

Stickstoffmonoxid – ein Faktor zur gezielten Steuerung hämatopoetischer Stammzellen?

Auswirkungen auf das Proliferations- und Differenzierungs-
verhalten CD34⁺ Zellen *in vitro*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Master of Science Julia Hümmer

aus Würzburg

1. Referentin: Prof. Dr. Cornelia Lee-Thedieck

2. Referent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Tag der mündlichen Prüfung: 10.05.2019

Erklärung

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde am Institut für Funktionelle Grenzflächen am Karlsruher Institut für Technologie am Campus Nord unter Betreuung von Prof. Dr. Cornelia Lee-Thedieck in der Arbeitsgruppe Stammzell-Material-Wechselwirkungen von September 2015 bis Januar 2019 durchgeführt. Teile der Arbeit werden in Publikationen zusammengefasst und in wissenschaftlichen Zeitschriften erscheinen.

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis des Karlsruher Instituts für Technologie in der gültigen Fassung habe ich beachtet. Die Arbeit oder Teile dieser habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.

Die beigefügte elektronische Version der Arbeit stimmt mit der schriftlichen Version überein. Weiterhin wurden die Primärdaten gemäß Abs. A (6) der Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis des Karlsruher Instituts für Technologie beim Institut abgegeben und archiviert.

Julia Hümmer

Inhaltsverzeichnis

Erklärung.....	II
Inhaltsverzeichnis.....	III
Kurzzusammenfassung.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung.....	13
1.1 Hämatopoetische Stammzellen.....	13
1.1.1 Hämatopoese.....	13
1.1.2 HSZ Nische im Knochenmark.....	17
1.2 NO als Signalmolekül in Säugetieren und tierischen Modellsystemen.....	22
1.2.1 Generierung von NO <i>in vivo</i>	22
1.2.2 Regulation der NOS und typische NO-vermittelte Prozesse <i>in vivo</i>	23
1.2.3 Konzentrationsabhängige Signalwege von NO.....	25
1.2.4 NO Freisetzungssysteme <i>in vitro</i>	32
1.2.5 Einfluss von NO auf die Zellproliferation, den Zellzyklus, Apoptoseprozesse sowie die Differenzierung von Zellen.....	35
1.2.6 NO-vermittelte Einflüsse auf HSZ.....	39
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	42
1.3.1 Auswirkungen von NO auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von HSPZ <i>in vitro</i>	42
1.3.2 Entwicklung eines NO-freisetzenden Materialsystems zur Überwindung der Limitierung löslicher, NO-freisetzender Verbindungen.....	43
2 Material und Methoden.....	45
2.1 Eingesetzte Materialien.....	45
2.1.1 Groß- und Kleingeräte.....	45
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	49
2.1.3 Chemikalien.....	50
2.1.4 Enzyme und Kits.....	54
2.1.5 Antikörper(konjugate) und Farbstoffe.....	55
2.1.5 Primer.....	57
2.1.6 Lösungen und Puffer.....	58
2.1.7 Eukaryotische Zellen und verwendete Kulturbedingungen.....	62
2.1.8 Programme zur Datenanalyse.....	64
2.2 Verwendete Methoden.....	64
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	64
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	72

2.2.3	Biochemische Methoden	75
2.2.4	Herstellung und Analyse des NO freisetzenden Hydrogelsystems	79
2.2.5	Zellbiologische Experimente	83
2.2.6	Graphische Darstellung und Statistik	89
3	Ergebnisse	91
3.1	HSPZ und MSZ exprimieren <i>in vitro</i> keine NOS Isoformen	91
3.2	Auswirkungen der Stimulation mit NO-freisetzenden Molekülen auf HSPZ <i>in vitro</i>	92
3.2.1	Abschätzung eines geeigneten Konzentrationsfensters für die Stimulation von HSPZ mit DETA/NO	93
3.2.2	Stimulation mit DETA/NO beeinflusst das Proliferations- verhalten von HSPZ <i>in vitro</i>	94
3.2.3	Stimulation mit DETA/NO beeinflusst das Expressionsmaß des HSPZ Markers CD34	97
3.2.4	Freigesetztes NO führt <i>in vitro</i> zu myeloider Differenzierung von HSPZ	103
3.2.5	Stimulation mit DETA/NO aktiviert den kanonischen NO/sGC/cGMP Signalweg	112
3.2.6	S-Nitrosylierung von Proteinen in HSPZ erfolgt <i>in vitro</i> bei Stimulation mit 10 µM DETA/NO	122
3.3	Etablierung eines NO-freisetzenden Heparin/sPEG Hydrogelsystems	124
3.3.1	Funktionalisierung des Heparin/sPEG Hydrogels mittels Mehrkomponenten-Ugi-Reaktion mit einem photo-sensitiven Nitroanilinderivat	124
3.3.2	Elektrochemischer Nachweis der Funktionalität des photosensitiven Heparin/sPEG Hydrogels	129
3.3.3	NO-freisetzendes Heparin/sPEG Hydrogel ist zellverträglich	130
4	Diskussion	132
4.1	HSPZ aus Nabelschnurblut und MSZ aus Knochenmark produzieren <i>in vitro</i> kein NO	132
4.2	Bis zu 20 µM DETA/NO sind für HSPZ verträglich und setzen <i>in vitro</i> physiologisch relevante NO Konzentrationen frei	133
4.3	NO beeinflusst die Proliferation von HSPZ <i>in vitro</i> in biphasischer Art und Weise	136
4.4	NO beeinflusst die Differenzierung von HSPZ <i>in vitro</i> und vermittelt die verstärkte Bildung myeloider Vorläuferzellen	141
4.5	Geringe DETA/NO Konzentrationen aktivieren den klassischen NO Signalweg in HSPZ während höhere DETA/NO Konzentrationen <i>in vitro</i> mit der S-Nitrosylierung von Proteinen einhergehen	148
4.6	Machbarkeitsnachweis eines photo-responsiven NO-freisetzenden Heparin/sPEG Hydrogels	156

5	Zusammenfassung und Ausblick	161
6	Literatur	167
	Danksagung	190
	Publikationsliste	192
	Anhang	193

Kurzzusammenfassung

Hämatopoetische Stammzellen (HSZ) sind die Stammzellen des Blutes, welche das Blutsystem kontinuierlich über Differenzierung in verschiedene Vorläuferzellen erneuern und gleichzeitig über Selbsterhaltungsprozesse einen nahezu konstanten Vorrat an HSZ sicherstellen. Die Balance zwischen Selbsterhalt und Differenzierung von HSZ wird in der sogenannten HSZ Nische im Knochenmark reguliert. Diese befindet sich in der Nähe von spezialisierten Blutgefäßen und besteht aus Nischenzellen, Matrixmolekülen und löslichen Faktoren, welche von ersteren sezerniert oder an letztere gebunden vorliegen. Stickstoffmonoxid (NO) stellt ein Signalmolekül dar, welches HSZ in der Nische regulieren könnte. Dieses kurzlebige Molekül wird beispielsweise von Endothelzellen durch NO Synthasen (NOS) gebildet und wurde *in vitro* als Regulator von Proliferations- und Differenzierungsvorgängen postuliert. Bezüglich des Einflusses von NO auf HSPZ wurden *in vitro* verschiedenste Effekte beschrieben, die in einer teils widersprüchlichen Datenlage resultierten. Dies kann unter anderem auf die verschiedenen Formen der NO Generierung sowie die unterschiedlichen eingesetzten Konzentrationen von NO-freisetzenden Verbindungen zurückgeführt werden. Da sich diese Spezies in ihrer Zerfallskinetik unterscheiden, variiert die freie Konzentration an NO drastisch und führt so zu schwer vergleichbaren Daten. Da NO-vermittelte, biologische Effekte hochgradig von der freien Konzentration des Signalmoleküls abhängen, ist die konzentrationsabhängige Untersuchung NO-vermittelter Effekte zentral. Des Weiteren basieren die in Bezug auf HSPZ erhobenen Daten weitgehend auf murinen Modellsystemen, die sich in der Expression von NOS und den generierten Konzentrationen von NO vom menschlichen System unterscheiden.

Daher wurde in vorliegender Arbeit systematisch der Einfluss von NO auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten humaner HSPZ *in vitro* untersucht. Hierdurch sollte die Frage beantwortet werden, ob NO einen Faktor darstellt, der HSPZ gezielt beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut mit einem breiten Konzentrationsbereich des NO Spendermoleküls DETA/NO kultiviert, das langfristig ein Tausendstel der Konzentration des Spendermoleküls an NO freisetzt. Die effektive mittlere Konzentration, bei dem der vitale Zellanteil auf 50% der Kontrolle gesunken war, lag hier bei 31,5 µM DETA/NO. Höhere Konzentrationen von DETA/NO waren für HSPZ über mehrere Tage nicht verträglich. HSPZ wurden anschließend mit bis zu 20 µM DETA/NO kultiviert, um ein Konzentrationsfenster abzudecken, dem HSPZ in Homöostase und Stress ausgesetzt sein könnten. Niedrige Konzentrationen an DETA/NO aktivierten in vorliegender Arbeit den klassischen NO Signalweg über die

Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase, welche eine Erhöhung der intrazellulären cGMP Konzentration nach sich zog und so unter anderem über cGMP-abhängige Proteinkinase die Phosphorylierung von downstream Zielen vermittelte, wie das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein. Dieser Konzentrationsbereich korrelierte mit der vermehrten Proliferation von HSPZ und der erhöhten Expression des HSPZ Markers CD34 in wenig teilungsaktiven Zellen. Basierend auf diesen Ergebnissen könnte NO in geringen Konzentrationen über den klassischen NO Signalweg HSPZ zur vermehrten Proliferation anregen. Erhöhte Konzentrationen von ca. 10 μ M DETA/NO führten hingegen zu einem veränderten Proliferationsverhalten von HSPZ sowie der verstärkten CD34 Expression in hoch proliferativen HSPZ Untergruppen. Weiterhin wurde mit steigender NO Konzentration eine zunehmende myeloide Differenzierung der Zellen beobachtet. Bei diesen erhöhten Konzentrationen modifizierte das zugesetzte NO außerdem Proteinthiole über Nitrosylierung. Auf Grundlage dieser Ergebnisse könnten erhöhte Konzentrationen von NO HSPZ über S-Nitrosylierungsvorgänge zu einer verstärkten myeloiden Differenzierung anregen. Ferner wurde in vorliegender Arbeit ein Heparin-basiertes Hydrogel entwickelt, welches lichtinduziert NO freisetzen kann. Dies wurde durch die postsynthetische Funktionalisierung der Heparinkomponente mit einer NO-freisetzenden Einheit via Mehrkomponenten-Ugi-Reaktion erreicht. Während lösliche Spendermoleküle die stark lokalisiert stattfindende Signalübertragung von NO nur unvollständig abbilden können, ermöglicht die Generation eines photo-responsiven Hydrogels die lokale und zeitliche Kontrolle der NO-Freisetzung und kann so NO Signale *in vivo* besser imitieren.

Zusammenfassend konnte in vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass NO *in vitro* die Proliferation humaner HSPZ in Abhängigkeit von der zugesetzten Konzentration biphasisch reguliert und mit zunehmender Konzentration die Differenzierung in myeloide Progenitorzellen verstärkt. Daher kann NO *in vitro* als Faktor eingesetzt werden, um das Verhalten von HSPZ gezielt zu beeinflussen. Um die *in vivo* stark lokalisierte Freisetzung von NO *in vitro* nachzubilden zu können und so den Einfluss von NO auf humane HSPZ weitergehend untersuchen zu können, wurde in vorliegender Arbeit der Machbarkeitsbeweis für ein Heparin-basiertes Hydrogel erbracht, welches NO lichtinduziert und kontrolliert freisetzen kann. Durch die zusätzliche Möglichkeit der Bindung von Wachstumsfaktoren kann dieses System eine Brücke zwischen der einfachen *in vitro* Kultur von HSPZ und der auf Modellorganismen basierten Untersuchung von HSPZ *in vivo* darstellen.

Abkürzungsverzeichnis

8-pCPT-cGMP	8-(4-chlorophenylthio)-cGMP
a.u.	engl. <i>arbitrary units</i> , willkürliche Einheiten
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
ANOVA	engl. <i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
aPC	aktiviertes Protein C
aq.	abgeleitet von lat. <i>aqua</i> , in wässriger Lösung
ATR	engl. <i>attenuated total reflection</i> , abgeschwächte Totalreflexion
BFU-E	engl. <i>burst forming unit-erythrocyte</i> , Kolonien, die einem Erythrozytenvorläufer entstammen
BH ₄	5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CaM	Calmodulin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAR Zellen	engl. <i>CXCL12 abundant reticular cells</i> , CXCL12-reiche, retikuläre Zellen
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i> , Differenzierungsmarker
Cdc42	engl. <i>cell division control 42 homolog</i> , Zellteilungs-Kontrollprotein 42 Homolog
Cdk	engl. <i>cyclin-dependent kinase</i> , Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	engl. <i>complementary desoxyribonucleic acid</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFU	engl. <i>colony forming unit</i> , koloniebildende Einheit
CFU-Assay	engl. <i>colony forming unit assay</i> , Koloniebildungsassay
CFU-G	CFU, welche Granulozyten hervorbringt
CFU-GEMM	CFU, welche in alle myeloiden Linien differenzieren kann
CFU-GM	CFU mit Differenzierungspotential in Granulozyten und Makrophagen

CFU-M	CFU, die Makrophagen hervorbringt
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CLPs	engl. <i>common lymphoid progenitors</i> , gemeinsame lymphoide Progenitorzellen
CMPs	engl. <i>common myeloid progenitors</i> , gemeinsame myeloide Progenitorzellen
cPTIO	2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid
CTV	CellTrace™ Violet
CXCL12	C-X-C Motiv Ligand 12
CXCR4	C-X-C Motiv Chemokin Rezeptor 4
ddH ₂ O	doppelt destilliertes und filtriertes Wasser
DEA/NO	Diethylenamin/NO Addukt
DETA/NO	Diethylentriamin/NO Addukt
DNA	engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	engl. <i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	EGF Rezeptor
EPCR	endotheliales Protein C Rezeptor
EtOH	Ethanol
EVH Domäne	Ena/VASP Homologie Domäne
EZM	extrazelluläre Matrix
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FBS	engl. <i>fetal bovine serum</i> , fetales Rinderserum
FMN	Flavin-Mononukleotid
FMO Kontrolle	engl. <i>fluorescence minus one control</i> , Fluoreszenz-minus-eins-Kontrolle
FTIR-Spektroskopie	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GMPs	engl. <i>granulocyte-makrophage progenitors</i> , Granulozyten-Makrophagen-Progenitorzellen
GSH	Glutathion
GSNO	S-Nitrosoglutathion
GTP	Guanosintriphosphat
HPZ	hämatopoetische Progenitorzellen
HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HSPZ	hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen
HSZ	hämatopoetische Stammzellen
IR	Infrarot
LepR	Leptin Rezeptor
Lin	engl. <i>lineage marker</i> , Differenzierungsmarker für reife Zellen
LMPPs	engl. <i>lymphoid-myeloid multipotent progenitors</i> , Progenitorzellen mit lymphoider Tendenz
LPS	Lipopolysaccharide
LTC-IC	engl. <i>long-term culture initiating cells</i> , langfristig kulturinitiierende Zellen
MAPK	Mitogen-assoziierte Proteinkinase
MEPs	engl. <i>megakaryocyte-erythrocyte progenitors</i> , Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitorzellen
MFI	mittlerer Fluoreszenzindex
miRNA	engl. <i>micro ribonucleic acid</i> , Mikro-Ribonukleinsäure
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MPPs	engl. <i>multipotent progenitors</i> , multipotente Progenitorzellen
MSZ	mesenchymale Stromazellen
NADPH	reduziertes Nukleinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NE	Norepinephrin
NFDM	engl. <i>non-fat dry milk</i> , Magermilchpulver
NIR	naher Infrarotbereich
NONOat	Diazeniumdiolat

NOS	NO Synthase
NOS1	neuronale NO Synthase
NOS2	induzierbare NO Synthase
NOS3	endotheliale NO Synthase
PAR1	proteaseaktivierter Rezeptor 1
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PEG	Polyethylenglykol
PI3K	Phosphoinositid-3-kinase
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
PPR	engl. <i>poly-proline region</i> , prolinreiche Domäne
PVDF	Polyvinylidenfluorid
O ₂ ⁻	Superoxid
OD	optische Dichte
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-on
ONOO ⁻	Peroxynitrit
Rb	Retinoblastom-Protein
rel.	relativ
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNS	engl. <i>reactive nitrogen species</i> , reaktive Stickstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
ROS	engl. <i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
SCF	engl. <i>stem cell factor</i> , Stammzellfaktor
SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Ser	Serin
SH3 Domäne	Src Homologie 3 Domäne
sGC	engl. <i>soluble guanylyl cyclase</i> , lösliche Guanylatzyklase
Sytox	Sytox TM AADvanced TM
TACE	engl. <i>TNF-α-converting enzyme</i> , TNF- α konvertierendes Enzym
TBS	engl. <i>tris-buffered saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-Tween-Puffer
TCPS	engl. <i>tissue-culture polystyrene</i> , Zellkulturplastik
TGF- β	engl. <i>transforming growth factor β</i> , transformierender Wachstumsfaktor β
Thr	Threonin
TMT	engl. <i>tandem mass tag</i> , Marker für die Massenspektrometrie
TNF	Tumornekrosefaktor
ToF-SIMS	engl. <i>Time-of-Flight secondary ion mass spectrometry</i> , Sekundärionenmassenspektrometrie
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
UV/vis	Licht mit Wellenlängen im UV und sichtbaren Bereich
VASP	Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein
VCAM1	engl. <i>vascular cell adhesion molecule 1</i> , vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1
VEGF	engl. <i>vascular endothelial growth factor</i> , Endothelwachstumsfaktor
VLA4	engl. <i>very late antigen 4</i> , sehr spätes Antigen 4
VE-Cadherin	engl. <i>vascular endothelial cadherin</i> , endotheliales Cadherin

1 Einleitung

1.1 Hämatopoetische Stammzellen

Verschiedenste Arten von Blutzellen übernehmen zentrale Körperfunktionen wie die Bekämpfung von Pathogenen durch die angeborene und erworbene Immunantwort, O₂ und CO₂ Transport oder die Blutgerinnung. Da die Lebensdauer dieser Zellen beschränkt ist, müssen sie ein Leben lang erneuert werden, um ihre Funktionen sicher zu stellen. Insbesondere in Notsituationen, wie beispielsweise bei einem großen Blutverlust nach Verletzungen, muss eine Vielzahl an Blutzellen in kurzer Zeit bereitgestellt werden. Alle Zelltypen des Blut- und Immunsystems stammen von einem multipotenten Vorläufer, den hämatopoetischen Stammzellen (HSZ), ab [1].

1.1.1 Hämatopoese

HSZ besitzen die Fähigkeit alle Zellen des Blutsystems zu generieren und gleichzeitig über Selbsterneuerungsprozesse die Population an HSZ konstant halten. Im murinen Modellsystem wurde gezeigt, dass eine einzelne HSZ ausreicht, um das gesamte Blutsystem zu regenerieren [2]. Diese stellt die Blutproduktion über eine große Zeitspanne sicher, welche die Lebensdauer des Spendertiers deutlich übersteigen kann [3]. Eine Stammzelle kann durch asymmetrische Zellteilung neben einer HSZ eine Vorläuferzelle generieren, welche anschließend mehrstufige Differenzierungsprozesse durchläuft und so eine Vielzahl an reifen Blutzellen hervorbringt [4].

Im Embryo entstehen die ersten HSZ in der Aorta-Gonaden-Mesonephros Region und der Plazenta [5, 6] aus hämatogenem Endothel [7]. Die Bildung von HSZ ist hier neben verschiedenen Liganden für den Notch- oder Hedgehog-Signalweg auch von der Scherbeanspruchung durch den Blutfluss abhängig und wird über NO vermittelt [8]. Aus der Aorta-Gonaden-Mesonephros Region migrieren HSZ in die fetale Leber sowie die Plazenta und schließlich in die Milz. Um den Zeitpunkt der Geburt wandern HSZ in das Knochenmark, welches im adulten Organismus den hauptsächlichen Ort für die Hämatopoese darstellt [1]. Während embryonale HSZ eine hohe Zellteilungsrate besitzen, befinden sich adulte HSZ in der Mehrheit in einem Ruhezustand, genannt Quieszenz [1].

Wie in Abbildung 1 A) dargestellt, differenzieren HSZ über verschiedene Vorläuferstadien, in Folge Progenitorzellen genannt, in reife Blutzellen. Während HSZ die Fähigkeit besitzen sich

selbst und so langanhaltend das Blutsystem zu erneuern [9], können multipotente Progenitorzellen (engl. *multipotent progenitors*, MPPs) dies nur mittelfristig, da ihr Selbsterneuerungspotential endlich ist. Nur eine von 10^6 Zellen im menschlichen Knochenmark ist eine funktionale HSZ [10]. Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ) lassen sich über den Oberflächenmarker CD (engl. *cluster of differentiation*) 34 isolieren, welcher auf weniger als 5% aller Blutzellen gefunden wird [11]. Für reinere HSZ Populationen müssen weitere immunphänotypische Oberflächenmerkmale herangezogen werden. Da CD38 und CD45RA reifere Progenitorzellen markieren, kann ihre fehlende Expression zur Anreicherung von HSZ verwendet werden [12-14]. Zusammen mit der Expression von CD90 und dem Mangel an Differenzierungsmarkern für reife Zellen (engl. *lineage marker*, Lin) können beispielsweise Zellanteile erhalten werden, die zu etwa 5% funktionale HSZ enthalten [15]. Der Verlust von CD90 wird dabei dem Übergang von $CD34^+ CD38^- CD45RA^- CD90^+$ HSZ zu MPPs zugeschrieben [16].

