihrer Knochenmarkentnahme sechs Wochen alt und die Empfängertiere am Tag der Bestrahlung und Transplantation der Knochenmarkszellen 10 Wochen alt. Der Transplantationsablauf entsprach dem oben geschildertem.

Vier Wochen nach der Knochenmarktransplantation wurde die Aortenligatur bzw. die SHAM-Operation wie unter 3.3 beschrieben ausgeführt.

3.6 Gruppenaufbau

Zur Untersuchung der Rolle der endothelialen NO-Synthase bei der druckinduzierten kardialen Hypertrophie wurden mehrere Experimente an verschiedenen Mausgruppen durchgeführt:

Bei den nicht transplantierten Tieren wurden die unterschiedlichen Auswirkungen der TAC induzierten Hypertrophie zwischen Wildtyp Mäusen (C57/Bl6N) und endothelialen NO-Synthase Knockout (eNOS^{-/-}) Mäusen untersucht (siehe Tabelle 3, Seite 31).

Ergänzend wurde hierbei noch ein Vergleich zwischen L-NAME behandelten Mäusen nach SHAM-OP bzw. nach Aortenligatur mit Wildtyp-SHAM Mäusen durchgeführt (siehe Tabelle 3, Seite 31).

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss des Knochenmarks bei der Herzhypertrophie genauer untersucht, indem man Knochenmarkstransplantationen zwischen Wildtyp- und eNOS^{-/-} -Mäusen wie unter 3.5 beschrieben durchführte. Um die potenzielle Rolle der aus dem Knochenmark stammenden Progenitorzellen bezüglich der kardialen Neoangiogenese bei Wildtypmäusen im Vergleich zu eNOS^{-/-} -Mäusen zu ermitteln, wurde GFP-exprimierendes Knochenmark transplantiert (siehe Tabelle 4, Seite 31). Die Fallzahlen „n“ der verschiedenen Gruppen sind in den nachfolgenden Tabellen dargestellt.

Zum besseren Verständnis der folgenden Abbildungen hier einige Erläuterungen:

HOST: :	Art der Empfängermäuse, welche Knochenmark erhalten haben
BM:	Art der Mäuse, deren Knochenmark gespritzt wurde
Surgery:	Operation, welche jeweilige Gruppe erhalten hat (SHAM bzw. TAC)

Tabelle 3 Nichttransplantierte Tiere

Gruppen	SHAM	TAC
Wildtypmäuse	30	23
eNOS ^{-/-} -Mäuse	13	12
L-Name - Mäuse	7	10

Tabelle 4 Transplantierte Tiere

Gruppen		SHAM	TAC
Host	BM		
WT	eNOS ^{-/-}	10	17
eNOS ^{-/-}	WT	10	15
WT	GFP	10	13
eNOS ^{-/-}	GFP	4	7

Im weiteren Verlauf sollen die Wildtypmäuse, welchen eNOS^{-/-}-Knochenmark transplantiert wurde als **BM-** bezeichnet werden. Die eNOS^{-/-}-Mäuse, welchen eNOS^{+/+}-Knochenmark (Wildtypknochenmark) appliziert wurde als **BM+** bezeichnet werden.

3.7 Histologie

3.7.1 Entparaffinieren der Paraffinschnitte

Um die Morphologie zu erhalten, wurde das in Formalin fixierte Gewebe in Paraffinblöcke eingebettet. Für die histologische Auswertung wurden aus den Paraffinblöcke mit einem Mikrotom (Leica, Germany) 3µm dicke Schnitte angefertigt und diese auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgezogen und durch Wärmebehandlung (1-2 Tage bei 55°C im Trockenschrank) auf diesen Objektträgern fixiert. Bevor die Myokardschnitte nun angefärbt werden konnten, mussten diese zunächst entparaffiniert werden. Ein möglichst vollständiges Entparaffinieren ist wichtig, um unspezifische Bindungen beim Färben zu minimieren. Um dies zu erreichen, wurden die auf dem Objektträger fixierten Proben auf einer Heizplatte (Labotech, Germany) für 30 min bei 70°C erhitzt und dann für 3 x 10 min nacheinander in Xylol-Bäder getaucht. Anschließend wurden die Objektträger in einer absteigenden Ethanolreihe (100%; 85%; 70%) und destilliertem Wasser für jeweils 5 min rehydriert.

3.7.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)

Für die Bestimmung des kurzen Achsendiameters der Kardiomyozyten wurden die Schnitte nach Ehrlich's Hämatoxylin und Eosin Methode gefärbt. Für die H&E-Färbung wurden die Proben, wie nachfolgend beschrieben, behandelt.

Die Gewebeschnitte wurden für 20 min bei Raumtemperatur mit der Hämatoxylinlösung bedeckt und anschließend in Aqua dest. für 5 min gewaschen. Danach wurden sie für 7 min bei Raumtemperatur mit Eosinlösung bedeckt und nachfolgend wieder für 5 min in Aqua dest. gewaschen. Nach diesen Färbeschritten wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%;85%;100%) für jeweils 5 Minuten in jeder Lösung dehydriert, für 2 x 3 min in Xylol gewaschen und abschließend in Enthellan eingebettet und mit einem Deckglas (WVR, Germany) versehen.

3.7.3 Picro-Sirius-Rot-Färbung

Das Ausmaß der kardialen Fibrose wurde mit Hilfe der Picro-Sirius-Rot-Färbung ermittelt. Für diese Färbung wurden die Proben, wie folgt, behandelt.

Die Gewebeschnitte wurden für 1 h bei RT mit der Sirius-Rot-Lösung (siehe 3.2.4) bedeckt und anschließend für 5 min in Aqua dest. gewaschen. Danach wurden die Proben wie unter 3.7.2 beschrieben durch eine aufsteigende Ethanolreihe (70%;85%;100%) dehydriert, dann mit Xylol behandelt und in Enthellan eingebettet und mit einem Deckglas versehen. Kollagenfasern wurden somit rot gefärbt und andere Gewebsstrukturen erschienen in einer gelben Farbe.

3.7.4 Immunfärbung

3.7.4.1 Grundprinzip

Die Immunfärbungen wurden benutzt, um bestimmte Zelltypen im Myokard wie Kardiomyozyten, glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Progenitorzellen und proliferierende Zellen zu identifizieren. Dazu wurden verschiedene Primärantikörper (siehe Tabelle 1, Seite 24) verwendet, welche spezifische Antigene dieser Zelltypen binden. Diese Primärantikörper wurden wiederum von Sekundärantikörpern detektiert, die speziell gegen die Antigene der Tiere, in welchem der Primärantikörper hergestellt worden war, gerichtet waren. Die Sekundärantikörper wurden wiederum abhängig von der jeweiligen Immunfärbung mit

verschiedenen Markern (Fluorochrome, Biotin, Meeretichperoxidase) gekoppelt (siehe Tabelle 2, Seite 25).

3.7.4.2 Vorbehandlung (Antigendemaskierung)

Die unter 3.7.1 beschriebenen entparaffinierten Gewebeschnitte wurden zunächst hitzebehandelt, damit das Gewebe aufgelockert wurde und die Epitope der Antigene freigelegt wurden (sogenannte Antigendemaskierung). Dazu wurden die Schnitte in einer hitzestabilen Plastikkuvette (Roth, Germany) in 0,05% Citraconiumanhydridpuffer bei pH7, 4 für eine Stunde in einem 98°C heißem Wasserbecken erhitzt. Anschließend verblieben die Objektträger zum Abkühlen für 30 min bei RT stehen.

3.7.4.3 Färbemethoden

Aufgrund der individuellen Immunreaktivität der Zielantigene kamen unterschiedliche Immunfärbungsmethoden zum Einsatz (indirekte 2-Schritt-Methode für Antigene mit starker Immunreaktivität, Streptavidin-Biotin-Methode und Tyramid-Amplifikation-Methode für Antigene mit schwacher Immunreaktivität). Bei allen Immunfärbungen wurde der Primärantikörper in einer feuchten Kammer im Kühlschrank bei +4°C über Nacht (für mindestens 12 Stunden) und anschließend bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Alle Inkubationen mit Antikörpern und Reagenzien bei 37°C wurden in feuchten Kammern im Wasserbad durchgeführt. Zwischen jedem Inkubationsschritt und nach der letzten Inkubation wurden die Objektträger in 1 x PBS oder 4 x SSC mit 0,1% Tween für jeweils dreimal 5 Minuten gewaschen. 4 x SSC vermindert Hintergrundfärbung und nichtspezifische Antikörperbindungen in problematischen Fällen der Immunfärbung besser als andere Waschpuffer. So konnte im Gegensatz zu 1 x PBS bei schwacher Antigenreaktivität ein gutes Fluoreszenzsignal erreicht werden.

Indirekte Zwei-Schritt-Methode

Diese Methode wurde genutzt um alpha- sarkomerisches Aktin und GFP zu detektieren. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden wurden alle Proben vor der Applikation des Primärantikörpers für 10 min bei RT mit 4% BSA gelöst in 4 x SSC inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper mit 4% BSA gelöst in 4 x SSC verdünnt (siehe Tabelle 1, Seite 24) und danach wie unter 3.7.4.3 beschrieben angewandt. Am nächsten Tag wurden die Proben mit einem Fluorchrom konjugierten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 2, Seite 25) im Verhältnis 1:30 in 4 x SSC verdünnt und bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

Streptavidin-Biotin-Methode

Diese Methode wurde angewandt um die Ki-67 Immunfärbung zu realisieren. Der Primärantikörper (siehe Tabelle 1, Seite 24) wurde mit 1 x PBS+0,1% Tween verdünnt. Eine Blocklösung wurde aufgrund der geringen Immunoreaktivität des Ki-67 Antigens nicht verwendet. Die Inkubation des Primärantikörpers wurde, wie oben beschrieben, ausgeführt. Am nächsten Tag wurden die Proben mit einem Biotin konjugiertem Sekundärantikörper (siehe Tabelle 2, Seite 25) im Verhältnis 1:30 mit 1 x PBS + 0,1% Tween für 2 Stunden bei 37°C und anschließend mit TRITC konjugiertem Streptavidin im Verhältnis 1:50 für 30 min bei 37°C inkubiert.

Tyramid Amplifikationsmethode

CD-31 wurde aufgrund seiner schwachen Immunreaktivität mit dieser Methode detektiert. Der Primärantikörper (siehe Tabelle 1, Seite 24) wurde mit 4 x SSC + 0,1% Tween verdünnt und anschließend wie oben beschrieben angewandt. Am nächsten Tag wurden die Proben zuerst mit einer Blocklösung, bestehend aus 5% Milch in 4 x SSC 30 min bei RT gelöst, und danach mit einem Peroxidase konjugiertem Sekundärantikörper (siehe Tabelle 2, Seite 25), welcher in der Blocklösung verdünnt wurde (1:500 für CD-31), für 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben in 4 x SSC + 0,1% Tween gewaschen und nachfolgend 10 min bei RT in der mit Amplification Diluent im Verhältnis 1:30 verdünnten Tyramidlösung inkubiert. Anschließend folgte wieder ein Waschschriff mit 4 x SSC + 0,1% Tween, welchem sich die Inkubation mit TRITC konjugiertem Streptavidin wie oben in der Streptavidin-Biotin-Methode beschrieben, anschloss.

Zur Färbung der Kerne wurden die Proben für 20 min bei RT in einer Feuchten Kammer mit DAPI inkubiert. Danach wurden die Proben für 5 min in Aqua dest. eingetaucht und schließlich in Vectashield eingebettet und mit Deckglas (WVR, Germany) geschützt.

3.7.4.4 Kontrolle der Immunfärbung

Um falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse auszuschließen, wurde eine Kontrolle der Immunfärbung durchgeführt. Die Gewebeproben zur Kontrolle wurden auf die gleiche Art fixiert, behandelt und eingebettet wie es bei den Proben der Versuchstiere der Fall war.

Als Positiv-Kontrolle für den Proliferationsmarker Ki-67 wurden Sarkomgewebsschnitte genutzt. Immunfärbungen für CD31 wurden mithilfe von angefärbten Koronararterien kontrolliert. Als Negativkontrollgewebe für alpha-sarkomerisches Aktin wurden tubuläre epitheliale Zellen von Nephronen in Nierenschnitten verwendet. Als Negativkontrolle für die GFP-Immunfärbung wurden linke Ventrikel von Wildtypmäusen, welche keine GFP-Knochenmarktransplantation erhalten hatten, genutzt.

Um Kreuzreaktionen der Sekundärantikörper mit den Gewebsantigenen auszuschließen, wurde normales (nicht immunogenes) Serum von derselben Spezies aus dem der Primärantikörper stammt zu einer Proteinkonzentration verdünnt, die der Verdünnung des herkömmlichen Primärantikörpers entspricht, und als negatives Kontrollreagenz gebraucht.

3.7.4.5 Schnittuntersuchung und Gewebemorphologie

Histologische Auswertungen und morphologische Analysen wurden an linksventrikulären Schnitten mit Hilfe eines Nikon E600 Mikroskop (Nikon, Japan) und der Lucia G Software (Version 4.81, Nikon, Japan) durchgeführt. Ein Okular mit eingebautem Rastermuster wurde verwendet, um die Zahl der CD31 positiven Zellen, der Kardiomyozyten und der Nicht-Kardiomyozyten zu zählen.

Für die Bestimmung der kardiomyozytären Hypertrophie wurden von mindestens 100 zufällig gewählten Kardiomyozyten der kurze Achsendurchmesser anhand von Photographien der H&E gefärbten Schnitte bei 400x Vergrößerung gemessen. In jeder Gruppe wurden mindestens sieben Herzen auf diesen Parameter untersucht.

Um das Ausmaß der Fibrose zu evaluieren, wurden 10 Felder im mittleren Drittel von jedem linksventrikulärem Schnitt, gefärbt mit Sirius Rot, bei einer 100x Vergrößerung fotografiert, wobei der interstitielle fibrilläre Kollagengehalt als Kollagengehalt in % des myokardialen Gewebes gemessen wurde. In jeder Gruppe wurden mindestens sieben Herzen untersucht.

Schnitte mit einer kombinierten Immunfärbung für CD31 und α -sarkomerischem Aktin wurden verwendet, um die Anzahl der endothelialen (CD31 positiven) Zellen, Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten pro mm^2 zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurde das Okular mit dem Rastermuster an 20 zufällig ausgewählten Stellen im Präparat bei 1000x

Vergrößerung eingesetzt und Zellkerne, welche positiv für endotheliale oder kardiomyozytäre Marker waren sowie die Gesamtzahl an Zellkernen, die sich innerhalb der Grenzen des Rastermusters befanden, gezählt. Die Zelldichte wurde aus folgender Formel heraus kalkuliert: $\text{Zelldichte (mm}^2\text{)} = \text{Zellanzahl (in 20 Feldern)} / ((0.00153664) * 20)$, wobei 0.00153664 die Größe des Rastermusters widerspiegelt und die Zahl 20 die Anzahl der Felder in denen gezählt wurde. Das Verhältnis der CD31 positiven Zellen zu den Kardiomyozyten wurde aus den oben gewonnen Werten kalkuliert.

Um die Anzahl der Ki-67 positiven Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten, der GFP positiven Zellen, sowie der Zellen die sowohl für GFP als auch für CD31 positiv sind, zu ermitteln, wurde deren Anzahl in jeweils kompletten Schnitten, welche für die entsprechende Marker angefärbt waren, gezählt. Danach wurden anhand der ermittelten Werten und der ausgemessenen Präparatfläche die Zelldichte der jeweiligen Zelltypen und ihr prozentualer Anteil kalkuliert. Die Präparatfläche wurde mit Hilfe von H&E- Schnitten bei 20X Vergrößerung ermittelt.

3.8 Fluorescence-Activated-Cell-Sorter Analysis

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

3.8.1 FACS- Analyse Blut

Wir entnahmen unseren Versuchstieren 50-100 µl EDTA Vollblut aus der Vena cava inferior. Zur Zelllyse wurde das Mausblut mit 3 ml Pharmlyse (1:10 verdünnt mit destilliertem Wasser) versetzt, bei Raumtemperatur inkubiert, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellsuspension wurde mit FACS Puffer BSA auf 100 µl aufgefüllt und zur Blockung unspezifischer Bindungen mit 10 µl Fc-Block (Becton Dickinson) 10 min bei 4°C behandelt. Die funktionsfähige Lymphozytenpopulation wurde analysiert durch die Antikörper Sca-1-FITC (E13-161.7, Pharmingen) und VEGFR-2 PE (Flk-1) (Avas12α1, Pharmingen). Isotypen-Antikörper (FITC rat IgG2a, PE rat IgG2a) dienten als Kontrolle in jedem

Experiment (Becton Dickinson). Alle Antikörper wurden in 10µl Dosen den Zellsuspensionen hinzugefügt und 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend je zweimal mit 2ml FACS-Puffer gewaschen und 10 min bei 1750 rpm zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 200 µl PBS resuspendiert und zur Messung vorbereitet.

3.8.2 FACS- Analyse Knochenmark

Knochenmark wurde aus Maus-Femur und -Tibia präpariert und mit FACS Puffer BSA als Lösungsmittel durch einen Filter (100 µm Nylon-Mesh in conical tube) separiert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (1000 rpm, 4°C, 10 min) und mit 1ml verdünnter Pharmlyse (1:10 verdünnt mit destilliertem Wasser) resuspendiert. Nach 5 min Inkubationszeit bei 4°C wurde mit 2ml FACS Puffer BSA geblockt, zentrifugiert und das Zellpellet mit 1ml FACS Puffer BSA resuspendiert. Nach einer Zellzählung wurden 1×10^6 Zellen in 50 µl Suspension weiterverarbeitet. Zur Blockung unspezifischer Bindungen wurden die Zellen mit 10 µl Fc-Block (Becton Dickinson) 10 min bei 4°C behandelt. Die Lymphozytenpopulation wurde analysiert durch die Antikörper Sca-1-FITC (E13-161.7, Pharmingen) und VEGFR-2 PE (Flk-1) (Avas12α1, Pharmingen). Isotypen-Antikörper (FITC rat IgG2a, PE rat IgG2a) dienten als Kontrolle in jedem Experiment (Becton Dickinson). Alle Antikörper wurden in 10µl Dosen den Zellsuspensionen hinzugefügt und 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend je zweimal mit 2ml FACS-Puffer gewaschen und 10 min bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 200 µl PBS resuspendiert und zur Messung vorbereitet.

3.9 Migrationsassay

Die Isolation endothelialer Progenitorzellen aus der Milz beruht auf einem mehrstufigen Selektionsprozess. In einem ersten Schritt werden mittels einer Ficoll-Trennung die mononukleären Zellen (MNC) der Milz isoliert. Die Population der endothelialen Progenitorzellen ist durch die Fähigkeit DiLDL (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninelabeled -acetylated LDL) zu phagozytieren gekennzeichnet.

