

Aus der Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Transplantations-, Gefäß- und  
Thoraxchirurgie der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Karl-Walter Jauch

**Eine Adiponectin-Vorbehandlung wirkt den  
ungünstigen Effekten eines diabetischen Milieus auf  
endotheliale Vorläuferzellen entgegen**

Dissertation  
zum  
Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der medizinischen Fakultät  
der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von  
Simon Franz Karl Leicht  
aus München  
2013

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München**

**Berichterstatter:** **Prof. Dr. med. Christopher Heeschen**

**Mitberichterstatter:** **Prof. Dr. Oliver Schnell**  
**Priv. Doz. Dr. Bärbel Otto**  
**Prof. Dr. Eberhard Standl**

**Dekan:** **Prof. Dr. med. Dr. h.c. Reiser, FACR, FRCR**

**Tag der mündlichen Prüfung:** **07.02.2013**

# 1. Inhaltsverzeichnis

<b>1. Inhaltsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>2. Zusammenfassung</b>	<b>4</b>
<b>3. Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>4. Material &amp; Methoden</b>	<b>10</b>
4.1 <i>Isolation humaner Progenitorzellen</i>	10
4.2 <i>Bestimmung der Blutadiponectinspiegel</i>	11
4.3 <i>Durchflusszytometrie</i>	11
4.4 <i>mRNA-Expression</i>	12
4.5 <i>Knock-down von AdipoR1 und AdipoR2</i>	12
4.6 <i>Bestimmung der in vitro-Migrationsfähigkeit der Progenitorzellen</i>	13
4.7 <i>Western Blot</i>	13
4.8 <i>Echtzeitdarstellung der Superoxidproduktion in vitro</i>	14
4.9 <i>Messung von Prostaglandin E<sub>2</sub>- und NO-Spiegeln in Zellkulturüberständen</i>	14
4.10 <i>Tiermodelle</i>	14
4.11 <i>Histologische Untersuchungen</i>	15
4.12 <i>Statistik</i>	16
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>17</b>
5.1 <i>Populationsverdopplungszeit bei ECFC von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2</i>	17
5.2 <i>Phänotypische Evaluierung der hECFC und dmECFC</i>	18
5.3 <i>Globuläres Adiponectin stimuliert die Proliferation der ECFC</i>	21
5.4 <i>Mechanismen der gestörten Proliferation der dmECFC</i>	25
5.5 <i>Die Behandlung mit gAcrp verbessert die migratorische Aktivität der dmECFC</i>	31
5.6 <i>Die Fähigkeit zur in vivo-Neovaskularisation ist bei dmECFC eingeschränkt und kann durch gAcrp-Gabe wiederhergestellt werden</i>	32
5.7 <i>Die Effekte der Vorbehandlung bestehen im hyperglykämischen Milieu fort</i>	36
<b>6. Diskussion</b>	<b>39</b>
<b>7. Ausblick</b>	<b>43</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>44</b>
<b>9. Anhang</b>	<b>45</b>
<b>10. Literaturverzeichnis</b>	<b>46</b>

## 2. Zusammenfassung

Endotheliale Vorläuferzellen bei Patienten mit Diabetes mellitus sind dysfunktional. Bisher fehlen jedoch wirkungsvolle Therapien, um diese Funktionsstörung zu rekonstituieren. Da Adiponectin positive Effekte auf die Endothelfunktion hat, wurden in der vorliegenden Arbeit die funktionellen Auswirkungen einer Behandlung von endothelialen koloniebildenden Zellen (*endothelial colony-forming cells*; ECFC) mit globulärem Adiponectin (gAcrp), der aktiven Domäne des Adiponectins, untersucht.

ECFC wurden aus Peripherblut von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 (dmECFC) isoliert und mit ECFC von jungen, gesunden Probanden (yECFC) sowie gleichaltrigen Probanden ohne Diabetes mellitus (hECFC) verglichen. Die Zellen wurden über 48 Stunden mit gAcrp behandelt und anschließend hinsichtlich Zellzahl, Zellzyklus und Migrationsfähigkeit untersucht. Zur Evaluation *in vivo* wurden menschliche ECFC in normoglykämische, athyme NMRI nu/nu Mäuse, sowie in Mäuse mit Streptozotocin-induzierter Hyperglykämie injiziert, die zuvor einer einseitigen Hinterlaufischämieoperation unterzogen wurden.

Während dmECFC im Vergleich zu yECFC und hECFC eine funktionelle Beeinträchtigung zeigten, verbesserte gAcrp deren Proliferation und Migration signifikant. Diese Effekte waren allerdings bei hECFC ausgeprägter als bei dmECFC und sind über den Cyclooxygenase-2-Weg vermittelt. Besonders hervorzuheben ist jedoch, dass eine deutliche und anhaltende Verbesserung der *in vivo*-Neovaskularisation im Vergleich zu unbehandelten dmECFC beobachtet werden konnte, wenn die Tiere mit gAcrp-vorbehandelten Zellen behandelt wurden. Dieser Behandlungserfolg stellte sich sowohl unter normoglykämischen, als auch unter hyperglykämischen Bedingungen ein.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung von ECFC mit gAcrp deren Funktionalität *in vitro* und *in vivo* unter normoglykämischen, wie auch unter hyperglykämischen Bedingungen verbessert. Eine Zelloptimierung mittels gAcrp vor Zelltherapie könnte also ein neuartiger Ansatz sein, um der funktionellen Beeinträchtigung von ECFC bei Diabetikern zu begegnen.

### **3. Einleitung**

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind weiterhin die häufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland wie auch in der gesamten westlichen Welt. In der Bundesrepublik starben in 2010 insgesamt 353.000 Menschen an Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Das Statistische Bundesamt listet die chronische ischämische Herzkrankheit, den akuten Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz als häufigste zum Tode führende Diagnosen. Unter den zehn häufigsten Ursachen finden sich weiterhin der Schlaganfall und die hypertensive Herzkrankheit (1).

Bei Patienten, die an Diabetes mellitus leiden, treten diese Erkrankungen früher und stärker in Erscheinung. Die ersten Daten aus einem größeren Patientenkollektiv stammen aus der Framinghamstudie. Die Autoren konnten damals anhand der 20-Jahre-*follow-up*-Daten zeigen, dass Patienten, die an Diabetes leiden, ein etwa doppelt so großes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen hatten, wie dies bei Nichtdiabetikern der Fall war. Die Herzinsuffizienz trat demnach bei männlichen Diabetikern beinahe doppelt so häufig, bei weiblichen Diabetikern sogar beinahe viermal so häufig auf wie bei Gesunden. Ein ähnliches Bild zeigte sich beim Risiko für die koronare Herzkrankheit. Auch Schlaganfälle traten mehr als doppelt so häufig auf wie bei der gesunden Vergleichsgruppe (2).

Andere Studien kommen sogar noch zu akzentuierten Ergebnissen. So ist in einer Studie ein etwa 2,5faches Risiko für das Entstehen einer Herzinsuffizienz für Patienten mit Diabetes mellitus im Vergleich zu gesunden Vergleichsprobanden beschrieben (3). Das relative Risiko für einen Herzinfarkt beträgt bei männlichen Patienten mit Diabetes mellitus laut einer schwedischen Studie von Lundberg et al. 2,9, bei weiblichen Patienten sogar 5,0 bei gleichzeitig höherem Risiko für einen fatalen Ausgang des Ereignisses (4).

Doch nicht nur diese akut bedrohlichen Erkrankungen sind beim Diabetiker häufiger. Gerade sich schleichend entwickelnde Erkrankungen wie die diabetische Retinopathie, die diabetische Nephropathie sowie das diabetische Fußsyndrom sind mit langen und für den

Patienten stark beeinträchtigenden Verläufen vergesellschaftet. Dies alles belastet nicht nur den Patienten selbst, sondern bedeutet auch eine große sozioökonomische Belastung (5).

Sowohl den akuten als auch den chronisch verlaufenden kardiovaskulären Erkrankungen gemein ist die zugrundeliegende Gefäßschädigung, deren Progression zwar mittels Reduktion der Risikofaktoren als auch pharmakotherapeutisch gemindert werden kann, für die aber bislang wirkungsvolle Therapiestrategien fehlen.

Im Laufe der letzten Jahre ist die regenerative Medizin vermehrt in den Fokus der Wissenschaft gerückt und hat in Folge auch zu vermehrter Präsenz dieser Thematik in den Medien und in der Öffentlichkeit geführt.

Da die Selbstregeneration des Körpers einerseits beschränkt ist, andererseits, wie oben erwähnt, das Aufhalten der Progression vorhandener Pathologien in vielen Fällen mit einem fortbestehenden Funktionsverlust, bedingt durch Gewebeuntergang, verknüpft ist, sucht die regenerative Medizin Wege, diesen Funktionsverlust durch Steigerung des Regenerationspotentials des körpereigenen Gewebes als auch durch einen Ersatz von untergegangenem Gewebe durch autologes oder allogenes Material auszugleichen.

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung von transplantierbarem Gewebe, seien es Zellen zur zellbasierten Therapie oder Gewebeverbände, dienen hierbei Stammzellen, die die Eigenschaft besitzen, sich in alle oder zumindest mehrere Zellarten der drei Keimblätter und damit unterschiedlichste Gewebetypen auszudifferenzieren.

Erstere, die so genannten embryonalen Stammzellen, werden aus der inneren Zellmasse von Blastozysten gewonnen und haben die Fähigkeit eine unbestimmte Zeit weiter zu wachsen und dabei ihre Pluripotenz zu erhalten (6; 7). Aufgrund dieser Eigenschaft sind sie in vielen Ländern Gegenstand intensiver Forschung, gerieten aber auch aufgrund ethisch-moralischer Diskussionen durch den Gewinnungsmodus beim Menschen in die Kritik.

Im Laufe der letzten Jahre tat sich noch eine weitere Möglichkeit auf, die die Vorteile von embryonalen Stammzellen im Hinblick auf die mögliche Ausdifferenzierung mit einer relativ einfachen Gewinnung frei von größeren ethischen Bedenken vereint. Diese induzierten pluripotenten Stammzellen wurden erstmals 2006 von Takahashi und Yamanaka

beschrieben. Die Autoren zeigten, dass mittels Zugabe von vier Faktoren, Oct3/4, Sox2, c-Myc und Klf4, zu Fibrozyten, die unter Zellkulturbedingungen wie für embryonale Stammzellen üblich gehalten wurden, diese zu Zellen reprogrammiert werden konnten, die die Fähigkeit besaßen, sich wie embryonale Stammzellen in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren (6).

Die adulten Stamm- und Progenitorzellen, welche als postnatale Stammzellen definiert sind, sind zwar aufgrund ihrer geringeren Differenzierungsfähigkeiten eingeschränkter in ihren Einsatzmöglichkeiten, jedoch einfach z.B. aus dem Blut oder dem Knochenmark von Patienten zu gewinnen. Somit können sie auch für eine autologe Transplantation von den zukünftigen Empfängern selbst entnommen werden.

Das prominenteste Beispiel für eine Therapie mit adulten Stammzellen ist die Knochenmarktransplantation, die schon seit vielen Jahren in der klinischen Routine durchgeführt wird. Über diese blutbildenden Stammzellen hinaus fanden sich im Laufe der letzten Jahre noch in vielen weiteren Geweben adulte Stamm- und Progenitorzellen, die für die unterschiedlichsten Gewebe ein gewisses regeneratorisches Potential besitzen.

In der Literatur verdichten sich die Hinweise aus experimentellen und frühen klinischen Studien, die vermuten lassen, dass endotheliale Vorläuferzellen, die aus dem Knochenmark ins periphere Blut mobilisiert werden, in Gebiete ischämisch geschädigten Gewebes einwandern und dort zur Neovaskularisation beitragen, wodurch die Gewebeperfusion verbessert und so die Geweberegeneration unterstützt wird (8-10). Auch wenn für endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und aus dem peripheren Blut in verschiedensten experimentellen und klinischen Ansätzen bereits eindrücklich gezeigt werden konnte, dass sie in der Lage sind, die Neovaskularisation zu verbessern, ist der klinische Einsatz sogenannter früher endothelialer Progenitorzellen durch deren begrenztes Proliferationsvermögen und eher monozytären Phänotyp beschränkt (3; 6; 7; 11-14).

Im Gegensatz dazu bilden die endothelialen koloniebildenden Zellen (*endothelial colony-forming cells*, ECFC) eine äußerst homogene Subpopulation der endothelialen

Vorläuferzellen. Diese zeichnen sich durch großes proliferatives Potential und eine starke endotheliale Prägung aus (14).

ECFC können aus Nabelschnurblut gewonnen werden. Auch eine Isolation aus Peripherblut ist möglich. Hierbei wiederum kann das Blut von gesunden Probanden, als auch von Patienten (z.B. mit Diabetes mellitus) verwendet werden. Aufgrund dieser manigfältigen Gewinnungsmöglichkeiten erscheinen ECFC daher für eine zellbasierte Therapie zur Gefäßregeneration sehr geeignet. Zwar zeigen aus Nabelschnurblut gewonnene Zellen eine hohe proliferative Kapazität im Vergleich zu Peripherblut-ECFC, doch ist deren klinische Anwendung durch die Notwendigkeit einer mit der Zelltherapie einhergehenden immunsuppressiven Therapie begrenzt. Andererseits sind die Vorläuferzellen, die von Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren und Erkrankungen, einschließlich Diabetes mellitus, isoliert wurden, hinsichtlich der verfügbaren Zellzahl eingeschränkt, dysfunktional und werden mit gestörter Gefäßhomöostase und –funktion in Zusammenhang gebracht (15-17). Außerdem zeigen Progenitorzellen *in vitro* eine Funktionseinschränkung, wenn sie erhöhten Glucosespiegeln ausgesetzt werden (18-20). Deshalb ist es beim Entwickeln zellbasierter Therapieregime, die Nutzen aus den Neovaskularisationsfähigkeiten autologer, endothelialer Vorläuferzellen ziehen möchten, unabdingbar, auch Strategien zur Aufhebung der funktionellen Defizite einzubeziehen, die durch die Erkrankung an den Zellen hervorgerufen wurden. Diese müssen dann beispielsweise, wie im Folgenden dargestellt, auf die Zellen von Diabetikern angewandt werden, bevor diese *in vivo* eingesetzt werden.

Zahlreiche Studien berichteten über eine enge Assoziation zwischen den Blutspiegeln von Adiponectin (auch bekannt als *adipocyte complement-related protein of 30 kDa, Acrp30*) – einem Hormon, das aus Adipozyten stammt – und Diabetes mellitus Typ 2. Während bei Typ-2-Diabetes niedrigere Adiponectinspiegel nachgewiesen werden konnten (21), zeigten Menschen mit hohen Serumadiponectinspiegeln ein geringeres Risiko einen Diabetes zu entwickeln (22; 23). Darüberhinaus sind höhere Adiponectinspiegel mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit assoziiert, eine Insulinresistenz oder einen Typ 2-Diabetes zu entwickeln (24-26). Deshalb untersuchten wir die Effekte, die durch eine Behandlung von ECFC von

Patienten mit Typ 2-Diabetes (dmECFC) mit der aktiven Domäne des Adiponectins, dem sogenannten globulären Adiponectin (gAcrp), hinsichtlich Zellzahl und –funktion zu erzielen sind. Wir konnten zeigen, dass sich globuläres Adiponectin sehr gut als Vorbehandlung eignet, um dmECFC vor ihrem Einsatz in der Zelltherapie funktionell zu rekonstituieren. Besonders hervorzuheben ist die Tatsache, dass die Effekte, die durch die Vorbehandlung erzielt werden konnten, auch in einer hyperglykämischen Umgebung persistierten und auch in hyperglykämischen Mäuse nach Hinterlaufischämie zu einer funktionellen Verbesserung führten. Dies ist im Hinblick auf die klinische Relevanz der gAcrp-Vorbehandlung von besonderer Bedeutung.