Mit zunehmender Differenzierung der Zellen geht ihre Spezialisierung auf eine Abstammungslinie einher und damit die Fähigkeit verloren sich in alle Blutzelltypen zu entwickeln. Reife Blutzellen werden grundsätzlich in lymphoide Zellen, wie T-, B- und NK-Zellen, und myeloide Zellen, wie Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Megakaryozyten, eingeteilt [17]. Wie in Abb. 1 B) gezeigt, wurde klassischerweise angenommen, dass sich alle reifen Zellen auf einen myeloiden bzw. lymphoiden Progenitorzelltyp zurückführen lassen, welche durch eine binäre Differenzierungsentscheidung aus MPPs hervorgehen. Diese stammbaumartige Abfolge von Differenzierungsentscheidungen über verschiedene Progenitorstadien wurde jedoch in jüngster Zeit in Frage gestellt und erweitert [18, 19]. So wurden Progenitorzellen mit lymphoider Tendenz (engl. *lymphoid-primed multipotent progenitors*, LMPPs) gefunden, die in Granulozyten, Monozyten, B- und T-Zellen differenzieren, ohne jedoch Erythrozyten und Megakaryozyten bilden zu können und durch die Kombination $CD34^+ CD38^- CD90^{low} CD45RA^+$ und $CD10^-$ beschrieben werden [20]. Diese Beobachtung deckt sich mit Berichten, die $CD34^+ CD10^-$ Zellen beschreiben, welche lympho-myeloides Potential besitzen und mit zunehmender Expression von CD10 nach und nach ihr myeloides Potential verlieren [21, 22].

Myeloide Progenitorzellen lassen sich in gemeinsame myeloide Progenitorzellen (engl. *common myeloid progenitors*, CMPs), Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitoren (engl. *megakaryocyte-erythrocyte progenitors*, MEPs) und Granulozyten-Makrophagen-Progenitoren (engl. *granulocyte-makrophage progenitors*, GMPs) einteilen. Die einzelnen Populationen lassen sich aufgrund der Kombination der Oberflächenmoleküle CD123 bzw. CD135 und CD45RA unterscheiden [23, 24].

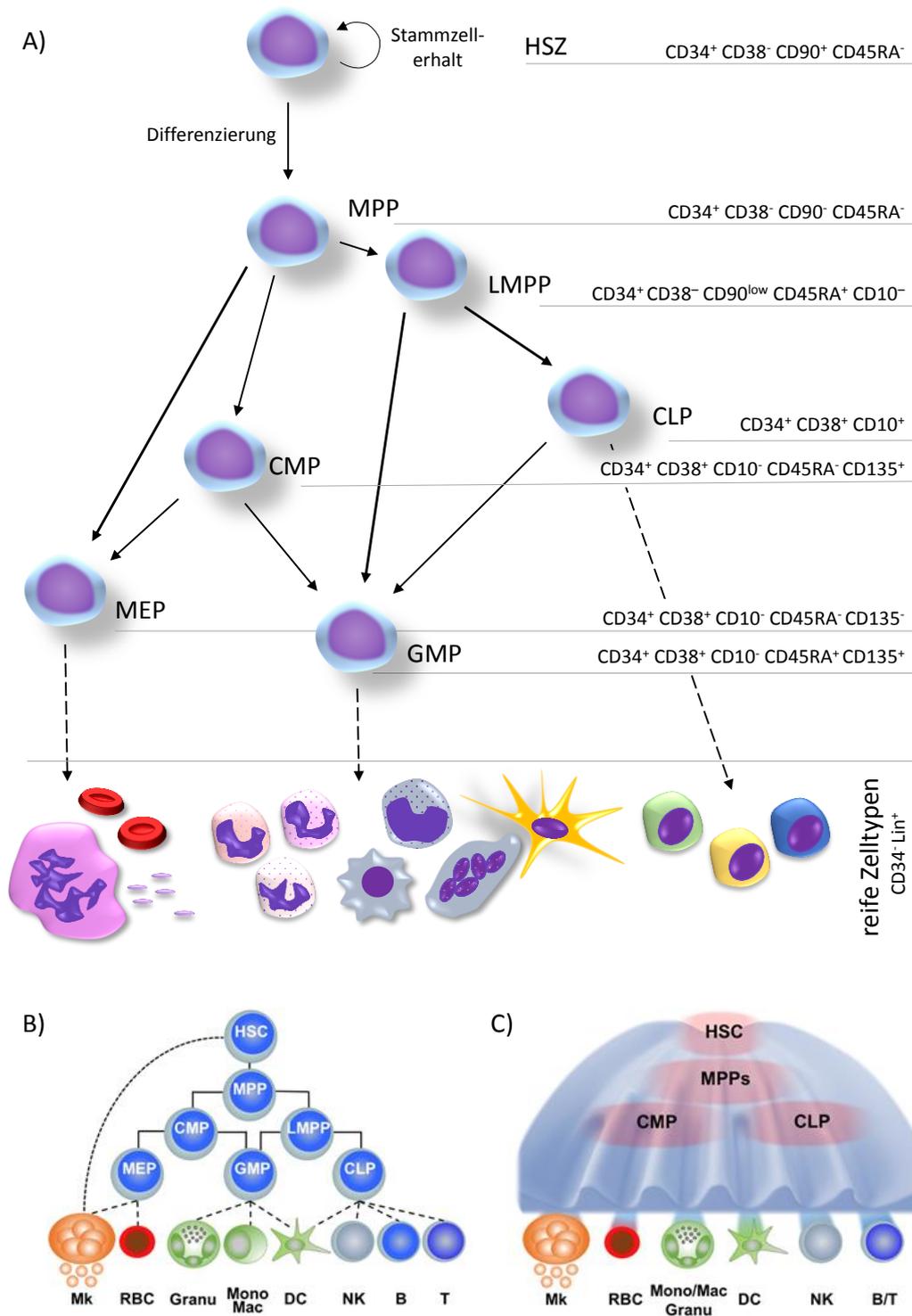


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Differenzierung von HSZ in reife Zelltypen. A) HSZ erneuern das Blutsystem durch Differenzierung in myeloide und lymphoide Zellen über verschiedene Progenitorzelltypen, welche sich durch charakteristische CD Marker Kombinationen (rechts im Bild) identifizieren lassen. Gleichzeitig besitzen HSZ die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und sichern so den Stammzellerhalt (angelehnt an [1]). B) Nach dem klassischen Stammbaum-Modell der Hämatopoese differenzieren HSZ über binäre Entscheidungen stufenweise in verschiedene Progenitoren, welche spezialisierte Zelltypen generieren. C) Das Waddington'sche Kontinuitätsmodell der HSZ Differenzierung geht von HSZ aus, die kontinuierlich transkriptomische Zustände ansammeln, welche die Differenzierungsrichtung beeinflussen. Zwischenstufen, wie MPPs oder CMPs, werden hier nicht als homogene Zellpopulationen sondern Übergangszustände des Kontinuums verstanden. B) und C) reproduziert von [17, 19] mit freundlicher Genehmigung von Elsevier B.V.

Myeloide Progenitoren, jedoch nicht erythroide Progenitoren, exprimieren CD123 und CD135. Außerdem geht der Übergang von CMPs zu GMPs mit der Expression von CD45RA einher. Hingegen sind gemeinsame lymphoide Progenitoren (engl. *common lymphoid progenitors*, CLPs) größtenteils auf die lymphoide Linie festgelegt und durch CD34 und den frühen B-Zellmarker CD10 gekennzeichnet [25, 26]. Aus ihnen können lymphoide Zellen, Monozyten und dendritische Zellen entstehen, jedoch können sie keine Granulozyten bilden [23].

Entgegen des klassischen Modells wurde über den Vergleich funktioneller Eigenschaften, Transkriptomanalysen und durchflusszytometrischer Daten gezeigt, dass HSZ und frühe Progenitoren wie MPPs und LMPPs, welche $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^-$ sind, keine diskreten Zelltypen beschreiben. Stattdessen stellen sie einen Teil eines Kontinuums an frühen HSPZ dar, welche bereits eine schwache Tendenz für eine Differenzierungslinie aufweisen [18], wie in Abb. 1 C) anhand des Waddington'schen Kontinuitätsmodells verdeutlicht. Des Weiteren sind LMPPs, CLPs und GMPs heterogene Populationen, die ein Kontinuum von Progenitoren bilden, welche lymphoides und myeloides Potential aufweisen [27]. Der größte Anteil von Progenitoren, der nicht auf eine Differenzierungslinie festgelegt war, wurde dabei in der LMPP Fraktion gefunden [27]. Wie frühe Entscheidungen für eine bestimmte Differenzierungslinie getroffen werden, die von der Induktion und Aufrechterhaltung linienspezifischer genetischer Programme begleitet sind, ist dabei nicht abschließend geklärt. Frühe HSZ exprimieren stammzellspezifische Gene. Jedoch exprimieren sie bereits in diesem Stadium Gene der frühen lymphoiden/myeloiden oder Megakaryozyten/Erythrozyten Linien [18], sodass erste Differenzierungsentscheidungen in eine dieser beiden Richtungen bereits in diesem Stadium angelegt sein könnten. Laut der Hypothese des *lineage priming* könnte die Multipotenz mit der Koexpression verschiedenster Transkriptionsfaktoren für exklusive Differenzierungslinien verbunden sein, welche sich gegenseitig inhibieren und so neutralisieren [1, 28]. Mit zunehmendem *priming* und Differenzierung werden die stammzellspezifischen Gencluster sowie ein Teil der linienspezifischen Genabschnitte herunterreguliert, während andere verstärkt werden. So können Transkriptionsfaktoren früher Genabschnitte die Expression nachgelagerter Genabschnitte regulieren, wie bei der Differenzierung erythroider Zellen aus HSZ über GATA2, TAL1 und GATA1 [29].

Die Balance von Selbsterneuerung und Differenzierung in HSZ ist stark kontrolliert um sicherzustellen, dass trotz der Bildung reifer Blutzellen eine konstante Population von HSZ erhalten wird. Dies ist nötig, um langfristig die Hämatopoese gewährleisten zu können und der Entstehung maligner Veränderungen vorzubeugen.

Diese Regulierung von HSZ findet in der HSZ Nische im Knochenmark statt. Zellen, die aus ihrer Umgebung entnommen werden, verlieren ihr Selbsterneuerungspotential rasch.

1.1.2 HSZ Nische im Knochenmark

Die große Mehrheit an HSZ befindet sich im roten Knochenmark. Hier bilden verschiedene Zelltypen, extrazelluläre Matrix (EZM) und membrangebundene, lösliche oder an die EZM assoziierte Liganden und Faktoren eine spezialisierte Mikroumgebung, genannt Nische, mit der HSZ interagieren und die das HSZ Verhalten beeinflusst. Die Nischenhypothese wurde bereits 1978 von Schofield aufgestellt, indem er postulierte, dass ein bestimmter Ort im Knochen existiert, der den lebenslangen Erhalt an HSZ sicherstellt [30]. Neben HSZ und heranreifenden hämatopoetischen Zellen befinden sich Endothelzellen, perivaskuläre Zellen, Osteoblasten, sympathische Nerven, Adipozyten und verschiedenste Typen mesenchymaler Stromazellen (MSZ) in der Knochenmarksnische [31].

Nach Transplantationen von HSZ wurde gezeigt, dass diese vorrangig in die Nähe des Endosteums an der Knochenoberfläche migrieren [32, 33]. Hierdurch wurde die Existenz einer endostealen Nische abgeleitet, in der Osteoblasten ruhende HSZ in ihrem Stammzellerhalt fördern [34-36]. Die Existenz einer solchen Nische wurde seither kontrovers diskutiert, da HSZ kurz darauf durch Identifikation mit SLAM Familien Markern vorrangig an Blutgefäßen, wie Sinusoiden, gefunden wurden [37]. Die Entwicklung neuer Verfahren ermöglichte die Beobachtung von HSZ unter Homöostase im Knochenmark [38, 39]. Hierbei scheinen verschiedene Blutgefäßumgebungen spezialisierte Nischen für HSZ darzustellen [40-45]. Dies schließt endosteale Einflüsse jedoch nicht aus, da auch diese Umgebung von einem engen Blutgefäßnetz durchzogen wird und es hierdurch zu einer erheblichen Überschneidung beider postulierter Nischentypen kommt. Arteriolen sowie Kapillaren, welche erstere mit venösen, sinusoidalen Blutgefäßen verbinden, finden sich vorrangig in der Nähe des Endosteums und im Bereich des trabekulären Knochens [41, 46].

Arterielle Blutgefäße und Kapillaren weisen im Vergleich zu Sinusoiden eine erhöhte Expression an endotheliale Cadherin (engl. *vascular endothelial cadherin*, VE-Cadherin) und Tight Junction Proteinen, eine geringere Permeabilität und höhere Scherraten durch Blutfluss auf [41]. Wie in Abbildung 2 gezeigt, werden sie von einer Schicht aus MSZ umgeben [41], welche sich durch die Expression des Neuron-Glia Antigens 2 (NG2) und Nestin auszeichnen [43]. Sinusoide hingegen sind dünnwandig und bestehen aus einer Endothelschicht. Sie sind von perivaskulären Zellen umgeben, die den C-X-C Motiv Liganden 12 (CXCL12) exprimieren und

daher als CXCL12-reiche (engl. *CXCL12 abundant retikular, CAR*) Zellen bezeichnet werden [47]. Dieses Chemokin interagiert mit dem auf HSZ exprimierten C-X-C Motiv Chemokin Rezeptor 4 (CXCR4) [48] und spielt eine zentrale Rolle in der Ansiedlung von HSZ in der Knochenmarksnische. Des Weiteren befinden sich an Sinusoiden perivaskuläre Stromazellen, die sich durch Expression des Leptin Rezeptors (LepR) auszeichnen [43, 49]. Verbindende Kapillaren weisen sowohl arterielle als auch sinusoidale Marker auf [50].

Da alle Blutgefäßtypen den trabekulären Knochen durchziehen, Arteriolen und Kapillaren jedoch in direkter Umgebung des Endosteums vorliegen, wird dort von osteovaskulären Nischen ausgegangen, welche HSZ in einem metabolisch inaktiven Zustand halten [41]. Diese Zellen sind durch geringe Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species, ROS*) gekennzeichnet, besitzen langfristiges Erneuerungspotential [51] und proliferieren mit sehr geringer Frequenz unter Erhalt ihres Stammzellcharakters [38, 44]. Hier vorhandene unterstützende Nischenzellen, wie Stroma- und Endothelzellen, weisen eine hohe Expression von CXCL12 und E-Selektin auf und halten HSZ so in dieser Nische. Neben osteogenen Zellen finden sich in dieser Nische einige myeloide Zelltypen [52] und nicht myelinisierende Schwann-Zellen [41]. Letztere erhalten den Ruhezustand von HSZ über Produktion des transformierenden Wachstumsfaktors β (engl. *transforming growth factor β , TGF- β*) [53, 54]. Osteoblasten scheinen nicht direkt für den Erhalt von HSZ essentiell [49, 55-57], sondern scheinen zusammen mit MSZ und parenchymalen hämatopoetischen Progenitorzellen an der Lymphopoese beteiligt [57-60].

Sinusoidale Blutgefäße sind mit HSZ assoziiert, welche verschiedene ROS Gehalte aufweisen. Diese Blutgefäße stellen einen wichtigen Teil der vaskulären Nische dar, welche die Proliferation, Differenzierung und Migration von HSZ in das Blutssystem kontrolliert und erlaubt [41, 61]. Der Einfluss von ROS in diesen Prozessen wird durch die Beobachtung gestützt, dass erhöhte ROS Konzentrationen für die HSPZ Mobilisierung in das Blut benötigt werden [62, 63]. Eindringendes Blutplasma durch die permeableren Sinusoide könnte zu erhöhten intrazellulären Konzentrationen an ROS in HSZ führen und damit die Differenzierung und Migration der Zellen ermöglichen [41]. Durch die geringeren Scherraten verglichen mit Arteriolen wird angenommen, dass der Übertritt von HSZ aus dem Knochenmark in das Blutssystem ebenso wie die transendotheliale Migration von Immunzellen im Knochenmark vorrangig an Sinusoiden stattfindet [41].

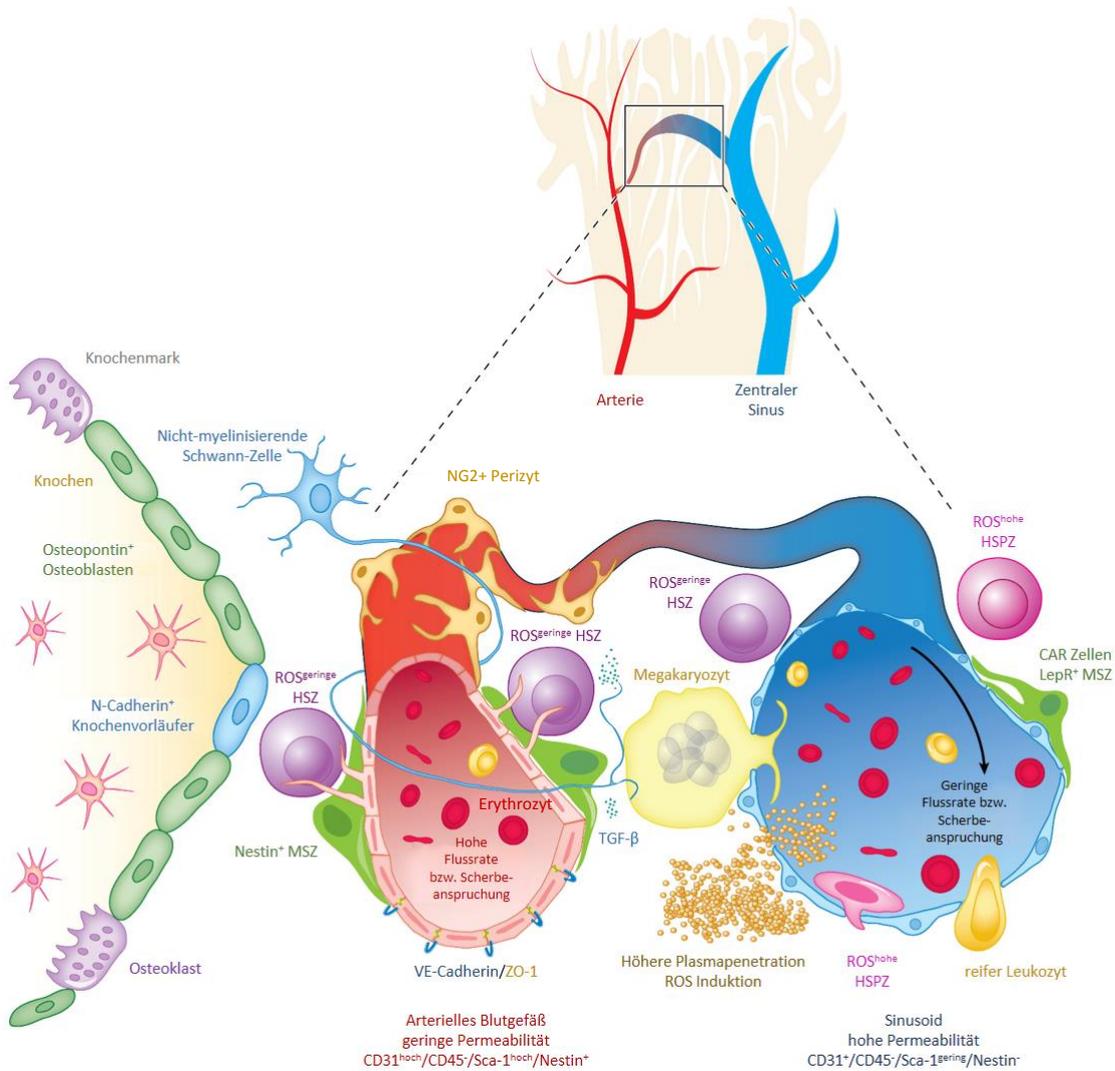


Abbildung 2 Schematische Darstellung der adulten HSZ Nische im Knochenmark. HSZ befinden sich in unmittelbarer Nähe verschiedener Blutgefäßtypen, die mit spezialisierten Mikroumgebungen in Verbindung gebracht werden. Ruhende HSZ befinden sich dabei vorrangig an wenig permeablen Arteriolen in der Nähe des Endosteums an der Grenzfläche zum Knochen (linker Bildabschnitt). Diese Gefäßtypen weisen zusätzlich Nestin⁺ MSZ sowie nicht myelinisierende Schwann-Zellen auf, welche die Quieszenz der HSZ unterstützen. An Sinusoiden, welche eine höhere Permeabilität aufweisen, finden sich metabolisch aktive HSPZ, welche durch höhere intrazelluläre ROS Gehalte gekennzeichnet sind (rechter Bildabschnitt). Diese Nische, welche zusätzlich CAR Zellen und LepR⁺ MSZ aufweist, wird daher mit der Migration der HSPZ in den Blutkreislauf bzw. der Differenzierung von HSZ in Verbindung gebracht. Abbildung modifiziert und reproduziert aus [42] mit freundlicher Genehmigung von ANNUAL REVIEWS, INC.

Sowohl verschiedene MSZ Populationen als auch Endothelzellen unterstützen den Stammzellerhalt beispielweise durch Expression von CXCL12 oder des Stammzellfaktors (engl. *stem cell factor*, SCF) [49, 55, 64]. Durch Deletion verschiedener Stroma- oder Endothelzellpopulationen wurde die für den Stammzellerhalt essentielle Funktion dieser Zelltypen gezeigt, indem sie HSZ in ihrem Ruhezustand fördern. Konditionelle Deletion von NG2⁺ Perizyten führte beispielsweise zu einem Anstieg an HSZ, die in den Zellzyklus eingetreten waren [43].