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

Die migratorische Kapazität der EPC wurde in einer modifizierten Boyden Kammer bestimmt [151]. Am ersten Tag wurden 4×10^6 MNC ausgesät auf beschichteten 6-well Kulturplatten und für 4 Tage kultiviert. Danach wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mittels Trypsin abgelöst und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300 μ l EBM resuspendiert und gezählt. 1×10^5 Zellen wurden in 500 μ l EBM plus Zusatzstoffe in die obere Kammer einer modifizierten Boyden Kammer pipettiert (HTS Fluoroblock, BD Biosciences, 8 μ m pore size) und die Kammer wurde in eine 24-well Platte mit EBM plus Zusatzstoffe und 100 ng/ml SDF-1 (R&D Systems) gestellt. Nach 24 Stunden wurde der Filter vorsichtig entfernt, gewaschen, inkubiert, mit DiLDL (DiLDL, 2.4 μ g/ml, CellSystems) gefärbt und fixiert. Die SDF-1 stimulierte migratorische Kapazität wurde quantifiziert durch Zählung der migrierten EPC an der Filterunterseite mittels eines Fluoreszenzmikroskops (Nikon E600 Mikroskop) (40 X Vergrößerung).

3.10 Auswertung

3.10.1 Statistik

Von den Daten wurden der Mittelwert und der SEM (Standard error of the mean; Streuungsmaß für den Mittelwert) ermittelt. Die Auswertung erfolgte mit dem Computer-Programm Statistica (StatSoft, Europa). Sofern anwendbar wurden ein Two-way-ANOVA mit einem Fisher-LSD post-hoc Test bzw. bei einer nicht parametrischer Verteilung ein Kruskal -Wallis Test durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0.05$ angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Effekt der Aortenligatur (TAC) bei nichttransplantierten Mäusen

4.1.1 Hämodynamische Daten und myokardiale Hypertrophie

Die TAC erhöhte den linksventrikulären Druck innerhalb aller Gruppen (**Abb. 1**). Es zeigte sich ein Druckanstieg von $78 \pm 4,5$ mm Hg in der SHAM- Gruppe (eNOS^{-/-}- SHAM $104 \pm 8,37$ mm Hg) auf $118 \pm 5,7$ mm Hg in der TAC- Gruppe (eNOS^{-/-}-TAC $146 \pm 5,5$ mm Hg). Desweiteren entwickelten die eNOS^{-/-}- Mäuse einen signifikant höheren linksventrikulären Druck nach SHAM-OP wie auch nach TAC im Vergleich zu den Wildtypmäusen(**Abb. 1A**).

Bei den mit L-NAME behandelten Tieren zeigte sich ein nicht signifikanter linksventrikulärer Druckanstieg von $83 \pm 11,16$ mm Hg in der SHAM- Gruppe auf $103 \pm 18,28$ mm Hg bei der TAC-Gruppe (**Abb. 1B**).

Als Parameter für die kardiale Hypertrophie wurde das Verhältnis von Herzgewicht zu Tibiallänge (mg/mm) gewählt. Es zeigte sich eine Erhöhung von $7,6 \pm 0,4$ mg/mm in der SHAM-Gruppe (eNOS^{-/-}- SHAM $8,5 \pm 0,4$ mg/mm) auf $13,4 \pm 1$ mg/mm in der TAC-Gruppe (eNOS^{-/-}-TAC 11 ± 1 mg/mm). Trotz der erhöhten linksventrikulären Drücke bei eNOS^{-/-}- Mäusen zeigte dies keine Auswirkungen auf das Verhältnis von Herzgewicht zu Tibiallänge im Vergleich zu den Wildtypmäusen (**Abb. 1C**).

In der mit L-NAME behandelten Gruppe erhöhte sich das Verhältnis von Herzgewicht zu Tibiallänge ebenfalls von $8,7 \pm 0,4$ mg/mm in der SHAM-Gruppe auf $11,3 \pm 0,7$ mg/mm in der TAC-Gruppe (**Abb. 1D**).

Abbildung 1

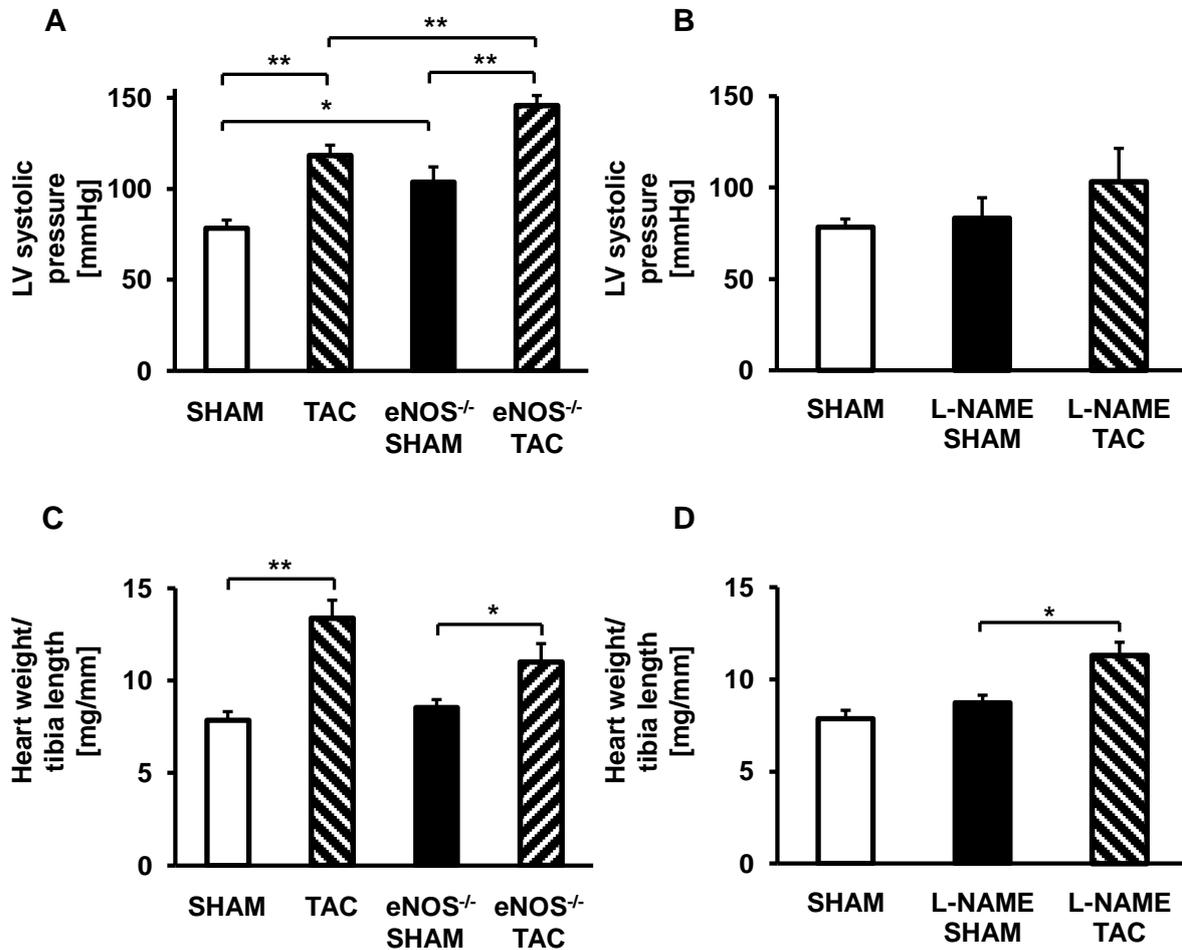


Abbildung 1: Effekt der Aortenligatur (TAC) auf den linksventrikulären Druck und das Verhältnis von Herzgewicht zu Tibialänge.

Die Aortenligatur erhöhte den (A) linksventrikulären Druck und das (C) Verhältnis von Herzgewicht zu Tibialänge bei Wildtyp- und eNOS^{-/-}-Mäusen. (A) eNOS^{-/-}-Mäuse entwickelten höhere linksventrikuläre Drücke als Wildtypmäuse.

(B, D) Auswirkung der Behandlung mit L-NAME (50mg/kgKG/Tag für einen Zeitraum von 35 Tagen) auf (B) den linksventrikulären Druck und (D) das Verhältnis von Herzgewicht zu Tibialänge nach TAC. *p<0,05, **p<0.01, n=6-24

4.1.2 Kardiomyozytäre linksventrikulären Hypertrophie

Um das Ausmaß der kardialen Hypertrophie auf kardiomyozytärer Ebene zu ermitteln wurde der kurze Achsendiameter der Kardiomyozyten per Lichtmikroskopie gemessen.

Die TAC führte auch hier zu einem Anstieg des kurzen kardiomyozytären Achsendurchmessers in allen Gruppen (TAC - Gruppe $11,3 \pm 0,3 \mu\text{m}$; eNOS^{-/-}-TAC $9,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$; LNAME-TAC $8,9 \pm 0,2 \mu\text{m}$) im Vergleich zu den SHAM- operierten Gruppen (SHAM-Gruppe $8,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$; eNOS^{-/-}- SHAM $7,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$; L-NAME – SHAM $7,1 \pm 0,11 \mu\text{m}$). Ebenfalls war zu sehen, dass trotz des erhöhten linksventrikulären Drucks in eNOS^{-/-}- Tieren im Vergleich zu Wildtyptieren, die eNOS^{-/-}- Tieren nach TAC einen signifikant geringeren kardiomyozytären Durchmesser besaßen als die Wildtyptiere. Bei den SHAM-operierten Tieren zeigte sich diesbezüglich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen (**Abb. 2**).

Abbildung 2

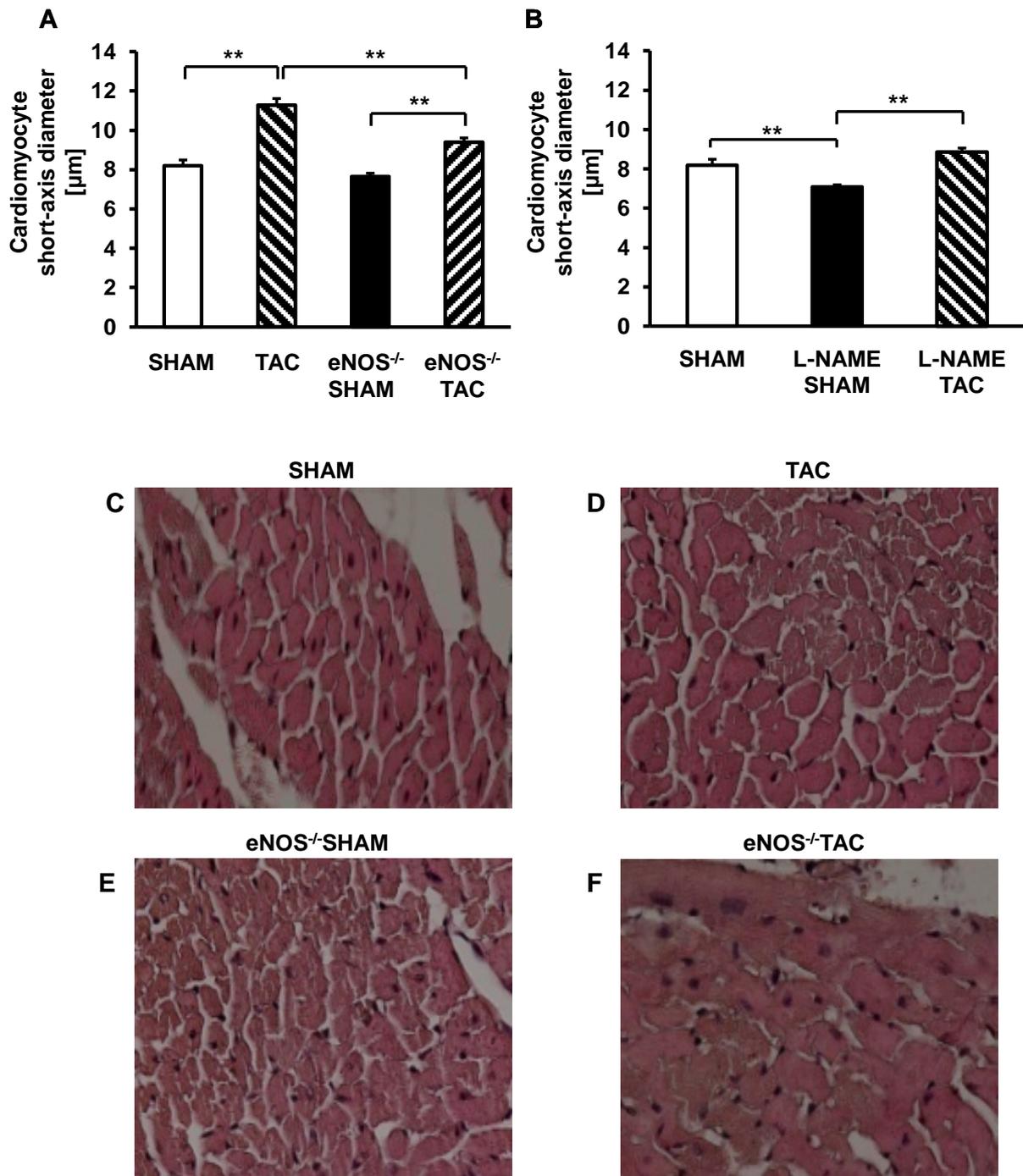


Abbildung 2: Effekt der Aortenligatur (TAC) auf die Myozytengröße

Die Aortenligatur erhöhte den Myozytenquerschnitt bei Wildtyp- und eNOS^{-/-}-Mäusen.

(A) eNOS^{-/-}-Mäuse entwickelten nach TAC einen kleineren Myozytenquerschnitt als Wildtypmäuse.

(B) Die TAC erhöhte bei Behandlung mit L-NAME (50mg/kgKG/Tag für einen Zeitraum von 35 Tagen) den Myozytenquerschnitt.

Repräsentative Hämatoxylin-Eosin gefärbte Paraffinschnitte des linken Ventrikels von jeweils (C) Wildtyp SHAM bzw.(E) eNOS^{-/-} SHAM Maus und (D) Wildtyp- bzw.(F) eNOS^{-/-} Maus, bei denen eine transaortale Konstriktion durchgeführt wurde. *p<0,05,**p<0,01, n=7-13.

4.1.3 Kardiale Fibrose

Als weiteren Parameter zur genaueren Erfassung der Auswirkungen im druckbelasteten Herzen wurde die durch Nachlast induzierte Fibrose im linken Ventrikel gemessen. Das Ausmaß der linksventrikulären Fibrose wurde dabei als Anteil des Kollagengehalts bezogen auf den gesamten Myokardschnitt in % bestimmt.

Die Aortenligatur führte in allen Gruppen (TAC-Gruppe $2,0 \pm 0,3\%$; eNOS^{-/-}-TAC $3,4 \pm 0,4\%$; L-NAME-TAC $7,0 \pm 0,7\%$) im Vergleich zu den SHAM- operierten Gruppen (SHAM-Gruppe $0,7 \pm 0,2\%$; eNOS^{-/-}- SHAM $2,1 \pm 0,2$; L-NAME-SHAM $1,9 \pm 0,3\%$) zu einer vermehrten Fibrosierung des linksventrikulären Myokards (**Abb. 3**).

Hierbei zeigte sich, dass eNOS^{-/-} - Mäuse sowohl nach SHAM-OP wie auch nach TAC signifikant mehr linksventrikuläre Fibrose entwickeln als Wildtypiere (**Abb. 3A**).

Zur Untersuchung, ob NO allgemein eine Fibrose mindernde Wirkung hat, wurde der unselektiven NOS-Hemmer L-NAME genutzt. Bei den mit L-NAME behandelten Tieren zeigte sich eine deutliche Fibrosierung sowohl nach SHAM-OP wie auch noch eindrücklicher nach TAC (**Abb. 3B**).

Abbildung 3

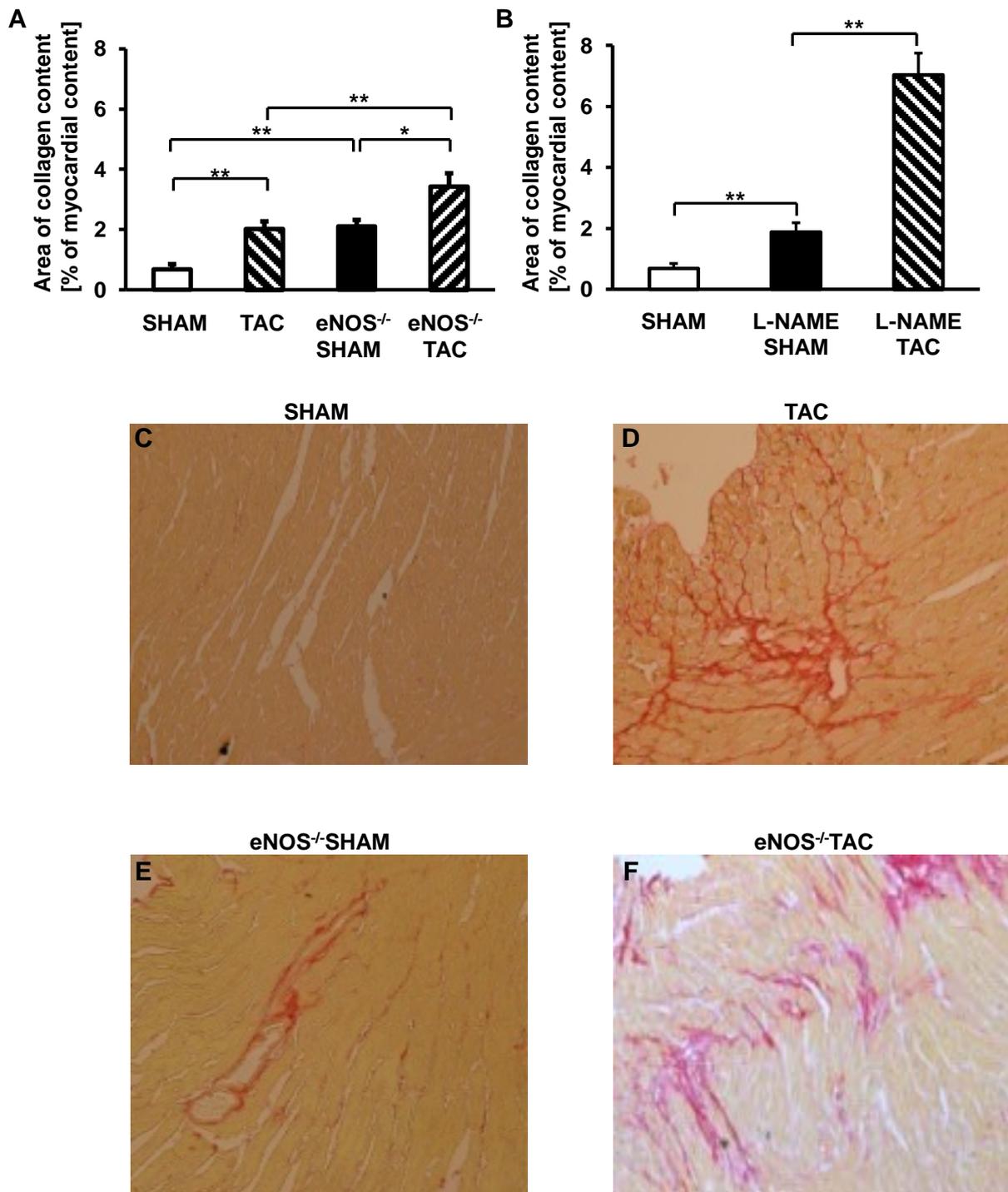


Abbildung 3: Effekt der Aortenligatur (TAC) auf das Ausmaß der Myokardfibrose.