## 4. Material & Methoden

### 4.1 Isolation humaner Progenitorzellen

Peripherblut wurde von Patienten mit Typ-2-Diabetes und einem HbA1c > 7,5 % [n=8; Männer und postmenopausale Frauen, 60±5,8 Jahre alt] einerseits, von gleichaltrigen Kontrollprobanden, die nicht an Diabetes mellitus litten [n=5; Männer und postmenopausale Frauen, 66±3,6 Jahre alt] (siehe Anhang, Tabelle 1) andererseits, sowie von jungen, gesunden Männern [n=5; 26,4±0,8 Jahre alt] entnommen. Letztere dienten als Quelle für voll funktionsfähige ECFC. Die Blutentnahme wurde nach ausführlicher Aufklärung, reichlicher Überlegung seitens der Patienten und schriftlicher Einwilligung vorgenommen.

Die Isolation und Kultivierung der ECFC wurde, wie von Yoder et al. zuvor beschrieben, durchgeführt (27). Hierzu wurde Vollblut aus einer peripheren Vene entnommen, zunächst mit PBS verdünnt und anschließend der Ficoll-Dichtezentrifugation zugeführt. Die so gewonnenen Zellen wurden sodann in 6-well-Zellkulturplatten kultiviert. Diese wurden zuvor mit Rattenschwanzcollagen Typ 1 beschichtet (BD Biosciences, Bedford, MA). Als Kulturmedium diente endotheliales Basalmedium-2 (EBM-2), dem 10% FCS (*fetal calf serum*, fetales Kälberserum) und EGM-2 SingleQuots (hEGF, hFGF-B, VEGF, Ascorbinsäure, Hydrocortison, Long-R3-IGF-1, Heparin und Gentamicin / Amphotericin) zugesetzt waren. Nach 24 Stunden wurden nicht-adhäsente Zellen und Debris entfernt. Während der ersten sieben Tage wurde das Medium täglich, danach alle zwei Tage gewechselt bis sich Zellkolonien zeigten. Die Kolonien wurden unter Verwendung von Trypsin gezielt mit der Pipette entnommen, in neue Zellkulturplatten überführt und für die Experimente weiter expandiert. Die so gewonnenen Zellen wurden anschließend während der letzten 48 Stunden mit PBS (Kontrolle) oder humanem, rekombinantem gAcp30 (1 µg/ml; Peprotech, Hamburg, Germany) in Gegenwart oder Abwesenheit von Parecoxib (100 µM; Dynastat™; Pfizer Inc., New York, NY, USA), Superoxiddismutase (300 U/ml; Sigma, Steinheim, Deutschland) oder L-NMA (1 mM; Sigma, Steinheim, Deutschland) behandelt.

Parallel dazu wurden ECFC von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und gesunden Kontrollen zur Ermittlung der Populationsverdopplungszeit über mindestens 25 Tage in Kultur gehalten. Die Zellen wurden regelmäßig bei einer Konfluenz von etwa 80% gesplittet, die Zellzahl wurde gezählt und 500.000 Zellen anschließend in einer neuen Kulturflasche wieder in Kultur genommen. Die Verdopplungszeit der Zellpopulation wurde wie folgt berechnet:

$$T_d = (t_2 - t_1) * \log(2) / \log(q_2 / q_1)$$

( $T_d$ : Verdopplungszeit der Population;  $t_2$ : zeitlicher Endpunkt;  $t_1$ : zeitlicher Startpunkt;  $q_2$ : Endpopulationsgröße;  $q_1$ : Startpopulationsgröße).

## 4.2 Bestimmung der Blutadiponectinspiegel

Bei der Blutabnahme wurden Spenderplasmaproben gewonnen und bei -20 °C konserviert. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden die Adiponectinplasmaspiegel mit dem Human Adiponectin ELISA Kit (Millipore, St. Charles, Missouri, USA) nach Herstellerangaben gemessen.

## 4.3 Durchflusszytometrie

Die Expression der Oberflächenmarker CD31, CD34 und VEGFR2 wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Zellen wurden anfangs mit Flebogamma (Grifols, Langen, Deutschland) vorbehandelt, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Anschließend wurden sie mit Antikörpern gegen die humane Oberflächenmoleküle CD31, CD34 (beide ebioscience, San Diego, CA, USA) und VEGFR2 (ReliaTech, Wolfenbüttel, Deutschland) gefärbt. Diese Färbungen wurden in frühen Passagen durchgeführt (Passage 8 bis 10). Jede Analyse beinhaltete  $10^5$  eingeschlossene Ereignisse.

Die Zellzyklusanalyse wurde mithilfe eines BrdU (Bromodesoxyuridin) Flow Kit (BD) anhand der Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen 2 Stunden mit BrdU inkubiert (“gepulst”).

Alle Proben wurden an einem FACSCalibur gemessen und mit der Software CELLQuest analysiert (beides BD).

#### **4.4 mRNA-Expression**

Zum Nachweis der spezifischen Adiponectin-Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 wurde die RNA sowohl von gesunden Kontrollen als auch von Diabetikern isoliert. Dies erfolgte mit einem RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben.

Die Quantifizierung von AdipoR1 und AdipoR2 mRNA wurde mit einer RT-PCR an 100 ng RNA unter Verwendung der zuvor beschriebenen Primer durchgeführt (28).

#### **4.5 Knock-down von AdipoR1 und AdipoR2**

Um die funktionelle Relevanz von AdipoR1 und AdipoR2 zu erfassen, transfizierten wir ECFC mit Accell siRNA (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) für AdipoR1 und/oder AdipoR2 nach Herstellerangaben. Danach wurde die Zellzahl in Abhängigkeit von einer Behandlung mit gAcpr erfasst.

## **4.6 Bestimmung der *in vitro*-Migrationsfähigkeit der Progenitorzellen**

Für diese Bestimmung wurden die Zellen über 48 Stunden mit 1 µg/ml gAcp, 100 µM Parecoxib, 300 U/ml Superoxiddismutase oder deren Kombinationen vorbehandelt.  $5 \times 10^5$  Zellen wurden jeweils in 250 µl DMEM + 5% FCS resuspendiert und in die obere Kammer einer modifizierten *Boyden* Kammer (BioCoat® invasion assay, 8 µm pore size, BD) eingebracht. Die obere Kammer wurde in eine 24-well-Zellkulturplatte mit 500 µl EGM-2 pro well eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Membranen vorsichtig aus den *boyden chambers* ausgeschnitten und auf Objektträgern die transmigrierten Zellen mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) angefärbt. Pro Probe wurden 4-6 Gesichtsfelder mit einem AxioScope 40 mit AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) bei 10facher Vergrößerung aufgenommen und mit der Software ImageJ (National Institutes of Health, USA) gezählt.

## **4.7 Western Blot**

Zur Bestimmung der Akt-Expression, einem prosurvival-Marker, wurden die Zellen über 6 Stunden in serumfreiem Medium gehalten, dann mit gAcp oder Insulin als Positivkontrolle behandelt und anschließend dem Western Blot zugeführt.

Dazu wurden die Zellen zunächst in Zellysepuffer mittels Ultraschall lysiert, die festen Zellbestandteile abzentrifugiert und dann die Proteinkonzentration im Lysat über den BCA Protein Assay (Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland) bestimmt.

Sodann wurden gleiche Proteinfesten jeder Probe durch Gelelektrophorese aufgetrennt und über einen klassischen Tankblot auf Nitrozellulose transferiert. Schließlich wurde die Membran zunächst mit Milchpulver geblockt, mit Akt-Antikörper behandelt, unspezifische Signale durch mehrere Waschschrifte reduziert und im letzten Schritt ein sekundärer Antikörper mit Meerrettichperoxidase aufgebracht. Dieser führte über die Oxidation von Luminol zu einer Chemolumineszenzreaktion, welche dann auf Film aufgenommen wurde.

## **4.8 Echtzeitdarstellung der Superoxidproduktion *in vitro***

Die Zellen wurden über 12 Stunden mit 1 µg/ml gAcrp stimuliert und anschließend während der letzten 10 Minuten vor Analyse mit MitoSOX Rot (Invitrogen, Barcelona, Spanien; 5 µM) inkubiert. Die Level des mitochondrialen Superoxides in Anwesenheit oder Abwesenheit von gAcrp wurden durch Quantifizierung der MitoSOX Rot-Intensität mittels eines konfokalen Leica SP2-Mikroskops bestimmt (Leica, Wetzlar, Deutschland).

## **4.9 Messung von Prostaglandin E<sub>2</sub>- und NO-Spiegeln in Zellkulturüberständen**

Zunächst wurden Zellkulturüberstände in einer Vakuumzentrifuge aufkonzentriert. Zur Spiegelbestimmung von Prostaglandin E<sub>2</sub> und NO wurden sodann ein Prostaglandin E<sub>2</sub> ELISA (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), sowie ein fluorometrischer NO Assay Kit (Biovision, Mountain View, CA, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt.

## **4.10 Tiermodelle**

Alle Tierversuche wurden entsprechend der institutionellen Richtlinien und nach Genehmigung durch das *Institutional Animal Care and Use Committee of the CNIO* (Madrid, Spanien), bzw. durch die Regierung von Oberbayern (München, Deutschland) durchgeführt. Weibliche, athyme NMRI *nu/nu* Nacktmäuse (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) kamen hierbei zur Verwendung. Zur Induktion eines Diabetes wurden die Tiere nach dem *low-dose streptozotocin induction protocol* des AMDCC (Animal Models of Diabetic Complications Consortium) behandelt. Hierfür wurden die Tiere über 4 Stunden nüchtern gehalten und erhielten anschließend eine intraperitoneale Injektion mit Streptozotocin (50 mg/kg Körpergewicht; Sigma). Diese Prozedur wurde über fünf Tage täglich wiederholt. Am 28. Tag wurde die Hyperglykämie über eine Bestimmung der Uringlucose mit einem Combur 10 Teststreifen (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) durchgeführt. Nur Tiere, die einen

minimalen Glucosegrad von 3+ (entspricht etwa >750 mg/dl) aufwiesen, wurden für die Experimente verwendet.

Normoglykämische und hyperglykämische Tiere wurden einer Hinterlaufischämieoperation unterzogen und 24 Stunden später intravenös mit  $5 \times 10^5$  ECFC pro Maus behandelt (29). Um eine Hinterlaufischämie zu erzeugen, wurde der proximale Teil der rechten Femoralarterie einschließlich der oberflächlichen und tiefen Äste durch Elektrokoagulation ligiert. Die darüberliegende Haut wurde mit chirurgischen Klammern verschlossen. Nach einer, respektive zwei Wochen wurde die Perfusion beider Hinterläufe mit einem O2C Laser Doppler mit LFM-2 Microsonde (2 mm tissue penetration; Lea Medizintechnik, Giessen, Deutschland) gemessen. Vor der Untersuchung wurden die Tiere auf eine 37°C warme Heizplatte gelegt, um Messunterschiede durch Schwankungen der Umgebungstemperatur zu minimieren. Die relative Perfusion wurde über den Quotienten aus Durchblutung von ischämischem und nicht-ischämischem Lauf errechnet.

Darüber hinaus untersuchten wir den Blutfluss mithilfe eines intravitalen Floureszenzbildgebungsverfahrens im Nahinfrarotbereich (30). Nach intravenöser Injektion des Fluorophors Indocyaningrün (ICG; Sigma) wurden Bilder in einem *in vivo*-Imaging System (IVIS)-200 (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA) aufgenommen und mit der Software Living Image<sup>TM</sup> 3.2 analysiert.

#### **4.11 Histologische Untersuchungen**

Der Einbau von ECFC in die ischämische Muskulatur wurde durch histologische Analysen mithilfe eines konfokalen Lasermikroskops untersucht. Hierzu wurden die Hinterläufe der Tiere am Ende der Experimente entnommen, in Kryomedium eingebettet und auf -20°C eingefroren. Die Proben wurden mit einem Ultramikrotom geschnitten, auf Objektträger aufgebracht und anschließend gefärbt. Lectin-FITC kam hierbei als Marker für endotheliale Zellen zum Einsatz. Humane Oberflächenmarker (Human-Leucocyte-Antigen A, B und C; HLA-ABC) wurden mit Alexa-647 gefärbt, um die transplantierten humanen Zellen im

murinen Gewebe zu identifizieren. Zudem wurden die Zellkerne mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), einem Farbstoff, der spezifisch den Zellkern darstellt, gefärbt.

In einem weiteren Experiment sollte geprüft werden, inwieweit ein verstärktes Einwandern der ECFC in den Zielbereich nach gAcp-Behandlung zu einer verbesserten Funktion führt. Hierzu wurden unbehandelte und gAcp-vorbehandelte dmECFC mit dem roten CellTracker CM-Dil gefärbt, bevor diese in Mäuse ( $5 \times 10^5$  Zellen/Maus) injiziert wurden, die 24 Stunden zuvor einer Hinterlaufischämieoperation unterzogen worden waren. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Tiere geopfert und wie oben genannt für eine histologische Untersuchung vorbereitet. Die Zellkerne wurden hier mit ToPro-3 angefärbt (beide Invitrogen, Deutschland). Dann wurden die Schnitte mit einem konfokalen Leica SP5 Mikroskop gescannt und die Zahl der ToPro-3<sup>+</sup>/CM-Dil<sup>+</sup> Zellen wurde gezählt. Anschließend wurde die Zellzahl pro gescanntem Feld errechnet.

## 4.12 Statistik

Die Ergebnisse für kontinuierliche Variablen sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Der Vergleich von kontinuierlichen Variablen wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test, gefolgt von einem paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Kategoriale Variablen wurden mit dem Pearson  $\chi^2$  Test verglichen. P-Werte  $< 0.05$  wurden als statistisch signifikant gewertet. Alle Analysen wurden mit SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Populationsverdopplungszeit bei ECFC von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2

Die Unterschiede in der Proliferation zwischen ECFC von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 (dmECFC) und ECFC von jungen, gesunden Probanden als maximalfunktionale Positivkontrolle (yECFC) wurden bestimmt. Nach nur fünf Tagen hatten die yECFC ihre Zahl im Vergleich zu den dmECFC bereits verdoppelt. An Tag 15 überragte die Population der yECFC die der dmECFC bereits um das 2,9fache, am Tag 25 gar um das 3,2fache. Die daraus errechnete Populationsverdopplungszeit betrug damit 6,7 Tage für dmECFC im Vergleich zu 4,6 Tagen bei yECFC ( $p<0,05$ ; Abbildung 1).

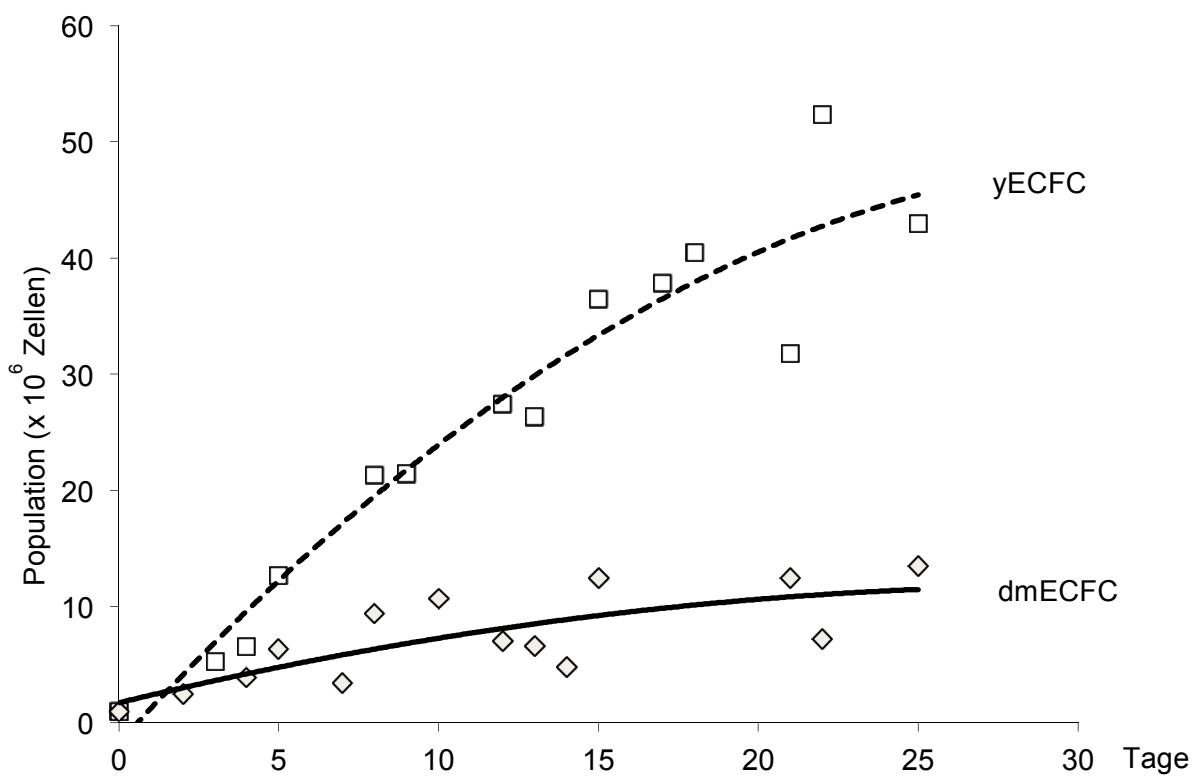


Abbildung 1: Die Proliferation von jungen, gesunden Kontrollen (yECFC; weiße Quadrate, gestrichelte Linie; n=5) und dmECFC (schwarze Rauten, durchgehende Linie; n=4) wurde anhand von Populationsverdopplungskurven verglichen ( $p<0,01$  dm ECFC versus yECFC).