Endothelzellen scheinen neben der Integrin-vermittelten Verankerung von HSZ an das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül 1 (engl. *vascular cell adhesion molecule 1*, VCAM1) [65] besonders bei der Regeneration von HSZ über Bereitstellung des epidermalen Wachstumsfaktors (engl. *epidermal growth factor*, EGF) [66] oder des Liganden für den Notch-Signalweg *Jagged-1* [67, 68] eine zentrale Rolle einzunehmen [50]. Des Weiteren sezernieren Nischenzellen wie MSZ wichtige EZM Bestandteile, welche neben ihrer Funktion als Stützstruktur HSZ direkt oder indirekt beeinflussen können. So vermitteln zum Beispiel biophysikalische Eigenschaften der EZM über Mechanotransduktion Signale an die zellulären Bestandteile der Nische [69]. Außerdem binden viele EZM Bestandteile lösliche Faktoren, die für den Erhalt von HSZ essentiell sind. Neben Fibronectin, Lamininen, Kollagenen, Osteopontin, Hyaluronsäure und Tenascin C stellen Heparansulfat Proteoglykane einen Bestandteil der EZM in der Nische dar, der HSZ beeinflusst [70]. So erhöhte eine verringerte Sezernierung von Heparansulfat die Mobilisierung und das Anwachsen von HSPZ nach Transplantation [71].

Das sympathische Nervensystem reguliert unter Homöostase die Zirkulation von HSPZ im Blut. Dem zirkadianen Rhythmus folgend fluktuiert unter anderem (u.a.) die Norepinephrin (NE) Ausschüttung und regt Nestin⁺ Stromazellen über den β 3-Adrenergen Rezeptor zu verminderter CXCL12 Expression an [72-74]. Dies führt zur Unterbrechung der CXCL12-CXCR4 Achse und mobilisiert HSPZ in das Blutsystem. Zusätzlich wurde gezeigt, dass mit dem Anstieg an NE eine Steigerung der Produktion des Tumornekrosefaktors (TNF) einhergeht. Zusammen erhöhen beide Signalmoleküle vorübergehend den ROS Gehalt in HSZ, vermitteln die Differenzierung der Zellen und verstärkte vaskuläre Permeabilität [75]. Im Gegensatz dazu führt eine nächtliche Erhöhung von TNF zu Melatonin-vermittelter Selbsterneuerung über die Expression u.a. des SCF Rezeptors, verringerter Permeabilität der Blutgefäße und die Senkung der intrazellulären ROS Konzentration [75]. Das sympathische Nervensystem scheint ebenfalls die Mobilisierung von HSPZ durch G-CSF zu steuern [76]. Die Balance zwischen Erhalt im Knochenmark und Mobilisierung in das Blutsystem wird in HSZ, die den endotheliales Protein C Rezeptor (EPCR) und den proteaseaktivierten Rezeptor 1 (PAR1) exprimieren, über klassische gerinnungshemmende Signalkaskaden und NO Produktion gesteuert [77]. Über die Ausschüttung von aktiviertem Protein C (aPC) durch Thrombomodulin⁺ Endothelzellen in Arteriolen und Kapillaren und Bindung von aPC an den EPCR wird der PAR1 Signalweg aktiviert. Dieser begrenzt die Bildung von NO und die Aktivität des Zellteilungs-Kontrollprotein 42 Homologs (engl. *cell division control protein 42 homolog*, Cdc42) und erhält, vermittelt über das sehr späte Antigen 4 (engl. *very late antigen 4*, VLA4), EPCR⁺ HSZ im Knochenmark [77].

Hingegen führt Bindung von Thrombin zur Aktivierung einer alternativen, PAR1 nachgelagerten Signalkaskade, welche die Generation von NO ermöglicht, die Cdc42 Aktivität erhöht, die VLA4 Affinität senkt und die Abspaltung von EPCR durch das TNF- α konvertierende Enzym (engl. *TNF- α -converting enzyme*, TACE) bewirkt. Parallel dazu führt dieser Signalweg zur Sekretion von CXCL12 durch Stromazellen und Endothelzellen sowie der erhöhten Expression von CXCR4 auf HSZ und ermöglicht so die Migration und Mobilisierung von CXCR4⁺ HSZ in das Blutssystem [77-79].

Auch verschiedenste hämatopoetische Zellen sind in der Knochenmarksnische anzutreffen und beeinflussen HSZ direkt oder indirekt. Beispielsweise regen CD169⁺ Makrophagen Nestin⁺ MSZ zur Expression von CXCL12 an und stellen so den Erhalt von HSZ über die CXCL12-CXCR4 Achse im Knochenmark sicher [80, 81]. Megakaryozyten liegen an Arteriolen und Sinusoiden vor und erhalten HSZ unter homöostatischen Bedingungen über die Produktion von u.a. Thrombopoietin, CXCL4 und TGF- β [82-85]. Ungeachtet dessen sind HSZ keine bloßen passiven Empfänger von Signalen umgebender Zellen, sondern interagieren mit diesen. So wurde *ex vivo* gezeigt, dass HSZ über Signal-Endosome Osteoblasten zur Sekretion von CXCL12 anregen [86]. Des Weiteren wurde durch *live-imaging* während der Embryonalentwicklung in Zebrafischen und Mäusen demonstriert, dass nach Ankunft von HSZ im kaudalen hämatopoetischen Gewebe eine zelluläre Reorganisation der perivaskulären Nische initiiert wird [87]. Damit wurde die Hypothese befeuert, dass HSZ weniger passive Komponenten der Nische darstellen, sondern diese aktiv umgestalten können. In jüngster Zeit wurden Studien veröffentlicht, die den Einfluss beinahe jedes Zelltyps auf HSZ zeigen (für Übersicht siehe [88, 89]). Ob diese Einflüsse indirekter oder direkter Natur sind, lässt sich jedoch oft nur schwer unterscheiden. Fest steht, dass die HSZ Nische im Knochenmark von einer Vielzahl an spezialisierten Stromazellen, Knochenzellen und Zellen hämatopoetischen Ursprungs unterschiedlicher Reife besiedelt wird. Zusätzlich stellen verschiedene Blutgefäßtypen sowie sympathische Nerven wichtige Komponenten des Knochenmarks dar, die ein dichtes Kommunikationsnetzwerk bilden und sich auf verschiedene Weisen gegenseitig beeinflussen. Auch NO scheint an diversen Signalwegen in der HSZ Nische beteiligt zu sein.

1.2 NO als Signalmolekül in Säugetieren und tierischen Modellsystemen

Während NO lange lediglich für ein Umweltgift gehalten wurde, entdeckten Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro und Ferid Murad, dass es sich bei dem „dem Endothel entstammenden, entspannenden Faktor“, der die Gefäßerweiterung von Blutgefäßen vermittelt, um dasselbe Molekül handelt [90]. Für ihre Entdeckung von „NO als Signalmolekül im Herzkreislaufsystem“ wurde ihnen 1998 der Nobelpreis für Medizin verliehen. Heute ist bekannt, dass NO als Signalmolekül, das in vielen Zellen hergestellt wird, mit einer Halbwertszeit von wenigen Sekunden in benachbarte Zellen diffundiert und dort an einer Vielzahl biologischer Reaktionen beteiligt ist. Die Wirkung von NO auf humane HSZ ist weitgehend unbekannt und basiert auf einer kontroversen Datenlage. Daher wird hier zunächst auf die Generation von NO sowie bekannte NO-vermittelte Signalwege in Säugetieren und tierischen Modellorganismen eingegangen.

1.2.1 Generierung von NO *in vivo*

NO wird von der Enzymklasse der NO Synthasen (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin hergestellt, wie schematisch in Abbildung 3 gezeigt. Die heterodimeren Proteine gleichen sich weitgehend in der enzymatischen Produktionsweise von NO. Man unterscheidet in Säugetieren die neuronale NOS (NOS1), die induzierbare NOS (NOS2) und die endotheliale NOS (NOS3), welche zusätzlich zu L-Arginin Sauerstoff und reduziertes Nikotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) als Kosubstrat benötigen [91]. Nach Elektronenübertrag von NADPH zu den Kofaktoren Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) und Flavin-Mononucleotid (FMN) in der C-terminalen Reduktasedomäne der NOS, werden die Ladungsträger zum Häm in der N-terminalen Oxigenasedomäne weitergegeben [92]. In dieser liegen außerdem 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH₄) als essentieller Kofaktor sowie L-Arginin und O₂ gebunden vor [93, 94]. Am Häm reduzieren und aktivieren die Elektronen O₂ und oxidieren L-Arginin in einem zweistufigen Prozess. Dabei wird zunächst die Guanidin-Gruppe der Aminosäure hydroxyliert und das entstandene N^ω-hydroxy-L-Arginin in einem zweiten Schritt unter NO Abgabe zu L-Citrullin oxidiert [95].

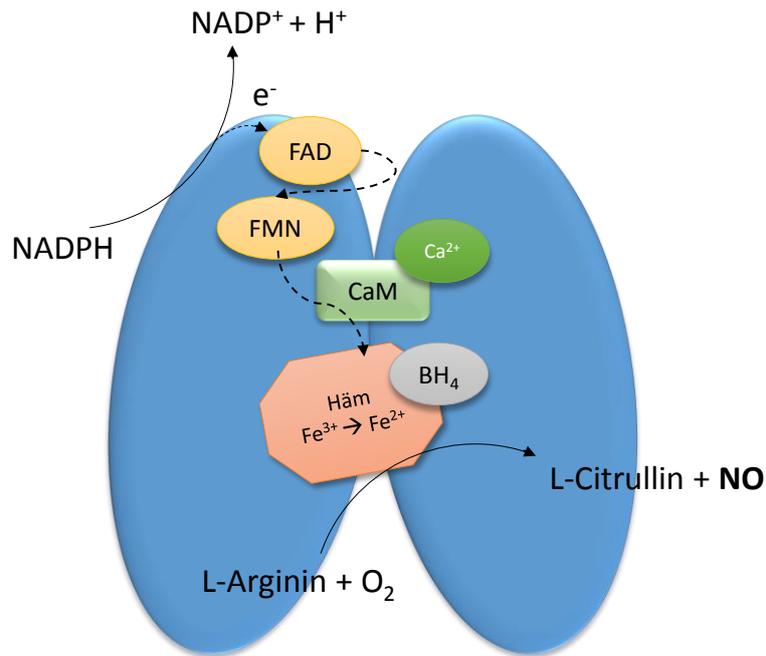


Abbildung 3 Vereinfachte, schematische Darstellung der NO Produktion durch NOS *in vivo*. In der Reduktasedomäne des Dimers (oberer Bildabschnitt) wird NADPH unter Elektronenabgabe oxidiert und der Elektronenfluss (gestrichelte Linie) über die Flavine (gelb) FAD und FMN zur assoziierten Häm-Einheit (rot) in der Oxigenasedomäne ermöglicht. In dieser liegt der essentielle Kofaktor BH₄ (grau) gebunden vor und vermittelt die Reduktion von O₂ sowie die Oxidation des Substrates L-Arginin zu L-Citrullin und NO. Für den Elektronenübertrag von der Reduktase- in die Oxigenasedomäne ist die Assoziation von Calmodulin (CaM) (hellgrün) als regulatorisches Protein, welches Ca²⁺ (grün) bindet, unabdingbar.

Zusätzlich zur enzymatischen Herstellung von NO über NOS, kann das Signalmolekül auch durch Reduktion von Nitrit mit Hilfe von Hämproteinen, wie Hämoglobin, oder durch enzymatische Reduktion zum Beispiel mit Hilfe der Xanthinoxidase generiert werden [96, 97]. Anders als die NO Synthese durch NOS, welche O₂ als Kofaktor erfordert, ist die reduktive Bildung von NO durch Nitrit nicht von der lokalen O₂ Konzentration abhängig und könnte so die NO Generation von NOS kompensieren, wenn hypoxische Bedingungen vorherrschen [98]. Diese alternativen Quellen stellen jedoch nur einen geringfügigen Anteil an der NO Produktion *in vivo* dar.

1.2.2 Regulation der NOS und typische NO-vermittelte Prozesse *in vivo*

Für einen effizienten Elektronentransfer zwischen der Reduktase- und Oxigenasedomäne von NOS ist die Bindung von Calmodulin (CaM) essentiell [99]. Bei den Ca²⁺ abhängigen Isoformen, NOS1 und NOS3, wird die reversible Bindung von CaM durch einen Anstieg an intrazel-

lulärem Ca^{2+} ausgelöst, der die Elektronenübertragung von NADPH zur Häm-Domäne ermöglicht [100]. NOS2 hingegen, ist nicht von Schwankungen der intrazellulären Ca^{2+} Konzentrationen abhängig, da CaM hier bei niedrigsten intrazellulären Ca^{2+} Konzentrationen an das Enzym assoziiert vorliegt [101].

Während NOS1 und NOS3 konstitutiv exprimiert sind und bei Bedarf hochreguliert werden können, ist NOS2 in den meisten Geweben unter Normalbedingungen nicht exprimiert. Eine Ausnahme stellen dabei Darmepithelzellen dar [102]. Durch die Stimulation mit bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) oder einer Kombination inflammatorischer Zytokine kann NOS2 jedoch in einer Vielzahl an Zellen induziert werden [103, 104]. Daraufhin ist das Enzym für einen Zeitraum von Stunden bis Tagen aktiv und produziert hohe Konzentrationen an NO, welche die durch konstitutiv exprimierte Isoformen produzierte um das 20-fache übersteigen. *In vivo* spielt diese Isoform zum Beispiel bei der Bekämpfung von Pathogenen durch Makrophagen als Teil der angeborenen Immunantwort eine zentrale Rolle [105]. Durch Regulation bzw. Induktion von Zellfunktionen und -tod von Immunzellen kann NO jedoch indirekt auch einen Teil der adaptiven Immunantwort darstellen [106].

Während NOS2 über längere Zeiträume hohe Konzentrationen an NO freisetzt, bilden die dauerhaft exprimierten NOS1 und NOS3 Ca^{2+} -abhängig niedrigere Konzentrationen von NO in pulsativer Art und Weise. So führt beispielsweise die verstärkte Scherbeanspruchung von Blutgefäßen beim Herzschlag zu einer kurzzeitigen Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration in den mechanisch beanspruchten Endothelzellen, sodass reversibel CaM an NOS binden kann und NO produziert wird [107]. NOS3 ist typischerweise in Endothelzellen exprimiert, wurde jedoch auch u.a. in Kardiomyozyten [108] oder Blutplättchen [109] nachgewiesen. Neben intrazellulären Ca^{2+} Konzentrationen kann die Enzymaktivität dieser NOS durch das Hitzeschockprotein 90 und Caveolin-1 reguliert werden [110-112]. Während im Grundzustand mehrheitlich Caveolin-1 an NOS3 gebunden vorliegt und so die Enzymaktivität unterdrückt, führt eine Bindung von CaM und des Hitzeschockproteins 90 zu einer Verdrängung von Caveolin-1 und damit zur Aktivierung des Enzyms [113]. Zusätzlich zu diesen Regulatoren kann NOS3 durch verschiedene Wachstumsfaktoren aktiviert werden, die durch Phosphoinositid-3-kinase (PI3K) oder Proteinkinase A (PKA) abhängige Mechanismen vermittelt werden [114, 115]. So phosphoryliert die Proteinkinase B (auch: Akt) der PI3K nachgelagert die NOS3 in Abhängigkeit des Endothelwachstumsfaktors (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), Sphingosin-1-phosphat und Östrogen [116, 117]. Scherbeanspruchung durch Blutfluss aktiviert hingegen hauptsächlich die PKA [118]. Unter physiologischen Bedingungen reguliert

NOS3 zum Beispiel die Einstellung der Blutgefäßweite über die Erschlaffung umgebender glatter Muskelzellen [119]. Gleichzeitig verhindert NO, welches in Richtung des Lumens diffundiert, die Aggregation sowie das Anhaften von Blutplättchen an die Gefäßwand und schützt so vor Thrombose [120, 121]. NOS3-gebildetes NO kann außerdem die Anhaftung von Leukozyten an die Gefäßwand verhindern, vor vaskulären Entzündungsreaktionen schützen und spielt eine wichtige Rolle in der Bildung neuer Blutgefäße [122].

NOS1 wird u.a. von Neuronen im Gehirn exprimiert und vermittelt die langfristige Regulation synaptischer Transmission, welche vor allem Prozesse wie Lernen, Erinnerung und die Neurogenese steuern [123-126]. Eine Beteiligung an akuter Neurotransmission wurde hingegen nicht gezeigt. Außerdem wurde NOS1 Expression im Rückenmark, den Nebennierendrüsen, nitrergen Nerven, Epithelzellen verschiedener Organe sowie einer Gruppe an Nieren-, Schilddrüsen- und glatten Muskelzellen nachgewiesen [127]. In der Peripherie sind viele Muskelgewebe mit nitrergen Nerven durchzogen, die NO freisetzen, um den Tonus der umgebenden Muskulatur zu senken, auch an Blutgefäßen. Daher spielt diese Isoform ebenfalls eine Rolle bei der Regulierung des Gefäßtonus und kann zum Teil die Rolle von NOS3 übernehmen, wenn diese dysfunktional ist [128]. Zusätzlich wurde von einer mitochondrialen NOS berichtet, welche jedoch als α -Isoform der NOS1 angesehen wird [129].

1.2.3 Konzentrationsabhängige Signalwege von NO

Anders als eine Vielzahl von Signalmolekülen agiert NO nicht über Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen, sondern diffundiert als relativ (rel.) stabiles Radikal durch die Zellmembranen benachbarter Zellen mit einem Einflussradius von $\sim 100 \mu\text{m}$ [130]. So erreicht es eine Vielzahl an Zielmolekülen in Nachbarzellen. Die Interaktion mit diesen hängt dabei stark von der Konzentration an freiem NO ab [131], wie in Abbildung 4 verdeutlicht. Bei niedrigen Konzentrationen dominieren direkte Effekte von NO durch Reaktion mit Metallen zum Beispiel in Hämproteinen. Leicht erhöhte Konzentrationen führen zur spezifischen Modifikation von Thiolresten über Nitrosylierung. Bei hohen Konzentrationen reagiert NO mit anderen reaktiven Spezies, wie H_2O_2 oder Superoxid (O_2^-). Die dabei entstehenden reaktiven Stickstoffspezies (engl. *reactive nitrogen species*, RNS) vermitteln indirekte Effekte von NO [132].

1.2.3.1 Klassischer NO Signalweg

Bei physiologischen Konzentrationen von NO im pM bis nM Bereich [133], wie sie von den konstitutiv exprimierten Isoformen synthetisiert werden, aktiviert NO primär die lösliche Guanylatzyklase (engl. *soluble guanylyl cyclase*, sGC), welche hauptsächlich zytosolisch vorliegt [134]. Dieses heterodimere Protein besteht aus je einer α - und einer β -Untereinheit [135] und besitzt eine prosthetische Hämgruppe [136], an die ein Histidinrest koordiniert vorliegt [137]. Die Aktivierung von sGC durch Bindung von NO geht mit einer 200-fachen Steigerung der Enzymaktivität einher, bei der Guanosintriphosphat (GTP) in cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und Pyrophosphat umgewandelt wird. Der exakte Mechanismus der Aktivierung von sGC durch NO ist nicht abschließend geklärt. Generell wurde gezeigt, dass die Bindung von NO an das Häm-Zentrum des Enzyms zur Unterbrechung der im Grundzustand vorliegenden His-Fe^{II} Bindung und zur Bildung eines fünffach koordinierten Nitrosyl-Häm-Komplexes führt [138, 139].

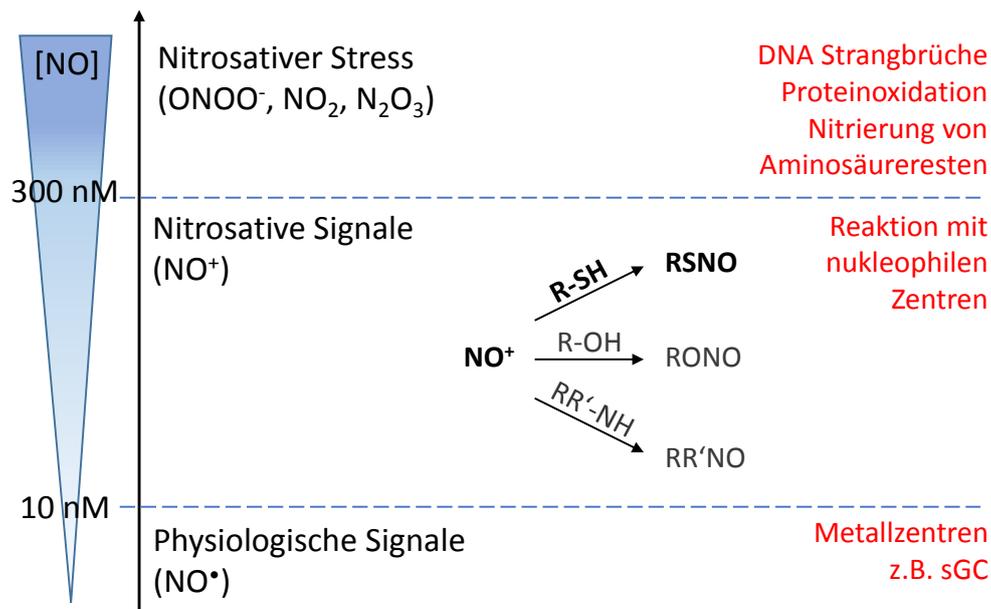


Abbildung 4 Schematische Darstellung direkter und indirekter NO-abhängiger Signalwege mit zunehmender Konzentration an NO (in Anlehnung an [98, 140, 141]). Mit steigenden Konzentrationen an NO, wie an der y-Achse aufgetragen, variieren die vorrangigen Interaktionspartner bzw. Wirkmechanismen von NO (rechte Bildseite, rot hervorgehoben) und erlauben so die Unterteilung in verschiedene NO-abhängige Signalwege (mittig dargestellt). Unter physiologischen Bedingungen (Konzentrationen von ca. 100 pM bis ca. 5 nM; unterer Bildabschnitt) herrschen direkte Reaktionen von NO mit Metallzentren von Proteinen vor, wie die Bindung von NO an die Hämgruppe der sGC und die damit einhergehende Aktivierung des klassischen NO Signalweges. Erhöhte Konzentrationen von NO (Konzentrationen bis ca. 300 nM, mittlerer Bildabschnitt) führen zur Reaktion von NO mit nukleophilen Zentren. Hierbei werden vorrangig Proteinthiole nitrosyliert (fett hervorgehoben). Sehr hohe NO Konzentrationen bis zu 1-3 μ M (oberer Bildabschnitt), welche für längere Zeiträume produziert werden können, führen zur Reaktion von NO mit anderen reaktiven Spezies zu RNS und zur unspezifischen Modifikation von Proteinen und DNA Strangbrüchen.