Die Aortenligatur erhöhte das Ausmaß der Myokardfibrose bei Wildtyp- und eNOS^{-/-}-Mäusen.

(A) eNOS^{-/-}-Mäuse entwickelten ein höheres Ausmaß an Fibrose als Wildtypmäuse.

(B) Die Behandlung mit L-NAME (50mg/kgKG/Tag für einen Zeitraum von 35 Tagen) führte nach TAC zu einem erhöhtem Ausmaß der Myokardfibrose.

Repräsentative Sirius-Red gefärbte Paraffinschnitte des linken Ventrikels von jeweils (C) SHAM bzw. (E) eNOS^{-/-} SHAM Maus und (D) Wildtyp- bzw. (F) eNOS^{-/-} Maus, bei denen eine transaortale Konstriktion durchgeführt wurde. *p<0,05, **p<0,01, n=7-17.

4.1.4 Zellproliferation

Das im Zellkern enthaltene Protein Ki-67, welches während allen Abschnitten des Zellzyklus, ausgenommen der G₀-Phase [152], exprimiert wird, wurde genutzt um die Anzahl der Zellen, welche Stadien der Zellteilung durchlaufen, zu ermitteln. Somit konnten wir die Proliferationskapazität des Myokards genauer erforschen.

Bei den SHAM - operierten Wildtypmäusen wurden keine Ki-67 proliferierenden Zellen gefunden. Die eNOS^{-/-}- SHAM Mäuse zeigten signifikant mehr Ki-67 positiven Kardiomyozyten als die Wildtyp-SHAM Mäuse. Allerdings sah man einen signifikanten Anstieg der Ki-67 exprimierenden Kardiomyozyten nach TAC sowohl bei den Wildtypmäusen (TAC-Gruppe 0,1± 0,02%) als auch bei den eNOS^{-/-} - Mäusen (eNOS^{-/-}- TAC 0,11 ± 0,02%) (**Abb. 4A**).

Die Anzahl der Ki-67 exprimierenden Nicht-Kardiomyozyten stieg signifikant in beiden Gruppen an. Sowohl in der Wildtyp-Gruppe als auch in der eNOS^{-/-}-Gruppe zeigte sich dies in einer prozentualen Erhöhung von 0,17 ± 0,02% in der SHAM Gruppe (eNOS^{-/-}- SHAM 0,18 ± 0,08%) auf 0,64 ± 0,09% in der TAC-Gruppe (eNOS^{-/-}- TAC 0,92 ± 0,33%) (**Abb. 4B**).

Abbildung 4

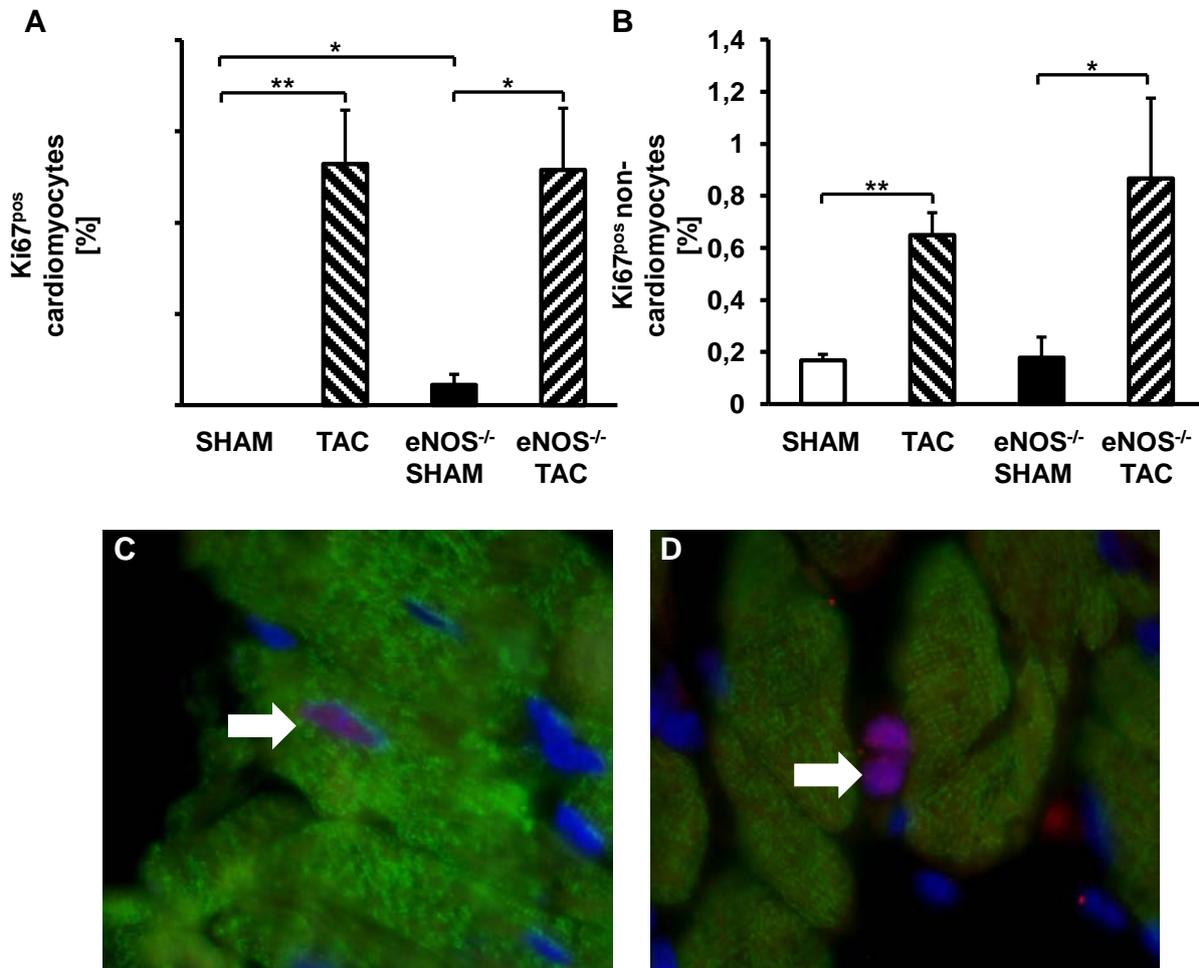


Abbildung 4: Effekt der Aortenligatur (TAC) auf die Anzahl der Ki-67^{pos} Kardiomyozyten und Ki-67^{pos} Nicht- Kardiomyozyten.

Die Aortenligatur erhöhte die Anzahl der (A) Ki-67^{pos} Kardiomyozyten und der (B) Ki-67^{pos} Nicht- Kardiomyozyten bei Wildtyp- und eNOS^{-/-}-Mäusen. eNOS^{-/-}-Mäuse zeigten im Vergleich zu Wildtypmäusen eine basal vermehrte Anzahl von Ki-67^{pos} Kardiomyozyten.

Beispiele von linksventrikulären Myokardschnitten mit einer kombinierten Immunfärbung für den Myozytenmarker α -sarkomerischen-Aktin (grün) und den Proliferationsmarker Ki-67 (rot). Proliferierende (D) Nicht- Kardiomyozyten und (C) Kardiomyozytenkerne sind mit weißen Pfeilen markiert. Kerne sind mittels DAPI blau angefärbt. *p<0,05, **p<0,01, n=7-14.

4.1.5 Endotheliale Progenitorzellen

Von der NO-Synthese ist bekannt, dass sie einen wichtigen Regulationsmechanismus zur EPC-Freisetzung darstellt [112]. Der Effekt der TAC auf die Anzahl der EPCs im peripherem Blut, Knochenmark und Milz ist in Abbildung 5 dargestellt. Die durchschnittliche Anzahl der EPC wurde dabei anhand der Wildtyp-SHAM Daten berechnet und in % angegeben. Sowohl im Blut als auch im Knochenmark zeigte sich eine Zunahme der EPC in der Wildtypgruppe nach TAC auf $136,9 \pm 14,4$ % im Blut ($164,2 \pm 22,0$ % im Knochenmark) im Vergleich zu den SHAM-operierten Mäusen ($100 \pm 6,3$ % im Blut; $100 \pm 5,7$ % im Knochenmark). Bei den eNOS^{-/-}- Mäusen ergab sich im Gegensatz dazu kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der EPCs im peripherem Blut wie auch im Knochenmark zwischen den SHAM- und TAC operierten Mäusen (eNOS^{-/-}- SHAM $100 \pm 5,4$ % im Blut vs. eNOS^{-/-}- TAC $84,3 \pm 8,6$ % im Blut; eNOS^{-/-}- SHAM $100 \pm 5,5$ % im Knochenmark vs. eNOS^{-/-}- TAC $108,1 \pm 5,5$ % im Knochenmark). Weiterhin stellte sich eine signifikante Hochregulation der Sca-1/VEGF-R2 positiven EPCs im Blut und im Knochenmark bei Wildtypmäusen im Vergleich zu eNOS^{-/-}- Mäusen nach TAC heraus (**Abb. 5A, B**).

Als etablierter Parameter der EPC-Funktion wurde die Migration in einer modifizierten Boyden Kammer mit SDF-1 als chemischem Lockstoff bestimmt. Hierbei zeigte sich bei den Wildtypmäusen, analog zu den eben beschriebenen Ergebnissen, keine Zunahme der EPC Migration nach TAC (SHAM 218 ± 22 EPC / $0,3\text{cm}^2$ vs. TAC 166 ± 25 EPC / $0,3\text{cm}^2$). Bei den eNOS^{-/-}- Mäusen sahen wir allerdings passend zu den EPC Anzahlen im peripherem Blut und Knochenmark keinen Unterschied der Migration zwischen SHAM (114 ± 22 EPC / $0,3\text{cm}^2$) und TAC (131 ± 19 EPC / $0,3\text{cm}^2$) operierten Mäusen. Die Wildtyp-SHAM Gruppe hatte eine signifikant bessere migratorische Kapazität als die eNOS^{-/-}- SHAM Gruppe (**Abb. 5 C**).

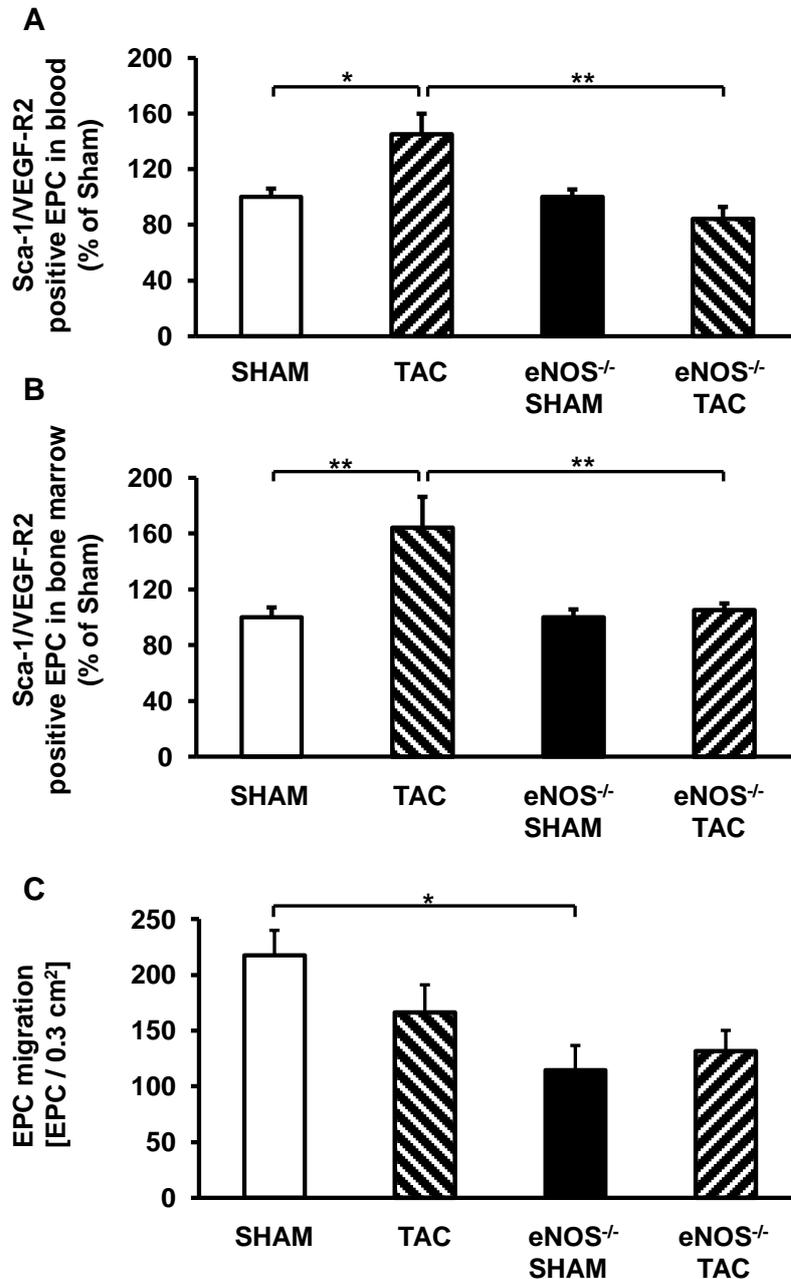


Abbildung 5: Effekt der Aortenligatur (TAC) auf die Anzahl der Sca-1/VEGFR2⁺ endothelialen Progenitorzellen im Blut und im Knochenmark sowie die Migrationskapazität der endothelialen Progenitorzellen.

Die Aortenligatur führte nur bei Wildtypmäusen zu einer Erhöhung der Sca-1/VEGFR2⁺ endothelialen Progenitorzellen im (A) Blut und im (B) Knochenmark.

Wildtypmäuse zeigten nach TAC eine vermehrte Anzahl von Sca-1/VEGFR2⁺ endothelialen Progenitorzellen im Blut und im Knochenmark im Vergleich zu eNOS^{-/-}-Mäusen.

(C) Die Migrationskapazität der EPCs war unter basalen Bedingungen bei Wildtypmäusen gegenüber eNOS^{-/-}-Mäusen erhöht. *p<0,05, **p<0,01, n=7-10

4.1.6 Druckinduzierte kardiale Neoangiogenese

Um die Auswirkungen der druckinduzierten Hypertrophie durch die TAC auf die Gefäßneubildung im linksventrikulärem Myokard genauer zu erforschen, identifizierten wir endotheliale Zellen mit Hilfe der Immunfärbung für das platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31). PECAM-1 eignet sich, aufgrund seiner hohen Expression an der Oberfläche endothelialer Zellen sehr gut zur Detektion von Gefäßneubildungen [153].

Es konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis von CD-31 positiven Zellen zu den Kardiomyozyten ausgedrückt in %, sich weder bei den Wildtypmäusen (SHAM $0,76 \pm 0,03\%$ vs. TAC $0,83 \pm 0,07\%$) noch bei eNOS^{-/-}- Mäusen (eNOS^{-/-}- SHAM $0,6 \pm 0,06\%$ vs. eNOS^{-/-}- TAC $0,72 \pm 0,06\%$) durch die TAC signifikant änderte. (**Abb. 6**)

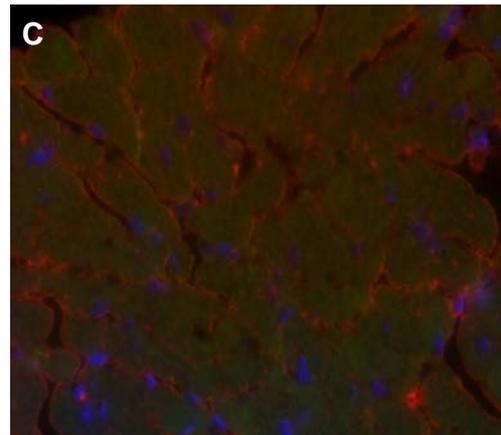
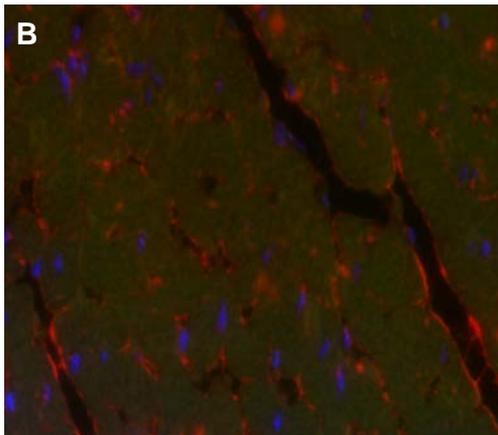
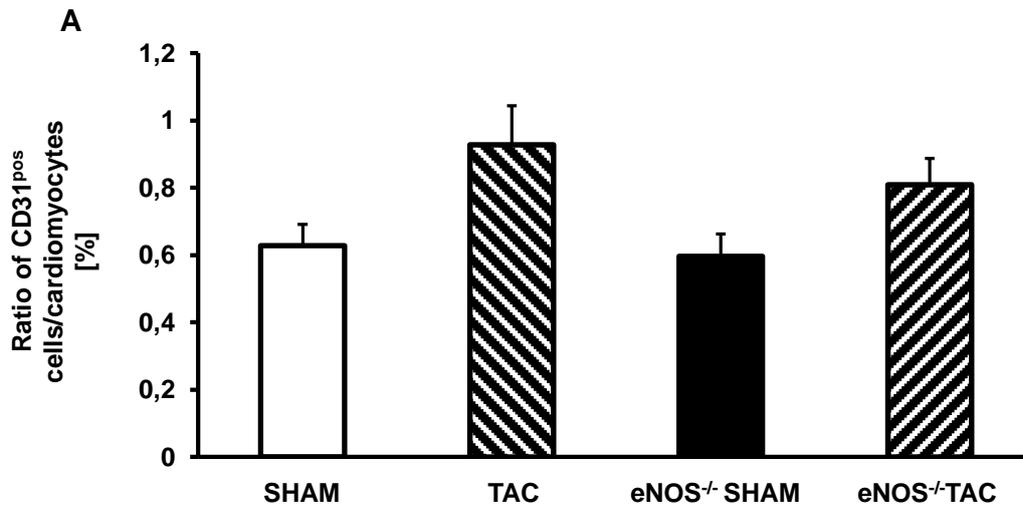


Abbildung 6: Effekt der Aortenligatur (TAC) auf die Kapillardichte

Die Aortenligatur führte bezüglich des Verhältnisses der (A) CD-31^{pos} Zellen zu den Kardiomyozyten weder bei den Wildtyp-, noch bei eNOS^{-/-}-Mäusen, zu einer Veränderung.