Interessanterweise wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen yECFC und ECFC von gleichaltrigen nicht-Diabetikern (hECFC) hinsichtlich Zellzahl nach 48 Stunden in Kultur (Abbildung 2) festgestellt.

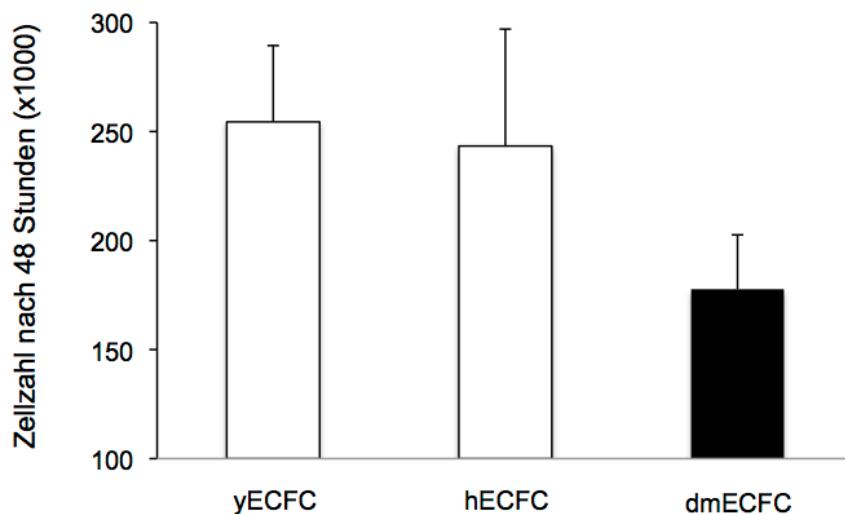


Abbildung 2: Zellzahlen von jungen, gesunden Kontrollen (yECFC; n=5), gleichaltrigen nicht-Diabetikern (hECFC; n=3) und Diabetikern (dmECFC; n=8) verglichen nach 48 Stunden in Kultur.

Da sich die anamnestischen Angaben zwischen den Spendern von hECFC und dmECFC nur hinsichtlich Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ 2, des *body mass index* (BMI) und der antidiabetischen Medikation unterschieden (siehe Anhang, Tabelle 1), stützen die Daten die Hypothese, dass die verminderte Funktion der dmECFC tatsächlich am ehesten dem Diabetes zuzuschreiben ist.

## 5.2 Phänotypische Evaluierung der hECFC und dmECFC

Die konventionelle Lichtmikroskopie zeigte bei dmECFC und hECFC eine Morphologie, die jener entsprach, die zuvor für ECFC, welche aus Nabelschnurblut gewonnen waren, beschrieben wurde (14) (Abbildung 3).

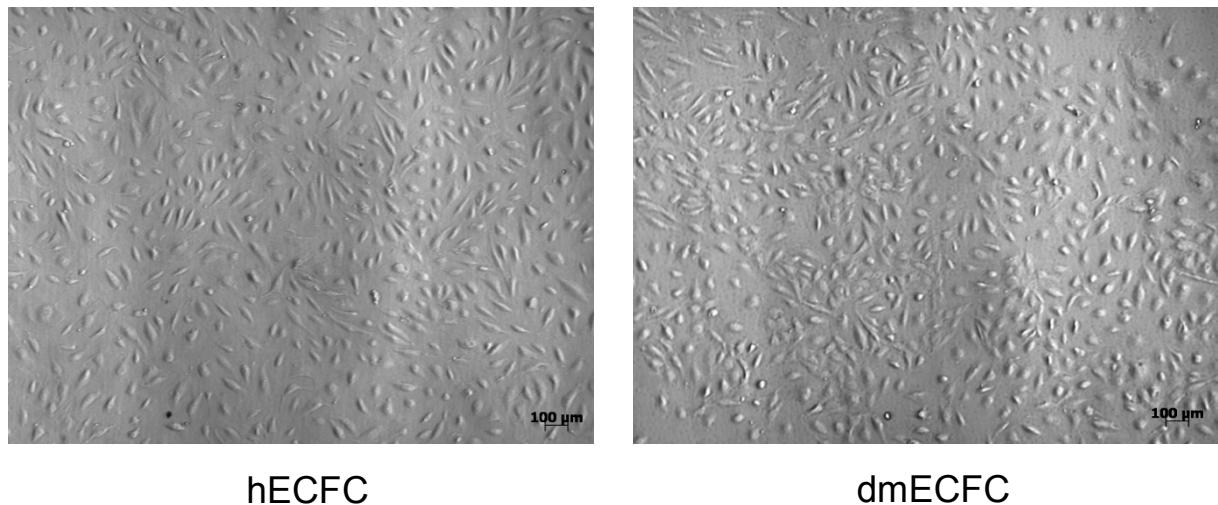


Abbildung 3: Typische ECFC-Morphologie bei hECFC und dmECFC im lichtmikroskopischen Vergleich. 40x Vergrößerung.

Wie in der Durchflusszytometrie ermittelt, war die Expression der endothelialen Marker CD31 und VEGFR-2, ebenso wie die des Vorläuferzellmarkers CD34 bei beiden Gruppen auf einem gleichen Level (Abbildung 4) und blieb im zeitlichen Verlauf unverändert (Abbildung 5).

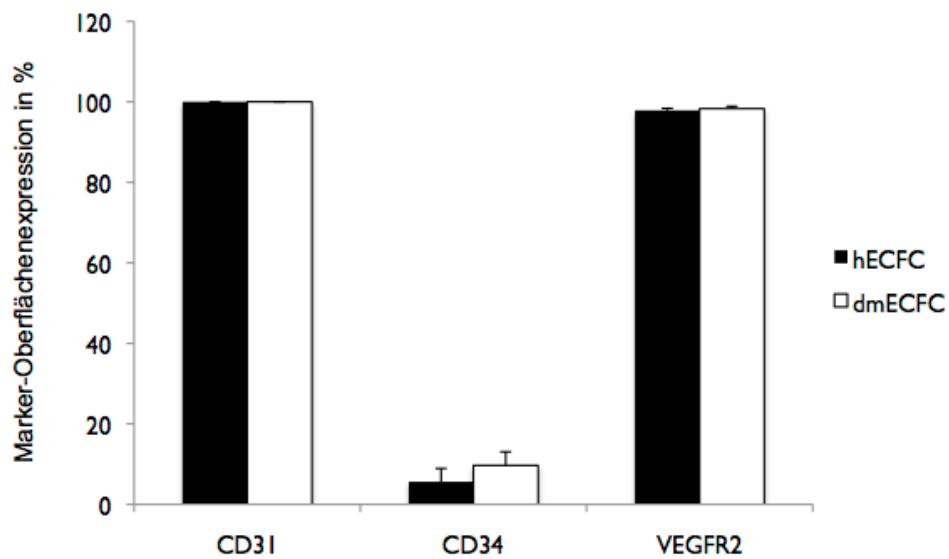


Abbildung 4: Expression endothelialer Oberflächen- und Progenitormarker bei dmECFC und hECFC (n=3).

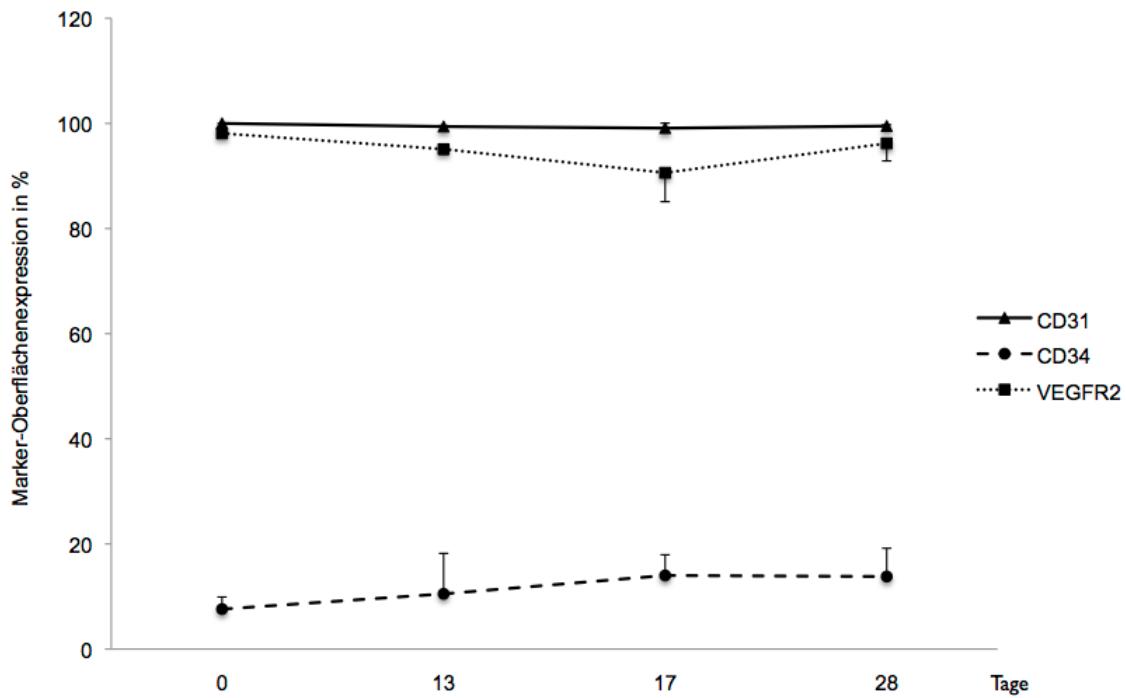


Abbildung 5: Die Expression von CD31, CD34 und VEGFR-2 wurde mittels Durchflusszytometrie im zeitlichen Verlauf gemessen.

Weiterhin zeigte eine Behandlung mit Adiponectin keine signifikanten Änderungen der Oberflächenexpression von CD31, CD34 oder VEGFR2 (Abbildung 6).

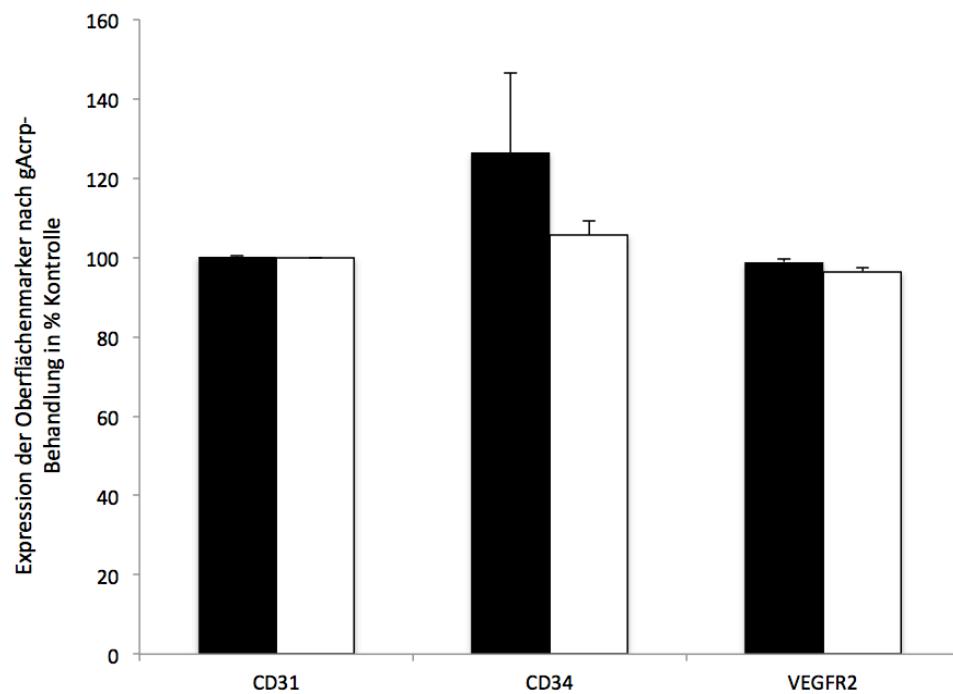


Abbildung 6: Änderungen in der Expression von CD31, CD34 und VEGFR2 bei ECFC von Diabetikern (weiße Säulen) und nicht-diabetischen gleichaltrigen Kontrollpersonen (schwarze Säulen) nach gAcrp-Behandlung.

Ein Unterschied der Expression von CD34 zeigte sich weder bei Behandlung mit gAcrp, noch zwischen Diabetikern und Gesunden. Hingegen ließ sich exemplarisch ein Expressionsunterschied in Abhängigkeit von der Zellkonfluenz messen (Abbildung 7).

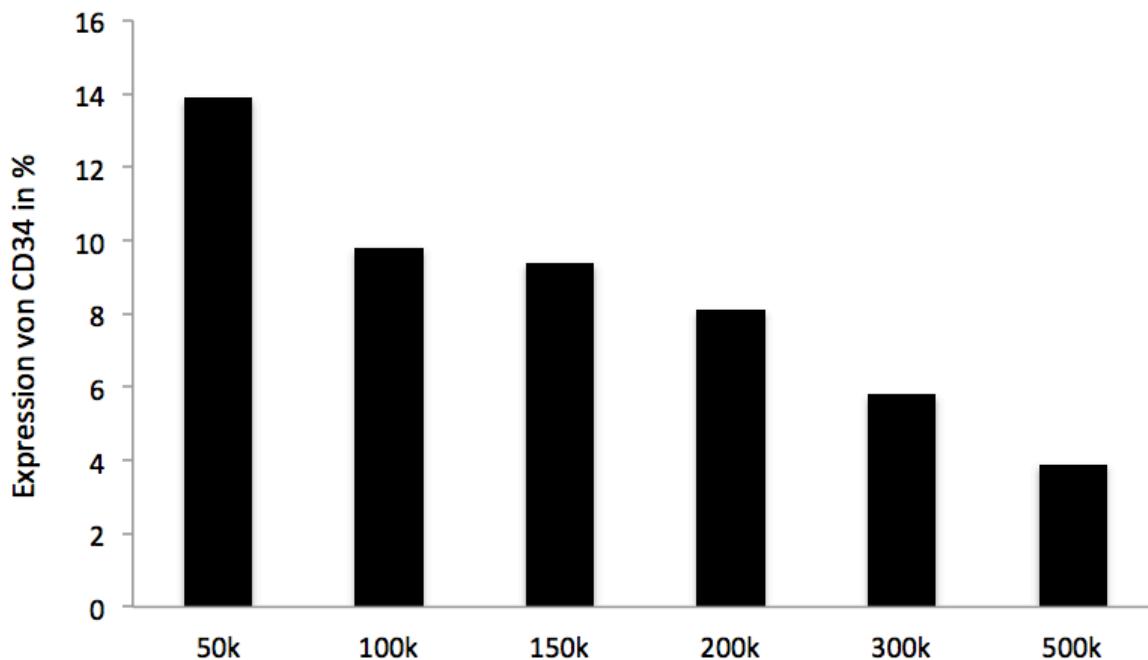


Abbildung 7: Abhängigkeit der CD34-Expression von der Zellkonfluenz in Kultur.