Es wird angenommen, dass durch die freie Histidylgruppe Konformationsänderungen verursacht werden, die zur Aktivierung des Enzyms führen [142]. Jüngere Studien postulieren hingegen, dass die Bindung von NO an das Hämzentrum der sGC lediglich zu einer teilweisen Aktivierung dieser führt, während zusätzliches NO benötigt wird, um die sGC maximal zu aktivieren [143]. Als Mechanismus hierfür wurde die zusätzliche Nitrosylierung von Cysteinresten des Enzyms vorgeschlagen [144].

Wie in Abbildung 5 schematisch gezeigt, führt die NO-abhängige Aktivierung der sGC zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration des sekundären Botenstoffes cGMP. Neben cyclisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen und cGMP-abhängigen Phosphodiesterasen (PDEs) stellen die cGMP-abhängigen Proteinkinasen G (PKG) eine wichtige Familie von Zielmolekülen von cGMP dar [145]. Beide Varianten dieser Serin(Ser)/Threonin(Thr) Kinasen, PKGI und PKGII, sind homodimere Proteine mit einem Leucin-Zipper-Motiv, die durch sub- μ M Konzentrationen von cGMP aktiviert werden [146]. PKGI ist hauptsächlich im Zytosol vorhanden und stellt die im Vergleich zur PKGII häufiger an cGMP-abhängigen Signalwegen beteiligte Kinase dar. Die PKGI Isozyme PKGI α und PKGI β werden durch alternatives Splicing des N-Terminus erhalten und werden je nach Gewebe in unterschiedlichen Verhältnissen koexprimiert [146]. Durch Bindung von cGMP an der regulatorischen Domäne der Ser/Thr Kinasen wird eine Konformationsänderung herbeigeführt, die die Inhibition des katalytischen Zentrums durch den N-Terminus unterbricht und so die Phosphorylierung von Substratproteinen ermöglicht. So vermittelt die PKG u. a. die Weitung von Blutgefäßen sowie die verminderte Aggregation von Blutplättchen (für Übersicht siehe [147, 148]).

Die Ziele des NO/sGC/cGMP/PKG Signalweges sind in einer Vielzahl von Zelltypen, wie HSPZ, nur rudimentär erforscht, während sie in glatten Muskelzellen sowie Blutplättchen weitreichend untersucht wurden. In diesen wurde gezeigt, dass die Aktivierung des Signalweges zur Senkung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration sowie zur Aktivierung der PDE5 führt. Letztere hydrolysiert cGMP und stellt so einen Feedback-Mechanismus bereit, der die PKG Aktivität einschränkt. Zusätzlich inaktiviert die PKG das Ras homolog Genfamilienmitglied A durch Phosphorylierung an Ser188, verändert die Genexpression in einer Vielzahl von Geweben und vermittelt je nach Zielgewebe zellschützende sowie proapoptotische Prozesse. Außerdem stellt das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) ein Zielmolekül der PKG dar.

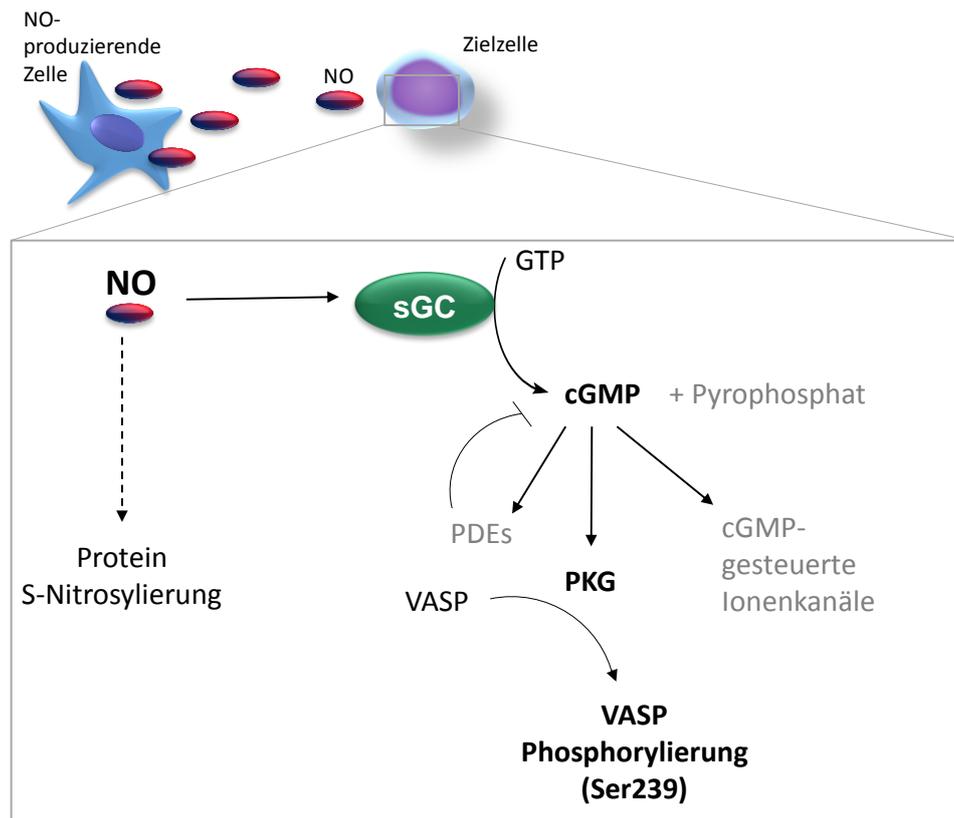


Abbildung 5 Schematische Darstellung NO-vermittelter Signalwege, welche unter physiologischen Bedingungen vorherrschen. NO wird von NOS-exprimierenden Zellen gebildet (oben links), erreicht benachbarte Zielzellen durch Diffusion (oben mittig) und aktiviert dort nach Diffusion durch die Zellmembran verschiedene Signalwege (Bildausschnitt). Bereits niedrige nM Konzentrationen an NO aktivieren den klassischen NO-Signalweg (rechter Bildabschnitt, Hauptbestandteile des Signalweges sowie in vorliegender Arbeit untersuchte Zielmoleküle sind fett hervorgehoben). Die Bindung von NO an die Hämgruppe der sGC (grün) führt zur verstärkten Produktion von cGMP aus GTP sowie von Pyrophosphat als Nebenprodukt. Die Erhöhung von intrazellulärem cGMP aktiviert neben der PKG cGMP-gesteuerte Ionenkanäle und PDEs. Letztere bauen cGMP ab und stellen so einen negativen Feedback-Mechanismus bereit (dargestellt durch Blockadepfeil). Physiologische Antworten des Signalweges werden vielfach über die Aktivierung der PKG vermittelt, welche NO-abhängig Proteine, wie zum Beispiel VASP an Ser239, phosphoryliert. Im gesunden Organismus wurden weiterhin die spezifische Modifikation von Proteinthiolen durch NO^+ beschrieben, genannt S-Nitrosylierung, welche im Vergleich zum klassischen Signalweg erhöhter NO Konzentrationen bedarf. Die Sicherstellung der Spezifität dieser Modifikation ist dabei nicht abschließend geklärt (Darstellung als gestrichelter Pfeil).

VASP ist als Mitglied der Ena (abgeleitet von engl. *enabled*)/VASP Familie ist ein Aktin-bindendes Fokaladhäsions-Adaptorprotein, welches maßgeblich an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts bei der Zelladhäsion und -migration und so an der Motilität von Zellen beteiligt ist [149-151]. Wie in Abbildung 5 dargestellt, besitzt VASP eine N-terminale Ena/VASP Homologie (EVH) 1 Domäne, eine zentrale prolinreiche Domäne (engl. *poly-proline region*, PPR) sowie eine C-terminale EVH2 Domäne. Die EVH1 Domäne vermittelt die Bindung von VASP an Prolin-reiche Liganden wie Vinkulin und Zyxin [152]. Die PPR ermöglicht die Assoziation mit dem Aktin-bindenden Protein Profilin und Src Homologie 3 (SH3) Domänen [153, 154]

während die EVH2 Domäne die Tetramerisierung von VASP vermittelt und Bindungsstellen für G- und F-Aktin aufweist [155]. Die Verortung und Funktion von VASP wird maßgeblich durch Phosphorylierungsereignisse bestimmt [156]. VASP besitzt fünf Phosphorylierungsstellen, von denen drei durch cyclisch-Nukleotid gesteuerte Proteinkinasen phosphoryliert werden können. Hierbei stellen die Phosphorylierungsstellen von VASP an Ser157, Ser239 und Thr278 jeweils vorrangig Ziele der cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-abhängigen PKA, der PKG und der Adenosinmonophosphat-aktivierten Proteinkinase (AMPK) dar [150, 157]. Während PKA erst Ser157 und später Ser239 phosphoryliert, führt die Aktivität der PKG zur Phosphorylierung der beiden Ser-Reste in umgekehrter Reihenfolge [158]. Es wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung an Ser157 die intrazelluläre Verortung von VASP beeinflusst und in migrierenden Zellen zur Assoziation des Proteins an die Zellmembran oder -fortsätze führt [157]. Phosphorylierung an Ser239 (und Thr278) hingegen verringert die F-Aktin Bündelung durch VASP sowie die VASP-gesteuerte Aktin Polymerisation und verursacht so eine verringerte Anzahl und Länge von Filopodien [157, 159, 160]. Die spezifische Phosphorylierung von VASP durch die PKG wurde bei der Erforschung des klassischen NO Signalweges in Blutplättchen häufig zur Überprüfung der Aktivität des Signalweges eingesetzt.

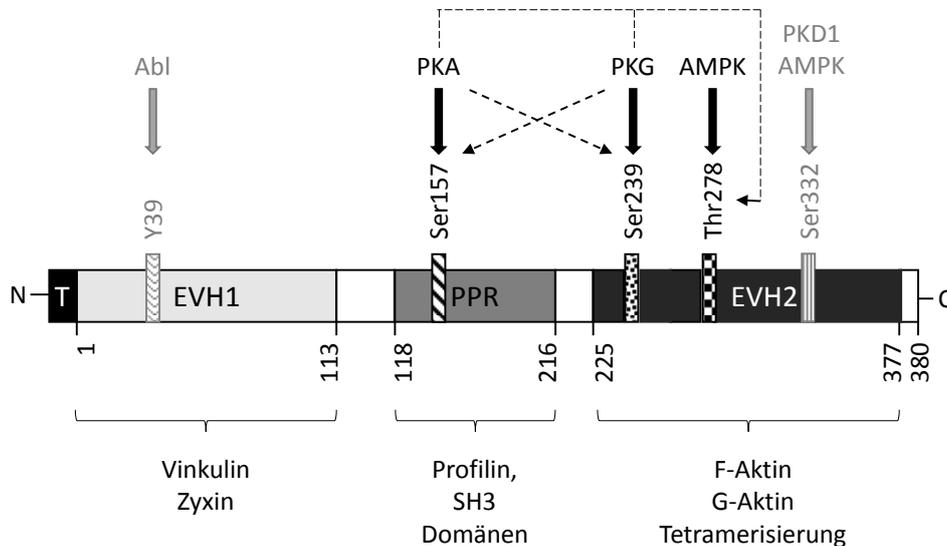


Abbildung 6 Schematische Darstellung von VASP und mögliche Phosphorylierungsstellen des Proteins. VASP besitzt eine N-terminale EVH1 Domäne (hellgrau), welche die Bindung an prolinreiche Liganden wie Vinkulin vermittelt, eine PPR (grau), welche u.a. die Assoziation mit Profilin vermittelt, und die EVH2 Domäne (dunkelgrau), die die Tetramerisierung von VASP sowie die Bindung von Aktin ermöglicht. Unter den fünf bekannten Phosphorylierungsstellen von VASP (schematisch durch gemusterte Balken dargestellt) können drei durch cyclisch Nukleotid-gesteuerte Kinasen modifiziert werden (schwarz gemustert). Dabei stellen Ser157 (diagonale Streifen), Ser239 (Punkte) und Thr278 (Schachbrett-Muster) vorrangige Ziele für die PKA, PKG und AMPK dar (verdeutlicht durch Blockpfeile). Nachrangig können die Kinasen jedoch auch die jeweils anderen Stellen phosphorylieren (gestrichelte Pfeile). Phosphorylierungsstellen, welche keine Ziele der cyclisch Nukleotid-gesteuerten Kinasen darstellen sind in hellgrau markiert. Abbildung angelehnt an [157].

1.2.3.2 S-Nitrosylierung

Neben dem cGMP-abhängigen Signalweg kann NO Proteine ebenfalls enzymunabhängig über die Addition einer Nitrosogruppe an ein Cysteinthiol modifizieren, genannt S-Nitrosylierung [161]. Mehr als 2000 verschiedene Zielmoleküle wurden bis dato identifiziert und sind in der „dbSNO“ Datenbank für Proteinnitrosylierungen zusammengefasst [162]. Diese reversible, redox-basierte, posttranslationale Modifikation geht mit der Regulierung verschiedenster physiologischer Prozesse einher [163-167]. Übermäßige S-Nitrosylierung wird jedoch mit einer Vielzahl pathophysiologischer Veränderungen in Verbindung gebracht [168-170]. Da NO nicht direkt an der Modifikation beteiligt ist, sondern der Bildung nitrosylierender Spezies durch die Oxidation von NO bedarf, wird angenommen, dass diese höhere NO Konzentrationen benötigt als die Aktivierung des klassischen Signalwegs [171]. Wie *in vivo* S-Nitrosylierungs-Ereignisse herbeigeführt werden ist nicht abschließend geklärt. So wurde zum Beispiel die Nitrosylierung von NOS mit anschließender Transnitrosylierung des Zielmoleküls, Übergangsmetallkatalyse, die Reaktion mit Sauerstoffspezies sowie die Rekombination von radikalischen Spezies als möglicher Mechanismus vorgeschlagen [172]. Da intrazellulär die S-Nitrosylierung von Proteinen mit anderen Reaktionen, wie der Reaktion von NO mit Superoxid (O_2^-) unter Bildung von Peroxynitrit ($ONOO^-$) oder der Reaktion mit einer Fe^{II} -Hämgruppe, konkurrieren muss, wurde die Modifikation als kurzreichweitiger Signalmechanismus postuliert, der vorrangig stattfindet, wenn die lokale Konzentration von NO erhöht ist [173]. Anders als enzymatische posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen, wird die S-Nitrosylierung eines Thiolrestes nicht über ein spezifisches Aminosäure-Motiv vermittelt, sondern hängt allein von der Reaktivität zwischen der nitrosylierenden Spezies und dem Proteinrest ab [174]. Es wurden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen, welche die Spezifität der Modifikation gewährleisten. Neben der Kollokalisierung der Proteinziele mit NOS, wurde der pK_a des Cysteinrestes, die Zugänglichkeit des Aminosäurerestes in der Tertiärstruktur von Proteinen, die umgebende Sekundärstruktur und die Hydrophobizität umgebender Strukturen diskutiert [175-180]. Gleichzeitig stellen die Modifikationen redox-sensitive Bindungen dar, die durch reduzierende Spezies, pH- und pO_2 Veränderungen und ultraviolettes (UV) Licht gebrochen werden können [181]. Da intrazellulär eine Vielzahl reduzierender Spezies, wie Glutathion (GSH), vorliegen, finden *in vivo* auch Denitrosylierungsreaktionen statt. Beispielsweise kann die Nitrosogruppe über Transnitrosylierung an GSH weitergegeben werden oder der Proteinrest glutathionyliert werden. Bis heute wird über die Rolle von S-Nitrosylierungen als stabile Modifikation diskutiert, welche Proteinfunktion und -stabilität steuert. Während einerseits die Meinung vorherrscht, dass es sich um eine weitverbreitete Modifikation handelt, die zelluläre Prozesse parallel zu

Phosphorylierungen steuert [182, 183], stellen andere diese These in Frage und argumentieren, dass S-Nitrosylierungen kurzlebige Zwischenstufen auf dem Weg zur Bildung von Disulfiden darstellen und die beschriebenen Effekte auf diese stabilere Modifikation zurückgeführt werden sollten [184].

1.2.3.3 Weitere NO-vermittelte Signalwege

Direkte physiologische Reaktionen von NO beruhen auf der Wechselwirkung mit Metallzentren von Proteinen wie der Aktivierung der sGC im Rahmen des klassischen NO Signalweges. NO konkurriert mit O₂ um die Bindung an andere Metalloproteine und kann so die Proteinfunktion regulieren oder inhibieren. Beispielsweise stellt die Cytochrom C Oxidase im Komplex IV der mitochondrialen Elektronentransportkette als Häm-Kupfer-Oxidase ein Ziel von NO dar [185]. NO reguliert so die oxidative Phosphorylierung in Zellen. *In vitro* inhibieren 10-20 nM NO reversibel die Cytochrom C Oxidase durch Bindung an das Metallzentrum und reduzieren so die mitochondriale Atmung um 10-20%. [186, 187]. Ein Überangebot des Signalmoleküls führt jedoch zur Reaktion mit anderen Radikalen und der Generierung von RNS, besonders unter oxidativem Stress, bei dem eine Vielzahl reaktiver Sauerstoffspezies vorliegt. Der Übergang von physiologischen zu pathophysiologischen Wirkweisen verläuft dabei graduell. Bei geringfügiger Erhöhung und Störung der Homöostase durch einen Mangel an O₂ oder Nährstoffen, die Anwesenheit von Pathogenen, zellulärer Veränderungen, mitochondrialer Fehlfunktion sowie durch Schäden an der Desoxyribonukleinsäure (engl. *desoxyribonucleic acid*, DNA) werden über die Stressantwort in Zellen Mechanismen ausgelöst, die dem Schutz der Zelle und der Wiederherstellung der Homöostase dienen [141]. In diesem Fall kann NO anti-apoptotisch und zellschützend wirken. Hohe Konzentrationen an RNS führen jedoch zu unspezifischem nitrosativem Stress, bei dem Proteine und andere Biomoleküle durch Intermediärspezies wie ONOO⁻ oder NO₂ oxidiert oder nitriert werden [141]. Des Weiteren kann NO in hohen Konzentrationen mit der DNA der Zielzellen interagieren und dort Strangbrüche und Fragmentierung auslösen [188, 189]. Dies beeinträchtigt die Faltung von Proteinen und die Funktion vieler Biomoleküle, sodass NO unter diesen Bedingungen Apoptose induziert. Tyrosinreste in Proteinen können bei erhöhter NO Konzentration durch verwandte Spezies wie NO₂ oder ONOO⁻ nitriert werden [190]. Diese Addition einer Nitrogruppe wird typischerweise mit der toxischen Wirkung hoher Konzentrationen an NO in Verbindung gebracht und als Biomarker für Entzündungsprozesse gesehen [191]. In jüngeren Publikationen wird jedoch kontrovers diskutiert, ob es sich bei diesen Modifikationen analog zur S-Nitrosylierung um gezielte posttranslationale Modifikationen handeln könnte [192-194].

Zusammenfassend führen hohe Konzentrationen von RNS zur unspezifischen Modifikation von Biomolekülen und damit zu Fehlfunktionen in der Zelle und zum Zelltod während geringere Konzentrationen derselben Spezies Mechanismen auslösen, die zum Überleben der Zelle führen [141].

Über S-Nitrosylierung ist NO indirekt an einer Vielzahl epigenetischer Prozesse beteiligt [195]. Beispielsweise vermittelt NO in vielen pathophysiologischen Prozessen Histon Hyperacetylierung über die Aktivierung der Histonacetyltransferase p300 und ist an der Regulation von Histondeacetylasen beteiligt [196]. Obwohl NO nicht an der Aktivierung von Histonmethyltransferasen beteiligt ist [196], führt NO direkt zu verstärkter Methylierung über die Inhibierung von Histondemethylasen. Durch Bindung an das katalytische Fe^{II} Zentrum der Enzyme inhibiert es die Enzymaktivität konzentrationsabhängig und führt so zu erhöhter Methylierung [197]. Ob diese epigenetischen Mechanismen, welche über *in vitro* Experimente mit NO-freisetzenden Verbindungen oder durch Analyse von pathologischem Gewebe gefunden wurden, auch in gesundem Gewebe *in vivo* eine Rolle spielen oder lediglich bei Erkrankungen vorherrschen, muss jedoch noch gezeigt werden.

Aufgrund der Instabilität von NO wird kontrovers diskutiert, ob ein Teil der NO zugeschriebenen Effekte in Wahrheit durch HNO vermittelt werden, welches durch Reduktion aus NO entsteht [198, 199]. Aufgrund der kurzen Lebensdauer von ca. 2s ist NO ein stark lokal wirkendes Signalmolekül, welches von seiner Quelle ausgehend durch Diffusion verdünnt wird und in wässriger Umgebung rasch zu Nitrit und Nitrat oxidiert wird. Hierdurch wird die Konzentration von freiem NO begrenzt. Die Konzentration von freiem NO und der NO-aktivierte Signalweg hängen daher von der lokalen Umgebung, insbesondere von der Konzentration an Sauerstoff ab [98].