(B) und (C) zeigen repräsentative linksventrikuläre Paraffinschnitte einer kombinierten Immunfärbung für α-sarkomerisches Aktin (grün) und endotheliale Zellenmarker CD-31 (rot). Die Kerne sind mittels DAPI blau angefärbt. (B) zeigt eine SHAM-Maus und (C) eine Maus nach TAC. n=7-18

4.2 Effekt der Aortenligatur (TAC) bei transplantierten Mäusen

Um die Rolle der endothelialen NO-Synthase für die myokardiale Reparaturprozessen bei linksventrikulärer Druckbelastung genauer zu erforschen, wurden die unter 3.5 beschriebenen Knochenmarktransplantationen von eNOS^{-/-}-Knochenmark in Wildtypmäuse, sowie von Wildtypknochenmark in eNOS^{-/-}-Mäuse verwendet. Somit sollte die Rolle der eNOS, welche im Knochenmark die am meist vorkommende Isoform ist [154], in Hinblick auf die myokardialen Umbauprozesse bei druckinduzierte Hypertrophie untersucht werden. Dabei interessierte vor allem der unterschiedliche Einfluss der knochenmarksständigen eNOS im Vergleich zur gewebeständigen eNOS.

Im weiteren Verlauf sollen die Wildtypmäuse, welchen eNOS^{-/-}-Knochenmark gespritzt wurde als **BM-** bezeichnet werden. Die eNOS^{-/-}-Mäuse, welchen eNOS^{+/+}-Knochenmark (Wildtypknochenmark) appliziert wurde als **BM+** bezeichnet werden.

4.2.1 Hämodynamische Daten und myokardiale Hypertrophie

Die TAC erhöhte in beiden Gruppen den linksventrikulären Druck von 76 ± 4 mm Hg in BM-SHAM (116 ± 13 mm Hg in BM+ SHAM) auf 102 ± 7 mm Hg in BM- TAC (136 ± 13 mm Hg in BM+ TAC). Weiterhin zeigte sich hier, dass der linksventrikuläre Druck bei Mäusen mit eNOS^{-/-}-Knochenmark im Vergleich zu eNOS^{-/-}-Mäusen mit eNOS^{+/+}-Knochenmark signifikant vermindert war (**Abb. 7A**).

Auch das Verhältnis von Herzgewicht zu Tibialänge, als Parameter der kardialen Hypertrophie, wurde in beiden Gruppen durch die TAC erhöht (BM- SHAM $9 \pm 0,8$ mg/mm vs. BM- TAC $13 \pm 0,8$ mg/mm; BM+ SHAM $6 \pm 0,4$ mg/mm vs. BM+ TAC $9 \pm 0,5$ mg/mm). Wildtypmäuse, die eNOS^{-/-}-Knochenmark erhielten zeigten einen signifikanten Anstieg des Verhältnisses von Herzgewicht zu Tibialänge im Vergleich zu eNOS^{-/-}-Mäusen mit eNOS^{+/+}-Knochenmark (**Abb. 7B**).

4.2.2 Kardiomyozytäre linksventrikulären Hypertrophie

Die Hypertrophie auf kardiomyozytärer Ebene wurde anhand des kurzen kardiomyozytären Durchmessers pro μm mittels Lichtmikroskop ermittelt. Hier zeigte sich innerhalb der Gruppen ein signifikanter Anstieg dieses Parameters durch die TAC auf $9,1 \pm 0,2$ μm in BM-TAC ($9,1 \pm 0,2$ μm in BM+ TAC) im Vergleich zu SHAM-operierten Tieren von $7,9 \pm 0,3$ μm in BM- SHAM ($7,4 \pm 0,2$ μm in BM+ SHAM). Das eNOS^{-/-}- Knochenmark schien

keinen Einfluss auf die Kardiomyozytengröße zu haben (**Abb. 7C**).

4.2.3 Kardiale Fibrose

Die Entwicklung linksventrikulärer Fibrose, definiert als Fläche des Kollagengehalts im prozentualen Verhältnis des gesamten Myokardschnittes, sollte bei den knochenmarktransplantierten Mäusen weiteren Aufschluss über die Gewebsveränderung des Myokards aufgrund von Druckbelastung geben. Die TAC bewirkte einen signifikanten Anstieg des Fibrosegehalts von $2,0 \pm 0,4\%$ in BM- SHAM ($1,6 \pm 0,2\%$ in BM+ SHAM) auf $4,0 \pm 0,6\%$ in BM- TAC ($2,7 \pm 0,3\%$ in BM+ TAC). Weiterhin zeigte sich hier nach TAC eine Abnahme der Fibrose durch eNOS^{+/+}- Knochenmark im Vergleich zu den Wildtyptieren, welche eNOS^{-/-}-Knochenmark erhalten hatten. (**Abb. 7D**).

Abbildung 7

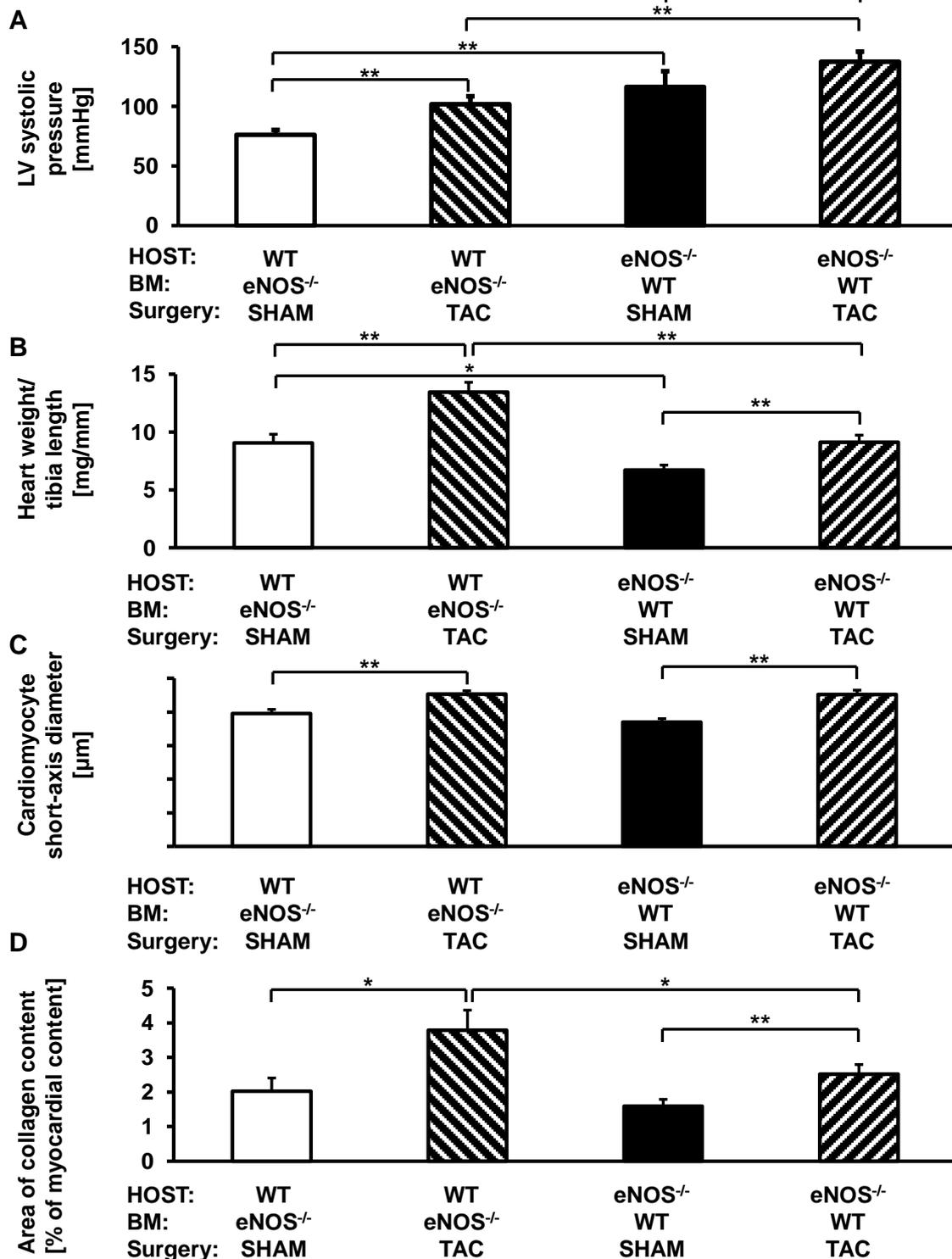


Abbildung 7: Effekt der Aortenligatur (TAC) und der Knochenmarkstransplantationen auf den linksventrikulären Druck, das Verhältnis von Herzgewicht zu Tibialänge, die Myozytengröße sowie das Ausmaß der Myokardfibrose.

Die Aortenligatur führte bei jedem der aufgeführten Parameter zu einer Erhöhung innerhalb der Gruppen. Die kongenital eNOS-defizienten Mäuse zeigten einen (A) erhöhten linksventrikulären Druck und ein vermindertes (B) Verhältnis von Herzgewicht zu Tibialänge im Vergleich zu den Wildtypmäusen mit eNOS^{-/-}-Knochenmark. (C) Die TAC erhöhte den Myozytenquerschnitt in beiden Gruppen. (D) Nach TAC resultierte eine verminderte Myokardfibrosierung in eNOS^{-/-}-Mäusen mit transplantiertem Wildtypknochenmark gegenüber Wildtypmäusen mit transplantiertem eNOS^{-/-}-Knochenmark. *p<0,05, **p<0,01, n=7-16

4.2.4 Zellproliferation

Wie schon bei den nichttransplantierten Gruppen wurde auch bei den knochenmarktransplantierten Tieren die Anzahl der proliferierenden Zellen anhand des Marker-Proteins Ki-67 quantifiziert. Hier ergab die TAC in Bezug auf die Anzahl Ki-67 positiver Kardiomyozyten als auch auf die Anzahl der Ki-67 positiven Nicht-Kardiomyozyten keinen signifikanten Unterschied in beiden Versuchsgruppen (**Abb. 8A, B** sowie **Tabelle 5** und **6**).

Tabelle 5 Ki-67^{pos} -Kardiomyozyten (Abb. 8A)

Gruppen		SHAM	TAC
Host	BM		
WT	eNOS ^{-/-}	0,014 ± 0,01%	0,1 ± 0,05%
eNOS ^{-/-}	WT	0,016 ± 0,009%	0,07 ± 0,025%

Tabelle 6 Ki-67^{pos} - Nicht -Kardiomyozyten (Abb. 8B)

Gruppen		SHAM	TAC
Host	BM		
WT	eNOS ^{-/-}	0,41 ± 0,07%	0,8 ± 0,24%
eNOS ^{-/-}	WT	0,36 ± 0,1 %	0,68 ± 0,16 %

Abbildung 8

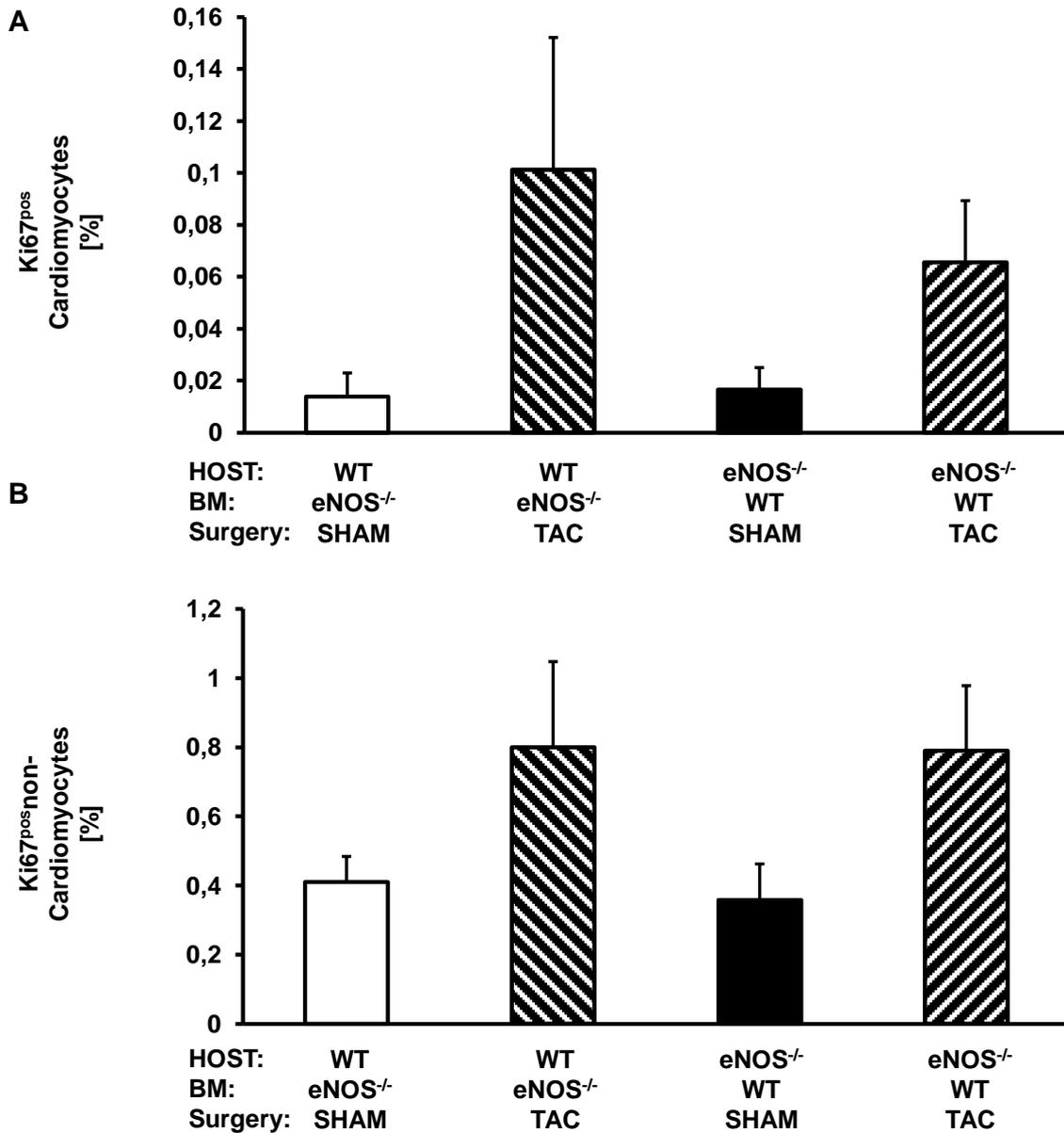


Abbildung 8: Effekt der Aortenligatur (TAC) und der Knochenmarkstransplantationen auf die Anzahl der Ki-67^{pos} Kardiomyozyten und Ki-67^{pos} Nicht-Kardiomyozyten.

Es ließ sich nach Aortenligatur kein Unterschied bei der Anzahl der (A) Ki-67^{pos} Kardiomyozyten und (B) Ki-67^{pos} Nicht-Kardiomyozyten in den Gruppen feststellen. n=8-12

4.2.5 Endotheliale Progenitorzellen

Wie aus Voruntersuchungen bereits bekannt, spielt die endotheliale NO-Synthase eine große Rolle bei der Freisetzung endothelialer Progenitorzellen [112]. Um genauer zu untersuchen, welche endotheliale NO-Synthase, ob die im Knochenmark vorhandene oder die im Gewebe vorkommende, hierbei eine größere Rollen spielt, wurden in den beiden knochenmarktransplantierten Gruppen die Sca-1/VEGF-R2 positiven EPCs im Blut und im Knochenmark quantifiziert.

Hierbei zeigte sich in beiden Zellpopulationen (Blut und Knochenmark) keine Hochregulation innerhalb der Gruppen nach TAC. Nachfolgende Einheiten werden angegeben in Anzahl der Ereignisse pro 100 000 Zellen. Bei Sca-1/VEGF-R2 positiven EPCs im Blut zeigten sowohl die BM- Gruppe mit $204,1 \pm 18,6$ bei BM- SHAM und $205,4 \pm 20,76$ bei BM- TAC wie auch die BM+ Gruppe mit $309,2 \pm 24,6$ bei BM+ SHAM und $311,6 \pm 16$, bei BM+ TAC keine wesentlichen Unterschieden in ihren Ergebnissen (**Abb. 9A**). Auch bei den Sca-1/VEGF-R2 positiven EPCs im Knochenmark spiegelte sich die fehlende Hochregulation durch die TAC wieder (BM- Gruppe mit $181,1 \pm 27,96$ bei BM- SHAM und $157,86 \pm 15,76$ bei BM- TAC wie auch die BM+ Gruppe mit $269 \pm 25,88$ bei BM+ SHAM und $252,3 \pm 19,6$ bei BM+ TAC) (**Abb. 9B**). Wie aus diesen Ergebnissen ersichtlich, führte das eNOS^{-/-}-Knochenmark im Gegensatz zur TAC jedoch sowohl im peripherem Blut wie auch im Knochenmark zu einer Herunterregulation der EPC (**Abb.9A, B**).

Die migratorische Kapazität der EPC wurde anhand einer modifizierten Boyden Kammer mit dem Lockstoff SDF-1 ermittelt. In der BM+ Gruppe sah man eine signifikante Verminderung der Migration nach TAC (BM+ SHAM 202 ± 22 EPC / $0,3\text{cm}^2$ vs. BM+ TAC 133 ± 9 EPC / $0,3\text{cm}^2$). In der BM- Gruppe zeigte sich kein Unterschied zwischen den SHAM operierten Mäusen (127 ± 7 EPC / $0,3\text{cm}^2$) und Mäusen nach TAC (106 ± 7 EPC / $0,3\text{cm}^2$). Zu erkennen war allerdings, dass die Migrationskapazität von Mäusen, welche eNOS^{-/-}-Knochenmark erhielten, sowohl nach SHAM wie auch nach TAC signifikant vermindert war im Vergleich mit Mäusen, welche eNOS^{+/+}-Knochenmark erhalten hatten (**Abb. 9C**).