### 5.3 Globuläres Adiponectin stimuliert die Proliferation der ECFC

In der Literatur wurden niedrige Adiponectinspiegel bei Diabetikern im Vergleich zu Gesunden gefunden (21). Dieser Unterschied fand sich tendenziell auch bei den untersuchten Probanden dieser Studie. Die Nicht-Diabetiker wiesen im Schnitt Spiegel von  $10,7 \pm 1,5 \mu\text{g/ml}$  auf, während bei Diabetikern niedrigere Spiegel mit  $8,2 \pm 1,8 \mu\text{g/ml}$  gemessen wurden. Dieser Unterschied war jedoch bei der hier vorliegenden kleinen Fallzahl nicht signifikant.

Als Nächstes wurde der Effekt einer Vorbehandlung mit gAcrp auf die proliferative Kapazität der ECFC untersucht. Die *in vitro*-Vorbehandlung mit gAcrp über 48 Stunden führte zu einer signifikanten Steigerung der Zellzahl bei gleichaltrigen Nichtdiabetikern (hECFC;  $48,4 \pm 14,1 \%$  Steigerung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle der hECFC,  $p < 0,05$ ) und Diabetikern

(dmECFC;  $18 \pm 2,5$  % Steigerung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle der dmECFC,  $p < 0,05$ ) (Abbildung 8). Die ECFC der hyperglykämen Patienten reagierten somit signifikant schlechter auf die Behandlung mit gAcrp ( $p < 0,05$ ) als die ECFC der normoglykämen Probanden.

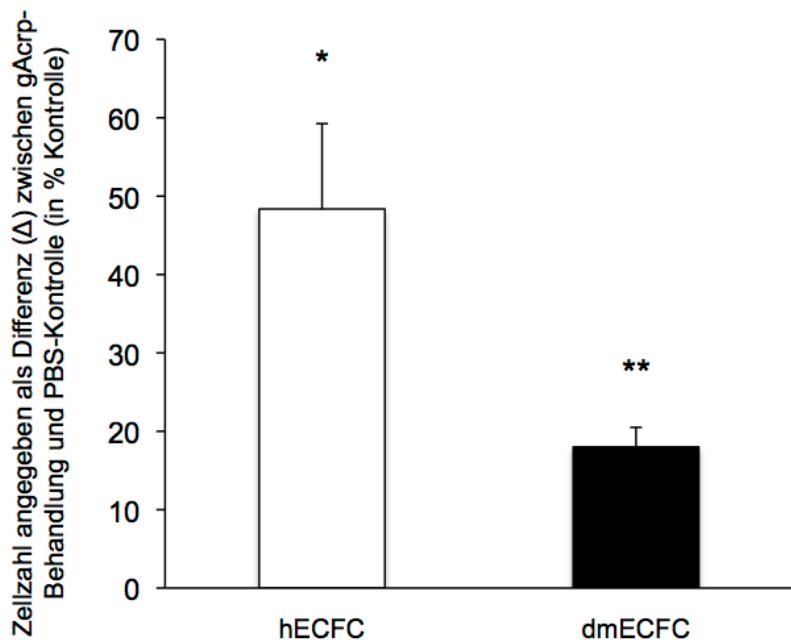


Abbildung 8: Zellzahlen von hECFC (n=3) und dmECFC (n=8) nach Stimulation mit 1 µg/ml gAcrp, angegeben als Differenz zwischen gAcrp-behandelt und PBS-Kontrolle (\*: p<0,05 vs. Kontrolle, \*\*: p<0,05 vs. Kontrolle und vs. hECFC).

Um den Mechanismus der höheren Zellzahl in der behandelten dmECFC-Gruppe weiter zu untersuchen, wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass eine Stimulation mit gAcrp die Fraktion der dmECFC in der S-Phase auf  $195,4 \pm 48,5\%$  im Vergleich zur Kontrolle erhöht ( $p < 0,05$ , Abbildung 9 & Abbildung 10).

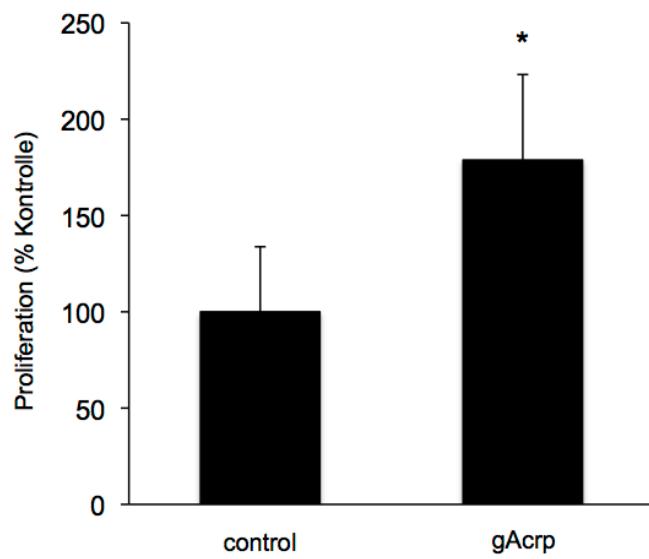


Abbildung 9: Proliferation gemessen als BrdU-Inkorporation nach Stimulation mit gAcrp (n=3; \*:  $p < 0,05$ ).

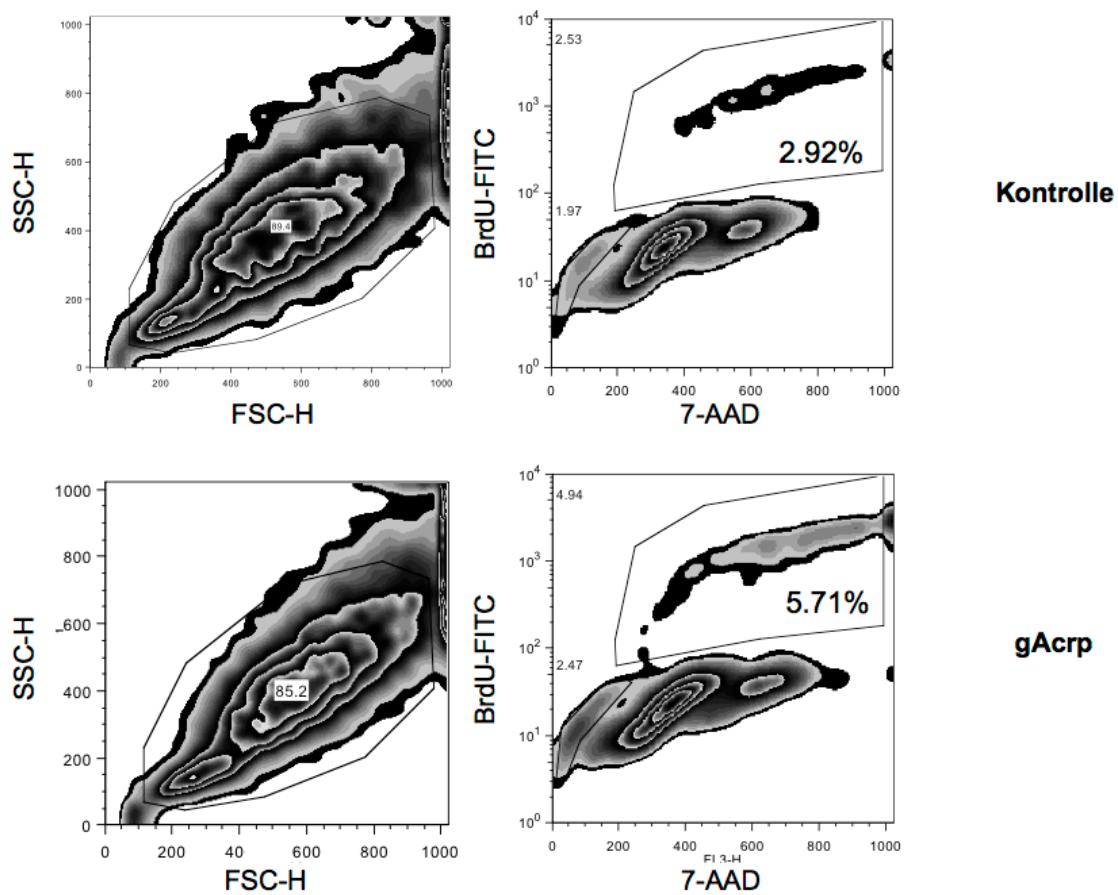


Abbildung 10: Repräsentative Abbildungen der zur Evaluation der BrdU-Inkorporation mittels Durchflusszytometrie gewählten *gating*-Strategie. Oben: Kontrolle. Unten: gAcrp.

Desweiteren wurde die Bedeutung des sog. *survivals* nach gAcp-Behandlung anhand des *prosurvival*-Proteins Akt untersucht. Es zeigte sich, dass gAcp in der Tat die Akt-Phosphorylierung, sowie das Gesamt-Akt hochregulierte. Insulin, die Positivkontrolle, führte zu einer vergleichbaren Hochregulation von Gesamt-Akt, während die Rate an phosphoryliertem Akt hier noch höher lag (Abbildung 11 & Abbildung 12).

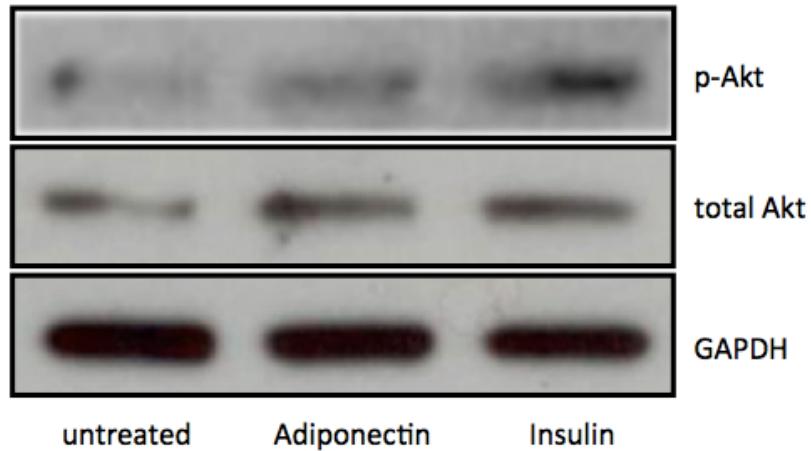


Abbildung 11: Expressionsbanden von phosphoryliertem Akt, Gesamt-Akt und dem *housekeeping gene* GAPDH.

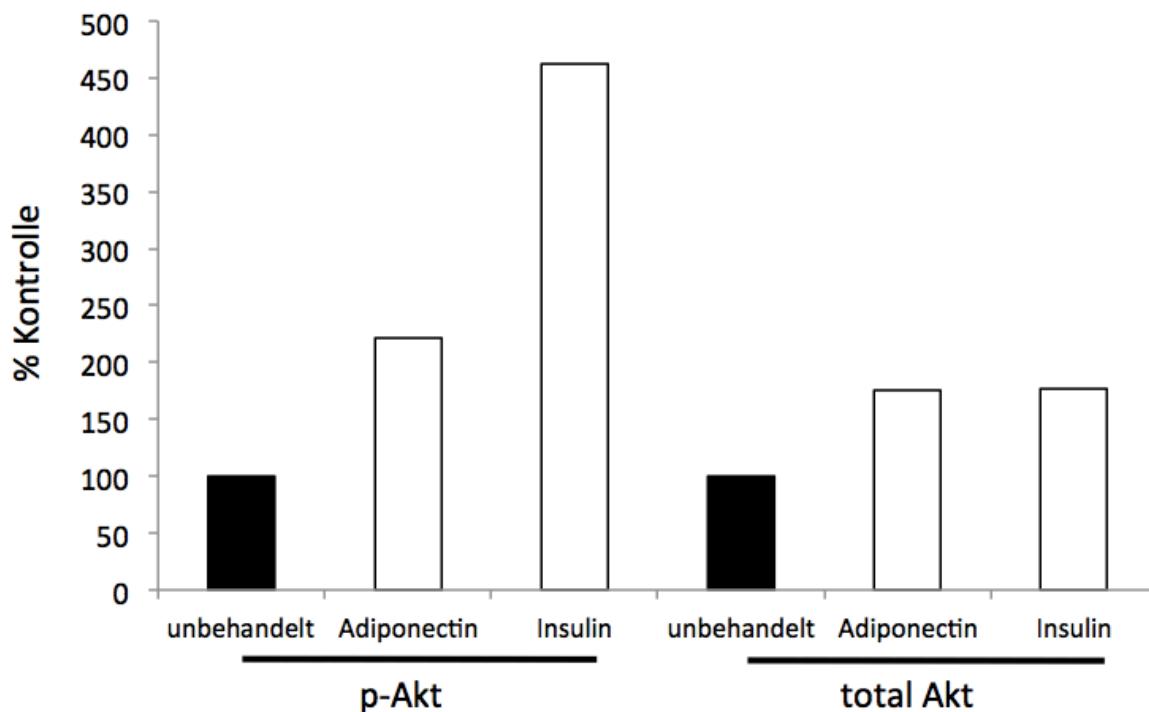


Abbildung 12: Expression von phosphoryliertem Akt (p-Akt) und Gesamt Akt (total Akt) bei unbehandelten, mit gAcpr behandelten Zellen und mit Insulin behandelten Kontrollzellen.

## 5.4 Mechanismen der gestörten Proliferation der dmECFC

Mithilfe der RT-PCR wurde untersucht, ob hECFC und dmECFC in ähnlicher Weise über die spezifischen Adiponectinrezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 verfügen (31). In der Tat exprimierten sowohl hECFC, als auch dmECFC AdipoR1 und AdipoR2 auf ähnlichen, hohen Leveln, die sich auch nicht von denen der yECFC unterschieden (Abbildung 13).

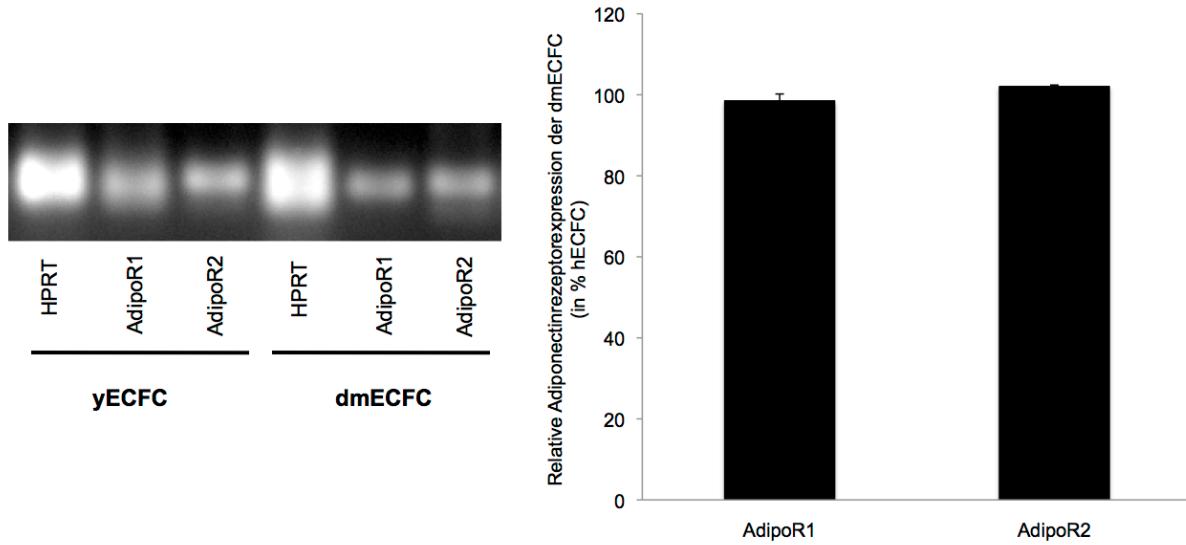


Abbildung 13: mRNA-Expression der spezifischen Adiponectinrezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 bei diabetischen und nicht-diabetischen ECFC. Links: RT-PCR an yECFC und dmECFC; Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) als Ladungskontrolle. Rechts: *realtime*-PCR an hECFC und dmECFC mit 18S rRNA als *housekeeping*-Gen.

Demnach wurde im Folgenden die Wirkung von gAcrp auf die Expansion *in vitro* untersucht.

Um den Mechanismus hinter der verminderten Antwort der dmECFC auf die gAcrp-Behandlung im Vergleich zu den hECFC weiter zu durchleuchten, wurde zunächst validiert, dass die Adiponectinrezeptoren bei den dmECFC tatsächlich funktionsfähig waren. Dazu wurden die mRNA von AdipoR1 und AdipoR2 mithilfe spezifischer siRNA ausgeschaltet (Abbildung 14).