1.2.4 NO Freisetzungssysteme *in vitro*

1.2.4.1 Lösliche NO-freisetzende Verbindungen

Für die Untersuchung NO-vermittelter Effekte *in vitro* und *in vivo* wurden eine Vielzahl an NO-freisetzenden Verbindungen entwickelt. In der Klinik werden hauptsächlich organische Nitrate, wie Nitroglycerin, eingesetzt [130], welche zur Freisetzung von NO der Aktivierung durch die mitochondriale Aldehyddehydrogenase bedürfen. Durch Inaktivierung des Enzyms als Antwort auf oxidativen Stress können jedoch Toleranzen gegenüber Nitroglycerin entstehen, die den Einsatz dieser Verbindung limitieren [200]. Für *in vitro* Studien wurden eine Vielzahl an NO-

freisetzenden Verbindungen eingesetzt. Die Kinetik der NO Freisetzung und die Konzentration an freiem NO variiert dabei ungemein, sodass viele teils widersprüchliche Daten im Zusammenhang mit NO-vermittelten Prozessen publiziert wurden.

Eine Klasse von NO-freisetzenden Verbindungen repräsentieren Metall-Nitrosylkomplexe, wie Natriumnitroprussid. Diese setzen NO enzymatisch aktiviert frei oder ohne enzymatische Beteiligung in Anwesenheit von reduzierenden Agenzien oder Licht [201-204]. Natriumnitroprussid ist ein häufig verwendeter, wasserlöslicher Komplex von Fe^{II} mit NO und fünf Cyanidionen. Durch die Beteiligung reduktiver Stoffwechselprozesse hängt die freie Konzentration an NO von der Verfügbarkeit von Reduktionsmitteln ab [205]. Des Weiteren verbleiben nach Freisetzung von NO der Metallkomplex und die Cyanidionen in den biologischen Systemen, sodass potentielle toxische Effekte und Kreuzreaktionen der Cyanide mit Hämoproteinen nicht ausgeschlossen werden können. Weiterhin werden *in vitro* S-Nitrosothiole, wie S-Nitroso-N-Acetyl-Penicillamin oder S-Nitrosoglutathion (GSNO), eingesetzt. Die Freisetzung von NO kann hier über Wärmezufuhr, Licht oder Kupferkatalyse stattfinden [206-209]. Neben freiem NO scheint NO^+ einen Großteil der freigesetzten Spezies darzustellen [210, 211], sodass mit der Verwendung von S-Nitrosothiolen hauptsächlich Transnitrosylierungsreaktionen einhergehen. Daher können sich die mit diesen Spendermolekülen erzielten Effekte maßgeblich von NO-induzierten unterscheiden [211]. Ein Vorteil dieser Klasse stellt jedoch die enzymunabhängige Freisetzungskinetik dar.

Diazeniumdiolate (NONOate) weisen eine $[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-$ Gruppe auf und setzen NO ebenfalls ohne enzymatische Vermittlung frei. Diese Verbindungen werden häufig in Zellkulturexperimenten eingesetzt, wenn eine kontrollierte Freisetzung von NO gewünscht ist. Sie zerfallen in wässriger Lösung mit neutralem oder saurem pH spontan in freies NO und den nukleophilen Rest [212]. Die Halbwertszeit des Zerfallsprozesses kann dabei über die Aminseitengruppen gesteuert werden, die das Molekül stabilisieren. NONOate setzen je nach Spezies 1,5-2 mol NO je mol der freisetzenden Verbindung frei. Die Kinetik ist dabei weitestgehend unabhängig von Thiolen, Metallen, Medienbestandteilen oder Licht [205]. Um die Freisetzung von NO aus NONOaten durch einen externen Auslöser zu steuern, wurden verschiedene NONOate mit enzymatisch spaltbaren Schutzgruppen versehen, sodass die Freisetzung erst in bestimmten Zielgeweben erfolgte [213-216]. Jedoch zerfallen auch diese geschützten Verbindungen nach enzymatischer Initiation des Prozesses spontan und erlauben keine Steuerung der Konzentration oder eine örtliche und zeitliche Kontrolle der freigesetzten Substanz [217].

Zu diesem Zweck wurden photokontrollierbare Verbindungen, wie Bis-N-Nitroso-geschützte [218] oder Nitrobenzenderivate [219-222] entwickelt, welche durch Energiezufuhr in Form von Licht NO freisetzen [217]. Während erstere NO photolytisch durch Belichtung im UV Bereich freisetzen, beruht die Freisetzung bei letzteren auf einer Nitrogruppe an einem aromatische System, welche durch sterisch anspruchsvolle Gruppen in direkter Nachbarschaft in eine zum π -System nicht-planare, gedrehten Konformation gezwungen wird [219, 221]. Durch zusätzlich eingebrachte Energie in Form von Licht kann die Nitrogruppe eine Nitro-zu-Nitrit-Umwandung durchlaufen, welche die Freisetzung von NO ermöglicht. Die Absorptionswellenlänge kann dabei durch die Verlängerung des aromatischen Systems bathochrom verschoben werden [221]. Als Alternativmethode wurde Zwei-Photonen-Anregung mittels Laser im Nahen Infrarotbereich (NIR) eingesetzt, um die nötige Energiedifferenz aufzubringen und Toxizitätsbedenken durch die hochenergetische Strahlung zu umgehen [219, 220, 223, 224]. Durch Einbettung dieser Moleküle in eine Matrix oder Anbindung an eine Gerüststruktur können Limitationen wie die häufig geringe Wasserlöslichkeit sowie mögliche Toxizitätsbedenken durch verbleibende Nebenprodukte umgangen werden [225-228].

1.2.4.2 NO-freisetzende Materialien

Um NO-freisetzende Materialsysteme zu erhalten, wurden häufig NO-freisetzende Verbindungen auf Basis von NONOaten bzw. S-Nitrosothiolen an freien Amin- bzw. Thiolresten der Matrizen eingebracht [229, 230]. So wurden NO-freisetzende Nano- oder Mikropartikel [231-233], Hydrogele [234-238], Polymere [239-246], Mizellen [247], Fasern [248, 249], Dendrimere [250-252], Zeolithe [253, 254], und metallorganische Gerüstverbindungen [255-257] erhalten, welche häufig auf antibakterielle bzw. gerinnungshemmende Beschichtungen oder auf den Einsatz als Wundauflagen abzielen. Meist basiert die NO Freisetzung hier auf spontanem Zerfall der NO-freisetzenden Funktionalität bei Kontakt mit physiologischen Medien. Zusätzlich wurden in einigen Arbeiten Schutzgruppen eingebracht, welche durch enzymatische Abspaltung die Freisetzung von NO steuerbar machten. Jedoch folgen auch diese Systeme dem „Alles-oder-Nichts“ Prinzip, da die Zerfallskinetik sowie die räumliche Verteilung des freigesetzten Signalmoleküls nicht kontrollierbar ist. Dieses Hindernis kann über die Verwendung von Licht als Steuerelement überwunden werden.

In den einfachsten Fällen wurden hierzu photo-responsive NO-freisetzende Verbindungen in gaspermeable, inerte Polymere eingeschlossen, um die mögliche Toxizität der Donoren bzw. ihrer Nebenprodukte sowie deren Instabilität in Zellkulturmedien zu umgehen. Hierzu wurden

licht-sensitive Ruthenium- oder Mangan-basierte Komplexe in Methylacrylat- [258] bzw. Polyethylenglykol (PEG)-basierte Hydrogele eingebettet [259-261] oder in Polyurethan eingeschlossen [262, 263]. Alternativ ermöglichte das Einbringen licht-sensitiver S-Nitrosothiole in Polymermatrizen die photo-induzierte Freisetzung von NO [264, 265]. Des Weiteren wurden Lanthanoid-basierte Nanopartikel zusammen mit einer Metall-Nitrosyl-Verbindung in einen gaspermeablen Polymerfilm eingegossen, um NO Freisetzung im NIR zu ermöglichen [266]. NO wurde außerdem mittels Lichtanregung aus Partikeln bestehend aus metallorganischen Gerüstverbindungen freigesetzt, welche in einen Polymerfilm eingegossen waren und als organische Liganden photo-sensitive Nitroimidazol-Derivate aufwiesen [267]. In jüngster Zeit wurde von Titan-basierten metallorganische Gerüstverbindungen berichtet, welche unter Zellkulturbedingungen stabil sind und licht-induziert NO freisetzen [268], jedoch stehen biologische Tests dieser Verbindungen noch aus. Durch das Einbringen von Adamantan-funktionalisierten licht-responsiven Nitrophenylgruppen in Hydrogele auf Basis von Cyclodextrinen [269] oder das Einbringen solcher Nitrophenylderivate in Hydrogelpartikel [270, 271] wurden Gele erhalten, die nicht nur als inerte Matrix dienen, sondern direkt NO freisetzen. Die Verwendung von Hydrogelen als Freisetzungsplattform bietet den Vorteil, dass weitere Funktionalitäten, wie zelladhäsive Sequenzen oder biologische Komponenten eingebracht werden können und so multifunktionale NO-freisetzende Hydrogele erhalten werden könnten.

1.2.5 Einfluss von NO auf die Zellproliferation, den Zellzyklus, Apoptoseprozesse sowie die Differenzierung von Zellen

Die Angriffspunkte für den NO-vermittelten Zellzyklusarrest sind dabei vielfältig, wie in Abbildung 7 schematisch dargelegt. Der NO-induzierte Zellzyklusarrest war häufig mit der vermehrten Expression des Cyclin-abhängigen Kinase (engl. *cyclin-dependent kinase*, Cdk) Inhibitors p21^{Cip1/Waf1} [272-278] und der verstärkten Verortung des Proteins im Zellkern [279] verbunden. Die nachgelagerte Hemmung der Cdk2 Aktivität [272, 273] führte zur Hypophosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb) [272, 280], welches in diesem Zustand als transkriptionaler Repressor der E2F Transkriptionsfaktor Familie [281] fungiert und so die Genexpression u.a. von Cyclin E inhibiert. Jedoch konnte der NO-vermittelte Zellzyklusarrest auch ohne Expression von p21^{Cip1/Waf1} gezeigt werden [275]. NO-abhängig wurde die Regulation der Expression verschiedener Cycline, wie Cyclin D1 [282] und Cyclin A [273, 279, 283, 284], gezeigt und so indirekt die Aktivität von Cdks gesteuert. Neben dem direkten Eingriff in Regulatoren des Zellzyklus kann NO auf verschiedene Arten mitogene Signalwege, wie den Mitogen-assoziierten Proteinkinase (MAPK) Signalweg regulieren. Dies wurde durch cGMP-abhängige

Phosphorylierung von VASP [285] oder Raf 1 (abgeleitet von engl. *rapidly accelerated fibrosarcoma*) [286] gezeigt. Jedoch wurden auch cGMP-unabhängige Effekte von NO beschrieben, wie die S-Nitrosylierung des EGF-Rezeptors (EGFR), welche die trans-(Auto)phosphorylierung des Rezeptors und damit dessen Tyrosinkinaseaktivität unterband [287]. Durch NO-abhängige Inhibition von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, wie den Fibroblasten Wachstumsfaktor oder den Plättchen abgeleiteten Wachstumsfaktor, kann NO auch in andere mitogene Signalwege eingreifen [288, 289]. Die anti-proliferative Wirkung von NO kann jedoch auch in der Inhibition von Enzymen begründet sein, welche für den normalen Ablauf des Zellzyklus benötigt werden. So wurde gezeigt, dass NO die Funktion der Ribonukleotid Reduktase [290], Ornithin Decarboxylase [291] und Araginase [291] blockieren kann. Alternativ können auch NO-abhängige epigenetische Modifikationen eine Rolle bei der Beeinflussung der Zellteilungsaktivität spielen. Welche dieser Mechanismen jedoch *in vivo* relevant sind ist weitgehend unklar.

Andere Veröffentlichungen zeigen, dass NO die Proliferation vieler Zellen *in vitro* stimulieren kann. Dabei überschneiden sich die Zielmoleküle und Signalwege häufig mit denen, die für die NO-abhängige Inhibition der Zellteilung beschrieben wurden. Durch verstärkte Translation von Cyclin D1 und der Ornithin Decarboxylase [292] bzw. erhöhter Cdk2-vermittelter Aktivität durch S-Nitrosylierung der Kinase [293] vermehrten sich Brustkrebszellen nach Stimulation mit NO stärker. In ersterem Fall wurde Ras-vermittelt der Raf/MAPK und der PI3K/Akt Signalweg aktiviert. Ebenso wurde in Endothelzellen gezeigt, dass Ras durch S-Nitrosylierung von NO aktiviert werden kann [294].

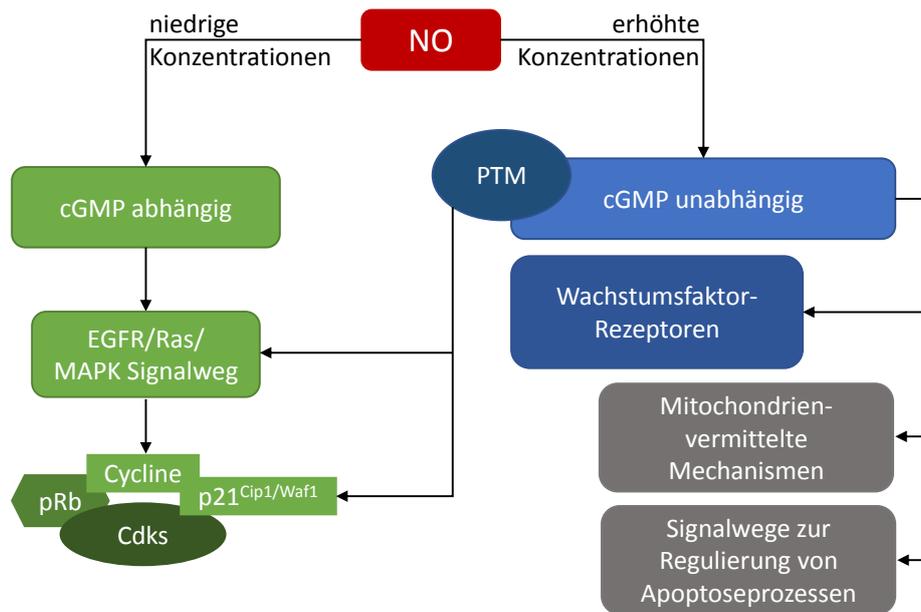


Abbildung 7 Der Einfluss von NO auf die Proliferation von Zellen wird durch verschiedenste Zielmoleküle und Signalwege vermittelt. Bei physiologischen, niedrigen Konzentrationen (linker Bildabschnitt) kann NO (rot) cGMP-abhängig in den EGFR/Ras/MAPK Signalweg eingreifen und den Zellzyklus beeinflussen (grün). Durch posttranslationale Modifikationen (PTM) von Proteinen kann NO jedoch bei erhöhten NO-Konzentrationen (rechter Bildabschnitt) auch cGMP-unabhängig diesen Signalweg beeinflussen, zum Beispiel durch S-Nitrosylierung des EGFR oder Ras. Unabhängig von cGMP wurde ebenfalls die NO-vermittelte Regulation verschiedener Wachstumsfaktoren und –rezeptoren (blau), sowie die Erhöhung von p21^{Cip1/Waf1} beschrieben, welches Cdk's inhibiert und durch die Hypophosphorylierung von Rb die Genexpression reguliert. Neben der Modifikation verschiedener Wachstumsfaktor-Rezeptoren kann NO in hohen Konzentrationsbereichen in mitochondriale Mechanismen und über die Modifikation Apoptose-vermittelnder Moleküle in Apoptoseprozesse eingreifen (grau). Abbildung in Anlehnung an [295].

Die NO-abhängige Proliferation neuronaler Stammzellen wird initial ebenfalls durch den MAPK Signalweg vermittelt, verläuft später jedoch über cGMP-abhängige Signalwege [296]. Die Mechanismen, die zu NO-vermittelter Zellproliferation führen sind jedoch nur bruchstückhaft verstanden [297]. Ein positiver Einfluss auf die Zellproliferation durch Stimulation mit NO-freisetzenden Verbindungen wurde *in vitro* u.a. auch für embryonale Stammzellen [298], epidermalen Stammzellen [299], murine Knochenmark-Stromazellen [300] und Endothelzellen [294] gezeigt. Weiterhin wurde NO-vermittelt die Proliferation und osteoblastische Differenzierung von humanen Knochenmark-Stromazellen induziert [301] und die Proliferation und Glykolyse von $\gamma\delta$ T Zellen vermittelt [302]. Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen führte die fehlende Expression von NOS3 zu verringerter Proliferation von Kardiomyozyten [303].

In Modellorganismen, wie *Drosophila melanogaster*, wurde gezeigt, dass NO die Balance zwischen Zellproliferation und Differenzierung aufrechterhält. Durch Inhibierung von NOS, die in der Imaginalscheibe während der Embryonalentwicklung hoch exprimiert vorliegen, wird in adulten Fliegen Hypertrophie von Organen und Körperteilen hervorgerufen, während die ektope Expression von NOS in Larven Hypotrophie induziert [304]. Des Weiteren wurde in *Xenopus laevis* Kaulquappen gezeigt, dass die Anzahl proliferativer Zellen im Mittelhirn über nitrege Nerven im Gehirn begrenzt wird und die Inhibition von NOS zu frühzeitiger Differenzierung sowie zu größeren, in ihrer Architektur gestörten Gehirnen führt [305, 306]. So scheint NO eine Rolle bei der Balance zwischen Proliferation und Differenzierung bei der Neurogenese zu spielen [307]. Nitrege Nerven im Gehirn kontrollieren die Proliferation neuraler Vorläuferzellen, während eine erhöhte NO Produktion nach Verletzungen die adulte Neurogenese vermittelt [308]. In murinen embryonalen Stammzellen bewirkte NO eine Verlangsamung der Differenzierung durch die Regulation von Pluripotenz- und Differenzierungsgenen. Die gleichzeitige Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges verringerte die Apoptose der Zellen und ging mit dem Zellzyklusarrest am G2/M Übergang einher [309]. Wie zuletzt gezeigt, kann NO neben direkten Auswirkungen auf Zellzyklusregulatoren und mitogene Signalwege zusätzlich das Überleben von Zellen durch Beeinflussung von Apoptoseprozessen sicherstellen. Während proapoptische, NO-vermittelte Signalwege über mitochondriale Apoptoseprozesse gesteuert werden [187, 310], vermittelt NO anti-apoptische Signalwege u.a. durch die Blockierung von Caspasen mittels S-Nitrosylierung [311-313]. Die Wirkung von NO hängt jedoch auch hier von der Konzentration, Dauer und dem untersuchten Zelltyp ab.

Zusammengefasst, sind die Auswirkungen von NO auf die Zellproliferation stark von der Konzentration des Signalmoleküls, den damit verbundenen aktivierten Signalwegen und den Zielzellen abhängig. Während niedrige physiologische Konzentrationen anti-apoptische und proliferative Effekte vermitteln können, führen hohe Konzentrationen von NO zum Stillstand des Zellzyklus, der Seneszenz oder Apoptose [132]. Fest steht jedoch, dass NO *in vivo* eine wichtige Rolle als Regulator von Proliferation und Differenzierung in der Entstehung vieler Organe einnimmt.

1.2.6 NO-vermittelte Einflüsse auf HSZ

Der Effekt von NO auf die Proliferation und Differenzierung von HSPZ wurde in verschiedenen Studien durch die Kultur mit NO-freisetzenden Verbindungen oder NO Fänger-molekülen, durch pharmakologische Inhibition oder den systemischen *knock-out* von NOS untersucht. Dabei wurden eine Vielzahl teils widersprüchlicher Daten generiert. So zeigten Studien, dass NO-freisetzende Verbindungen die Koloniebildungsfähigkeit humaner, mononukleärer Zellen sowie CD34⁺ Zellen aus dem Knochenmark inhibierten, während durch NOS Inhibition die Anzahl langfristig kulturinitiierender Zellen (engl. *long-term culture initiating cells*, LTC-IC) erhöht wurde [314]. Ebenso wurde durch Kultur von murinen, hämatopoetischen Progenitorzellen in Gegenwart eines NO Fänger-moleküls die verstärkte Proliferation und Differenzierung dieser Zellen beobachtet [315] sowie durch pharmakologische NOS Inhibition eine erhöhte Anzahl an murinen HSPZ im Knochenmark gefunden [316]. Diese Studien deuten auf einen anti-proliferativen Einfluss von NO auf HSZ hin.

Im Gegensatz dazu wurde in NOS3^{-/-} Mäusen eine geringere Proliferation und eine verminderte Koloniebildungsfähigkeit von HSPZ beobachtet [317]. NO vermittelte außerdem in einem Zebrafisch-Entzündungsmodell die Stress-induzierte Expansion von HSZ durch Induktion der NOS2a [318, 319]. Weiterhin erhöhte exogen zugesetztes NO in einer anderen Studie die Anzahl an LTC-IC in murinen, mononukleären Zellen aus dem Knochenmark, während die Anzahl an myeloiden, koloniebildenden Einheiten (engl. *colony forming units*, CFUs) verringert war. Die Expression der NOS1 durch Knochenmark-Stromazelllinien wurde in dieser Arbeit mit der Fähigkeit in Verbindung gebracht, HSZ in Kultur zu erhalten [320]. Durch *knock-out* von NOS1 erhöhte sich die Anzahl an CFUs in murinen, mononukleären Zellen aus der Milz und dem Knochenmark [320]. Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass NO die Hämatopoese negativ reguliert und HSPZ in ihrem Stammzellerhalt fördert. Außerdem wurde gezeigt, dass M2-polarisierte Makrophagen den Selbsterhalt und die Expansion humaner HSZ erhalten während M1-polarisierten Makrophagen u.a. aufgrund der unterschiedlichen Expression von NOS2 diese negativ beeinflussen [321].