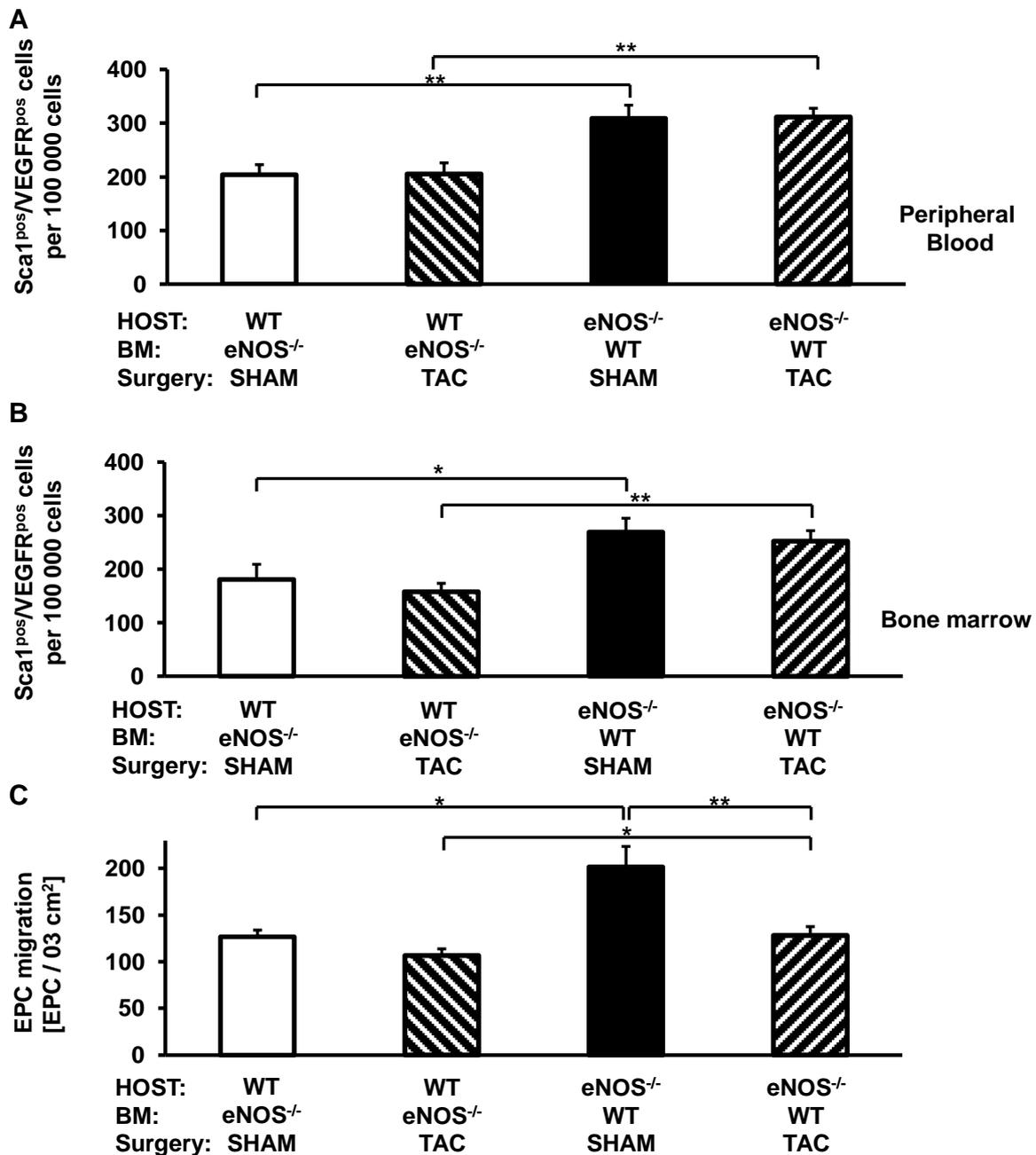


Abbildung 9: Effekt der Aortenligatur (TAC) und der Knochenmarkstransplantationen auf die Anzahl der Sca-1/VEGFR2⁺ endothelialen Progenitorzellen im Blut und im Knochenmark sowie die Migrationskapazität der endothelialen Progenitorzellen.

eNOS^{-/-}-Mäusen mit transplantiertem Wildtypknochenmark zeigten im (A) Blut und im (B) Knochenmark sowohl auf basalem Niveau, als auch nach Aortenligatur, eine erhöhte Anzahl von Sca-1/VEGFR2⁺ endothelialen Progenitorzellen, sowie eine (C) verbesserte Migrationskapazität im Vergleich zu Wildtypmäusen mit transplantiertem eNOS^{-/-}-Knochenmark. (C) Die Migrationskapazität von eNOS^{-/-}-Mäusen mit transplantiertem Wildtypknochenmark wurde durch die TAC gemindert. *p<0,05, **p<0,01, n=5-9

4.2.6 Druckinduzierte kardiale Neoangiogenese

Zur Erfassung von Endothelzellen im Myokard wurde eine CD-31- Immunfärbung durchgeführt. Analog zu den Ergebnissen der nichttransplantierten Tiere zeigte sich auch hier kein Unterschied des Verhältnisses der CD-31^{pos}-Zellen zu den Kardiomyozyten innerhalb beider knochenmarktransplantierte Gruppen nach TAC (BM- SHAM $0,83 \pm 0,06\%$ vs. BM-TAC $0,98 \pm 0,06\%$; BM+ SHAM $1,3 \pm 0,1\%$ vs. BM+ TAC $1,2 \pm 0,08\%$). Allerdings konnte, sowohl nach SHAM als auch nach TAC, eine Abnahme der kardialen Kapillardichte bei den Mäusen die eNOS^{-/-}-Knochenmark erhalten hatten im Vergleich zu denen mit eNOS^{+/+}-Knochenmark beobachtet werden (**Abb. 10A**).

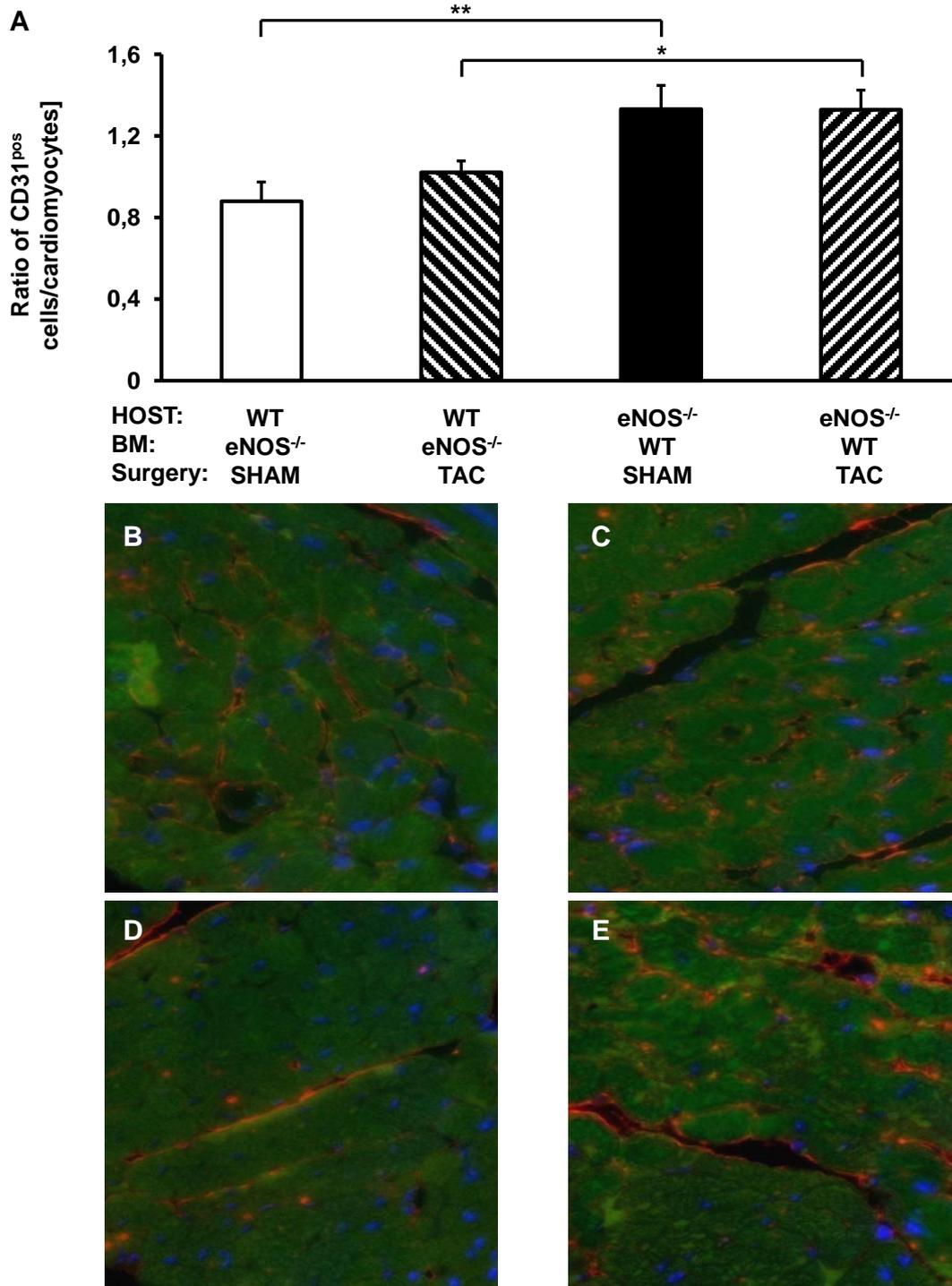


Abbildung 10: Effekt der Aortenligatur (TAC) und der Knochenmarkstransplantationen auf die Kapillardichte.

(A) eNOS^{-/-}-Mäusen mit transplantiertem Wildtypknochenmark entwickelten sowohl auf basalem Niveau, als auch nach Aortenligatur, eine verbesserte Kapillardichte im Myokard im Vergleich zu Wildtypmäusen mit transplantiertem eNOS^{-/-}-Knochenmark.

(B), (C), (D) und (E) repräsentieren linksventrikuläre Paraffinschnitte einer kombinierten Immunfärbung für α -sarkomerisches Aktin (grün) und dem endothelialen Zellmarker CD-31 (rot). Die Kerne sind mittels DAPI blau angefärbt. (B) ist BM+ SHAM; (C) ist BM+ TAC; (D) ist BM- SHAM; (E) ist BM- TAC. *p<0,05, **p<0,01, n=9-14

4.2.7 Identifizierung von aus dem Knochenmark stammenden Endothelzellen im Myokard

Um zu erforschen in welchem Ausmaß aus dem Knochenmark stammende Zellen zu der kardialen Angiogenese beitragen, wurde eine Kombinationsfärbung für CD-31 und GFP an Wildtypmäusen und eNOS^{-/-}-Mäusen, welche GFP positives Knochenmark erhalten hatten, durchgeführt. Es zeigte sich dabei eine signifikante Erhöhung der GFP^{pos}CD-31^{pos} Zellen nach TAC innerhalb beiden Gruppen. Die Anzahl dieser Zellen steigerte sich von $5,2 \pm 0,8\%$ in Wildtyptieren nach SHAM-Operation auf $15,5 \pm 3,2\%$ in Wildtyptieren nach TAC. Bei den eNOS^{-/-}-Mäusen zeigte sich eine Zunahme von $6,5 \pm 3\%$ in eNOS^{-/-}-SHAM –Mäusen auf $15,5 \pm 4\%$ in eNOS^{-/-}-TAC-Mäusen. Zwischen den Wildtyp- und den eNOS^{-/-}- Mäusen zeigten sich keine Unterschiede.

Der extramedulläre eNOS-Mangel hatte somit keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der aus dem Knochenmark stammenden endothelialen Zellen bei Druckbelastung (**Abb.11 A**).

Abbildung 11

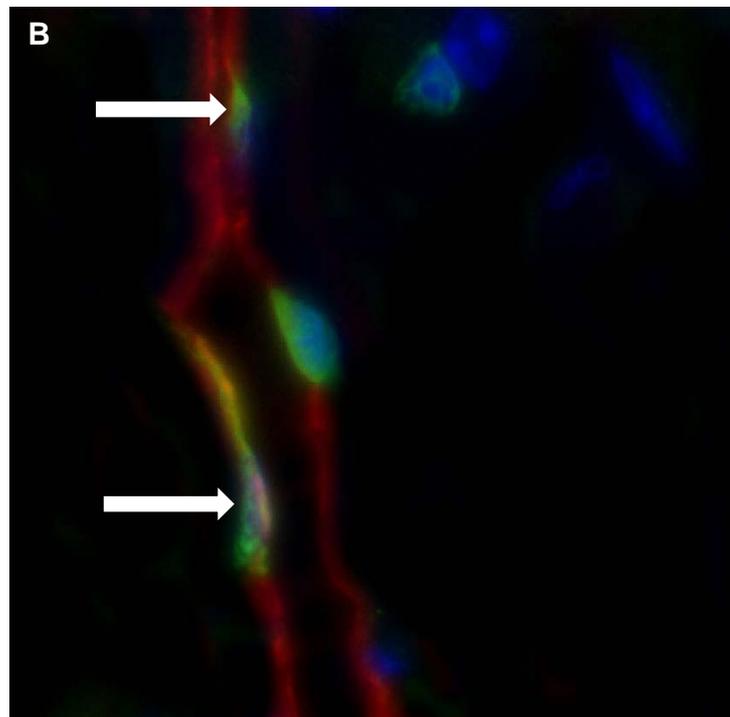
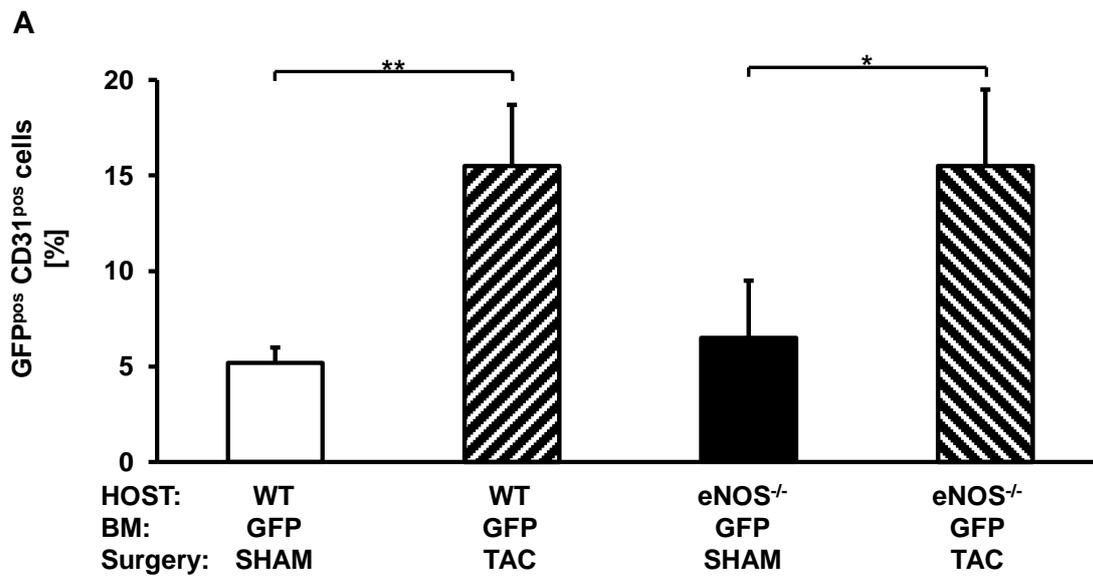


Abbildung 11: Effekt der Aortenligatur (TAC) auf die Anzahl der aus dem Knochenmark stammenden Endothelzellen im Myokard.

(A) Die Aortenligatur führte innerhalb beider Gruppen zu einer erhöhten Anzahl der GFP^{pos} CD31^{pos} Zellen im Myokard.

(B) zeigt eine kombinierte Immunfärbung für GFP (grün) und CD-31 (rot). Doppelt positive Zellen sind durch Pfeile markiert. Zellkerne sind mittels DAPI blau angefärbt. *p<0,05, **p<0,01, n=4-13

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer Druckbelastung auf das linksventrikuläre Myokard untersucht. Dabei interessierte vor allem, welche Rolle die endotheliale NO-Synthase in Bezug auf die kardiovaskulären Veränderungen bei nachlastinduzierter Hypertrophie einnimmt. Spezielles Interesse galt dem Einfluss von endothelialen NO auf die kardiale Angiogenese und EPC – Rekrutierung bei nachlastinduzierter Hypertrophie.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass bereits das basale Fehlen von NO in eNOS-Knockout Mäusen zu einer Fibroseentwicklung im Myokard führt.

Weiterhin konnten durch diese Arbeit erstmals Hinweise dafür entdeckt werden, dass die Lokalisation der eNOS für die kardiale Angiogenese und EPC-Rekrutierung entscheidend ist.

5.1 Kardiales Remodeling bei der nachlastinduzierten linksventrikulären Hypertrophie bei nichttransplantierten Mäusen

5.1.1 Systemische Hemmung der NO-Synthase durch L-NAME

Um einen ersten Einblick zu erlangen, welchen Einfluss NO auf die kardialen Veränderungen bei druckinduzierter Hypertrophie hat, wurde der unselektive NOS-Inhibitor L-NAME verwendet. Von diesem ist bekannt, dass er bei oraler Verabreichung zu einer Hypertension führt [155, 156] und somit ein etabliertes Modell der Nachlasterhöhung darstellt.

Die Aortenligatur führte zu einer kardialen (Verhältnis von Herzgewicht zu Tibialänge) und kardiomyozytären Hypertrophie bei den mit L-NAME behandelten Mäusen. Bezüglich der kardialen Hypertrophie ergab sich zwischen WT-SHAM und L-NAME SHAM kein Unterschied. L-NAME SHAM zeigte gegenüber WT-SHAM einen kleineren Myozytenquerschnitt auf. Die Datenlage bezüglich der Parameter kardialer Hypertrophie und Myozytengröße ist dabei kontrovers. So konnten unterschiedliche Arbeitsgruppen sowohl kardiale Hypertrophie [157, 158] und Myozytengrößenzunahme [157] als auch kardiale Hypotrophie [159, 160] und Myozytengrößenabnahme [161, 162] durch L-NAME Gabe zeigen. Die divergierenden Resultate können unter anderem aufgrund unterschiedlicher

Methodik, der Verwendung unterschiedlicher Spezies als Versuchstiere (z.B. Ratten, Mäuse), wie auch auf die Dauer der Behandlung und Dosis des verabreichten L-NAME zurückzuführen sein.

Der größte Effekt der L-NAME Gabe war eine deutliche Fibrosierung des Myokards. Dabei zeigte sich, dass L-NAME SHAM schon deutlich mehr Fibrose bildet als WT-SHAM und die Aortenligatur die Fibrosierung innerhalb der L-NAME Gruppe nochmal deutlich steigern konnte. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten auch andere Arbeitsgruppen eine deutliche Fibrosierung des Myokards bei L-NAME behandelten Tieren nachweisen [163, 164]. Schließlich kann man folgern, dass NO eine antifibrotische Wirkung bei den WT-SHAM Tieren haben muss.

Das Ausmaß der Myokardfibrose bei den mit L-NAME behandelten Mäusen könnte weiterhin eine Ursache für die verkleinerten Myozyten dieser Tiere sein. Es ist vorstellbar, dass die Myokardfibrose zum einen durch eine Kompression der Myozyten und zum anderen durch eine Beeinträchtigung der nutritiven Versorgung der Kardiomyozyten aufgrund einer perivaskulärer Fibrose zu einer Verkleinerung der Myozyten führt.

Da L-NAME allerdings ein dosisabhängiger, unspezifischer Inhibitor aller 3 NOS Isoformen ist, welcher unter anderem auch noch Nebeneffekten, wie z.B. eine Mastzelldegranulation [165] aufweist, wurde ein eNOS Knockout Modell zur genaueren Charakterisierung der Rolle der eNOS für die Remodelingprozesse bei nachlastinduzierter Hypertrophie genutzt.

5.1.2 Unterschiede von eNOS^{-/-} - und Wildtyp- Mäusen

Unumstritten ist, dass die endotheliale NO-Synthese an Remodelingprozessen im linksventrikulären Myokard entscheidend beteiligt ist. Die Frage allerdings, ob sie dieses linksventrikuläre Remodeling in positiver oder maladaptiver Weise beeinflusst, ist nicht endgültig geklärt.