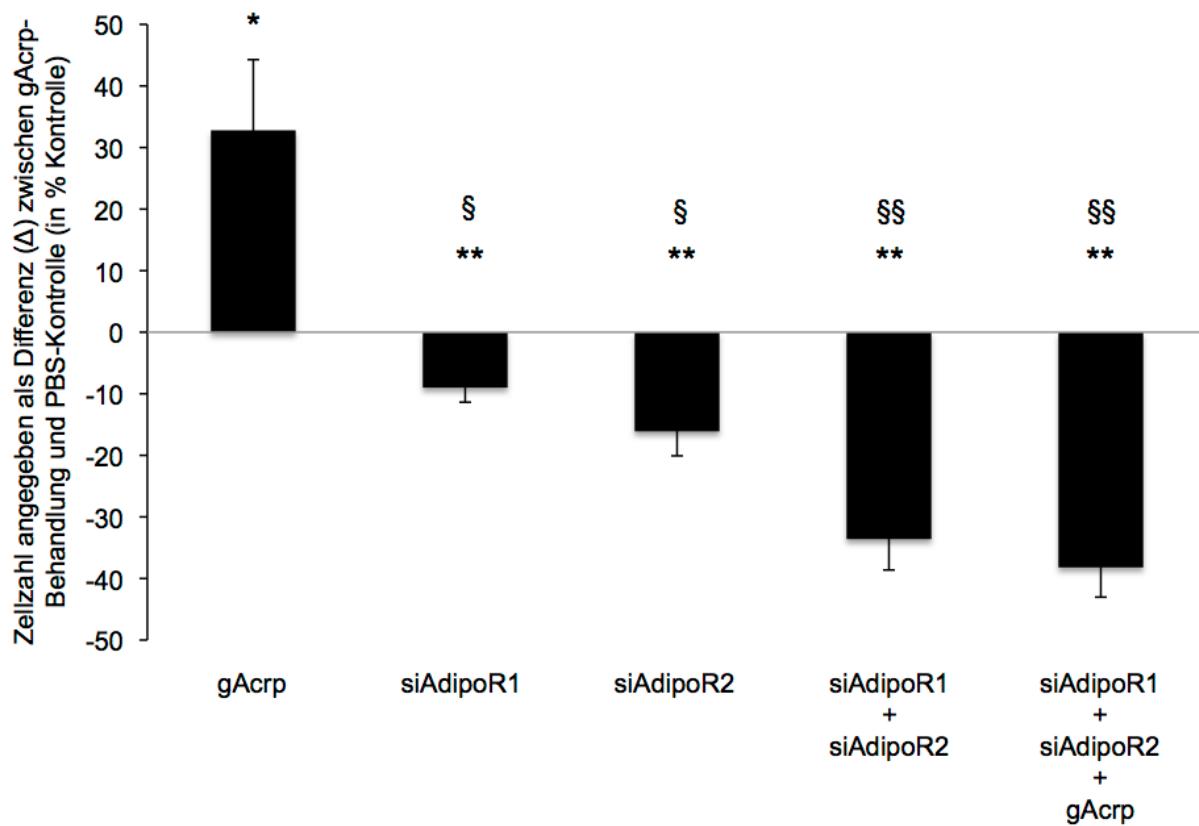


Abbildung 14: Die selektive Inhibition von AdipoR1 und AdipoR2 wurde mit Hilfe von siRNA durchgeführt. Die Stimulation der Zellen mit gAcrp wurde anhand der Zunahme der ECFC ermittelt (\*:  $p<0,05$  vs. Kontrolle, \*\*  $p<0,05$  vs. gAcrp, §  $p<0,05$  vs. AdipoR1+AdipoR2+gAcrp, §§  $p<0,05$  vs. AdipoR1+gAcrp and AdipoR2+gAcrp, n=3).

Die Ausschaltung der individuellen Rezeptoren AdipoR1 oder AdipoR2 oder der Kombination aus beiden führte zu einem signifikanten Abfall der Zellzahlen ( $p<0,05$ ), die durch eine Gabe von gAcrp nicht aufgehoben werden konnte. Diese Daten bestätigen, dass dmECFC funktionierende AdipoR1- und AdipoR2-Rezeptoren exprimieren.

Anschließend wurde der Fokus auf einen gesteigerten oxidativen Stress als Mechanismus der gestörten gAcrp-Antwort bei dmECFC gelegt, da die Dysfunktionalität endothelialer Vorläuferzellen bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 mit exzessiver Produktion von *reactive oxygen species* (ROS) in Zusammenhang gebracht wird (32). Um die weniger deutlichen stimulatorischen Effekte von gAcrp auf dmECFC im Vergleich zu hECFC zu kompensieren, wurden die Zellen zusätzlich mit Superoxiddismutase (SOD) behandelt, um den oxidativen Stress auf die Zellen zu vermindern. Während SOD alleine keine Auswirkungen auf die dmECFC-Zahl hatte, zeigte sich nach SOD-Behandlung eine

verbesserte Stimulierbarkeit der dmECFC ( $33,5 \pm 8,7\%$  Steigerung bei SOD+gAcrp) (Abbildung 15).

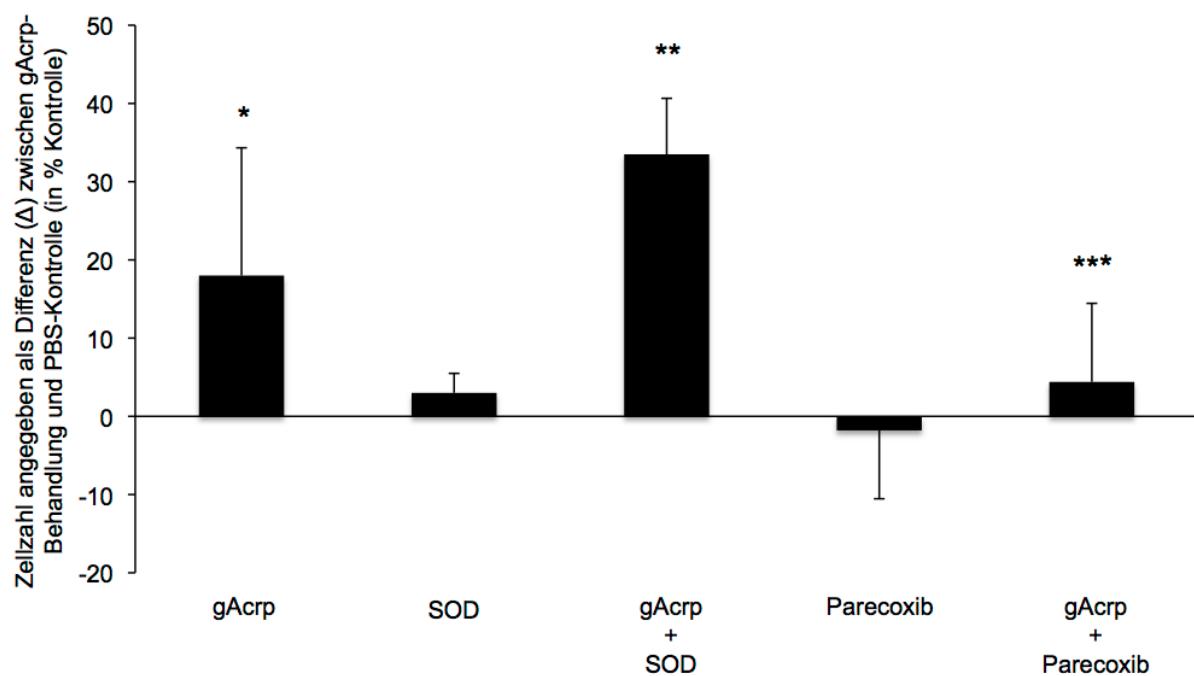


Abbildung 15: Effekt einer Behandlung von dmECFC mit gAcrp (n=7), Superoxiddismutase (SOD) (n=4), Parecoxib (n=6), allein oder in Kombination mit gAcrp auf die Zellzahl, angegeben als Differenz zwischen Behandlung und PBS-Kontrolle (\*: p<0.001 vs. Kontrolle; \*\*: p<0.05; \*\*\*: p< 0.01 vs. Kontrolle, p<0.05 vs. gAcrp).

Danach sollte geklärt werden, wie die gAcrp-Gabe den oxidativen Stress in ECFC beeinflusst. Dazu wurden hECFC und dmECFC über zwölf Stunden mit gAcrp behandelt und eine Echtzeitbildgebung der intrazellulären Produktion von Superoxidanionen mit MitoSOX Rot durchgeführt (Abbildung 16). Die Quantifizierung der Signalintensität ergab, dass die gAcrp-Vorbehandlung die Superoxidspiegel in diabetischen ECFC signifikant senken konnte (p<0.01). Deshalb wurde geschlussfolgert, dass die verminderten Effekte von gAcrp auf dmECFC zumindest teilweise superoxidabhängig sind oder mit Superoxid in Verbindung zu bringen sind.

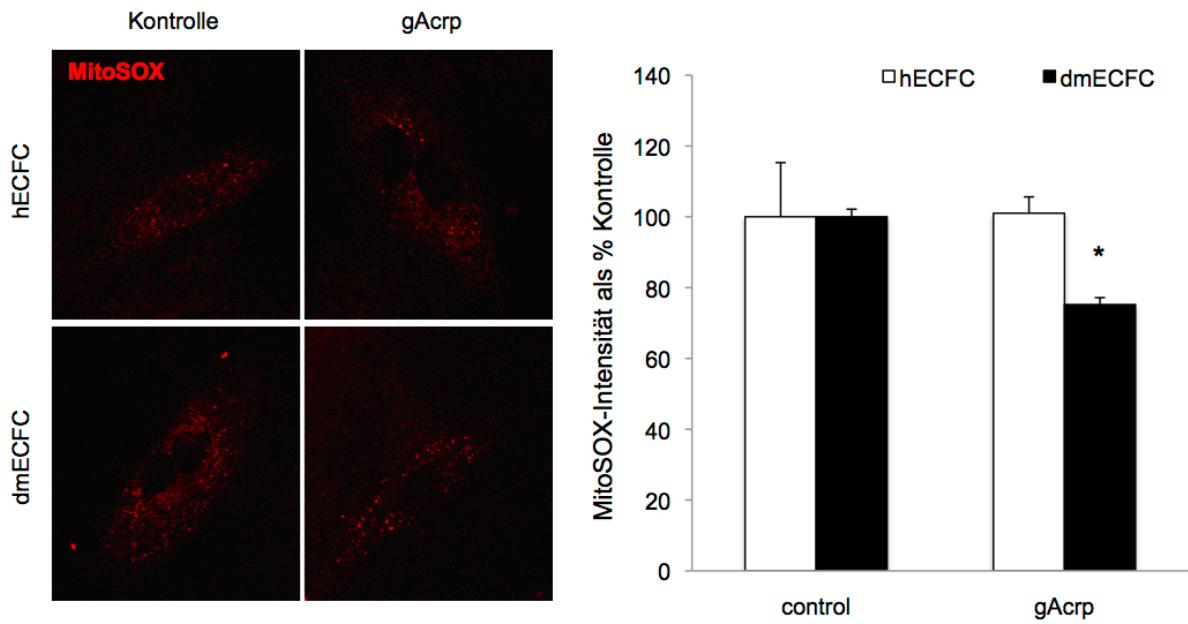


Abbildung 16: Effekte einer Vorbehandlung mit gAcrp auf die intrazelluläre Superoxidproduktion der ECFC. Repräsentative Echtzeitbilder (links) der unbehandelten und gAcrp-behandelten hECFC und dmECFC nach Inkubation mit MitoSOX Rot und Quantifizierung der MitoSOX-Intensität (rechts) (\*:  $p < 0,01$  vs. Kontrolle,  $n=3$ ).

Des Weiteren wurde in der Literatur beschrieben, dass Adiponectin eine Aktivierung des Cyclooxygenase-2-Weges (COX-2) induzieren und folglich die Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)-Produktion in Stromazellen steigern kann (33). Analog konnten wir zeigen, dass gAcrp die PGE<sub>2</sub>-Produktion in dmECFC erhöht ( $120 \pm 8,4\%$ ;  $p < 0,05$ ). Ebenfalls führte eine gleichzeitige Behandlung mit Parecoxib, einem selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitor, zu einer Aufhebung dieses Effekts ( $92 \pm 13,4\%$ , Abbildung 17).

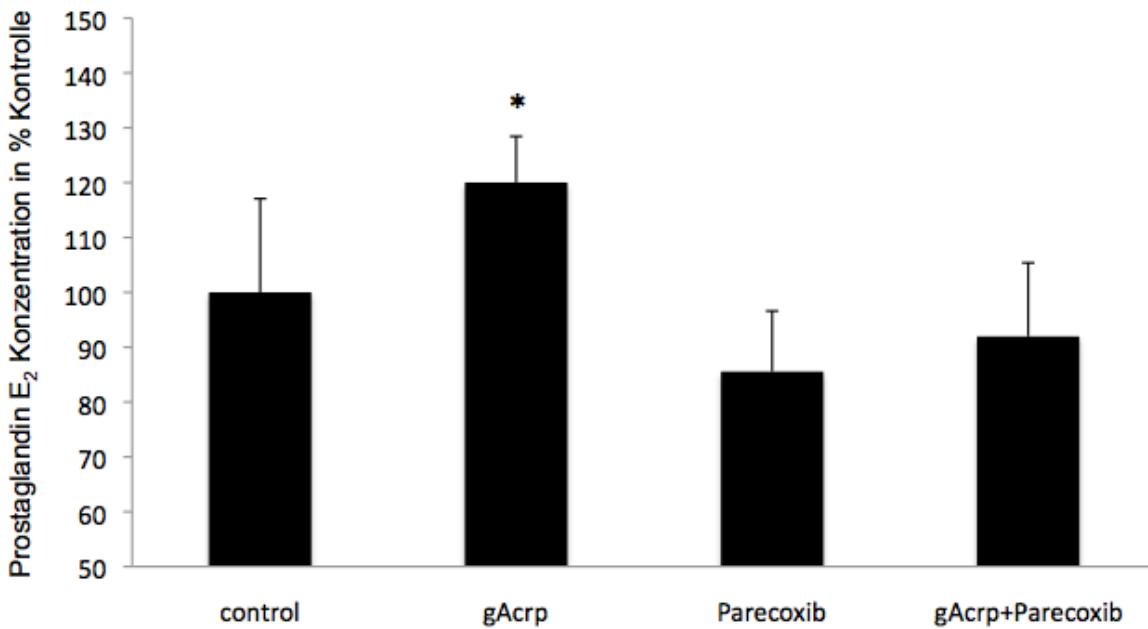


Abbildung 17: Produktion von Prostaglandin E<sub>2</sub> in Zellkulturüberständen von dmECFC, unbehandelt und/oder nach gAcrp/Parecoxib-Behandlung, gemessen mittels Prostaglandin E<sub>2</sub>-ELISA.

Kürzlich wurde von unserer Arbeitsgruppe beschrieben, dass PGE<sub>2</sub> die Proliferation und Funktion der endothelialen Progenitorzellen stimuliert. Dieser Effekt ließ sich durch Inhibition von COX-2 wieder zunichte machen (34). Entsprechend wurde die Hypothese aufgestellt, dass gAcrp-induzierte Effekte auf ECFC über den COX-2-Weg vermittelt werden. Die Verwendung des selektiven COX-2-Inhibitors Parecoxib alleine wirkte sich hierbei nicht auf die Zellproliferation aus, konnte aber wirkungsvoll den gAcrp-vermittelten Anstieg der Zellzahl verhindern, wenn es gleichzeitig mit gAcrp auf die Zellen angewandt wurde (Abbildung 17). Dies lässt vermuten, dass die stimulierenden Effekte von gAcrp zumindest teilweise über den COX-2-Weg vermittelt werden. Darüber hinaus wurde von unserer Arbeitsgruppe kürzlich bewiesen, dass Prostaglandin E<sub>1</sub> und E<sub>2</sub> die Proliferation und Migration von endothelialen Vorläuferzellen über die Induktion von eNOS bewirken (34). Zur Untersuchung der Abhängigkeit des gAcrp-Effekts auf ECFC-Zahlen vom eNOS-Weg wurden Überstände aus der Zellkultur für einen fluorometrischen NO-Assay gesammelt. Dieser ergab, dass gAcrp zu einer signifikanten Zunahme der Nitritspiegel führt, was auf eine erhöhte Produktion von NO hinweisend ist (142,2±21,8% Kontrolle, p<0,05, Abbildung 18).