Weiterhin wurde in verschiedenen Studien der Einfluss von NO auf die Differenzierung von HSPZ gezeigt. Murine HSZ, welche in Gegenwart von NO kultiviert wurden, proliferierten verstärkt und zeigten erhöhte myeloide Differenzierung [322]. Durch Stimulation humaner CD34⁺ Zellen mit NO wurde eine reduzierte erythroide Differenzierung und die verstärkte Differenzierung in Granulozyten und Makrophagen beobachtet [323]. Hingegen wiesen Mäuse, welche durch die Atemwege mit NO stimuliert wurden, eine erhöhte Anzahl an Erythrozyten

und vermehrt Hämoglobin auf. Die verstärkte erythroide Differenzierung konnte auch durch die Kultur muriner, mononukleärer Zellen aus dem Knochenmark bzw. humaner CD34⁺ Zellen über CFU-Assays in Gegenwart von membrangängigen cGMP Analoga erreicht werden und ging mit einer Reduktion an frühen myeloiden Progenitorzellen einher [324]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Inhibition von NOS die Differenzierung und Reifung humaner CD34⁺ Zellen aus dem peripheren Blut in dendritische Zellen beeinträchtigt [325]. Zusammenfassend scheint NO daher im hämatopoetischen System an Differenzierungsentscheidungen und dem Fortschreiten durch verschiedene Differenzierungsstadien beteiligt zu sein.

NO ist zudem maßgeblich an der Mobilisierung von HSPZ vom Knochenmark in die Blutzirkulation beteiligt. Wie in 1.1.2 beschrieben, spielt die NO Produktion durch Nischenzellen eine zentrale Rolle bei der Vermittlung von PAR1-abhängigen Signalwegen. Je nach Ligand steuern klassische Gerinnungs-Signalkaskaden die Mobilisierung bzw. den Erhalt von EPCR⁺ HSZ im Knochenmark. Hierbei verringert die Aktivierung des Rezeptors durch endothelial produziertes aPC die NO Freisetzung, indem PAR1-abhängig NOS3 phosphoryliert wird und hierdurch die Aktivität dieser Isoform verringert wird. Zusätzlich führte die pharmakologische Aktivierung des EPCR oder die Blockierung von NOS3 zur Expansion von EPCR⁺ HSZ und Stromazellen [79]. Des Weiteren wurde im murinen NOS3^{-/-} Modell gezeigt, dass parakrines NO für die VEGF-induzierte Mobilisierung von HSPZ essentiell ist, da die Aktivität und Expression der an diesem Prozess beteiligten Matrix-Metalloproteinase (MMP)-9 durch niedrige Konzentrationen von NO aktiviert wird [317, 326]. Die MMP-9 spaltet hier die membranständige Form von SCF ab und vermittelt so die Mobilisierung von endothelialen Vorläuferzellen und HSPZ aus der Knochenmarksnische in das Blut [327]. Interessanterweise korrelierte im murinen Knochenmark die NO Produktion mit der Verfügbarkeit von MMP-9 [328]. Das gefundene NO stammte hier mehrheitlich von NOS3, jedoch war auch NOS2 exprimiert. Kürzlich wurde diese Isoform, die mit einer höheren Konzentration an freiem NO in Verbindung gebracht wird, als negativer Regulator der Migration von HSPZ identifiziert, welche die Mobilisierung dieser Zellen in die Blutzirkulation verhindert [329]. Daneben scheint NO die Mobilisierung von HSPZ indirekt über die Permeabilität der Blutgefäße zu beeinflussen [330], da NO Produktion *in vitro* invers mit der VE-Cadherin Expression korreliert [331]. Exogen zugesetztes NO erhöht außerdem cGMP-unabhängig die Oberflächenexpression von CXCR4 und damit die chemotaktische Antwort von CD34⁺ Zellen [332]. Die Mobilisierung von HSPZ durch den CXCR4 Antagonisten AMD3100 ist interessanterweise mit der Hochregulierung von NOS3 verbunden, welche nachgeordnet die MMP-9 aktiviert und den Gehalt an löslichem SCF erhöht [333]. Außerdem wird die Affinität von VLA-4 auf HSZ durch den klassischen NO Signalweg herunterreguliert

[334]. Jedoch spielt NO nicht nur bei der Stammzellmobilisierung eine entscheidende Rolle, sondern beeinflusst auch das Einwandern und Anwachsen von Stammzellen nach der Transplantation. So erhöhte die exogene Kultur muriner HSZ in Gegenwart von NO die CD34 Expression der Zellen und ging bei jungen Spendern mit dem verbessertem Einwandern der Zellen in die HSZ Nische nach Transplantation und einer hohen Funktionalität der Zellen einher, während HSZ älterer Spender nach Transplantation schlechter in das Knochenmark einwanderten und das Blutsystem langfristig zu einem geringeren Anteil wiederherstellten [335].

Neben diesen direkten Effekten, kann NO HSZ auch indirekt über Nischenzellen in ihrer Umgebung beeinflussen. Beispielsweise wurde gezeigt, dass die Vorbehandlung von MSZ mit exogenem NO zu einem verbesserten Einwandern und Anwachsen von HSZ in das Knochenmark nach Transplantation führte [336]. Dies lag in der NO-abhängigen Bildung von Mikrovesikeln begründet, welche Mikro-Ribonukleinsäure (engl. *micro ribonucleic acid*, miRNA) für *jagged-1* und VEGF enthielten und so u.a. den Notch Signalweg aktivierten. Weiterhin bewirkten MSZ aus Knochenmark eine NOS2-vermittelte Differenzierung von murinen, myeloiden CD11b⁺ Zellen aus myeloiden Vorläufern, welche die Wiederherstellung des hämatopoetischen Systems nach Knochenmarkstransplantationen in Mäusen beschleunigte [337].

1.3 Zielsetzung der Arbeit

1.3.1 Auswirkungen von NO auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von HSPZ *in vitro*

Wie in 1.2.6 dargelegt, wurden verschiedenste Einflüsse von NO auf die Proliferation und Differenzierung von HSPZ gezeigt. Viele dieser Studien wurden im murinen Modellsystem oder im Zebrafisch durchgeführt, welche im Vergleich zum humanen System speziesspezifische Unterschiede aufweisen zum Beispiel in Bezug auf die Induzierbarkeit der NOS2 durch Zytokine [338]. Aufgrund der variierenden eingesetzten experimentellen Bedingungen, wie die Wahl der NO-freisetzenden Verbindung, des gewählten NO Konzentrationsbereichs sowie der analysierten HSPZ Population, ist der Vergleich dieser Ergebnisse erschwert und resultiert in einer teils widersprüchlichen Datenlage. Weiterhin sind Studien, welche auf der pharmakologischen Inhibition bzw. auf *knock-out* von NOS Isoformen basieren, dahingehend limitiert, dass konzentrationsabhängige Effekte von NO auf HSPZ nicht untersucht werden können. Gerade für dieses Signalmolekül, welches verschiedene Signalwege abhängig von der freien Konzentration von NO aktiviert, ist die Betrachtung eines breiten Konzentrationsbereiches zentral, um die Aktivität und NO Generation der verschiedenen NOS Isoformen unter Homöostase und Stress nachbilden zu können. Wie in 1.2.6 beschrieben, fungiert NO in der murinen HSZ Nische im Knochenmark als „Schalter“ und vermittelt konzentrationsabhängig den Erhalt von HSZ in der Nische oder die Mobilisierung der Zellen aus dieser in das Blutsystem. Analog könnte NO in der humanen HSZ Nische ein wichtiges Molekül darstellen, welches HSZ Verhalten kontrolliert. Die direkte Untersuchung der Wirkung von NO auf humane HSPZ in der Nische ist jedoch durch deren Komplexität erschwert, in der verschiedenste Nischezelltypen als mögliche Quelle von NO dienen könnten und dicht verflochtene Kommunikationsnetzwerke vorliegen, welche potentiell von NO beeinflusst werden können.

Das Ziel vorliegender Arbeit war daher die systematische Untersuchung des Einflusses von NO auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten humaner HSPZ *in vitro*. Um zu identifizieren, ob NO ein autokrin oder parakrin wirkendes Signalmolekül für HSPZ darstellt, sollte zunächst die Expression von NOS Isoformen in HSPZ aus Nabelschnurblut oder MSZ aus Knochenmark untersucht werden. Für den Zusatz von NO in einem breiten Konzentrationsbereich, welcher *in vivo* unter Homöostase und Stress von den NOS Isoformen produziert werden kann, sollte aufgrund der langfristigen und gleichmäßigen Generierung von NO das NONOat Diet-

hylenetriamin/NO Addukt (DETA/NO) eingesetzt werden, welches unter physiologischen Bedingungen eine Halbwertszeit von 20 h besitzt und nach gängigen Abschätzungen ca. 100 nM freies NO bei einer Konzentration von 100 μ M DETA/NO generiert [141]. Das Zellteilungsverhalten von HSPZ sollte durch Kultur der Zellen, nach Färbung mit einem Proliferationsfarbstoff, in Gegenwart verschiedener NO Konzentrationen nachverfolgt werden. Durch zusätzliche Färbung der HSPZ mit einem CD Antikörperpanel nach der Kultur mit DETA/NO sollte die Differenzierung der Zellen in frühe Vorläuferstadien identifiziert werden. Um mögliche konzentrationsabhängige Effekte von NO auf die Aktivierung eines NO-abhängigen Signalweges *in vitro* rückführen zu können, sollten die Konzentrationsbereiche von NO identifiziert werden, bei welchen der klassische NO Signalweg aktiv ist bzw. S-Nitrosylierungen von Proteinen in HSPZ auftreten. Die Aktivierung des klassischen NO-Signalweges sollte zum einen durch die NO-abhängige Änderung der intrazellulären cGMP Konzentration und zum anderen durch die PKG-abhängige Phosphorylierung von VASP überprüft werden. Zusätzlich sollte die Aktivität von cGMP-unabhängigen Signalwegen, wie die Nitrosylierung von Proteinthiolen, bei physiologischen Konzentrationen an NO untersucht werden.

Zusammen sollten diese Experimente zu einem besseren Verständnis der konzentrationsabhängigen Aktivierung NO-vermittelter Signalwege in humanen HSPZ beitragen und eruiert werden, ob NO einen Faktor darstellt, mit dem *in vitro* die Proliferation und Differenzierung von HSPZ gezielt beeinflusst werden kann. Eine solche Steuerung des HSPZ Verhaltens *in vitro* wäre für die therapeutisch motivierte *ex vivo* Kultur von HSPZ zur Expansion oder Differenzierung von HSPZ in verschiedene Vorläuferzelltypen interessant.

1.3.2 Entwicklung eines NO-freisetzenden Materialsystems zur Überwindung der Limitierung löslicher, NO-freisetzender Verbindungen

NO-induzierte Signalwege sind aufgrund der geringen Stabilität des Signalmoleküls kurzreichweitig. Weiterhin ist die Aktivierung der unterschiedlichen NO-abhängigen Signalwege von der Konzentration von NO und damit von der Distanz der Zielzelle zur NO Quelle abhängig. Daher finden NO-induzierte Signale auf HSPZ höchstwahrscheinlich räumlich stark kontrolliert statt, beispielsweise durch Kollokalisierung von HSPZ mit NO-produzierenden Nischenzellen, wie Endothelzellen. Diese setzen grundlegend NO in pulsativer Art und Weise frei. Die NO Konzentration reduziert sich dabei mit zunehmendem Abstand von der NO Quelle durch die rasche Umwandlung von NO zu Nitrit und Nitrat, sodass ein Konzentrationsgradient an NO entsteht. Um diese dynamischen NO Schwankungen sowie Gradienten *in vivo* zu imitieren sind

lösliche NO-generierende Verbindungen nicht geeignet, da sie homogen im Medium verteilt vorliegen und NO je nach Zerfallskinetik der Verbindung im gesamten Kulturvolumen gleichmäßig freisetzen.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Entwicklung eines zellverträglichen Materialsystems, welches die Freisetzung von NO *in vivo* nachahmen kann. Hierfür sollte ein poröses Material entwickelt werden, welches durch Einbringen eines externen Stimulus die zeitliche und räumliche Kontrolle der NO Freisetzung erlaubt und so *in vitro* die Generation eines NO Gradienten ausgehend von der Materialschicht ermöglicht. Als freisetzendes System sollte ein Hydrogel auf Basis von Heparin eingesetzt werden [339], welches die Möglichkeit bietet, Signalmoleküle, wie Wachstumsfaktoren, zu binden und so als multifunktionale NO-freisetzende Plattform dienen könnte. Als Steuerimpuls sollte Licht eingesetzt werden, da dies durch Variation der Wellenlänge oder Intensität des eingestrahlteten Lichtes die pulsatile Freisetzung von NO ermöglichen würde. Hierdurch sollte das HSPZ Verhalten unter Homöostase besser nachbildet werden, als es durch den Einsatz löslicher Verbindungen erreicht werden kann. Durch Vergleich des Einflusses eines NO Gradienten bzw. der pulsatilen Schwankung der NO Generation auf die Proliferation und Differenzierung von HSPZ mit Daten, welche mit löslichen NO-freisetzenden Verbindungen erzielt wurden, könnte die Rolle der räumlichen und zeitlichen Generation von NO auf die induzierten NO-Signalwege in HSPZ untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Eingesetzte Materialien

2.1.1 Groß- und Kleingeräte

In Tabelle 1 sind die für die Versuche eingesetzten Geräte aufgeführt.

Tabelle 1 Auflistung verwendeter Geräte

<i>Gerätebezeichnung</i>	<i>Hersteller, Firmensitz</i>
Autoklav Laboklav 135-MS Liquid Support	SHP Steriltechnik AG, Flechtingen
Durchflusszytometer BD FACSVerse™ Typ 3 Laser 4-2-2	Becton Dickinson Inc., East Rutherford, NJ, USA
Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Horizontale Elektrophoresekammer Sub-Cell® GT	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Feinwaage SI-234	Denver Instrument, Bohemia, NY, USA
Flockeneisautomat AF80	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, IL, USA
Fluoreszenzmikroskop AxioObserver.Z1 im CellObserv Komplettsystem	Carl Zeiss AG, Jena
FT-IR Spektrometer Tensor 27	Bruker Corp., Billerica, MA, USA
Gefrierschrank (-20 °C) Gastro 1331	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß
Gefrierschrank (-80 °C) Herafreeze 240	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Gefriertrocknungsanlage ALPHA 1-4	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode/Harz
Gelelektrophoreseschlitten	Renner GmbH, Dannstadt-Schauernheim
Gießstand Mini-PROTEAN [®] Tetra Cell Casting stand & Clamps	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Glasplatten Mini-PROTEAN [®] Spacer Plates (1 mm) und Short Plates	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Inkubator C170	Binder GmbH, Tuttlingen
Inkubator Hera cell 150i	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Kolbenhubpipetten Eppendorf Research [®] plus	Eppendorf AG, Hamburg
Kühlschrank Profiline 500l	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß
Kühlschüttler MKR 13	DITABIS Digital Biomedical Imaging Systems AG, Pforzheim
Kunststoffkamm Mini-Protean [®] 10 bzw. 15 well	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Labormischer Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Laborschüttler Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Laborzentrifuge Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
LED Lichtquelle FC5-LED	Prizmatix Ltd., Holon, Israel
Lumi-Imager [™] F1 Detektionssystem	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg

MACSMix™ Tube Rotator	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Mehrkanalpipette (12 Kanal, 10-200 µl)	VWR International GmbH, Darmstadt
Mehrstellen-Magnetriührer Variomag Poly 15	VWR International GmbH, Darmstadt
Mikrozentrifuge MiniStar silverline	VWR International GmbH, Darmstadt
MiniMACS™ Separator	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Multipette® M4	Eppendorf AG, Hamburg
NanoDrop™ 2000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Wal- tham, MA, USA
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen
NO Measuring System inNO Model-T	Innovative Instruments Inc., Tampa, FL, USA
NO Sensor amiNO-700	Innovative Instruments Inc., Tampa, FL, USA
pH-Meter VWR pHenomenal™ pH 110L	VWR International GmbH, Darmstadt
Pipettierhilfe Pipetboy acu 2	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Plattenlesegerät EnSpire™ Multilabel Reader	Perkin Elmer Instruments Inc., Waltham, MA, USA
Reinstwasseranlage Arium® Pro UV/VF M	Sartorius AG, Göttingen
Schüttelwasserbad SW23	Julabo GmbH, Seelbach
Schwenktisch Mini Blot Mixer	VWR International GmbH, Darmstadt
Schwenktisch VWR Standard Analog Shaker	VWR International GmbH, Darmstadt

Sicherheitswerkbank Klasse II Thermo Scientific™ Herasafe™ KS	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Sicherheitswerkbank Klasse II Thermo Scientific™ Safe 2020	Thermo Fisher Scientific Inc., Wal- tham, MA, USA
Spannungsquelle Power Pack Basic	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Stickstoffbehälter Arpege 110	Airliquide Deutschland GmbH, Karls- ruhe
Tank-Blot-System Criterion™ Blotter	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Tischzentrifuge 5415D oder 5418R	Eppendorf AG, Hamburg
Thermocycler Applied Biosystems™ Thermal Cycler 2720	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
TOF.SIMS 5	IONTOF GmbH, Münster
Ultraschallbad Ultrasonic Cleaner 2.75L	VWR International GmbH, Darmstadt
Zählgitter	STEMCELL Technologies Germany GmbH, Köln

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien, die für Versuche benötigt wurden, sind in Tabelle 2 gelistet.

Tabelle 2 Aufzählung eingesetzter Verbrauchsmaterialien

<i>Verbrauchsmaterial</i>	<i>Hersteller, Firmensitz</i>
BD™ CompBeads	Becton Dickinson Inc., East Rutherford, NJ, USA
BD™ CS&T Beads	Becton Dickinson Inc., East Rutherford, NJ, USA
Deckgläser (rund, 15 mm)	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig
Entsalzungssäulen Zeba™ Spin (7K <i>molecular weight cut-off</i>)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Filterpapier Whatman™ GB003	GE Healthcare Inc., Little Chalfont, UK
MS Säulen	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Nitrozellulose Membran (0,45 µm)	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Petrischalen (35 mm und 145 mm)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen (1000 µl, 100 µl und 10 µl)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran Immunblot® (0,2 µM)	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Reaktionsgefäße (2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml und 0,2 ml)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Serologische Pipetten (25 ml, 10 ml, 5 ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich

Sterilfilter Filtropur S0.2	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
ThinCert™ Platte (12-Well)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
UV-Star® Platte (96-Well)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturflaschen CELLSTAR® (T75 für adhärente oder Suspensionszellen)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturplatten CELLSTAR® (12-, 24-, 48-, 96-Well)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zentrifugenröhrchen CELLSTAR® Polyp- ropylen Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich

2.1.3 Chemikalien

In der Arbeit verwendete Chemikalien und Lösungsmittel sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3 Auflistung eingesetzter Chemikalien und Lösungsmittel

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller, Firmensitz</i>
Aceton (≥99,5%, zur Synthese)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Acrylamide/Bis Solution (40%, 37,5:1)	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Agarose TopVision™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
(3-Aminopropyl)triethoxysilan	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt
BlueEye Prestained Protein Marker	Jena Bioscience GmbH, Jena

Bovines Serumalbumin (BSA)	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
8-(4-Chlorophenylthio)-cGMP	Merck KGaA, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Applichem GmbH, Darmstadt
2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid Kaliumsalz	Merck KGaA, Darmstadt
Diethylenamin/NO Addukt	Merck KGaA, Darmstadt
Diethylenetriamin/NO Adduct	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
DNA Gel loading dye (6x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
DNA ladder 100 bp bzw. 1 kb plus	VWR International GmbH, Darmstadt
Dodecylhydrogensulfat Natriumsalz	Applichem GmbH, Darmstadt
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)- Dinatriumsalz	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure (EGTA)	Merck KGaA, Darmstadt
Formaldehyd solution (37%)	Merck KGaA, Darmstadt
GelRed® Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, Inc., Hayward, CA, USA
Glukose (D(+), 99%)	Thermo Fisher (Kandel) GmbH, Karlsruhe
L-Gluthathion reduziert	Merck KGaA, Darmstadt

Glycerin (für die Molekularbiologie)	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin (AnalaR NORMAPUR®)	VWR International GmbH, Darmstadt
Heparin (porcine mucosa, 14 kDa)	Merck KGaA, Darmstadt
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Lithiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Magermilchpulver	Applichem GmbH, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol (zur Analyse, EMSURE® ACS)	Merck KGaA, Darmstadt
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid	Merck KGaA, Darmstadt
N-Hydroxysulfosuccinimide Natriumsalz	Merck KGaA, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> , SDS)	Merck KGaA, Darmstadt
Natrium Iodid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck KGaA, Darmstadt
4-Nitro-3-(trifluormethyl)anilin 98%	Merck KGaA, Darmstadt
Nulease-Free Water, Ambion™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid	Merck KGaA, Darmstadt
Pierce Protease and Phosphatase Inhibitor Mini Tablets, EDTA-free	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Polyethylenglykol-Amin, sternförmig, (4-arm, 10 kDa)	JenKem Technology USA Inc., Plano, TX, USA
Ponceau S	Merck KGaA, Darmstadt
2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Roti [®] -Nanoquant	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
S-Nitroso-Gluthathion	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
SuperSignal [™] West Femto Maximum Sensitivity Substrat	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<i>tert</i> -Butyl isocyanid	Merck KGaA, Darmstadt
Toluol anhydrous	Merck KGaA, Darmstadt
Triethylamin	Merck KGaA, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris, blotting grade)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Triton X-100	Applichem GmbH, Darmstadt
Tween 20 für die Molekularbiologie	Merck KGaA, Darmstadt

2.1.4 Enzyme und Kits

In Tabelle 4 sind alle in dieser Arbeit benutzten Kits dargestellt.