Es zeigte sich ein signifikant erhöhter linksventrikulärer systolischer Druck bei eNOS defizienten Mäusen gegenüber Wildtypmäusen. Die Entwicklung einer Hypertension in eNOS Knockout Mäusen ist durch verschiedene Studien belegt [166, 167].

Sowohl Wildtyp- als auch eNOS^{-/-} -Mäuse entwickelten nach Aortenligatur eine kardiale Hypertrophie (Verhältnis von Herzgewicht zu Tibialänge). Zwischen den Wildtyp- und den eNOS^{-/-} -Mäusen stellte sich allerdings kein Unterschied bezüglich der kardialen Hypertrophie heraus. Hinsichtlich des Verhältnisses von Herzgewicht zu Tibialänge konnten einerseits Studien, welche einen ähnlichen Parameter untersuchten (wie z.B. das Linksventrikuläres Gewicht / Körpergewicht oder die linksventrikuläre Wanddicke), eine signifikante Zunahme ihres Parameters nach TAC bei eNOS^{-/-} -Mäusen gegenüber Wildtypmäusen darstellen [168, 169]. Diesen Ergebnissen gegenüberstehend konnte Takimoto et al. 2005 nachweisen, dass Wildtypmäuse im Vergleich zu eNOS^{-/-} -Mäusen ein erhöhtes Verhältnis von Herzgewicht zu Tibialänge nach TAC entwickeln [170]. In Übereinstimmung mit dem in dieser Arbeit ermittelten Ergebnis zeigte sich aber auch in anderen Arbeitsgruppen kein Unterschied zwischen den SHAM operierten eNOS^{-/-} - und Wildtyp- Mäusen bei dem Verhältnis von Herzgewicht zu Tibialänge [168-171]. In der vorliegenden Arbeit kann NO kein Einfluss auf die kardiale Hypertrophie im Modell der Nachlasterhöhung zugesprochen werden.

Zur genaueren Begutachtung der Remodelingprozesse bei der nachlastinduzierten Hypertrophie wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung zum Messen des Kardiomyozytenquerschnitts verwendet. Die Aortenligatur erhöhte den Kardiomyozytenquerschnitt in beiden Gruppen. Die Wildtypmäuse entwickelten nach der Aortenliagtur im Vergleich zu den eNOS^{-/-} -Mäusen größere Kardiomyozyten. Aus in vitro Studien ist bekannt, dass NO auf Kardiomyozyten antihypertroph wirkt [172, 173]. Übereinstimmend mit dieser Erkenntnis sind die Arbeiten von Ruetten et al. 2005 und Ichinose et al. 2003, welche beide eine Vergrößerung der Kardiomyozyten in eNOS^{-/-} - Mäusen im Vergleich mit Wildtypmäusen nach Aortenligatur entdeckten [168, 169]. Dem

entgegengesetzt stehen die Ergebnisse von Takimoto et al. 2005, der bezüglich der Kardiomyozytengröße mit der vorliegenden Arbeit übereinstimmt. In den Untersuchungen von Takimoto et al. entwickelten Wildtypiere nach TAC einen fast um das zweifache erhöhten Kardiomyozytenquerschnitt im Vergleich mit den eNOS^{-/-}-Mäusen. Die Begründung dieses erhöhten Kardiomyozytenquerschnitts von Wildtypmäusen gegenüber eNOS^{-/-}-Mäusen liegt in einer durch die Druckbelastung des Herzens getriggerten Entkoppelung der eNOS, welche daraufhin vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) exprimiert. ROS wiederum stimuliert kardiale Hypertrophie [170]. Dadurch lässt sich schließen, dass die eNOS das kardiale Remodeling durchaus negativ beeinflussen kann, indem sie bei erhöhter Nachlast, in Folge der vermehrten ROS-Produktion, die kardiomyozytäre Hypertrophie fördert.

Ferner kommt es durch die Remodelingprozesse im Herzen zu einem Verlust von Herzmuskelzellen. Das Herz wurde lange Zeit als entdifferenziertes Organ ohne eine Erneuerungsmöglichkeit der Kardiomyozyten angesehen [174]. Diese These wurde jedoch durch verschiedene Arbeitsgruppen in Frage gestellt [20, 175, 176]. Eine im Jahr 2010 veröffentlichte Studie von Bergmann et al. konnte zeigen, dass die Kardiomyozyten sich durchgehend in einer sehr geringen Anzahl erneuern [177]. In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen der druckinduzierten Hypertrophie die Zellproliferation der Kardio- und Nichtkardiomyozyten untersucht. Insbesondere der Einfluss der endothelialen NO-Synthase auf die Zellproliferationen sollte erforscht werden. Zur Detektion der Zellproliferationen nutzten wir das Markerprotein Ki-67, welches im Zusammenhang mit Zellvermehrungen exprimiert wird. Der Umstand, dass Ki-67 während allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2, Mitose) in Erscheinung tritt und bei ruhenden, im G0 Status befindlichen Zellen, nicht aufzufinden ist, macht es zu einem exzellenten Marker um die Wachstumsfraktion einer bestimmten Zellpopulation zu ermitteln [178]. Dabei ist jedoch nicht zu ermitteln, ob die durch Ki-67 markierte Zelle eine Karyokinese oder Zytokinese vollzieht. Folglich resultiert aus einer erhöhten Anzahl Ki-67^{pos}-Kardiomyozyten nicht direkt eine proportionale Vermehrung der Kardiomyozyten im Myokard. Unsere Arbeitsgruppe konnte 2007 nachweisen, dass bei Wildtypmäusen die Nachlasterhöhung im Herzen zu einem Proliferationsreiz für Kardio- und Nichtkardiomyozyten führt [111]. Diese Ergebnisse konnten durch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit Wildtyp- und eNOS^{-/-}-Mäusen nochmals bestätigt werden. Wildtypmäuse und eNOS^{-/-}-Mäusen zeigten allerdings keinen Unterschied in der Anzahl der Zellproliferationen nach Aortenligatur auf. Weitere

Forschungsgruppen stimmen mit den hier vorliegenden Daten überein, dass verschiedene Stimuli wie z.B. eine Nachlasterhöhung oder auch ein Myokardinfarkt zu einer erhöhten Proliferationsrate von Kardiomyozyten im Herzen führt [176, 179-181]. Das Kardiomyozyten unter physiologischen Bedingungen, wie bei den hier vorliegenden WT-SHAM Mäusen, nicht proliferieren, wurde weiterhin von Walsh et al. bestätigt [182]. NO übt eine Vielzahl von Effekten auf den Zellzyklus aus [183]. So sind für NO sowohl proliferative [114] als auch antiproliferative Wirkungen beschrieben [139, 140]. In dem in dieser Arbeit durchgeführten Modell der Nachlasterhöhung kann der eNOS keinen entscheidenden Einfluss auf die Proliferationsraten von Kardio- und Nichtkardiomyozyten zugesprochen werden. Es kann allerdings festgehalten werden, dass verschiedene pathologische Reize das Herz zu einer erhöhten Zellproliferation anregen.

Eine weitere wichtige Komponente des kardialen Remodeling ist die Fibrosebildung. Abhängig von ihrem Ausprägungsgrad kann sie zu verschiedenen klinischen Krankheitsbildern, wie z.B. der diastolischen Funktionsstörung oder einer gestörten Erregungsausbreitung, führen [184-186]. Hieraus sollte ersichtlich sein, dass ein genaueres Verständnis der Fibroseentstehung von Bedeutung ist.

Um den Gehalt an Fibrose evaluieren zu können, wurde eine Sirius-Red-Färbung verwendet. Mit dieser sollte der Einfluss der eNOS auf die Fibrosierung des Myokards untersucht werden. Die Aortenligatur resultierte bei Wildtyp- und eNOS^{-/-}-Mäusen in einer vermehrten Myokardfibrosierung. eNOS^{-/-}-Mäuse entwickelten nach der Aortenligatur signifikant mehr Myokardfibrose als Wildtypmäuse. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnten auch andere Arbeitsgruppen in Modellen der nachlastinduzierten Hypertrophie (Konstriktion der thorakalen bzw. abdominalen Aorta) eine vermehrte Fibrosierung des linksventrikulären Myokards bei eNOS^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp -Mäusen aufzeigen [168, 169].

Weitere Zustimmung erhalten die Ergebnisse dieser Arbeit durch in vitro Versuche, welche NO eine antifibrotische Wirkung nachweisen konnten [172, 187]. Erstmalig konnten in dieser Arbeit allerdings ein signifikanter Anstieg der Myokardfibrose bei eNOS^{-/-}-SHAM im Vergleich mit Wildtyp-SHAM Mäusen festgestellt werden. Die Myokardfibrosierung bei einer eNOS-Defizienz wird durch verschiedene pathologische Mechanismen hervorgerufen. Darunter unter anderem die Induktion von einer endothelial-mesenchymalen Transformation, die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen resultierend in extrazellulärem Matrixremodeling sowie der Verlust endothelialer Zellen [188-190]. Letztendlich kann man

NO sowohl unter basalen Bedingungen wie auch bei erhöhter Nachlast eine antifibrotische Wirkung zusprechen.

Die Regulation der kardialen Angiogenese stellt einen Scheitelpunkt für den Übergang von adaptiver zu dekompensierter Hypertrophie dar [191]. Zur Aufrechterhaltung eines suffizienten Gefäßnetzwerkes ist das Myokard zur Angiogenese und Vaskulogenese fähig. Dabei scheinen EPC die Neoangiogenese des Herzens positiv beeinflussen zu können, was durch verschiedene Studien belegt werden konnte [102, 192]. Die eNOS wurde als zentraler Mediator der EPC-Mobilisation identifiziert. Die Induktion der eNOS im Knochenmark über verschiedene Stimuli (VEGF / SDF-1) und die damit resultierende vermehrte Freisetzung von NO führt zu einer Kaskade, welche letztendlich zu einer EPC-Freisetzung führt. Diese Erkenntnis der Schlüsselrolle der eNOS für die EPC-Mobilisation wird unter anderem durch Laufs et al. 2004 belegt, welche einen NO-abhängigen Anstieg der EPCs nach körperlichem Training in Wildtypmäusen darstellen konnten, der bei eNOS^{-/-}-Mäusen ausblieb [102, 112, 192].

Infolge dieser zentralen Rolle der eNOS für die EPC-Mobilisation wurde der Einfluss der eNOS bei nachlastinduzierter Hypertrophie auf die Anzahl der EPC im Knochenmark und Blut untersucht. Die Aortenligatur führte bei den Wildtypmäusen im Gegensatz zu den eNOS^{-/-}-Mäusen zu einer gesteigerten Anzahl von EPCs im Knochenmark und im Blut. Diese Daten korrelieren mit der Arbeit von Müller et al. 2007 [111] und veranschaulichen, dass die eNOS einen wichtigen Regulator der EPC- Mobilisation bei erhöhter Nachlast darstellt.

Die Migrationsfähigkeit der EPC wurde durch die Aortenligatur nicht beeinflusst. Allerdings zeigte sich, dass Wildtyp-SHAM-Mäuse eine bessere Migrationsfähigkeit als eNOS^{-/-}-SHAM-Mäuse aufweisen. Zuspriech erhält diese Erkenntnis aus Untersuchungen, die NO eine migrationsfördernde Eigenschaft zuweisen [114, 193].

Um die Kapillarisation des Myokards zu ermitteln, wurde eine CD-31-Färbung durchgeführt. Nach Aortenligatur ließ sich jedoch lediglich eine Tendenz zu einer verbesserten Kapillarisation nachweisen. Die eNOS^{-/-}-Mäusen hatten trotz der bei ihnen vermehrt auftretenden Fibrose, der geringeren Baseline- Migrationskapazität sowie der fehlenden EPC Hochregulation im Blut und im Knochenmark keine schlechtere myokardiale Kapillarisation als die Wildtypmäuse. Die ermittelten Ergebnisse werden durch ähnliche Arbeiten gestützt, die keine veränderte Kapillarisation zwischen eNOS^{-/-}- und

Wildtypmäusen beobachteten [194, 195]. Dies ist zum Teil durch Kompensationsmechanismen in adulten eNOS^{-/-}-Mäusen zu erklären. Einer dieser Kompensationsmechanismen ist die Stimulation der kardialen Angiogenese in eNOS^{-/-}-Mäusen durch erhöhte Konzentrationen von ANP [171, 196]. Des Weiteren muss man in Betracht ziehen, dass Endothelzellen zur Kapillarisierung nicht nur aus dem Knochenmark stammen, sondern auch residente Stammzellen im Herzen bzw. in den Gefäßen und differenzierungsfähige Endothelzellen zur Neoangiogenese beitragen können [197, 198].

So kann man bezüglich der Angiogenese zusammenfassen, dass die eNOS zwar ein wichtiger Regulator der EPC-Freisetzung bei druckinduzierter Hypertrophie ist, sie allerdings im Rahmen dieses Hypertrophie-modells, aufgrund der anfänglichen Kompensationsmechanismen, keinen Unterschied auf die myokardiale Kapillarisierung ausübt.

5.2 Kardiales Remodeling bei der nachlastinduzierten linksventrikulären Hypertrophie bei den knochenmarkstransplantierten Mäusen

Um speziell die Rolle der eNOS des Knochenmarks in Bezug auf das kardiale Remodeling und die kardiale Kapillarisation im Rahmen der nachlastinduzierten Hypertrophie zu untersuchen wurde die unter dem Punkt 3.5 beschriebenen Knochenmarkstransplantationen durchgeführt. Die eNOS ist im Knochenmark die am meist vorkommende Isoform der NO-Synthasen [154]. Ihr Einfluss im Model der nachlastinduzierten Hypertrophie ist bislang nur ungenau erforscht. Da man allerdings weiß, dass die eNOS einen wichtigen Regulator der EPC-Freisetzung darstellt [112], könnte ihr Einfluss einen entscheidenden Anteil an den myokardialen Umbauprozessen bei druckinduzierten Hypertrophie haben.

Bezüglich der mittels des Markerproteins Ki-67 gemessenen Proliferationen von Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten konnte lediglich ein Trend zu einer vermehrten Proliferation nach Aortenligatur festgestellt werden. Zwischen den knochenmarkstransplantierten Gruppen ergab sich kein Unterschied. Der Umstand dieser Proliferationsergebnisse kann durch folgende Erläuterungen verständlich dargestellt werden. Im Fall von ausgereiften Kardiomyozyten führt die Zellteilung durch Polyploidie und Mehrfachkernteilung zur Genommultiplikation. Diese wiederum schützt durch eine erhöhte Expression von Genen, welche in der Protektion von Apoptose, DNA-Schäden und oxidativem Stress involviert sind das Gewebe vor verschiedensten Stressarten [199]. Als ein indirekter Beweis für dieses Konzept könnte die Abwesenheit jeglicher Differenz in der Anzahl der proliferierenden Zellen bei den knochenmarkstransplantierten Mäusen angesehen werden. Die Bestrahlung, als eine Art Gewebestress, führte so bei den SHAM-operierten Mäusen schon zu einer erhöhten Zellproliferation, welche eine Differenz in den Gruppen verhinderte. Weiterhin ist festzuhalten, dass das transplantierte Knochenmark keinen Einfluss auf die Zellproliferation hatte.

Die Aortenligatur führte in beiden knochenmarktransplantierten Gruppen zu einer Zunahme des linksventrikulären Drucks, des Verhältnisses von Herzgewicht zu Tibialänge und des Kardiomyozytenquerschnitts. Die von Geburt an eNOS-defizienten Mäuse entwickelten einen höheren linksventrikulären Druck als die Wildtypmäuse, denen eNOS^{-/-}-Knochenmark transplantiert wurde. Die Knochenmarktransplantationen hatten somit keinen Einfluss auf die von NO vermittelte Blutdruckregulation.

Die durch die Aortenligatur induzierte kardiale Hypertrophie (Herzgewicht/ Tibialänge) und Fibrose war in den eNOS^{-/-}-Mäusen mit transplantiertem Wildtypknochenmark gegenüber den Wildtypmäuse mit eNOS^{-/-}-Knochenmark vermindert. Dieser positiver Effekt des Wildtypknochenmarks bei den von Geburt an eNOS-defizienten Mäusen resultierte aus der verbesserten kardialen Angiogenese infolge einer basal erhöhten Anzahl von EPCs im Blut und im Knochenmark sowie einer verbesserten Migrationsfähigkeit.

Die fehlende EPC-Mobilisation und die beobachtete Reduktion der Migrationsfähigkeit nach Aortenligatur, welche allerdings nur bei Mäusen mit extramedullärem eNOS Mangel signifikant gemindert war, verdeutlichen die Wichtigkeit der eNOS in den EPCs selber und in den Zellen des Knochenmarkstromas für die EPC Mobilisation und die Aufrechterhaltung deren migratorischer Funktion bei Nachlasterhöhung [112]. Weiterhin kann angenommen werden, dass die Erhöhung der Nachlast in Kombination mit der Bestrahlung der Mäuse zu einem Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies und einer Reduktion der MMP-9 Aktivität führt und es somit ähnlich wie in dem Modell des Myokardinfarkts zu einer verminderten EPC-Mobilisation und Migrationsfähigkeit kommen kann [200]. Aufgrund der höheren basalen Migrationsfähigkeit der EPC war die Differenz zwischen SHAM und TAC bei eNOS^{-/-}-Mäusen mit transplantiertem Wildtypknochenmark stärker ausgeprägt.

Die hier vorliegenden Daten sind mit früheren Untersuchungen, welche die Bedeutung der eNOS für die EPC-vermittelte Angiogenese, die EPC-Mobilisation und die Aufrechterhaltung der Funktion der EPCs demonstrieren, vereinbar. Insbesondere Aicher et al. deckten die Schlüsselrolle der eNOS im Knochenmarkstroma für die Rekrutierung von EPC auf [112]. Eine weitere, mit der in dieser Arbeit gestellten These der ausschlaggebenden Rolle der eNOS des Knochenmarks und nicht der eNOS des extramedullären Gewebes, in Einklang zu bringende Studie ist die von Masaaki et al. 2005. In dieser wurde mithilfe des Modells der ischämischen Vorkonditionierung aufgezeigt, dass die festgestellten kardioprotektiven

Effekten auf die eNOS der EPC zurückzuführen ist [201]. Knochenmarkstransplantationen von eNOS^{-/-}- Knochenmark in Wildtypmäuse führten zu einer Verschlechterung der Resultate. Weiterhin zeigte sich, dass die EPC keineswegs nur durch Eingliederung in das Gefäßsystem die Mikrozirkulation des Herzens aufrechterhalten, sondern durch die Expression von kardioprotektiven Zytokinen, einschließlich der eNOS, zur Gefäßregeneration beitragen [201]. You et al. 2006 ermittelten eine gefäßmodulierende Wirkung resultierend aus einer EPC induzierten NO-Freisetzung. Diese erfolgte durch die eNOS der EPC und führte zu einer gesteigerten vaskulären Permeabilität und Vasodilatation, was sich günstig auf die Neovaskularisation auswirkte. Dagegen führte die Transplantation von eNOS^{-/-}-Knochenmark in Wildtypmäuse zu keiner Neovaskularisation im Modell der Hinterlaufischämie [202]. Eine andere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass die ex vivo Vorbehandlung von EPC mit einem NO-Synthase-Verstärker deren Potenzial zur Angiogenese fördert [203]. Folglich spielt die eNOS in den EPC und im Knochenmark eine bedeutende Rolle für die kardiale Angiogenese im Rahmen der druckinduzierten Hypertrophie.