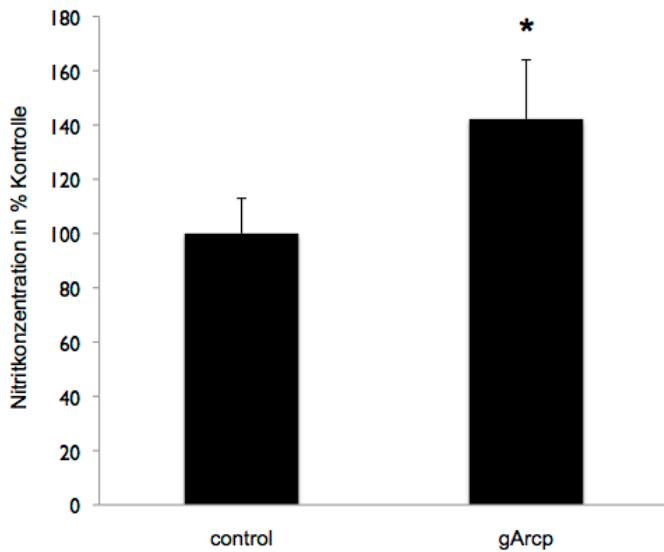


Abbildung 18: Konzentration von Nitrit als quantitatives Maß der NO-Produktion in Zellkulturüberständen, \*: p<0,05 vs. control, n=3.

Damit zeigen sich Hinweise, dass gAcrp direkt die Produktion von NO stimuliert, was für eine Beteiligung des eNOS-Weges bei der Funktionsverbesserung der dmECFC bei der Behandlung mit gAcrp spricht.

## 5.5 Die Behandlung mit gAcrp verbessert die migratorische Aktivität der dmECFC

Migration ist eine Schlüsselfunktion von endothelialen Progenitorzellen, die entscheidend für die zelltherapeutischen Effekte *in vivo* ist (35). Bezeichnenderweise zeigten die gAcrp-behandelten ECFC eine vergleichbar gesteigerte migratorische Aktivität bei hECFC ( $39,6 \pm 15,3\%$  Anstieg gegenüber Kontrolle) wie er bei den dmECFC gefunden wurde ( $30,3 \pm 9,2\%$  Anstieg gegenüber Kontrolle) (Abbildung 19).

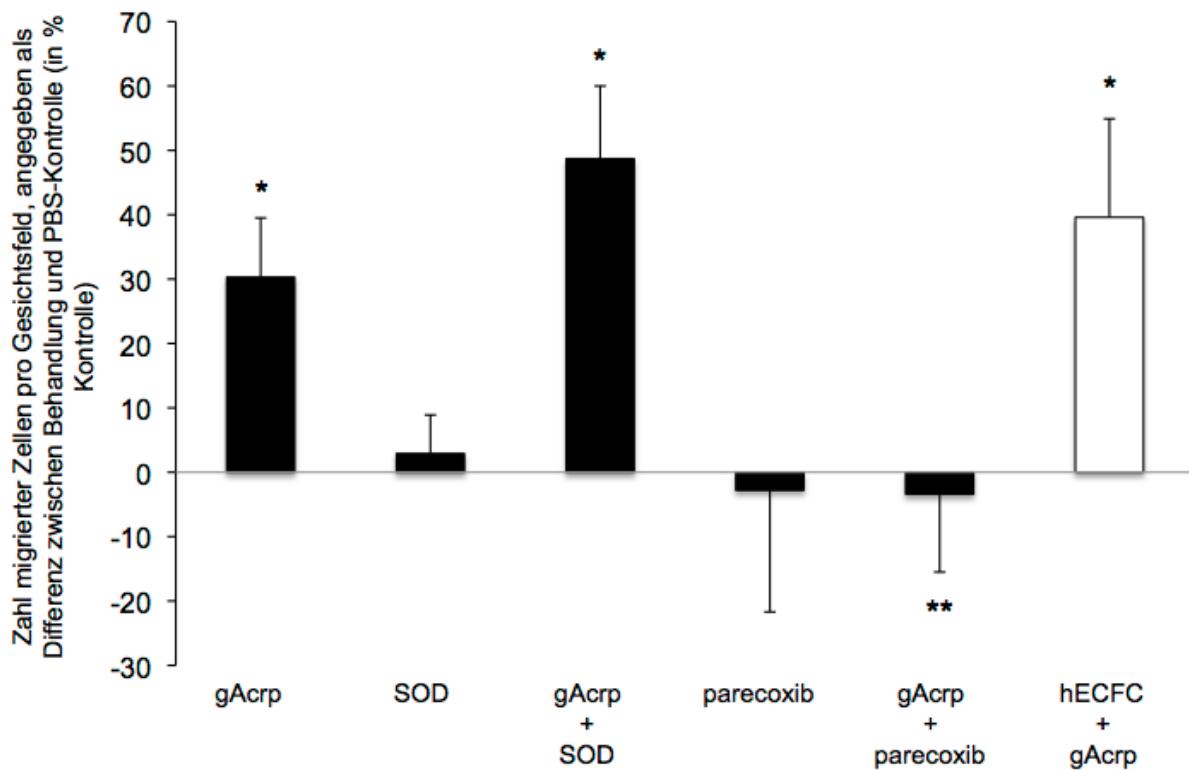


Abbildung 19: Migratorische Aktivität der ECFC nach gAcrp-Vorbehandlung (n=4) von dmECFC in Gegenwart oder Abwesenheit von SOD oder Parecoxib (je n=3). Der letzte Balken (weiß) zeigt einen Vergleich mit hECFC, die mit gAcrp behandelt wurden. (\*: p<0,01 vs. control; \*\*: p<0,05 vs. gAcrp, n=3).

Ebenso wie bei der Zellzahl führte eine Parecoxibgabe alleine nicht zu einer Veränderung der migratorischen Aktivität, während der gAcrp-Effekt durch eine gleichzeitige Parecoxibbehandlung verschwand. Auf funktionaler Ebene konnte durch gleichzeitige Zugabe von gAcrp und SOD im Vergleich zur alleinigen gAcrp-Gabe ein weiterer Trend zu verbesserter Migration gezeigt werden ( $48,7 \pm 11,3\%$  Steigerung bei gAcrp+SOD versus  $30,3 \pm 9,2\%$  Steigerung bei alleiniger gAcrp-Gabe;  $p=0,289$ ).

## 5.6 Die Fähigkeit zur *in vivo*-Neovaskularisation ist bei dmECFC eingeschränkt und kann durch gAcrp-Gabe wiederhergestellt werden

In der Vergangenheit wurde bereits gezeigt, dass ECFC, die aus Nabelschnurblut gewonnen werden, in der Lage sind, in *in vivo*-Hinterlaufischämienmodellen die Neovaskularisation zu verbessern (36), jedoch existierten bisher keine veröffentlichten Daten zu hECFC und

dmECFC. Daher wurde der Frage nachgegangen, ob ECFC von Diabetikern und gleichaltrigen Kontrollen in der Lage sind, die Neovaskularisation in einem normoglykämischen Nacktmausmodell, welches als für eine experimentelle Zelltherapie am zugänglichsten betrachtet werden muss, zu verbessern (Abbildung 20).

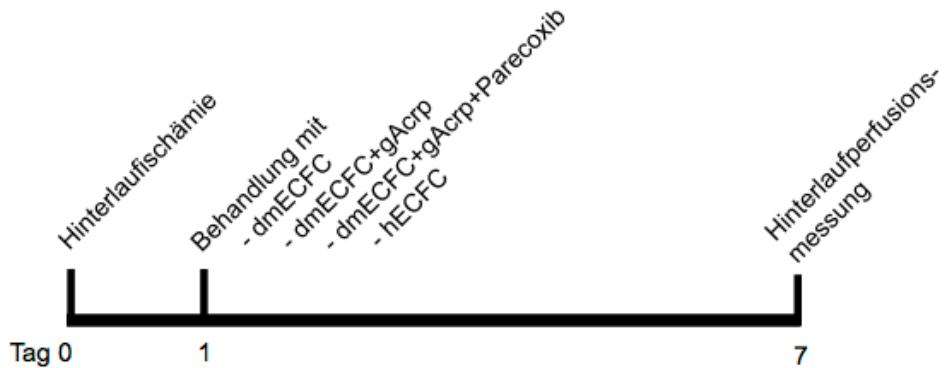


Abbildung 20: Experimentablauf zur Evaluation der Behandlung mit dmECFC oder hECFC in normoglykämischen NMRI nu/nu-Mäusen.

Zunächst wurde bestätigt, dass die infundierten ECFC tatsächlich zu den ischämischen Gebieten wandern und sich dort in die Gefäßwände einbauen. In den durchgeföhrten histologischen Analysen fanden sich HLA-ABC-positive Zellen (rot) in enger Nachbarschaft zu Lectin-positiven (grünen) Blutgefäßen und darüberhinaus sogar Zellen, die sich in die Gefäßwand eingebaut hatten (gelb). Diese Beobachtungen bestätigen, dass die Therapieeffekte zumindest zum Teil einem vaskulären Einbau der ECFC zuzuschreiben sind (Abbildung 21).

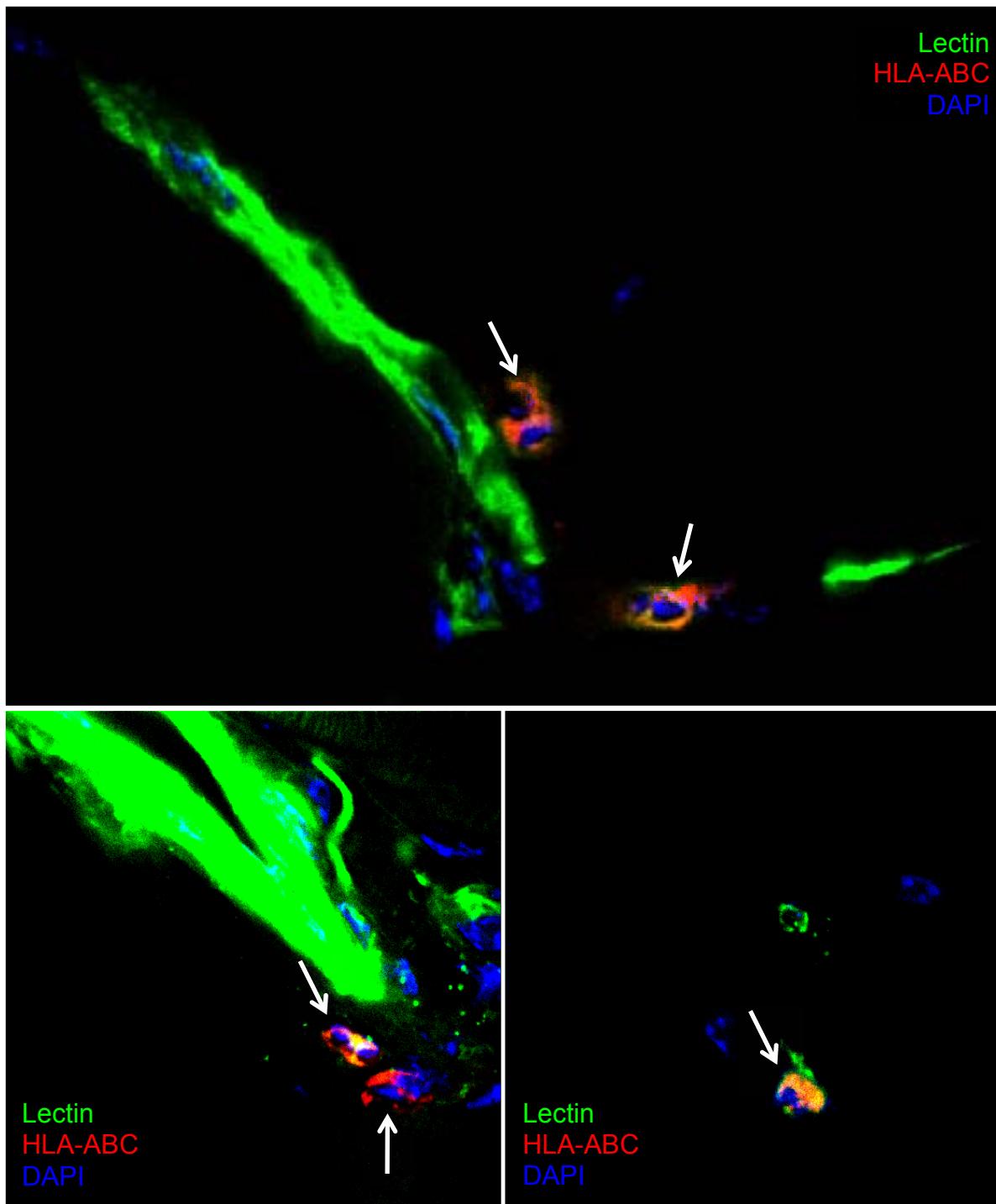


Abbildung 21: Einbau humaner ECFC in das ischämische Gewebe. Histologische Analyse der Expression von spezifischem, humanen HLA-ABC (AlexaFluor 647: rot), dem endothelialen Marker Lectin (FITC: grün) und Zellkerne (DAPI: blau). Die Pfeile zeigen auf die humanen Zellen.

Und tatsächlich konnte beobachtet werden, dass die Zellen der Nichtdiabetiker zu einer signifikanten ( $p<0,05$ ) Verbesserung der Hinterlaufperfusion führten (Relativer Blutfluss im ischämischen, verglichen mit dem nichtischämischen Lauf;  $60,9\pm10,1\%$  bei hECFC versus  $20,1\pm7,5\%$  bei der unbehandelten Kontrolle) (Abbildung 22 & Abbildung 23).

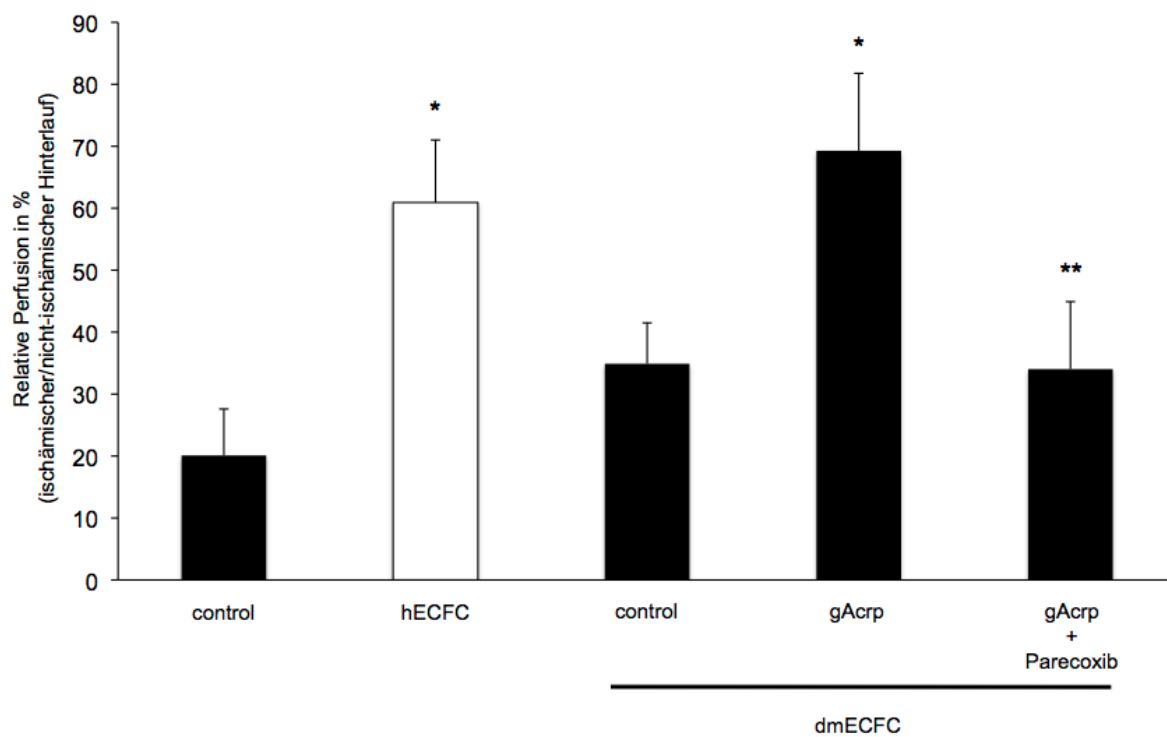


Abbildung 22: Quantifizierung der Hinterlaufperfusion nach Injektion von dmECFC, die mit gAcrp in Anwesenheit oder Abwesenheit von Parecoxib behandelt wurden, im Vergleich mit hECFC (\*: p<0,05 vs. control, p<0,05 vs. dmECFC, \*\*: p<0,05 vs. gAcrp, n=4-8).