Tabelle 4 Auflistung in vorliegender Arbeit eingesetzter Kits

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller, Firmensitz</i>
Cell Viability Imaging Kit	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
CD34 Microbead Kit, human	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Cyclic GMP XP [®] Assay Kit	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA
Measure-IT [™] High-Sensitivity Nitrite Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
peqGOLD Hot Taq-DNA Polymerase Kit	VWR International GmbH, Darmstadt
peqGOLD dNTP Set	VWR International GmbH, Darmstadt
Pierce [™] BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Pierce [™] S-Nitrosylation Western Blot Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
TaqMan [™] Reverse Transcription Reagents	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
RNeasy Mini Kit bzw. Micro Kit	QIAGEN N.V., Venlo, NL

2.1.5 Antikörper(konjugate) und Farbstoffe

In Tabelle 5 sind fluoreszenzmarkierte Antikörperkonjugate sowie Farbstoffe aufgeführt, welche für Färbungen eingesetzt wurden, die anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert wurden.

Tabelle 5 Antikörperkonjugate und Farbstoffe für Analysen mittels Durchflusszytometrie

<i>Bezeichnung (Fluorochrom)</i>	<i>Klon</i>	<i>Eingesetzte Verdünnung</i>	<i>Hersteller, Firmensitz</i>
7-Aminoactinomycin (7-AAD)		1:80	Becton Dickinson Inc., East Rutherford, NJ, USA
Annexin V (FITC)		1:20	BioLegend Inc., San Diego, CA, USA
Anti-Human CD34 (PE)	581	1:20	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Anti-Human CD34 (PE-Cy TM 7)	581	1:40	Becton Dickinson Inc., East Rutherford, NJ, USA
Anti-Human CD38 (APC-H7)	HB7	1:20	Becton Dickinson Inc., East Rutherford, NJ, USA
Anti-Human CD10 (APC)	HI10a	1:20	Becton Dickinson Inc., East Rutherford, NJ, USA
Anti-Human CD45RA (FITC)	HI100	1:5	Becton Dickinson Inc., East Rutherford, NJ, USA
Anti-Human CD135 (PE)	4G8	1:5	Becton Dickinson Inc., East Rutherford, NJ, USA
CellTrace TM Violet		1:5000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
IgG1 Isotypkontrolle (R-PE)		1:20	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
SYTOX TM AADvanced TM		1:1000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Tabelle 6 enthält eine Auflistung von Antikörpern, welche zur Markierung von Proteinen im Rahmen von Protein-Immun-Blots eingesetzt wurden.

Tabelle 6 Antikörper und Farbstoffe für die Markierung von Proteinen im Rahmen von Protein-Immun-Blots				
<i>Antigen</i>	<i>Klon</i>	<i>Wirt- spezies</i>	<i>Verdün- nung</i>	<i>Hersteller, Firmensitz</i>
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	GAPDH-71.1	Maus	1:4000	Merck KGaA, Darmstadt
Phospho-VASP (Ser157)	polyklonal	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA
Phospho-VASP (Ser237)	polyklonal	Kaninchen	1:2000	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA
Vinkulin	hVIN-1	Maus	1:400	Merck KGaA, Darmstadt
VASP	43/VASP	Maus	1:1000	Becton Dickinson Inc., East Rutherford, NJ, USA
Rabbit IgG, HRP-gekoppelt	polyklonal	Ziege	1:20000	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA
Mouse IgG, HRP-gekoppelt	polyklonal	Pferd	1:20000	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA

2.1.5 Primer

In vorgelegter Arbeit verwendete Primer, sowie deren Bindestellen, erwartete Produktgrößen und eingesetzte Annealingtemperaturen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7 Eingesetzte Primersequenzen mit entsprechenden Bindestellen sowie erwartete Produktgrößen in Basenpaaren (bp) und verwendete Annealingtemperaturen

<i>Oligo Name</i>	<i>Sequenz (5'→3')</i> <i>NCBI Referenzsequenz (Bindestellen)</i>	<i>Produktgröße</i> <i>(bp)</i>	<i>Annealing</i> <i>Temperatur (°C)</i>
NOS1	vorwärts: CCTCCCGCCCTGCACCATCTT rückwärts: CTTGCCCCATTTCCATTCCTCGTA <i>NM_000620.5 (3802-3822;3976-3953)</i> <i>NM_001204218.1 (4080-4100;4254-4231)</i> <i>NM_001204214.1 (2565-2585;2739-2716)</i> <i>NM_001204213.1 (2570-2590;2744-2721)</i>	175	60
NOS2	vorwärts: TCCGAGGCAAACAGCACATTCA rückwärts: GGGTTGGGGGTGTGGTGATGT <i>NM_000625.4 (2321-2342; 2782-2762)</i>	462	62
NOS3	vorwärts: CATCTTCAGCCCCAAACGGA rückwärts: AGCGGATTGTAGCCTGGAAC <i>NM_000603.5 (2501-2520; 2628-2609)</i> <i>NM_033208.4 (2616-2635; 3178-3159)</i>	128	60

2.1.6 Lösungen und Puffer

Zum Ansetzen von Lösungen und Puffern wurde in dieser Arbeit ausschließlich doppelt destilliertes und filtriertes Wasser (ddH₂O) mit einem Widerstand von 18,2 M Ω · cm bei 25 °C aus einer Reinstwasseranlage eingesetzt. Zum Abmessen kleiner Volumina wurden Kolbenhubpipetten verwendet, größere Volumina wurden in der Zellkultur mittels serologischer Pipetten abgemessen. Zum Ansetzen von Puffern wurden Messzylinder oder -kolben verwendet, um Volumina zu bestimmen.

Medien und Lösungen für die Zellkultur

In Tabelle 8 sind Medien und Lösungen aufgeführt, welche direkt, wie erhalten, für die Zellkultur eingesetzt wurden. Puffer, welche selbst hergestellt wurden, sowie ihre Zusammensetzung sind in Tabelle 9 gelistet.

Tabelle 8 Erworbene Medien und Lösungen für die Zellkultur

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller, Firmensitz</i>
Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose	Merck KGaA, Darmstadt
Eagle's Minimal Essential Medium	Merck KGaA, Darmstadt
Fetales Rinderserum (engl. <i>fetal bovine serum</i> , FBS)	Merck KGaA, Darmstadt
Heparin (2 U · ml ⁻¹)	PL BioScience GmbH, Aachen
Hematopoietic Progenitor Cell Expansion Medium DXF	PromoCell GmbH, Heidelberg
Iscove's Modified Dulbecco's Medium + 2% FBS	STEMCELL Technologies Germany GmbH, Köln
Lymphocyte Separation Medium 1077	PromoCell GmbH, Heidelberg
MethoCult H4434	STEMCELL Technologies Germany GmbH, Köln

Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium	Merck KGaA, Darmstadt
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Merck KGaA, Darmstadt
Plättchenlysate (human)	PL BioScience GmbH, Aachen
Trypanblau 0,4%	Merck KGaA, Darmstadt
Trypsin/EDTA	Merck KGaA, Darmstadt
Versen (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt
Zytokin Mix E	PromoCell GmbH, Heidelberg

Tabelle 9 Hergestellte Puffer für die Zellkultur

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zusammensetzung</i>	
Annexin Puffer (pH = 7,4)	10 mM	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
	140 mM	NaCl
	2,5 mM	CaCl ₂
Erylyse Puffer (pH = 7,4)	150 mM	NH ₄ Cl
	10 mM	NaHCO ₃
	0,1 mM	EDTA-Dinatriumsalz
FACS Puffer	0,1%	FBS in PBS
Rinsing Puffer (2mM EDTA)	2 mM	Versen in PBS
Running Puffer	0,5% (w/v)	BSA in Rinsing Solution
Sytox Färbelösung	1 µM	SYTOX TM AADvanced TM in Annexinpuffer

Lösungen und Puffer für die Molekularbiologie

Für die Molekularbiologie eingesetzte Puffer sowie deren Zusammensetzung sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10 Angesetzte Puffer für molekularbiologische Methoden

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zusammensetzung</i>	
Tris-Acetat-EDTA Puffer (pH=8)	40 mM	Tris
	10 mM	C ₂ H ₃ NaO ₂
	1 mM	EDTA

Lösungen für die Proteinbiochemie

In Tabelle 11 finden sich Puffer und Lösungen, die für biochemische Methoden benötigt wurden, sowie deren Zusammensetzung.

Tabelle 11 Hergestellte Puffer und Lösungen für biochemische Methoden

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zusammensetzung</i>	
Lämmli-Puffer (4x)	125 mM	Tris-HCl (pH=6,8)
	20%	Glycerol
	4%	SDS
	0,01%	Bromphenolblau
	0,05%	β-Mercaptoethanol
Lysepuffer (pH=7,5)	20 mM	Tris-HCl
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA
	1%	Triton X-100 Protease und Phosphatase Inhibitor nach Herstelleranleitung

Ponceau Färbelösung	0,1% (w/v)	Ponceau S
	5%	Essigsäure
SDS Gel		
Trenngel (12%)	750 mM	Tris (pH=8,8)
	12%	Acrylamid/Bisacrylamid
	0,1%	SDS
	0,033%	Ammoniumpersulfat
	0,07%	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Sammelgel (4%)	125 mM	Tris (pH=6,8)
	4%	Acrylamid/Bisacrylamid
	0,1%	SDS
	0,05%	Ammoniumpersulfat
	0,1%	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
SDS-Elektrophoresepuffer	50 mM	Tris Base
	380 mM	Glycin
	35 mM	SDS
Stripping Puffer	100 mM	β -Mercaptoethanol
	62,5 mM	Tris-HCl (pH=6,7)
	2%	SDS
Tris-gepufferte Salzlösung	20 mM	Tris-HCl
(engl. tris-buffered saline,	140 mM	NaCl
TBS) (pH=7,6)		
TBS-Tween-Puffer (TBST)	0,1%	Tween 20 in TBS
Transferpuffer (pH=8,4)	12,5 mM	Tris
	100 mM	Glycin
	10%	Methanol

2.1.7 Eukaryotische Zellen und verwendete Kulturbedingungen

Die humane Zelllinie KG-1a ist eine Suspensionszelllinie, die einen Subklon der Zelllinie KG-1 darstellt und als eine undifferenzierte Variante dieser beschrieben wird [340]. KG-1 wurde von einem Patienten mit Erythroleukämie, welche sich in akute, myeloische Leukämie entwickelte, isoliert. Durch die Expression von CD34 auf der Zelloberfläche von KG-1a Zellen eignen sich diese als Modell für HSPZ bei Experimenten, die aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von primären HSPZ nicht mit diesen durchgeführt werden können. Die Zelllinie wurde vom Leibniz-Institut-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH erworben und in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium mit 20% Fetalem Rinderserum (engl. *fetal bovine serum*, FBS) kultiviert. Zur Subkultivierung wurde das Medium alle 2-3 Tage gewechselt und die Zellzahl zwischen $3 \cdot 10^5$ und $1 \cdot 10^6$ Zellen \cdot ml⁻¹ gehalten.

Die aus dem Knochenmark eines an Erythroleukämie erkrankten Patienten isolierte Suspensionszelllinie TF-1 wurde von der Leibniz-Institut-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH erhalten. Die Zelllinie weist einige unreife Eigenschaften auf und kann zu reifen erythroiden oder Makrophagen-ähnlichen Zellen differenziert werden [341]. Sie eignet sich als Modellzelllinie, um Rezeptoren für Interleukin 3 oder den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor zu untersuchen. Da das Zellwachstum von beiden Faktoren abhängt, wurde zur Kultur in RPMI 1640 Medium mit 20% FBS zusätzlich 10% konditioniertes Medium der Zelllinie 5637 zugesetzt. Die Zellen wurden in einer Dichte von $0,2-1 \cdot 10^6$ Zellen \cdot ml⁻¹ kultiviert.

Die humane Epithelzelllinie 5637 wurde ursprünglich aus einem Karzinom der Urinblase isoliert und bei der Leibniz-Institut-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH käuflich erworben. Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% FBS kultiviert. Sobald die Zellen in einer T75 Flasche 50% Konfluenz erreicht hatten, wurde das verbrauchte Zellkulturmedium entfernt und mit 15 ml frischem Medium ersetzt und die Zellen weitere 3 Tage kultiviert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen, steril filtriert und in kleinen Mengen bei -20 °C gelagert.

Die humane Zelllinie Caco-2 wurde von Prof. Dr. Véronique Orian-Rousseau (Institut für Toxikologie und Genetik, Karlsruher Institut für Technologie) zur Verfügung gestellt. Diese adhären Epithelzellen wurden ursprünglich aus einem Patienten mit kolorektalem Adenokarzinom isoliert und wurden in dieser Arbeit aufgrund ihrer Expression der NOS2 als Positivkontrolle für die Expression dieser Isoform verwendet. Die Zellen wurden in einer Dichte von

$1 \cdot 10^4$ Zellen \cdot cm^{-1} in Eagle's Minimum Essential Medium mit 20% FBS ausgesät und bei 80% Konfluenz passagiert.

Die humane Keratinozyten Zelllinie HaCaT wurde vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) erhalten. Hierbei handelt es sich um eine adhärenz Zelllinie die aus histologisch gesunder Haut erhalten wurde und die *in vitro* spontan transformiert ist [342]. Sie exprimiert NOS1 und wurde daher als Positivkontrolle für die Expression dieser Isoform eingesetzt. HaCaT Zellen wurden in einer Dichte von $1 \cdot 10^4$ Zellen \cdot cm^{-1} in Dulbecco's Modified Eagle Medium mit $4,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Glukose (DMEM high glucose) unter Zusatz von 10% FBS ausgesät und bei 70-80% Konfluenz passagiert.

Bei der Suspensionszelllinie THP-1 handelt es sich um humane Zellen, die aus dem Blut eines Spenders mit akuter monozytärer Leukämie isoliert wurden [343]. Die Zelllinie wurde von Prof. Dr. Jörg Overhage (ehemals: Institut für Funktionelle Grenzflächen, Karlsruher Institut für Technologie, aktuell: Carlton University, Kanada) erhalten. Sie wurde als Positivkontrolle für die Expression von NOS3 eingesetzt, da sie diese Isoform in hohem Maß aufweist. Die Zellen wurden zur Kultur in einer Dichte von $3-8 \cdot 10^5$ Zellen \cdot ml^{-1} in RPMI 1640 mit 10% FBS gehalten.

Primäre MSZ wurden von Prof. Dr. Karen Bieback (Institut Transfusionsmedizin und Immunologie Mannheim, Medizinische Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg; Deutsches Rotes Kreuz Blutspenderservice Baden-Württemberg/Hessen, Mannheim) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in DMEM high glucose unter Zusatz von 5% (v/v) humanem Plättchenlysat und $2 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ Heparin in einer Dichte von 2000 Zellen \cdot cm^{-1} ausgesät und bei 80% Konfluenz passagiert. Für Experimente wurden MSZ bis Passage 6 verwendet.

Primäre HSPZ wurden aus humanem Nabelschnurblut über die positive Selektion des Oberflächenmarkers CD34 isoliert. Die Präparate wurden von der Nabelschnurblutbank des Deutschen Roten Kreuz Services Mannheim oder der DKMS Nabelschnurblutbank gGMBH Dresden erhalten. Die Nabelschnurblutspende erfolgte nach Information und unterschriebener Einverständniserklärung der Spender. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Landesärztekammer Baden-Württemberg genehmigt (B-F-2013-111). Zur Isolation von HSPZ wurden lediglich Nabelschnurblutpräparate verwendet, die nicht älter als 48 h waren. Die frisch isolierten HSPZ wurden soweit nicht anders angegeben, direkt für Experimente verwendet und in Hematopoietic Progenitor Cell Expansion Medium mit 1 % (v/v) Zytokin Mix E kultiviert.

2.1.8 Programme zur Datenanalyse

Programme, die zur Auswertung der erhobenen Rohdaten eingesetzt wurden, sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12 Verwendete Programme für die Datenauswertung

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller, Firmensitz</i>
FlowJo 7.6.5	FlowJo LLC, Ashland, OR, USA
GraphPad Prism 6.07	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
ImageJ 1.49v	Wayne Rasband, National Institute of Health, Maryland, USA
Microsoft Excel 2013	Microsoft Corp., Redmont, WA, USA
OPUS 7.2	Bruker Corp., Billerica, MA, USA

2.2 Verwendete Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Um steriles Arbeiten zu gewährleisten, wurden alle Tätigkeiten unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse II durchgeführt und ausschließlich sterile Verbrauchsmaterialien verwendet. Mehrfach verwendete Materialien, wie Glasflaschen, wurden mit feuchter Hitze in einem Autoklav sterilisiert. Für die Zellkultur verwendete Lösungen und Puffer wurden steril erworben oder nach Ansetzen mittels eines Filters der Porengröße 0,2 µm steril filtriert. Zellen wurden in Brutschränken mit 37 °C, 95% Luftfeuchte und 5% CO₂ kultiviert. Während der Kultur wurden die Zellen täglich mikroskopisch auf Kontaminationen mit Mikroorganismen überprüft. Zentrifugationsschritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben, bei 300 · g für 5 min bei Raumtemperatur (RT) mit 9-facher Beschleunigungs- und Abbremsrate.

2.2.1.1 Routinearbeiten in der Zellkultur

Auftauen von Zellen

Kryokonservierte Zellen wurden unter Schwenken im auf 37 °C temperierten Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension in 9 ml vorgewärmten, zellspezifischen Kulturmedium verdünnt. Nach Überführen der Zellen in eine T75 Zellkulturflasche wurden diese für 24 h im Brutschrank inkubiert und am Folgetag ein Medienwechsel durchgeführt.

Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Färbung

Die Anzahl vitaler Zellen wurde über Farbstoffausschluss mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Dieser Farbstoff dringt durch die perforierte Zellmembran toter Zellen und bindet intrazellulär an Proteine, wodurch die Zellen blau erscheinen [344]. Hierzu wurde die Zellsuspension mit einer 0,4% Lösung Trypanblau vermischt (Volumenverhältnis 1:2 bis 1:10) und in eine Neubauer Zählkammer eingebracht. Durch Zählung der ungefärbten und gefärbten Zellen konnte unter dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung die Anzahl der vitalen und toten Zellen ermittelt werden. Hierzu wurde der Durchschnitt der Zellzahl in den vier Großquadraten mit dem Verdünnungsfaktor sowie dem Kehrwert des Produkts aus Quadratfläche und Kammerhöhe (10^4) multipliziert und so die Zellzahl pro ml erhalten.

Passagieren adhärenter Zellen

Adhärente Zellen wurden bei 60–80% Konfluenz passagiert, um sie in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten. Hierzu wurde das Zellkulturmedium abgenommen und der Zellrasen mit vorgewärmtem PBS gespült. Anschließend wurde 1 ml Trypsin/EDTA zugegeben und die Zellen für maximal 5 min im Brutschrank inkubiert. Nach mikroskopischer Überprüfung der Ablösung der Zellen wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 10 ml serumhaltigem, zellspezifischem Medium unterbunden. Nach Zellzählung wurde die Zellsuspension zentrifugiert und die entsprechende Zellzahl in frisches, zellspezifisches Medium in einer neuen Kulturflasche ausgesät. Die Passagenzahl wurde hierbei um 1 erhöht.

Passagieren von Suspensionszellen

Suspensionszellen wurden nach leichtem Klopfen an die Zellkulturflasche aus dieser entnommen und gezählt. Durch Verdünnung der Zellsuspension mit frischem, vorgewärmtem, zellspezifischem Medium wurde die gewünschte Zellzahl eingestellt und die Zellen in eine frische Zellkulturflasche überführt. Die Passage wurde dabei um 1 erhöht.

2.2.1.2 Isolation von CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut

Zur Isolation von HSPZ aus Nabelschnurblut wurde zunächst der mononukleäre Zellanteil mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Lymphozytentrennmedium erhalten. Dieses Medium auf Basis des neutralen, hochverzweigten Polysaccharids Ficoll 400 besitzt bei 20 °C eine Dichte von 1,077 g · ml⁻¹ und erlaubt eine Auftrennung von Blutproben mittels Zentrifugation in ein Pellet aus Erythrozyten und Granulozyten unter der Lymphozytentrennmedium-Phase. Oberhalb dieser befindet sich eine Schicht mononukleärer Zellen, der sogenannte „*buffy coat*“, der von Blutplasma überschichtet ist [345]. Hierzu wurde das Nabelschnurblut zunächst im Verhältnis 1:3 mit Rinsing Puffer verdünnt und je 35 ml des verdünnten Blutes vorsichtig auf 15 ml vorgelegtes Lymphozytentrennmedium überschichtet, sodass sich zwei Phasen bildeten. Durch Zentrifugieren (1500 · g, 20 min, RT, 5-fache Beschleunigung, ohne Bremse) wurden die Blutbestandteile nach Dichte getrennt, sodass die mononukleären Zellen mit einer Serumpipette abgenommen werden konnten. Die mononukleäre Zellfraktion wurde anschließend mit Rinsing Puffer im Verhältnis 1:2 verdünnt und zentrifugiert (300 · g, 15 min, RT, 9-fache Beschleunigung und Abbremsung). Nach Verwerfen des Überstandes wurden alle erhaltenen Pellets in 12 ml Rinsing Puffer vereinigt und erneut zentrifugiert (300 · g, 10 min, RT, 9-fache Beschleunigung und Abbremsung). Der Überstand wurde wiederum verworfen und das erhaltene Pellet in 10 ml Erylysepuffer resuspendiert, um Erythrozyten zu entfernen. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Zellsuspension zentrifugiert und der Überstand verworfen. Falls das Pellet eine starke Rotfärbung durch verbliebene Erythrozyten aufwies, wurde die Erylyse mit verkürzter Inkubationszeit wiederholt. Das Zellpellet wurde in 10 ml Rinsing Puffer resuspendiert und die Zellzahl ermittelt.