Die Erkenntnis der ausschlaggebenden Rolle der eNOS des Knochenmarks und der EPCs für die myokardiale Angiogenese steht in einem direkten Zusammenhang mit der Myokardfibrosierung. Ursache von Fibrose ist unter anderem der Endothelzellschaden an myokardialen Kapillaren. Insofern entwickelt sich eine progressiv fortschreitende myokardiale Fibrose auch aus einer verminderten Kapillarisation des Myokards. Dieser fibrotische Prozess aufgrund einer mikrovaskulären Rarefizierung wurde von Goligorsky 2010 auch als „drop-out of blood vessels“ bezeichnet [204]. Die in dieser Arbeit dargestellte verbesserte Kapillarisation der von Geburt an eNOS-defizienten Mäusen mit transplantiertem Wildtypknochenmark resultiert dementsprechend in einer reduzierten kardialen Fibrose gegenüber den Wildtypmäusen mit transplantiertem eNOS^{-/-}-Knochenmark. Dieses Resultat veranschaulicht noch einmal die Schlüsselrolle der eNOS in den EPCs und nicht, wie Buys et al. 2007 bestätigen, die der eNOS in den Kardiomyozyten als Ursache für die verminderte Fibrosierung des Myokards [146].

Das Zellen aus dem Knochenmark einen Beitrag am myokardialen Remodeling leisten, konnten weiterhin durch die Ergebnisse der Transplantationen von GFP-positivem Knochenmark in Wildtyp- und eNOS^{-/-}-Mäuse untermauert werden. Die kongenitale eNOS-Defizienz im extramedullären Gewebe hatte keinen Einfluss auf die Anzahl der aus dem Knochenmark stammenden CD31^{pos}GFP^{pos}Zellen im Myokard. Dieses Ergebnis spricht auch dafür, dass die Erneuerung von chronisch dysfunktionalem kardialen Endothel durch residente Stammzellen und Proliferation ausgereifter Endothelzellen bewirkt werden kann [205]. Dagegen konnte man nach der Aortenligatur eine gleichwertige Erhöhung der CD31^{pos}GFP^{pos}Zellen im Myokard beider Gruppen beobachten. Vereinbar ist diese Erkenntnis mit You et al. 2006, die aufgrund einer gefäßmodulierende Wirkung durch die eNOS der EPCs auch eine verbesserte Eingliederung der Knochenmarkszellen in ischämische Areale beobachten konnte [202]. Somit kann man der eNOS des Knochenmarks (EPC, Knochenmarkszellen) im Rahmen der nachlastinduzierten Hypertrophie einen bedeutenden Stellenwert für die Integration von aus dem Knochenmark stammenden Zellen ins Myokard zusprechen.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die eNOS des Knochenmarks und der EPCs ein wichtiger Regulator für die myokardiale Angiogenese und Fibrose bei druckinduzierter kardialer Hypertrophie ist. Diese Erkenntnis präsentiert eine faszinierende Perspektive für die Kreation neuer Behandlungsstrategien der druckinduzierten kardialen Hypertrophie. Durch Anregung der eNOS-Aktivität im Knochenmark und in den EPCs könnte man die myokardiale Angiogenese steigern, um schließlich den Übergang vom adaptiven Remodeling zur Herzinsuffizienz zu hemmen.

6 Literaturverzeichnis

1. WHO, *The Top ten causes of death*, in *Fact Sheet No. 308*. 2008.
2. Statistisches Bundesamt Deutschland, 2007: *Krankheiten des Herz-/Kreislaufsystems weiterhin häufigste Todesursache*, in 2008. p. Pressemitteilung Nr.303 vom 22.08.2008.
3. Levy, D., et al., *Stratifying the patient at risk from coronary disease: new insights from the Framingham Heart Study*. *Am Heart J*, 1990. 119(3 Pt 2): p. 712-7; discussion 717.
4. Benjamin, E.J. and D. Levy, *Why is left ventricular hypertrophy so predictive of morbidity and mortality?* *Am J Med Sci*, 1999. 317(3): p. 168-75.
5. Zak, R., *Cell proliferation during cardiac growth*. *Am J Cardiol*, 1973. 31(2): p. 211-9.
6. Owens, G.K., *Growth response of aortic smooth muscle cells in hypertension*, in Lee RMKW (ed): *Blood Vessel Changes in Hypertension: Structure and Function*. Boca Raton, Fla, CRC Press, 1989: p. pp 45-63.
7. Brilla, C.G., et al., *Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension*. *Circ Res*, 1990. 67(6): p. 1355-64.
8. Weber, K.T., et al., *Physiologic versus pathologic hypertrophy and the pressure-overloaded myocardium*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1987. 10 Suppl 6: p. S37-50.
9. Weber, K.T. and C.G. Brilla, *Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system*. *Circulation*, 1991. 83(6): p. 1849-65.
10. Anversa, P., R. Ricci, and G. Olivetti, *Quantitative structural analysis of the myocardium during physiologic growth and induced cardiac hypertrophy: a review*. *J Am Coll Cardiol*, 1986. 7(5): p. 1140-9.
11. Grossman, W., D. Jones, and L.P. McLaurin, *Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle*. *J Clin Invest*, 1975. 56(1): p. 56-64.
12. Linzbach, A.J., *Heart failure from the point of view of quantitative anatomy*. *Am J Cardiol*, 1960. 5: p. 370-82.
13. Boluyt, M.O., O.H. Bing, and E.G. Lakatta, *The ageing spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from stable compensated hypertrophy to heart failure*. *Eur Heart J*, 1995. 16 Suppl N: p. 19-30.

14. Sutton, M.G. and N. Sharpe, *Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy*. Circulation, 2000. 101(25): p. 2981-8.
15. Loud, A.V., et al., *Absolute morphometric study of myocardial hypertrophy in experimental hypertension. I. Determination of myocyte size*. Lab Invest, 1978. 38(5): p. 586-96.
16. Olivetti, G., et al., *Myocyte cellular hypertrophy is responsible for ventricular remodeling in the hypertrophied heart of middle aged individuals in the absence of cardiac failure*. Cardiovasc Res, 1994. 28(8): p. 1199-208.
17. Vliegen, H.W., et al., *Morphometric quantification of myocyte dimensions validated in normal growing rat hearts and applied to hypertrophic human hearts*. Cardiovasc Res, 1987. 21(5): p. 352-7.
18. Grossman, W., *Cardiac hypertrophy: useful adaptation or pathologic process?* Am J Med, 1980. 69(4): p. 576-84.
19. Gerdes, A.M. and J.M. Capasso, *Structural remodeling and mechanical dysfunction of cardiac myocytes in heart failure*. J Mol Cell Cardiol, 1995. 27(3): p. 849-56.
20. Anversa, P. and B. Nadal-Ginard, *Myocyte renewal and ventricular remodeling*. Nature, 2002. 415(6868): p. 240-3.
21. Pearlman, E.S., et al., *Muscle fiber orientation and connective tissue content in the hypertrophied human heart*. Lab Invest, 1982. 46(2): p. 158-64.
22. Weber, K.T., et al., *Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium*. Circ Res, 1988. 62(4): p. 757-65.
23. Borg, T.K. and J.B. Caulfield, *The collagen matrix of the heart*. Fed Proc, 1981. 40(7): p. 2037-41.
24. Weber, K.T., *Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network*. J Am Coll Cardiol, 1989. 13(7): p. 1637-52.
25. Brilla, C.G. and B. Maisch, *Regulation of the structural remodeling of the myocardium: from hypertrophy to heart failure*. Eur Heart J, 1994. 15 Suppl D: p. 45-52.
26. Weber, K.T., et al., *Fibrillar collagen and remodeling of dilated canine left ventricle*. Circulation, 1990. 82(4): p. 1387-401.
27. Schnee, J.M. and W.A. Hsueh, *Angiotensin II, adhesion, and cardiac fibrosis*. Cardiovasc Res, 2000. 46(2): p. 264-8.
28. Tan, L.B., et al., *Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II*. Circ Res, 1991. 69(5): p. 1185-95.

29. Weber, K.T., *Fibrosis and hypertensive heart disease*. Curr Opin Cardiol, 2000. 15(4): p. 264-72.
30. Weber, K.T. and C.G. Brilla, *Factors associated with reactive and reparative fibrosis of the myocardium*. Basic Res Cardiol, 1992. 87 Suppl 1: p. 291-301.
31. Weber, K.T., et al., *Rebuilding and remodeling following myocardial infarction: The Good, the Bad, and the Ugly of tissue repair*, in *Dialogues in Cardiovascular Medicine*. 1999.
32. Anderson, K.R., M.G. Sutton, and J.T. Lie, *Histopathological types of cardiac fibrosis in myocardial disease*. J Pathol, 1979. 128(2): p. 79-85.
33. Jalil, J.E., et al., *Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle*. Circ Res, 1989. 64(6): p. 1041-50.
34. Silver, M.A., et al., *Reactive and reparative fibrillar collagen remodelling in the hypertrophied rat left ventricle: two experimental models of myocardial fibrosis*. Cardiovasc Res, 1990. 24(9): p. 741-7.
35. Bache, R.J., *Effects of hypertrophy on the coronary circulation*. Prog Cardiovasc Dis, 1988. 30(6): p. 403-40.
36. Breisch, E.A., et al., *Cardiac vasculature and flow during pressure-overload hypertrophy*. Am J Physiol, 1986. 251(5 Pt 2): p. H1031-7.
37. Marcus, M.L., et al., *Alterations in the coronary circulation in hypertrophied ventricles*. Circulation, 1987. 75(1 Pt 2): p. I19-25.
38. Roberts, J.T. and J.T. Wearn, *Quantitative changes in the capillary-muscle relationship in human hearts during normal growth and hypertrophy*. American Heart Journal, 1941. 21(5): p. 617-633.
39. Anderson, P.G., S.P. Bishop, and S.B. Digerness, *Vascular remodeling and improvement of coronary reserve after hydralazine treatment in spontaneously hypertensive rats*. Circ Res, 1989. 64(6): p. 1127-36.
40. Folkow, B., *Physiological aspects of primary hypertension*. Physiol Rev, 1982. 62(2): p. 347-504.
41. Lee, R.M., et al., *Ultrastructural changes in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. A morphometric study*. Blood Vessels, 1983. 20(2): p. 72-91.
42. McGuire, P.G., et al., *Increased deposition of basement membrane macromolecules in specific vessels of the spontaneously hypertensive rat*. Am J Pathol, 1989. 135(2): p. 291-9.

43. van Hoeven, K.H. and S.M. Factor, *Endomyocardial biopsy diagnosis of small vessel disease: a clinicopathologic study*. Int J Cardiol, 1990. 26(1): p. 103-10.
44. Schwartzkopff, B., et al., *Structural and functional alterations of the intramyocardial coronary arterioles in patients with arterial hypertension*. Circulation, 1993. 88(3): p. 993-1003.
45. Rees, D.D., R.M. Palmer, and S. Moncada, *Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. 86(9): p. 3375-8.
46. Treasure, C.B., et al., *Hypertension and left ventricular hypertrophy are associated with impaired endothelium-mediated relaxation in human coronary resistance vessels*. Circulation, 1993. 87(1): p. 86-93.
47. Tomanek, R.J., et al., *Morphometry of canine coronary arteries, arterioles, and capillaries during hypertension and left ventricular hypertrophy*. Circ Res, 1986. 58(1): p. 38-46.
48. Breisch, E.A., et al., *Exercise-induced cardiac hypertrophy: a correlation of blood flow and microvasculature*. J Appl Physiol, 1986. 60(4): p. 1259-67.
49. Tomanek, R.J., J.C. Searls, and P.A. Lachenbruch, *Quantitative changes in the capillary bed during developing, peak, and stabilized cardiac hypertrophy in the spontaneously hypertensive rat*. Circ Res, 1982. 51(3): p. 295-304.
50. Anversa, P. and J.M. Capasso, *Loss of intermediate-sized coronary arteries and capillary proliferation after left ventricular failure in rats*. Am J Physiol, 1991. 260(5 Pt 2): p. H1552-60.
51. Dimmeler, S., et al., *HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway*. J Clin Invest, 2001. 108(3): p. 391-7.
52. Kureishi, Y., et al., *The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals*. Nat Med, 2000. 6(9): p. 1004-10.
53. Müller, P., et al., *ACE inhibition promotes upregulation of endothelial progenitor cells and neoangiogenesis in cardiac pressure overload*. Cardiovasc Res, 2009. 83(1): p. 106-14.
54. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med, 2000. 6(4): p. 389-95.
55. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. 386(6626): p. 671-4.
56. Folkman, J., *What is the role of endothelial cells in angiogenesis?* Lab Invest, 1984. 51(6): p. 601-4.

57. Werner, N., et al., *Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes*. N Engl J Med, 2005. 353(10): p. 999-1007.
58. Aicher, A., A.M. Zeiher, and S. Dimmeler, *Mobilizing endothelial progenitor cells*. Hypertension, 2005. 45(3): p. 321-5.
59. Heissig, B., et al., *Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand*. Cell, 2002. 109(5): p. 625-37.
60. Zeng, L., et al., *HDAC3 is crucial in shear- and VEGF-induced stem cell differentiation toward endothelial cells*. J Cell Biol, 2006. 174(7): p. 1059-69.
61. Oh, I.Y., et al., *Involvement of E-selectin in recruitment of endothelial progenitor cells and angiogenesis in ischemic muscle*. Blood, 2007. 110(12): p. 3891-9.
62. Peichev, M., et al., *Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors*. Blood, 2000. 95(3): p. 952-8.
63. Asahara, T., et al., *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis*. Science, 1997. 275(5302): p. 964-7.
64. Hristov, M., W. Erl, and P.C. Weber, *Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. 23(7): p. 1185-9.
65. DeLisser, H.M., et al., *Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis*. Am J Pathol, 1997. 151(3): p. 671-7.
66. Timmermans, F., et al., *Endothelial progenitor cells: identity defined?* J Cell Mol Med, 2009. 13(1): p. 87-102.
67. Crosby, J.R., et al., *Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation*. Circ Res, 2000. 87(9): p. 728-30.
68. Murayama, T., et al., *Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo*. Exp Hematol, 2002. 30(8): p. 967-72.
69. Hur, J., et al., *Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. 24(2): p. 288-93.
70. O'Neill, T.J.t., et al., *Mobilization of bone marrow-derived cells enhances the angiogenic response to hypoxia without transdifferentiation into endothelial cells*. Circ Res, 2005. 97(10): p. 1027-35.

71. Walter, D.H., et al., *Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells*. *Circulation*, 2002. 105(25): p. 3017-24.
72. Werner, N., et al., *Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. 22(10): p. 1567-72.
73. Kong, D., et al., *Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cells*. *Circulation*, 2004. 109(14): p. 1769-75.
74. Moldovan, N.I. and T. Asahara, *Role of blood mononuclear cells in recanalization and vascularization of thrombi: past, present, and future*. *Trends Cardiovasc Med*, 2003. 13(7): p. 265-9.
75. Shi, Q., et al., *Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells*. *Blood*, 1998. 92(2): p. 362-7.
76. Silvestre, J.S., et al., *Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells in ischemic apolipoprotein E-knockout mice accelerates atherosclerosis without altering plaque composition*. *Circulation*, 2003. 108(23): p. 2839-42.
77. Kalka, C., et al., *Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(7): p. 3422-7.
78. Murohara, T., *Therapeutic vasculogenesis using human cord blood-derived endothelial progenitors*. *Trends Cardiovasc Med*, 2001. 11(8): p. 303-7.
79. Kawamoto, A., et al., *Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia*. *Circulation*, 2001. 103(5): p. 634-7.
80. Kocher, A.A., et al., *Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function*. *Nat Med*, 2001. 7(4): p. 430-6.
81. Taguchi, A., et al., *Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model*. *J Clin Invest*, 2004. 114(3): p. 330-8.
82. Asahara, T., et al., *Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization*. *Circ Res*, 1999. 85(3): p. 221-8.
83. Asahara, T., et al., *VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells*. *Embo J*, 1999. 18(14): p. 3964-72.

84. Werner, N., et al., *Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury*. *Circ Res*, 2003. 93(2): p. e17-24.
85. Leistner, D.M., et al., *Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy*. *Clin Res Cardiol*, 2011.
86. Stamm, C., et al., *Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2007. 133(3): p. 717-25.
87. Stamm, C., et al., *Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration*. *Lancet*, 2003. 361(9351): p. 45-6.
88. Klein, H.M., et al., *Intramyocardial implantation of CD133+ stem cells improved cardiac function without bypass surgery*. *Heart Surg Forum*, 2007. 10(1): p. E66-9.
89. Valgimigli, M., et al., *CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure*. *Circulation*, 2004. 110(10): p. 1209-12.
90. Everaert, B.R., et al., *Current perspective of pathophysiological and interventional effects on endothelial progenitor cell biology: focus on PI3K/AKT/eNOS pathway*. *Int J Cardiol*, 2010. 144(3): p. 350-66.
91. Askari, A.T., et al., *Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy*. *Lancet*, 2003. 362(9385): p. 697-703.
92. Shintani, S., et al., *Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction*. *Circulation*, 2001. 103(23): p. 2776-9.
93. Yamaguchi, J., et al., *Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization*. *Circulation*, 2003. 107(9): p. 1322-8.
94. Powell, T.M., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(2): p. 296-301.
95. Takahashi, T., et al., *Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization*. *Nat Med*, 1999. 5(4): p. 434-8.
96. Heeschen, C., et al., *Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization*. *Blood*, 2003. 102(4): p. 1340-6.

97. Bahlmann, F.H., et al., *Endothelial progenitor cell proliferation and differentiation is regulated by erythropoietin*. *Kidney Int*, 2003. 64(5): p. 1648-52.
98. Gill, M., et al., *Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells*. *Circ Res*, 2001. 88(2): p. 167-74.
99. Rafii, S. and D. Lyden, *Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration*. *Nat Med*, 2003. 9(6): p. 702-12.
100. Strehlow, K., et al., *Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation*. *Circulation*, 2003. 107(24): p. 3059-65.
101. Laufs, U., et al., *Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects*. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2005. 12(4): p. 407-14.
102. Laufs, U., et al., *Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis*. *Circulation*, 2004. 109(2): p. 220-6.
103. Huang, P.H., et al., *Intake of red wine increases the number and functional capacity of circulating endothelial progenitor cells by enhancing nitric oxide bioavailability*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. 30(4): p. 869-77.
104. Llevadot, J., et al., *HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow--derived endothelial progenitor cells*. *J Clin Invest*, 2001. 108(3): p. 399-405.
105. Vasa, M., et al., *Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease*. *Circulation*, 2001. 103(24): p. 2885-90.
106. Oliveras, A., et al., *Endothelial progenitor cells are reduced in refractory hypertension*. *J Hum Hypertens*, 2008. 22(3): p. 183-90.
107. Ma, F.X., et al., *Oxidized low density lipoprotein impairs endothelial progenitor cells by regulation of endothelial nitric oxide synthase*. *J Lipid Res*, 2006. 47(6): p. 1227-37.
108. Kondo, T., et al., *Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. 24(8): p. 1442-7.
109. Tepper, O.M., et al., *Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures*. *Circulation*, 2002. 106(22): p. 2781-6.