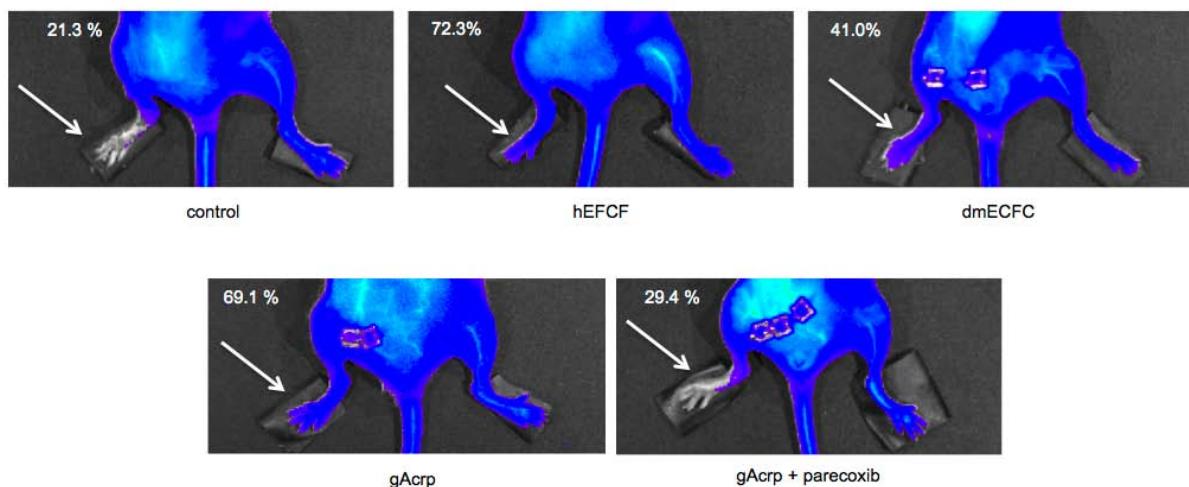


Abbildung 23: Repräsentative Bilder von Hinterlaufperfusionsmessungen, wie nach ICG-Injektion gemessen. Die Pfeile zeigen auf den ischämischen Hinterlauf. Die relative Durchblutung zwischen ischämischen und nicht-ischämischen Hinterlauf ist in Prozent angegeben.

Entsprechend der oben angeführten *in vitro*-Daten zeigten auch mit dmECFC behandelte Tiere einen erhöhten Blutfluss, jedoch erreichten die beobachteten Unterschiede kein signifikantes Level im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, was ihrer verminderten *in vivo*-

Neovaskularisationsfähigkeit zuzuschreiben ist (Relativer Blutfluss:  $34,9 \pm 6,6\%$  bei dmECFC vs.  $20,1 \pm 7,5\%$  bei der unbehandelten Kontrolle) (Abbildung 22 & Abbildung 23).

In einem nächsten Schritt wurde die *in vivo*-Relevanz dieses Protokolls zur Vorbehandlung mit gAcrp *in vitro* evaluiert. Die so vorbehandelten dmECFC führten nach ihrer Injektion zu einer signifikant besseren Hinterlaufdurchblutung (Relativer Blutfluss:  $65,2 \pm 5,1\%$ ,  $p < 0,01$ ), verglichen mit den mit unbehandelten dmECFC therapierten Tieren. Besonders bemerkenswert ist hierbei, dass sich somit die mit den gAcrp-optimierten dmECFC behandelten Tiere nicht von denen unterschieden, die mit hECFC therapiert wurden ( $p = 0,67$ ) (Abbildung 22 & Abbildung 23).

Ferner wurde die Bedeutung der sog. Homing-Kapazität der Zellen (die Fähigkeit der Zellen, in die ischämischen Gebiete einzuwandern) für die Effekte der dmECFC-Behandlung mit gAcrp untersucht. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede zwischen unbehandelten ( $17 \pm 12$  Zellen pro 100 Feldern) und gAcrp-behandelten dmECFC ( $18 \pm 9$  Zellen pro 100 Felder).

## 5.7 Die Effekte der Vorbehandlung bestehen im hyperglykämen Milieu fort

Da für hyperglykäme Umgebungen gezeigt wurde, dass diese sich *in vitro* negativ auf endotheliale Vorläuferzellen auswirken (18; 20), wurde weiterhin untersucht, ob die Neovaskularisationskapazität von gAcrp-behandelten dmECFC in einem hyperglykämen *in vivo*-Milieu erhalten bleibt (Abbildung 24).



Abbildung 24: NMRI nu/nu-Tiere wurden nach dem *low-dose streptozotocin protocol* der AMDCC behandelt, um vor Hinterlaufischämie eine Hyperglykämie zu erzeugen.

Tatsächlich ließen sich konsistente Therapieeffekte beobachten, die den im normoglykämischen Modell beobachteten entsprachen. Während die unbehandelten Kontrolltiere eine sehr spärliche Hinterlaufdurchblutung aufwiesen (Relative Perfusion:  $18,5 \pm 2,5\%$ ), verbesserte die Gabe von unbehandelten dmECFC die relative Perfusion bereits auf  $45,3 \pm 5,5\%$  ( $p < 0,05$  gegenüber der Kontrolle) (Abbildung 25).

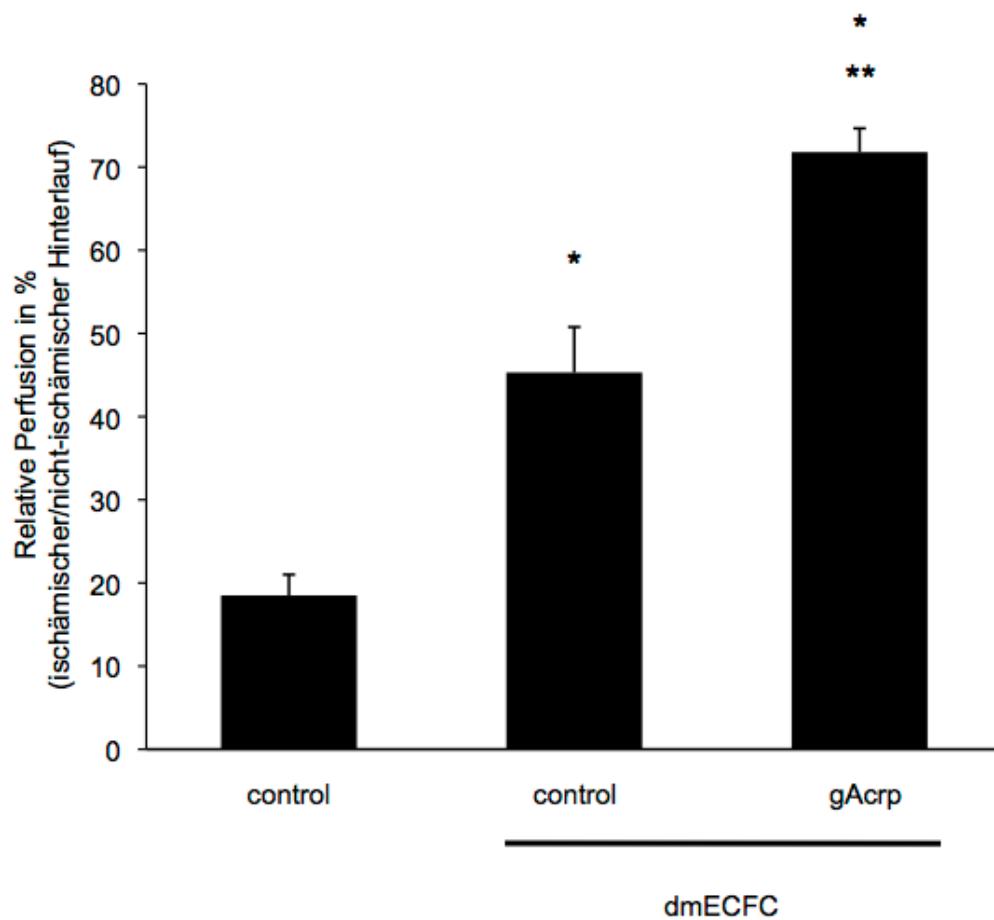


Abbildung 25: Relative Perfusion hyperglykämischer Mäuse, gemessen mit dem O2C-Laserdoppler zwei Wochen nach Hinterlaufischämieoperation (\*:  $p < 0,05$  vs. control; \*\*:  $p < 0,05$  vs. dmECFC,  $n=3-6$ ).

Darüber hinaus zeigten sich bei den Tieren noch weitere, signifikante Verbesserungen bei der Hinterlaufdurchblutung, wenn sie mit gAcrp-vorbehandelten dmECFC therapiert ( $71,8 \pm 2,9\%$ ,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle,  $p < 0,05$  vs. unbehandelte dmECFC) wurden. Folglich konnten die gAcrp-behandelten dmECFC den dramatisch verminderten Blutfluss in einem

Hinterlaufischämiedeck wiederherstellen, ein Effekt, der auch in einer klinisch äußerst relevanten hyperglykämen *in-vivo*-Umgebung fortbesteht.

## 6. Diskussion

In dieser Arbeit werden Daten aufgezeigt, die die positiven Effekte des globulären Adiponectins auf Zahl und Funktion endothelialer Progenitorzellen von Patienten mit Typ-2-Diabetes belegen. Es stellte sich heraus, dass ECFC, die mit gAcrp behandelt wurden, viel geeigneter für eine Zelltherapie sind als ihre unbehandelten Gegenstücke. Beachtenswerterweise wurden diese Effekte *in vivo* sowohl unter nichtdiabetischen Bedingungen als auch in einer hyperglykämischen Umgebung in diabetischen Mäusen beobachtet. Aufgrund der hier präsentierten Daten soll die Vorbehandlung von ECFC, die von Patienten mit Typ-2-Diabetes gewonnen wurden, mit gAcrp als neuer Weg zur angepassten Zelloptimierung vor deren Einsatz als autologe Zelltherapie postuliert werden.

Die verminderte Proliferation und Funktion von endotelialen Progenitorzellen (EPC) bei Patienten mit Typ-2-Diabetes wurde bereits zuvor beschrieben (19; 37-39). Ingram et al. lieferten erste Anhalte dafür, dass Nabelschnurblut-ECFC bei Neugeborenen von Müttern, die an Gestationsdiabetes litten, ebenfalls niedrigere Proliferationsraten und eine verminderte neovaskulatorische Potenz, sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* aufwiesen (20). Die hier durchgeföhrten Experimente bekräftigen diese Befunde weiter und nähren darüberhinaus Hinweise auf eine verminderte Leistungsfähigkeit von ECFC aus Peripherblut erwachsener Patienten. In der Tat wurde eine erniedrigte Proliferationsrate der dmECFC *in vitro* und, was noch wichtiger ist, eine reduzierte Neovaskularisationskapazität *in vivo* verglichen mit nicht-diabetischen ECFC beobachtet. Unter diesem Aspekt erscheinen Optimierungsstrategien unabdingbar für den klinischen Einsatz dieser Zellen in einem autologen Setting.

1995 beschrieben Scherer et al. erstmals ein Serumprotein, das der Komplementkomponente C1q ähnlich ist und ausschließlich in Adipozyten produziert wird und benannten es daher als *adipocyte complement-related protein of 30 kDa* (Acrp30), welches später als Adiponectin bezeichnet wurde (40). Für dieses Protein wurde in mehreren Studien eine Korrelation zwischen Adiponectin und Diabetes mellitus Typ 2 gezeigt. Hotta et

al. stellten bei Typ-2-Diabetikern niedrigere Serumadiponectinspiegel im Vergleich zu *body mass index*-gleichen Kontrollen fest (21). Umgekehrt scheinen Menschen mit hohen Adiponectinspiegel ein niedrigeres Risiko für das Auftreten eines Diabetes zu haben (22; 23) und steigende Adiponectinspiegel scheinen die Gefahr zu reduzieren eine Insulinresistenz und einen Typ-2-Diabetes zu entwickeln (24-26). Erst kürzlich zeigten Shibata et al. eine Korrelation zwischen Adiponectinspiegeln und der Anzahl aus dem Blut stammender EPC. Zusätzlich berichteten sie über einen vorteilhaften Effekt von Adiponectin auf die Zahl früher EPC *in vitro* (41). Stimulierende Effekte von Adiponectin wurden ebenfalls für hämatopoetische Stammzellen, Osteoblasten und Mesangioblasten gezeigt (41-44). In der vorliegenden Arbeit wird nun erstmals ein starker Effekt einer gAcrp-Vorbehandlung auf in hohem Maße reine ECFC bei deren Vorbehandlung vor Gabe in ischämischen Modellen *in vivo* gezeigt.

Vormals demonstrierten Shibata et al. weiterhin einen protektiven Effekt von Adiponectin für myokardiale Ischämie-Reperfusions-Schäden, welcher durch eine Inhibition der Apoptose über die AMP-aktivierte Proteinkinase und über die Inhibition von TNF $\alpha$  über COX-2-abhängige Wege vermittelt wird (45). Zusätzlich werden Stromazellen und Lymphozytenvorläufer von Adiponectin über den COX-2-Weg beeinflusst (33). Weiterhin konnte unsere Arbeitsgruppe kürzlich zeigen, dass Prostaglandin E<sub>1</sub> und E<sub>2</sub> Progenitorzellen durch eine Induktion von eNOS bezüglich Proliferation und Funktion stimulieren können (34). Als Konsequenz daraus postulierten wir, dass die beobachteten Effekte von gAcrp primär über die Induktion von COX-2 vermittelt werden, gefolgt von einem Anstieg der Prostaglandin E<sub>2</sub>-Sekretion und eNOS-Expression, was zu einer verstärkten Proliferation und, noch wichtiger, einer gestärkten Funktion der ECFC führt. In der Tat führte die Inhibition des COX-2-Weges zu einer Aufhebung der Adiponectin-induzierten Effekte auf ECFC. Nicht nur die native Proliferation der dmECFC war im Vergleich zu den nichtdiabetischen vermindert, auch die gAcrp-vermittelte Steigerung der Proliferation war bei den dmECFC weniger stark ausgeprägt.

Oxidativer Stress wurde als eines der Haupthindernisse bei der Proliferation endothelialer Vorläuferzellen ausgemacht, da dieser die Zellen vermehrt in die Seneszenz treibt (46). Indem sie antioxidative Enzyme in großen Mengen exprimieren (insbesondere Superoxiddismutase), sind Progenitorzellen normalerweise gut gegen oxidativen Stress geschützt (47). Dennoch konnten Ceradini et al. zeigen, dass in Streptozotocininduzierten diabetischen Mausmodellen die Mobilisation, sowie die migratorische Aktivität von aus dem Knochenmark stammenden endothelialen Vorläuferzellen aufgrund oxidativen Stresses dramatisch reduziert sind. Eine Zugabe von Superoxiddismutase konnte die beobachteten, negativen Effekte aufheben (48). Vereinbar mit diesen Erkenntnissen zeigen wir nun, dass die durch gAcrp erhöhten dmECFC-Zahlen mit adjuvanter Gabe von Superoxiddismutase weiter gesteigert werden. Nichtsdestoweniger konnte gAcrp alleine bereits eine signifikante Steigerung der Zellzahl bewirken, was durch andere antioxidative Eigenschaften von Adiponectin ermöglicht wird, wie bereits gezeigt (1), und war in der Lage einen starken zelltherapeutischen Effekt *in vivo* zu bewirken. Dementsprechend wird hier eindeutig gezeigt, dass gAcrp die Spiegel der *reactive oxygen species* in den dmECFC reduziert.

Darüber hinaus stellen starke, invasive Eigenschaften, welche *in vitro* als Zellmigration in einer Matrigel<sup>TM</sup>-beschichteten, modifizierten Boyden-Kammer quantifiziert werden können, ein unabdingbares, entscheidendes Merkmal für systemisch infundierte Progenitorzellen dar, damit diese in das ischämische Gewebe einwandern können. Interessanterweise bewirkte die alleinige gAcrp-Behandlung der dmECFC eine deutliche Zunahme bei der migratorischen Aktivität, die vergleichbar mit der der nichtdiabetischen ECFC war. Diese gesteigerte Migrationsaktivität konnte mit der gleichzeitigen Gabe von SOD noch gesteigert werden, wenn auch nicht auf einem statistisch signifikanten Level. Bemerkenswerterweise verbesserten die gAcrp-vorbehandelten dmECFC im in dieser Arbeit verwandten murinen Hinterlaufischämiemodell die Neovaskularisation signifikant, während un behandelte dmECFC im Hinblick auf die Verbesserung der Neovaskularisation schlechtere Ergebnisse aufwiesen. Obwohl die Proliferation der dmECFC unter Therapie mit gAcrp durch oxidativen Stress immer noch limitiert ist, legen diese Daten nahe, dass die gAcrp-Vorbehandlung

trotzdem zu einer soliden funktionalen Verbesserung der dmECFC führt, die zu starker regenerativer Aktivität *in vivo* führt.

Man könnte annehmen, dass die so wiedererlangte Funktionsverbesserung der gAcrp-behandelten ECFC durch ein erneute Exposition gegenüber einer hyperglykämen Umgebung über die zuvor genannten oder auch unbekannte Mechanismen wieder zum Erliegen kommt. Eine gerade erst veröffentlichte Studie von Eren et al. beschäftigte sich mit der Frage, ob der Erfolg einer vaskulären Zelltherapie auf die Blutadiponectinspiegel bei Spender oder Empfänger angewiesen ist (49). Die Autoren kommen hierbei zu dem Schluss, dass eine Adiponectinämie beim Empfänger essentiell für die proangiogenetischen Effekte der Zelltherapie sind. Diese Daten suggerieren, dass mit Adiponectin vorbehandelte dmECFC in einem hyperglykämen Milieu aufgrund eines supprimierten Adiponectinblutspiegels ineffektiv sein müssten. Jedoch zeigen unsere Ergebnisse eindeutig, dass eine Optimierung einer vaskulären Zelltherapie mit Adiponectin in der Tat einer ungünstigen hyperglykämen Umgebung standhalten kann.

Zusammenfassend wird hier erstmals gezeigt, dass die Wirkung einer *ex vivo*-Vorbehandlung mit gAcrp auf dmECFC sogar nach einem Retransfer in ein hyperglykämes Environment erhalten bleibt. Dies demonstriert die grundsätzliche Machbarkeit und Effektivität eines *ex vivo* Behandlungsprotokolls zur Progenitorzelloptimierung vor deren Verwendung in der Zelltherapie. Darüberhinaus bekräftigen diese Erkenntnisse unsere früheren Daten bezüglich der Wichtigkeit des COX-2-Weges für die Neovaskularisationskapazität isolierter ECFC (34) und wir bieten somit wichtige neue Hinweise darauf, dass die Aktivierung des COX-2-Weges, welche mittels gAcrp-Gabe sicher bewerkstelligt werden kann, ein wichtiges Ziel für zukünftige Strategien zur Progenitorzelloptimierung sein kann.

## **7. Ausblick**

Die regenerative Medizin ist ein sich schnell entwickelndes Feld in der Biomedizin. Die hier gezeigten Optimierungserfolge versprechen ein großes Potential für das gewählte Vorgehen einer ex vivo-Vorbehandlung vor Zelltherapie allgemein und eine Behandlung von endothelialen Vorläuferzellen mit Adiponectin im Speziellen. Zur klinischen Umsetzung der Erkenntnisse aus dieser Arbeit wie aus der gesamten Grundlagenforschung in diesem Bereich ist ein tiefgreifenderes Verständnis der physiologischen Abläufe der Zell- und Differenzierungssteuerung nötig, um die hier erlangten Ergebnisse in eine noch zielgerichteter klinische Therapie translatieren zu können. Ziel kann es sein, dass eines Tages aus beliebigen Patientenzellen neue Zellen, Gewebe oder sogar ganze Organe durch quasi körpereigenes Gewebe ersetzt werden können und so der durch Krankheiten verursachte Funktionsverlust wieder aufgehoben werden kann.

## **8. Danksagung**

Es gibt eine große Zahl an Leuten, denen ich an dieser Stelle für Ihre jahrelange Unterstützung bei der Umsetzung dieser Dissertation danken möchte und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

An allererster Stelle ist hier mein Doktorvater, Prof. Dr. Christopher Heeschen, zu nennen, der mir diese Arbeit überhaupt ermöglicht hat und dem ich nicht nur die vorliegende Arbeit, sondern auch eine fundierte wissenschaftliche Ausbildung sowie die Mitarbeit an zahlreichen Publikationen zu verdanken habe.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. Alexandra Aicher, Dr. Theresa Schwarz und Dr. Patrick Hermann, die mir stets mit Rat und Tat beiseite standen und bei der Laborarbeit und beim Verfassen meiner Arbeit immer eine große Hilfe waren.

Auch danke ich Prof. Dr. J. Seissler und Team für die Findung von geeigneten Patienten.

Ebenso den übrigen Mitarbeitern am Klinikum Großhadern und am CNIO, die mich auf unterschiedlichste Arten unterstützt haben, gilt mein Dank.

Ebenfalls danke ich Prof. Dr. Dr. K.-W. Jauch für all die Unterstützung und die Möglichkeit, diese Arbeit an seiner Klinik auszuführen.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern und Geschwistern danken, dass sie mich all die Jahre mit Verständnis und Zuspruch begleitet haben und es mir ermöglicht haben, mich ganz auf Studium und Dissertation zu konzentrieren.

## 9. Anhang

**Tabelle 1:** Patienteneigenschaften der Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und der gleichaltrigen Kontrollen ohne Diabetes mellitus Typ 2

	<b>Non-diabetic controls n=5</b>	<b>Diabetic patients n=8</b>	<b>P-value</b>
Größe (m)	1.69±0.05	1.72±0.03	n.s.
Gewicht (kg)	75.6±6.1	103±7.9	n.s.
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.3±1.3	34.9±2.4	0.03
Alter (Jahren)	66±3.6	60±5.5	n.s.
Bluthochdruck	3 (60%)	7 (88%)	n.s.
Hypercholesterinämie	3 (60%)	6 (75%)	n.s.
Hypertriglyceridämie	0 (0%)	3 (38%)	n.s.
KHK	0 (0%)	1 (13%)	n.s.
HI	0 (0%)	0 (0%)	-
pAVK	0 (0%)	0 (0%)	-
Schlaganfall	0 (0%)	1 (13%)	n.s.
Niereninsuffizienz	0 (0%)	1 (13%)	n.s.
Antidiabetische Medikation	0 (0%)	8 (100%)	0.001
Antihypertensive Medikation	3 (60%)	6 (75%)	n.s.
Lipidsenkende Medikation	1 (20%)	3 (38%)	n.s.

BMI: body mass index; KHK: koronare Herzkrankheit; HI: Herzinfarkt; pAVK: periphere arterielle Verschlusskrankheit; n.s.: nicht signifikant. Ergebnisse für kontinuierliche Variablen sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Vergleiche zwischen den Gruppen wurden mittels dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U Test analysiert. Der Vergleich kategorischer Variablen wurde mit dem Pearson  $\chi^2$  Test durchgeführt.

## 10. Literaturverzeichnis

1. Destatis (Ed.). *Gesundheit - Todesursachen in Deutschland*. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt der Bundesrepublik Deutschland, 2011
2. Kannel WB, McGee DL: Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. JAMA : the journal of the American Medical Association 1979;241:2035-2038
3. Nichols GA, Gullion CM, Koro CE, Ephross SA, Brown JB: The incidence of congestive heart failure in type 2 diabetes: an update. Diabetes Care 2004;27:1879-1884
4. Lundberg V, Stegmayr B, Asplund K, Eliasson M, Huhtasaari F: Diabetes as a risk factor for myocardial infarction: population and gender perspectives. Journal of internal medicine 1997;241:485-492
5. Economic costs of diabetes in the U.S. In 2007. Diabetes Care 2008;31:596-615
6. Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 2006;126:663-676
7. Martin GR: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1981;78:7634-7638
8. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 1997;275:964-967
9. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T: Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. Nat Med 1999;5:434-438
10. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP: Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. Blood 1998;92:362-367
11. Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB: Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24:288-293
12. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL: Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. Circulation 2003;107:1164-1169
13. Raemer PC, Haemmerling S, Giese T, Canaday DH, Katus HA, Dengler TJ, Shankar SG: Endothelial progenitor cells possess monocyte-like antigen-presenting and T-cell-co-stimulatory capacity. Transplantation 2009;87:340-349
14. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC: Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. Blood 2004;104:2752-2760
15. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC: Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. Circulation 2002;106:2781-2786
16. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T: Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. N Engl J Med 2003;348:593-600
17. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S: Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. Circ Res 2001;89:E1-7

18. Chen YH, Lin SJ, Lin FY, Wu TC, Tsao CR, Huang PH, Liu PL, Chen YL, Chen JW: High glucose impairs early and late endothelial progenitor cells by modifying nitric oxide-related but not oxidative stress-mediated mechanisms. *Diabetes* 2007;56:1559-1568
19. Thum T, Fraccarollo D, Schultheiss M, Froese S, Galuppo P, Widder JD, Tsikas D, Ertl G, Bauersachs J: Endothelial nitric oxide synthase uncoupling impairs endothelial progenitor cell mobilization and function in diabetes. *Diabetes* 2007;56:666-674
20. Ingram DA, Lien IZ, Mead LE, Estes M, Prater DN, Derr-Yellin E, DiMeglio LA, Haneline LS: In vitro hyperglycemia or a diabetic intrauterine environment reduces neonatal endothelial colony-forming cell numbers and function. *Diabetes* 2008;57:724-731
21. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y: Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1595-1599
22. Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, Knowler WC, Krakoff J: Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* 2002;360:57-58
23. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF: Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 2003;361:226-228
24. Snehalatha C, Mukesh B, Simon M, Viswanathan V, Haffner SM, Ramachandran A: Plasma adiponectin is an independent predictor of type 2 diabetes in Asian Indians. *Diabetes Care* 2003;26:3226-3229
25. Choi KM, Lee J, Lee KW, Seo JA, Oh JH, Kim SG, Kim NH, Choi DS, Baik SH: Serum adiponectin concentrations predict the developments of type 2 diabetes and the metabolic syndrome in elderly Koreans. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;61:75-80
26. Yamamoto Y, Hirose H, Saito I, Nishikai K, Saruta T: Adiponectin, an adipocyte-derived protein, predicts future insulin resistance: two-year follow-up study in Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:87-90
27. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, Krasich R, Temm CJ, Prchal JT, Ingram DA: Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 2007;109:1801-1809
28. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadokawa T: Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003;423:762-769
29. Sasaki K, Heeschen C, Aicher A, Ziebart T, Honold J, Urbich C, Rossig L, Koehl U, Koyanagi M, Mohamed A, Brandes RP, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S: 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 USA* 2006;103:14537-14541
30. Saif J, Schwarz TM, Chau DY, Henstock J, Sami P, Leicht SF, Hermann PC, Alcalá S, Mulero F, Shakesheff KM, Heeschen C, Aicher A: Combination of injectable multiple growth factor-releasing scaffolds and cell therapy as an advanced modality to enhance tissue neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:1897-1904
31. Pang TT, Narendran P: The distribution of adiponectin receptors on human peripheral blood mononuclear cells. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1150:143-145
32. Galasso G, Schiekofer S, Sato K, Shibata R, Handy DE, Ouchi N, Leopold JA, Loscalzo J, Walsh K: Impaired angiogenesis in glutathione peroxidase-1-deficient mice is associated with endothelial progenitor cell dysfunction. *Circ Res* 2006;98:254-261

33. Yokota T, Meka CS, Kouro T, Medina KL, Igarashi H, Takahashi M, Oritani K, Funahashi T, Tomiyama Y, Matsuzawa Y, Kincade PW: Adiponectin, a fat cell product, influences the earliest lymphocyte precursors in bone marrow cultures by activation of the cyclooxygenase-prostaglandin pathway in stromal cells. *J Immunol* 2003;171:5091-5099
34. Herrler T, Leicht S, Huber S, Hermann P, Schwarz T, Kopp R, Heeschen C: Prostaglandin E Positively Modulates Endothelial Progenitor Cell Homeostasis: An Advanced Treatment Modality for Autologous Cell Therapy. *J Vasc Res* 2009;46:333-346
35. Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Sasaki K, Bruhl T, Farhadi MR, Vajkoczy P, Hofmann WK, Peters C, Pennacchio LA, Abolmaali ND, Chavakis E, Reinheckel T, Zeiher AM, Dimmeler S: Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization. *Nat Med* 2005;11:206-213
36. Smadja D, Bieche I, Silvestre J, Germain S, Cornet A, Laurendeau I, Duong-Van-Huyen J, Emmerich J, Vidaud M, Aiach M, Gaussem P: Bone Morphogenetic Proteins 2 and 4 Are Selectively Expressed by Late Outgrowth Endothelial Progenitor Cells and Promote Neoangiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;23
37. Chen MC, Sheu JJ, Wang PW, Chen CY, Kuo MC, Hsieh CJ, Chen JF, Chang HW: Complications impaired endothelial progenitor cell function in Type 2 diabetic patients with or without critical leg ischaemia: implication for impaired neovascularization in diabetes. *Diabet Med* 2009;26:134-141
38. Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, Rookmaaker MB, Verseyden C, de Boer HC, Verhaar MC, Braam B, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ: Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes* 2004;53:195-199
39. Capla JM, Grogan RH, Callaghan MJ, Galiano RD, Tepper OM, Ceradini DJ, Gurtner GC: Diabetes impairs endothelial progenitor cell-mediated blood vessel formation in response to hypoxia. *Plast Reconstr Surg* 2007;119:59-70
40. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF: A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995;270:26746-26749
41. Shibata R, Skurk C, Ouchi N, Galasso G, Kondo K, Ohashi T, Shimano M, Kihara S, Murohara T, Walsh K: Adiponectin promotes endothelial progenitor cell number and function. *FEBS Lett* 2008;582:1607-1612
42. DiMascio L, Voermans C, Uqoezwa M, Duncan A, Lu D, Wu J, Sankar U, Reya T: Identification of adiponectin as a novel hemopoietic stem cell growth factor. *J Immunol* 2007;178:3511-3520
43. Luo XH, Guo LJ, Yuan LQ, Xie H, Zhou HD, Wu XP, Liao EY: Adiponectin stimulates human osteoblasts proliferation and differentiation via the MAPK signaling pathway. *Exp Cell Res* 2005;309:99-109
44. Fiaschi T, Tedesco FS, Giannoni E, Diaz-Manera J, Parri M, Cossu G, Chiarugi P: Globular adiponectin as a complete mesoangioblast regulator: role in proliferation, survival, motility, and skeletal muscle differentiation. *Mol Biol Cell* 2010;21:848-859
45. Shibata R, Sato K, Pimentel DR, Takemura Y, Kihara S, Ohashi K, Funahashi T, Ouchi N, Walsh K: Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. *Nat Med* 2005;11:1096-1103
46. Imanishi T, Hano T, Nishio I: Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. *J Hypertens* 2005;23:97-104
47. Dernbach E, Urbich C, Brandes RP, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S: Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress. *Blood* 2004;104:3591-3597

48. Ceradini DJ, Yao D, Grogan RH, Callaghan MJ, Edelstein D, Brownlee M, Gurtner GC: Decreasing intracellular superoxide corrects defective ischemia-induced new vessel formation in diabetic mice. *J Biol Chem* 2008;283:10930-10938
49. Eren P, Camus S, Matrone G, Ebrahimian TG, Francois D, Tedgui A, Sebastien Silvestre J, Blanc-Brude OP: Adiponectinemia controls pro-angiogenic cell therapy. *Stem Cells* 2009;27:2712-2721