110. MacEneaney, O.J., et al., *Endothelial progenitor cell number and colony-forming capacity in overweight and obese adults*. Int J Obes (Lond), 2009. 33(2): p. 219-25.
111. Müller, P., et al., *Pressure-induced cardiac overload induces upregulation of endothelial and myocardial progenitor cells*. Cardiovasc Res, 2008. 77(1): p. 151-9.
112. Aicher, A., et al., *Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells*. Nat Med, 2003. 9(11): p. 1370-6.
113. Murohara, T., et al., *Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia*. J Clin Invest, 1998. 101(11): p. 2567-78.
114. Ziche, M., et al., *Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P*. J Clin Invest, 1994. 94(5): p. 2036-44.
115. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. 288(5789): p. 373-6.
116. Ignarro, L.J., et al., *Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation*. J Pharmacol Exp Ther, 1988. 244(1): p. 181-9.
117. Palmer, R.M., D.S. Ashton, and S. Moncada, *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine*. Nature, 1988. 333(6174): p. 664-6.
118. Förstermann, U., et al., *Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions*. Hypertension, 1994. 23(6 Pt 2): p. 1121-31.
119. Michel, T. and O. Feron, *Nitric oxide synthases: which, where, how, and why?* J Clin Invest, 1997. 100(9): p. 2146-52.
120. Morris, S.M., Jr. and T.R. Billiar, *New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis*. Am J Physiol, 1994. 266(6 Pt 1): p. E829-39.
121. Nathan, C., *Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make?* J Clin Invest, 1997. 100(10): p. 2417-23.
122. Welch, G. and J. Loscalzo, *Nitric oxide and the cardiovascular system*. J Card Surg, 1994. 9(3): p. 361-71.
123. Xie, Q. and C. Nathan, *The high-output nitric oxide pathway: role and regulation*. J Leukoc Biol, 1994. 56(5): p. 576-82.
124. Schwarz, P., et al., *Endogenous and exogenous nitric oxide inhibits norepinephrine release from rat heart sympathetic nerves*. Circ Res, 1995. 77(4): p. 841-8.

125. Moncada, S. and A. Higgs, *The L-arginine-nitric oxide pathway*. N Engl J Med, 1993. 329(27): p. 2002-12.
126. Kelly, R.A., J.L. Balligand, and T.W. Smith, *Nitric oxide and cardiac function*. Circ Res, 1996. 79(3): p. 363-80.
127. Busse, R., I. Fleming, and V.B. Schini, *Nitric oxide formation in the vascular wall: regulation and functional implications*. Curr Top Microbiol Immunol, 1995. 196: p. 7-18.
128. Fleming, I. and R. Busse, *Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003. 284(1): p. R1-12.
129. Ignarro, L.J., *Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties*. Faseb J, 1989. 3(1): p. 31-6.
130. Dierks, E.A. and J.N. Burstyn, *Nitric oxide (NO), the only nitrogen monoxide redox form capable of activating soluble guanylyl cyclase*. Biochem Pharmacol, 1996. 51(12): p. 1593-600.
131. Förstermann, U., et al., *Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries*. Circ Res, 1986. 58(4): p. 531-8.
132. Alheid, U., J.C. Frölich, and U. Förstermann, *Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets*. Thromb Res, 1987. 47(5): p. 561-71.
133. Busse, R., A. Luckhoff, and E. Bassenge, *Endothelium-derived relaxant factor inhibits platelet activation*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1987. 336(5): p. 566-71.
134. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide*. Br J Pharmacol, 1987. 92(3): p. 639-46.
135. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. 148(3): p. 1482-9.
136. Bath, P.M., et al., *Nitric oxide and prostacyclin. Divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro*. Arterioscler Thromb, 1991. 11(2): p. 254-60.
137. Kubes, P. and D.N. Granger, *Nitric oxide modulates microvascular permeability*. Am J Physiol, 1992. 262(2 Pt 2): p. H611-5.

138. Kubes, P., M. Suzuki, and D.N. Granger, *Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(11): p. 4651-5.
139. Nakaki, T., M. Nakayama, and R. Kato, *Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells*. Eur J Pharmacol, 1990. 189(6): p. 347-53.
140. Nunokawa, Y. and S. Tanaka, *Interferon-gamma inhibits proliferation of rat vascular smooth muscle cells by nitric oxide generation*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. 188(1): p. 409-15.
141. Li, H. and U. Förstermann, *Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease*. J Pathol, 2000. 190(3): p. 244-54.
142. Förstermann, U., *Endothelial NO synthase as a source of NO and superoxide*. European Journal of Clinical Pharmacology, 2006. 62(0): p. 5-12.
143. Dimmeler, S. and A.M. Zeiher, *Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide*. Nitric Oxide, 1997. 1(4): p. 275-81.
144. Kim, Y.M., C.A. Bombeck, and T.R. Billiar, *Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis*. Circ Res, 1999. 84(3): p. 253-6.
145. Mohan, P., et al., *Myocardial contractile response to nitric oxide and cGMP*. Circulation, 1996. 93(6): p. 1223-9.
146. Buys, E.S., et al., *Cardiomyocyte-restricted restoration of nitric oxide synthase 3 attenuates left ventricular remodeling after chronic pressure overload*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. 293(1): p. H620-7.
147. Hudlicka, O., *Is physiological angiogenesis in skeletal muscle regulated by changes in microcirculation?* Microcirculation, 1998. 5(1): p. 7-23.
148. Fukumura, D., et al., *Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(5): p. 2604-9.
149. Papapetropoulos, A., et al., *Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells*. J Clin Invest, 1997. 100(12): p. 3131-9.
150. Lee, P.C., et al., *Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice*. Am J Physiol, 1999. 277(4 Pt 2): p. H1600-8.
151. Vasa, M., et al., *Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease*. Circ Res, 2001. 89(1): p. E1-7.

152. Gerdes, J., et al., *Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67*. J Immunol, 1984. 133(4): p. 1710-5.
153. Newman, P.J., *The role of PECAM-1 in vascular cell biology*. Ann N Y Acad Sci, 1994. 714: p. 165-74.
154. Grassi, F., et al., *Bone re/modeling is more dynamic in the endothelial nitric oxide synthase(-/-) mouse*. Endocrinology, 2006. 147(9): p. 4392-9.
155. Baylis, C., B. Mitruka, and A. Deng, *Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage*. The Journal of Clinical Investigation, 1992. 90(1): p. 278-281.
156. Ribeiro, M.O., et al., *Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension*. Hypertension, 1992. 20(3): p. 298-303.
157. Devlin, A.M., et al., *Vascular smooth muscle cell polyploidy and cardiomyocyte hypertrophy due to chronic NOS inhibition in vivo*. Am J Physiol, 1998. 274(1 Pt 2): p. H52-9.
158. Rikitake, Y., et al., *Decreased perivascular fibrosis but not cardiac hypertrophy in ROCK1 +/- haploinsufficient mice*. Circulation, 2005. 112(19): p. 2959-65.
159. Bartunek, J., et al., *Chronic N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension : novel molecular adaptation to systolic load in absence of hypertrophy*. Circulation, 2000. 101(4): p. 423-9.
160. Kurisu, S., et al., *Cardiac angiotensin II type 2 receptor activates the kinin/NO system and inhibits fibrosis*. Hypertension, 2003. 41(1): p. 99-107.
161. de Oliveira, C.F., et al., *Development of cardiomyocyte hypertrophy in rats under prolonged treatment with a low dose of a nitric oxide synthesis inhibitor*. Eur J Pharmacol, 2000. 391(1-2): p. 121-6.
162. Rossi, M.A., S.G. Ramos, and C.M. Prado, *Chronic inhibition of nitric oxide synthase induces hypertension and cardiomyocyte mitochondrial and myocardial collagen remodelling in the absence of hypertrophy*. J Hypertens, 2003. 21(5): p. 993-1001.
163. Babal, P., et al., *Chronic inhibition of NO synthesis produces myocardial fibrosis and arterial media hyperplasia*. Histol Histopathol, 1997. 12(3): p. 623-9.
164. Moreno, H., Jr., et al., *Chronic nitric oxide inhibition as a model of hypertensive heart muscle disease*. Basic Res Cardiol, 1996. 91(3): p. 248-55.
165. Kimura, M., et al., *Mast cell degranulation in rat mesenteric venule: effects of L-NAME, methylene blue and ketotifen*. Pharmacol Res, 1999. 39(5): p. 397-402.

166. Huang, P.L., et al., *Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase*. Nature, 1995. 377(6546): p. 239-42.
167. Shesely, E.G., et al., *Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(23): p. 13176-81.
168. Ichinose, F., et al., *Pressure overload-induced LV hypertrophy and dysfunction in mice are exacerbated by congenital NOS3 deficiency*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. 286(3): p. H1070-5.
169. Ruetten, H., et al., *Concentric left ventricular remodeling in endothelial nitric oxide synthase knockout mice by chronic pressure overload*. Cardiovasc Res, 2005. 66(3): p. 444-53.
170. Takimoto, E., et al., *Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load*. J Clin Invest, 2005. 115(5): p. 1221-31.
171. Bubikat, A., et al., *Local atrial natriuretic peptide signaling prevents hypertensive cardiac hypertrophy in endothelial nitric-oxide synthase-deficient mice*. J Biol Chem, 2005. 280(22): p. 21594-9.
172. Calderone, A., et al., *Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts*. J Clin Invest, 1998. 101(4): p. 812-8.
173. Ritchie, R.H., et al., *Angiotensin II-induced hypertrophy of adult rat cardiomyocytes is blocked by nitric oxide*. Am J Physiol, 1998. 275(4 Pt 2): p. H1370-4.
174. Soonpaa, M.H. and L.J. Field, *Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis*. Circ Res, 1998. 83(1): p. 15-26.
175. Anversa, P. and J. Kajstura, *Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart*. Circ Res, 1998. 83(1): p. 1-14.
176. Beltrami, A.P., et al., *Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction*. N Engl J Med, 2001. 344(23): p. 1750-7.
177. Bergmann, O., et al., *Evidence for cardiomyocyte renewal in humans*. Science, 2009. 324(5923): p. 98-102.
178. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. J Cell Physiol, 2000. 182(3): p. 311-22.
179. Hsieh, P.C., et al., *Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury*. Nat Med, 2007. 13(8): p. 970-4.

180. Pasumarthi, K.B., et al., *Enhanced cardiomyocyte DNA synthesis during myocardial hypertrophy in mice expressing a modified TSC2 transgene*. *Circ Res*, 2000. 86(10): p. 1069-77.
181. Urbanek, K., et al., *Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(18): p. 10440-5.
182. Walsh, S., et al., *Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation in vivo--an analysis based on cardiomyocyte nuclei*. *Cardiovasc Res*, 2010. 86(3): p. 365-73.
183. Cui, X., et al., *cGMP-independent nitric oxide signaling and regulation of the cell cycle*. *BMC Genomics*, 2005. 6: p. 151.
184. Burlew, B.S. and K.T. Weber, *Cardiac fibrosis as a cause of diastolic dysfunction*. *Herz*, 2002. 27(2): p. 92-8.
185. Pellman, J., R.C. Lyon, and F. Sheikh, *Extracellular matrix remodeling in atrial fibrosis: mechanisms and implications in atrial fibrillation*. *J Mol Cell Cardiol*, 2010. 48(3): p. 461-7.
186. van Rijsingen, I.A., et al., *Exercise related ventricular arrhythmias are related to cardiac fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy mutation carriers*. *Neth Heart J*, 2011. 19(4): p. 168-174.
187. Kim, N.N., et al., *Regulation of cardiac fibroblast extracellular matrix production by bradykinin and nitric oxide*. *J Mol Cell Cardiol*, 1999. 31(2): p. 457-66.
188. Nakayama, T., et al., *Endothelial injury due to eNOS deficiency accelerates the progression of chronic renal disease in the mouse*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009. 296(2): p. F317-27.
189. O'Riordan, E., et al., *Chronic NOS inhibition actuates endothelial-mesenchymal transformation*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. 292(1): p. H285-94.
190. Steed, M.M., et al., *Functional consequences of the collagen/elastin switch in vascular remodeling in hyperhomocysteinemic wild-type, eNOS^{-/-}, and iNOS^{-/-} mice*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010. 299(3): p. L301-11.
191. Shiojima, I., et al., *Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure*. *J Clin Invest*, 2005. 115(8): p. 2108-18.
192. Landmesser, U., et al., *Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase*. *Circulation*, 2004. 110(14): p. 1933-9.

193. Murohara, T., et al., *Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19(5): p. 1156-61.
194. Kubis, N., et al., *Decreased arteriolar density in endothelial nitric oxide synthase knockout mice is due to hypertension, not to the constitutive defect in endothelial nitric oxide synthase enzyme*. *J Hypertens*, 2002. 20(2): p. 273-80.
195. Zhao, X., X. Lu, and Q. Feng, *Deficiency in endothelial nitric oxide synthase impairs myocardial angiogenesis*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. 283(6): p. H2371-8.
196. Kuhn, M., et al., *The natriuretic peptide/guanylyl cyclase--a system functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in mice*. *J Clin Invest*, 2009. 119(7): p. 2019-30.
197. Beltrami, A.P., et al., *Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration*. *Cell*, 2003. 114(6): p. 763-76.
198. Ingram, D.A., et al., *Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells*. *Blood*, 2005. 105(7): p. 2783-6.
199. Anatskaya, O.V. and A.E. Vinogradov, *Genome multiplication as adaptation to tissue survival: evidence from gene expression in mammalian heart and liver*. *Genomics*, 2007. 89(1): p. 70-80.
200. Thum, T., et al., *Bone marrow molecular alterations after myocardial infarction: Impact on endothelial progenitor cells*. *Cardiovasc Res*, 2006. 70(1): p. 50-60.
201. Ii, M., et al., *Endothelial progenitor cells are rapidly recruited to myocardium and mediate protective effect of ischemic preconditioning via "imported" nitric oxide synthase activity*. *Circulation*, 2005. 111(9): p. 1114-20.
202. You, D., et al., *Increase in vascular permeability and vasodilation are critical for proangiogenic effects of stem cell therapy*. *Circulation*, 2006. 114(4): p. 328-38.
203. Sasaki, K., et al., *Ex vivo pretreatment of bone marrow mononuclear cells with endothelial NO synthase enhancer AVE9488 enhances their functional activity for cell therapy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(39): p. 14537-41.
204. Goligorsky, M.S., *Microvascular rarefaction: The decline and fall of blood vessels*. *Organogenesis*, 2010. 6(1): p. 1-10.
205. Perry, T.E., et al., *Bone marrow-derived cells do not repair endothelium in a mouse model of chronic endothelial cell dysfunction*. *Cardiovasc Res*, 2009. 84(2): p. 317-25.

7 Dank

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Professor Dr. med. Ulrich Laufs für die Überlassung des interessanten Themas und für das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit bedanken. Er hat diese Arbeit mit seiner Erfahrung und Ideen immer wieder vorangetrieben.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinem Betreuer Herrn Dr. med. Patrick Müller bedanken, der mich jederzeit tatkräftig und moralisch unterstützt hat.

Herrn Dr. med. Andrey Kazakov danke ich recht herzlich für die Zusammenarbeit und seine ständige Hilfsbereitschaft.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des kardiologischen Forschungslabors, insbesondere den medizinisch-technischen Assistentin Frau Simone Jäger, Frau Ellen Becker und Frau Irina Hartmann für ihren jederzeit tatkräftigen Beistand und der freundlichen Zusammenarbeit.

Zudem danke ich meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht und somit den Weg für diese Arbeit geebnet haben.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jagoda
Vorname: Philippe
Anschrift: Kirrberger Straße 11 A
66424 Homburg
Tel.: 017623597362
Geburtsdatum: 11.12.1982
Geburtsort: Viersen
Familienstand: ledig
Eltern: Dieter Jagoda, Diplom-Physiker
Brigitte Jagoda, Diplom-Dolmetscherin

Schulausbildung

1989 – 1991 Erich-Simdorn Grundschule Neuberg
1991- 1993 Thomas-Mann-Grundschule Zweibrücken
1993-2002 Abitur am Helmholtz-Gymnasium Zweibrücken

Zivildienst

2002 – 2003 am Universitätsklinikum des Saarlandes

Studium

Oktober 2003 – September 2004 Lehramtstudium für Sport und Mathematik an der Universität des Saarlandes
Oktober 2004 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
September 2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 2007 bis Juni 2009 experimentelle Doktorarbeit bei Herrn Prof. Dr. med. Laufs in der Klinik für Innere Medizin III (Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin) der Universität des Saarlandes

November 2010 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Seit April 2011 Assistenzarzt in der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie
am Universitätsklinikum Homburg/Saar tätig

Sonstige Aktivitäten

Wissenschaftlicher Mitarbeiter des Instituts der Anatomie als Helfer im anatomischen
Präparierkurs von Oktober 2006 – Februar 2007

Oktober 2007 – Februar 2008

9 Publikationen

Originalarbeiten

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

Under revision:

Müller P, Kazakov A, **Jagoda P**, Semenov A, Böhm M, Laufs U
Endothelial nitric oxide synthase of the bone marrow regulates myocardial hypertrophy and fibrosis

Abstracts

Müller P, **Jagoda P**, Kazakov A, Semenov A, Böhm M, Laufs U (2009)
Regulation der kardialen Angiogenese bei Nachlasterhöhung durch EPC aus dem Knochenmark
Clin Res Cardiol; 98: Suppl 1,: P 1317.

Müller P, **Jagoda P**, Kazakov A, Semenov A, Böhm M, Laufs U (2009)
Regulation of cardiac angiogenesis in pressure overload by endothelial progenitor cells from the bone marrow
Eur Heart J; 30 (Abstract Suppl): 500: P3083.

Müller P, **Jagoda P**, Kazakov A, Semenov A, Böhm M, Laufs U (2009)
Endothelial Nitric Oxide Synthase of the Bone Marrow Regulates Cardiac Angiogenesis in Pressure Overload.
Circulation; 120:S_865: V3816.

Müller P, Kazakov A, Semenov A, **Jagoda P**, Böhm M, Laufs U (2010)
Differierende Effekte von ACE-Inhibitor und AT1-Rezeptorblocker bei kardialer Nachlasterhöhung ohne zusätzliche Vorteile der Kombinationstherapie.
Clin Res Cardiol 99, Suppl 1, : P1335.

Müller P, Kazakov A, Semenov A, **Jagoda P**, Böhm M, Laufs U (2010)
Combination therapy with ACE-inhibitors and AT1-receptor-blockers has no additional benefit in experimental cardiac pressure overload despite minor differences between the two treatments
Eur Heart J; 31 (Abstract Suppl):7: V176