Im nächsten Schritt wurden die HSPZ aus dem mononukleären Zellanteil mittels positiver Selektion über die Expression des Oberflächenmarkers CD34 aufgereinigt. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit antikörpergekoppelten, superparamagnetischen Nanopartikeln markiert, die gegen CD34 gerichtet waren. Hierzu wurde das Zellpellet nach Zentrifugation in 300 µl kaltem Running Puffer sowie je 100 µl FcR Blockier- und CD34 Microbead Markierreagenz je 10⁸ mononukleärer Zellen (mindestens 300 µl Laufpuffer bzw. 100 µl Blockier- und Markierreagenz) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde bei 4 °C für 30 min auf dem MACSMix™ Tube Rotator bewegt und anschließend mit 10 ml kaltem Running Puffer gewaschen. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in 1 ml Running Puffer je 10⁸ mononukleärer Zellen aufgenommen, erneut zentrifugiert und schließlich in 500 µl Running Puffer je 10⁸ mononukleärer Zellen resuspendiert. Zur positiven Selektion der markierten CD34⁺ Zellen über eine magnetische Säule wurde eine MS-Säule am MiniMACS™ Separator befestigt und diese mit 750 µl

kaltem Running Puffer äquilibriert. Anschließend wurde die markierte Zellsuspension auf die Säule geladen und die Säule anschließend dreimal mit je 500 µl Running Puffer gespült. Die mit den markierten Zellen beladene Säule wurde nun vom Magneten entfernt und die Zellen mit Hilfe des Säulenstempels in 1 ml Running Puffer eluiert. Die positive Selektion der markierten Zellen wurde auf einer zweiten Säule wiederholt, jedoch wurden die Zellen hierbei in 500 µl Running Puffer eluiert. Nach Zellzahlbestimmung wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in einer Dichte von 10^6 Zellen · ml⁻¹ in vorgewärmtem, zellspezifischem Medium aufgenommen. Von jeder Blutprobe wurde nach Isolation der Anteil an CD34⁺ Zellen ermittelt, indem eine Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörperkonjugaten gegen CD34 durchgeführt und durchflusszytometrisch analysiert wurde. Zellen wurden ausschließlich für Versuche eingesetzt, wenn der CD34⁺ Zellanteil mindestens 95% betrug.

2.2.1.3 Stimulation von Zellen mit löslichen, NO freisetzenden Molekülen

Für die Stimulation mit NO wurden dem Zellkulturmedium Moleküle zugesetzt, welche in neutraler bzw. saurer Umgebung spontan zerfallen und NO freisetzen. Zur Stimulation mit der Verbindung DETA/NO wurde zunächst auf Eis eine 200 mM Stammlösung in 0,01 M NaOH hergestellt. Die Konzentration der intakten Verbindung wurde über das Lambert-Beer'sche Gesetz (siehe Formel 1) mittels UV/vis Spektroskopie bestimmt, indem die Optische Dichte (OD) der Lösung gemessen wurde [346].

$$OD = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (1)$$

Hierbei stellt I_0 die Intensität des einfallenden Lichtstrahls, I die Intensität des transmittierten Lichts, ε_{λ} den Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ , c die Stoffmengenkonzentration der absorbierenden Substanz und d die Schichtdicke des durchstrahlten Körpers dar. Zur Konzentrationskontrolle von DETA/NO wurde die OD der Lösung bei 252 nm gemessen und mit $\varepsilon_{252nm} = 7640 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ die Konzentration der intakten Substanz berechnet [212]. Die Stammlösung wurde bis zu 7 d bei -80 °C gelagert. Vor jeder Stimulation wurde die OD der Stammlösung überprüft, um sicherzustellen, dass kein vorzeitiger Zerfall des Moleküls eingetreten war. Zur Stimulation der Zellen wurden Vorverdünnungen von DETA/NO in PBS auf Eis hergestellt und die Zellen mit dieser stimuliert, wobei die finale Verdünnung im Zellkulturmedium stets 1:1000 betrug. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert. DETA/NO wurde täglich frisch zugegeben und das Medium täglich erneuert, um eine kontinuierliche Freisetzung von NO zu gewährleisten und die Ansammlung der zerfallenen Chemikalie im Medium zu verhindern.

Zur Bestimmung der NO-abhängigen Signalwege wurde zusätzlich die Verbindung Diethylenamin/NO Addukt (DEA/NO) als NO freisetzendes Molekül mit kurzer Halbwertszeit von 2-3 min unter physiologischen Bedingungen verwendet. Die Stimulation wurde analog zu DETA/NO nach Konzentrationsüberprüfung der intakten Verbindung über die OD bei 250 nm mit $\epsilon_{250\text{ nm}} = 6500\text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ durchgeführt [212].

2.2.1.4 Durchflusszytometrische Analysen

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Messung einer Vielzahl an Einzelzellereignissen in kurzer Zeit. Hierbei wird eine Zellsuspension in einer Trägerflüssigkeit fokussiert und die Zellen einzeln durch den Strahlengang eines Lasers geführt. Durch die Detektion des gestreuten Lichtes über Photoelektronenvervielfacher und die Verwendung geeigneter Filtersätze lassen sich verschiedene Informationen über die untersuchte Zellpopulation gewinnen. Über das Vorwärts- bzw. Seitwärtsstreulicht kann auf die rel. Größe bzw. die Granularität der Zellen geschlossen werden. Zusätzliche Markierung von Zellen mit Fluorochromen, beispielsweise mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, erlauben die Detektion des zur Anregungswellenlänge rotverschobenen Emissionssignals dieser Konjugate. Dabei ist die rel. Fluoreszenzintensität proportional zur Zahl der gebundenen Farbstoffmoleküle. In der vorliegenden Arbeit wurde ein BD FACSVerser™ Durchflusszytometer mit drei Lasern der Wellenlängen 405 nm, 488 nm und 640 nm verwendet, das eine gleichzeitige Analyse von bis zu 8 Farben ermöglichte.

Vor der Analyse wurden die Spannungen der Photoelektronenvervielfacher der Detektoren anhand einer ungefärbten bzw. einfachgefärbten Probe so eingestellt, dass sich sowohl das Signal der ungefärbten Probe als auch das Signal der Positivkontrolle im linearen Bereich des Detektors befand. Anschließend wurde der Fluoreszenzübertrag von einem Messkanal in die anderen kompensiert, indem mit einzelgefärbten Proben sogenannte *reference settings* erstellt wurden. Bei Analysen von Einfachfärbungen war dies nicht notwendig. Zur Probendetektion wurde eine Fließrate von $60\text{ }\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ verwendet. Nach Einstellen der optimalen Messparameter wurden diese durch das Referenzieren auf BD™ CS&T beads gespeichert und konnten vor jeder Messung erneut geladen werden, sodass eine erneute Kompensation an den einzelnen Messtagen entfiel. Die Analyse der mittels Durchflusszytometrie generierten Daten erfolgte mit Hilfe des Programmes FlowJo. Zur Diskriminierung von Dubletten wurde das Flächensignal gegen die Breite des Spannungspulses des Vorwärtsstreulichtes verwendet. Zur Analyse der Fluoreszenzintensität wurden jeweils die Flächensignale der Spannungspulse herangezogen. Zur

Einteilung der Zellen in positive und negative Ereignisse wurden positive Gates als 1% positiver Ereignisse der Isotypkontrolle bei Einzelfärbungen bzw. der Fluoreszenz-minus-eins-Kontrolle (engl. *fluorescence minus one control*, FMO Kontrolle) bei Mehrfachfärbungen definiert.

Quantifizierung apoptotischer und nekrotischer Zellen durch Färbung mit Annexin V und SYTOXTM AADvancedTM

Apoptotische und nekrotische Zellen wurden durch Färbung mit fluoreszenz-markiertem Annexin V und SYTOXTM AADvancedTM (Sytox) markiert. Annexin V bindet an Phosphatidylserine, welche sich bei apoptotischen Zellen durch den Verlust der Asymmetrie der Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran auf der Zellaußenseite befinden [347]. Spät apoptotische und nekrotische Zellen, die bereits eine permeable Zellmembran aufweisen, wurden durch den Farbstoff Sytox detektiert, da dieser aufgrund seiner Größe nur in Zellen mit perforierter Zellmembran eindringen kann und dort an Nukleinsäure bindet [348]. So konnte durch Kombination der Farbstoffe zwischen früh apoptotischen (Annexin V⁺ und Sytox⁻), spät apoptotischen und nekrotischen (Annexin V⁺ und Sytox⁺) und vitalen (Annexin V⁻ und Sytox⁻) Zellen unterschieden werden. Zur Färbung wurden zunächst $2 \cdot 10^4$ Zellen in 500 μ l Annexinpuffer gewaschen und nach Zentrifugation in 100 μ l Sytox Färbelösung resuspendiert. Nach Zugabe von 5 μ l Annexin V-FITC wurden die Zellen für 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert und anschließend mit 500 μ l Annexinpuffer gewaschen. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in 120 μ l Annexinpuffer resuspendiert und direkt mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Kompensationskontrollen wurden Einzelfärbungen mit Annexin V-FITC oder Sytox durchgeführt. Hierzu wurde jeweils die Hälfte der Zellpopulation vor der Färbung durch 30 min Inkubation in 50% Ethanol (EtOH) oder durch Erhitzen für 10 min auf 70 °C abgetötet und die gesamte Zellpopulation anschließend in 100 μ l Annexinpuffer mit 5 μ l Annexin V oder 100 μ l Sytox Färbelösung aufgenommen. Zusätzlich wurde für Spannungseinstellungen eine ungefärbte Kontrolle mitgeführt.

Bestimmung der CD34 Expression nach Zellisolation durch Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörperkonjugaten

Zur Kontrolle des Gehaltes an CD34⁺ Zellen nach Isolation von HSPZ aus Nabelschnurblut wurde eine Färbung gegen dieses Antigen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörperkonjugaten durchgeführt. Hierzu wurden je $5 \cdot 10^4$ Zellen direkt nach Isolation in 500 μ l FACS Puffer gewaschen. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 50 μ l FACS Puffer resuspendiert und 2,5 μ l des Anti-human CD34 Antikörperkonjugates bzw. der zugehörigen IgG Isotypkontrolle

zugegeben. Nach Inkubation für 30 min bei 4 °C wurde den Proben 500 µl FACS Puffer hinzugegeben und die Zellen anschließend zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 150 µl FACS Puffer resuspendiert und der markierte Zellanteil mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Verfolgung der Zellproliferation über Färbung mit CellTrace™ Violet

Zur Analyse der Proliferation von HSPZ unter dem Einfluss von DETA/NO wurden die Zellen nach Isolation mit dem Farbstoff CellTrace™ Violet (CTV) gefärbt. Hierzu wurden 10^6 Zellen in PBS resuspendiert und pelletiert. Die Zellen wurden anschließend möglichst rasch in 1 µM CTV in 1 ml PBS resuspendiert und die Zellsuspension gründlich durchmischt. Die Zellsuspension wurde für 20 min im Brutschrank inkubiert und anschließend 5 ml 10% FBS in PBS zugefügt, um ungebundene Farbstoffmoleküle zu entfernen. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen pelletiert, der Überstand verworfen, die Zellen in zellspezifischem Kulturmedium aufgenommen, gezählt und direkt für Versuche eingesetzt. Zur Kompensation des Fluoreszenzübertrages in andere Messkanäle wurden KG1a Zellen mit CTV gefärbt und als Einzelfärbung mitgeführt.

Analyse von Vorläuferzellpopulationen durch Färbung mit Hilfe eines Antikörperpanels

Um die verschiedenen Vorläuferzellanteile quantifizieren zu können, wurden je $5-10 \cdot 10^4$ mit CTV gefärbte Zellen zentrifugiert und das Zellpellet in 50 µl FACS Puffer aufgenommen. Anschließend wurden murine Antikörperkonjugate, wie in Tabelle 13 aufgeführt, zugegeben und die Zellen nach gründlichem Mischen für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Als Kontrollen wurde für jedes eingesetzte Fluorochrom eine FMO Kontrolle mitgeführt. 10 min vor Ablauf der Inkubationszeit wurde 0,75 µl des Farbstoffs 7-AAD zugegeben, der ausschließlich tote Zellen mit perforierter Zellmembran färbt [349]. Anschließend wurden ungebundene Antikörper und Farbstoffe durch Zugabe von 1 ml FACS Puffer verdünnt. Nach Zentrifugation der Proben wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 150 µl FACS Puffer aufgenommen und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zur Kompensation wurden Einzelfärbungen mit BD™ CompBeads durchgeführt. Diese Mikropartikel aus Polystyrol tragen auf der Oberfläche Immunoglobuline gegen die murine Leichtkette und ließen sich so durch die im Antikörperpanel eingesetzten Antikörperkonjugate markieren. Hierzu wurde zu je einem Tropfen der Partikel je 1 µl eines Antikörperkonjugates zugesetzt und der Farbstoff durch leichtes Klopfen in der Flüssigkeit verteilt. Nach 10 min Inkubation bei RT im Dunkeln wurde 100 µl FACS Puffer sowie ein Tropfen der Kontrollpartikel zugegeben und die Suspension direkt zur Kompensation

verwendet. Für eine Einfachfärbung von Zellen mit 7-AAD, wurden 10^5 KG1a Zellen durch 5 min Erhitzen auf 95 °C abgetötet, nach Abkühlen mit 10^5 vitalen Zellen vereinigt und in 100 µl FACS Puffer aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 0,75 µl 7-AAD gefärbt (10 min, RT). Zusätzlich wurde eine ungefärbte Kontrolle desselben Zelltyps zur Einstellung der Spannungen der Photoelektronenvervielfacher der Detektoren mitgeführt.

Tabelle 13 Antikörperkonjugate zur Färbung charakteristischer Antigene zur Einteilung von HSPZ in einzelne Progenitorzellpopulationen

<i>Murine Antikörper</i>	<i>Gekoppeltes Fluorochrom</i>	<i>Volumen (µl)</i>
Anti-human CD34	PE-Cy7	1,25
Anti-human CD38	APC-H7	2,5
Anti-human CD10	APC	2,5
Anti-human CD45RA	FITC	10
Anti-human CD135	PE	10

2.2.1.5 Analyse myeloider Progenitoren mittels Koloniebildungsassay

Der Koloniebildungsassay (engl. *colony forming unit assay*, CFU-Assay) erlaubt die Unterscheidung von CFUs anhand ihrer charakteristischen Morphologie. Durch Ausplattieren einer Einzelzellsuspension in einem Medium hoher Viskosität kann durch die Quantifizierung der gebildeten Kolonien auf das Differenzierungs- und Proliferationspotential der eingesetzten Zellen rückgeschlossen werden. Homogene Kolonien aus verstreut erscheinenden, kleinen, weißen Zellen verweisen auf eine CFU, welche Granulozyten, wie Eosinophile, Basophile und Neutrophile, hervorbringt (CFU-G). Kolonien aus einer homogenen Population größerer, weißen Zellen entstammen einer CFU, die Makrophagen hervorbringen kann (CFU-M). Mischformen beider Zellpopulationen lassen auf einen gemeinsamen Vorläufer schließen, welcher das Differenzierungspotenzial in Granulozyten und Makrophagen besaß (CFU-GM). Homogene, hämoglobinierte, kompakte Kolonien entstammen hingegen einem Erythrozyten-Vorläufer (engl. *burst forming unit-erythroid*, BFU-E). Unreifere Vorläufer, die in alle myeloiden Linien differenzieren können (CFU-GEMM), bilden heterogene Kolonien aus Granulozyten, Makrophagen und Erythrozyten und stellen morphologisch eine Mischform der anderen Kolonietypen dar [350].

Für jeden Ansatz wurden $1,5 \cdot 10^3$ HSPZ in 300 μ l Iscove's Modified Dulbecco's Medium mit 2% FBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde anschließend zu 3 ml MethoCult H4434 gegeben und auf einem Labormischer gründlich unter das viskose Medium gemischt. Nach 5 min Ruhephase wurde je 1 ml der Zelmischung in Dreifachbestimmung luftblasenfrei in eine 35 mm Petrischale plattiert. Die Petrischalen wurden in einer feuchten Kammer für 12-14 Tage im Brutschrank inkubiert und die gebildeten Kolonien anschließend manuell auf einem Zählgitter mit dem Labormikroskop bei 50-facher Gesamtvergrößerung ausgezählt, wobei die Kolonien von CFU-GM, CFU-M sowie CFU-G zusammengefasst wurden.

2.2.1.6 Zytokompatibilitätstest mittels Lebend/Tot Färbung

Zur Überprüfung der Zytokompatibilität von Testoberflächen wurde das Cell Viability Imaging Kit verwendet, welches die Unterscheidung von metabolisch aktiven und toten Zellen erlaubt. Stoffwechselnde Zellen setzen intrazellulär den zellpermeablen, nicht-fluoreszierenden Farbstoff-Vorläufer Calcein-AM zum fluoreszierenden Calcein um, während der DNA Farbstoff Propidium Iodid aufgrund der mangelnden Integrität der Zellmembran in tote Zellen eindringt. Zusätzlich werden alle Zellen über den zellpermeablen DNA Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt. Zur Färbung wurde die Färbelösung nach Herstellerprotokoll angesetzt und direkt dem Zellkulturmedium zugesetzt. Nach 30 min Inkubation im Brutschrank wurde dem Zellkulturmedium 1 ml PBS zugegeben, um den Hintergrund durch ungebundene Farbstoffmoleküle zu verringern und die Zellen auf den Testoberflächen direkt mikroskopisch analysiert (20 Mikroskopiebilder pro Oberfläche). Die Analyse der Mikroskopiebilder erfolgte anhand von Einzelkanalbildern in ImageJ. Über die Festlegung eines Farbschwellenwertes wurden die positiven Zellsignale ausgewählt und mit dem Partikelanalyse-Werkzeug gezählt (Parameter: *Exclude on edges*, *size* = $10-\infty$, *circularity* = 0,1-1). Die so erhaltenen Zellzahlen der drei Farbkanäle wurden für jedes Mikroskopiebild in Excel exportiert und die Vitalität der Zellen über den Anteil metabolisch aktiver Zellen ermittelt.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Ribonukleinsäure Isolation

Zur Isolation von Ribonukleinsäure (engl. *ribonucleic acid*, RNA) wurde das Isolationskit RNeasy® mini verwendet. Hierzu wurden zunächst bis zu $5 \cdot 10^6$ adhärenente Zellen trypsiniert bzw. bis zu $5 \cdot 10^6$ Suspensionszellen aus der Kultur entnommen und durch Zentrifugation pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet gelockert und in 350 μ l

1% β -Mercaptoethanol in Puffer RLT lysiert. Die RNA Isolation wurde weiter nach Herstellerangaben durchgeführt. Im Anschluss wurde die RNA Konzentration über die OD der Probe bei 280 nm am NanoDrop™ 2000 Spektrophotometer gemessen.

2.2.2.2 Reverse Transkription

Aus der isolierten RNA wurde mit Hilfe der TaqMan® Reverse Transcription Reagents komplementäre DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA) hergestellt. Der enthaltene oligo Desoxythymidine Nukleotid Primer bindet hierbei an den Poly-Adenin-Schwanz der eukaryotischen mRNA und dient so als Startpunkt für die RNA-abhängige DNA Polymerase. Die sogenannte reverse Transkriptase fügt komplementäre Nucleotide an das 3' Ende des Primers und synthetisiert so einen zur Templat RNA komplementären DNA Strang [351]. Für die cDNA Synthese wurden 250-500 ng RNA in 9,62 μ l RNase freiem H₂O eingesetzt und 15,38 μ l des Mastermixes hinzugegeben, dessen Zusammensetzung in Tabelle 14 aufgeführt ist. Diese Mischung wurde für die reverse Transkription im Thermocycler 30 min auf 48 °C erwärmt, anschließend wurde das Enzym 5 min bei 90 °C hitzeinaktiviert und das Produkt schließlich auf 4 °C gekühlt.

Tabelle 14 Zusammensetzung des Mastermixes für die reverse Transkription

<i>Komponenten</i>	<i>Volumen für 1x Ansatz (μl)</i>
10x TaqMan RT Buffer	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	5,5
dNTPs	5
Oligo Desoxythymidine Nukleotid Primer (2,5 μ M)	1,25
RNase Inhibitor	0,5
Multiscribe RT (50 U μ l ⁻¹)	0,625

2.2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) wurden im nächsten Schritt spezifische Genabschnitte der zuvor synthetisierten cDNA vervielfältigt. Hierzu wurden der cDNA Oligonukleotidprimer, aufgeführt in Tabelle 7, die spezifisch an die zu amp-

lizierenden Genabschnitte binden, hinzugefügt. Ausgehend von diesen kann die hitzebeständige DNA Polymerase aus den bereitgestellten Nukleotiden einen DNA Strang komplementär zur eingesetzten cDNA synthetisieren [351]. Zur DNA Vervielfältigung mittels PCR wurde das PeqGOLD Hot Taq-DNA Polymerase Kit sowie das peqGOLD dNTP Set verwendet. Hierzu wurde für einen 25 µl Ansatz 20-50 ng cDNA in 1 µl zu 24 µl des Mastermixes hinzugefügt, wie in Tabelle 15 aufgeführt. Als Negativkontrolle wurde stets eine Kontrollprobe mitgeführt, der RNasefreies H₂O anstelle von Templat zugesetzt wurde. In einem Thermocycler wurde die Probe zunächst für 30 s auf 95 °C erhitzt. Anschließend durchliefen die Proben 30 Zyklen von Denaturierung, Annealing und Elongation wie in Tabelle 16 aufgeführt. Abschließend wurden die amplifizierten Proben auf 4 °C gekühlt.

Tabelle 15 Komponenten eines 25 µl Ansatzes Mastermix für die Vervielfältigung spezifischer DNA Abschnitte mittels PCR

<i>Komponenten</i>	<i>Volumen (µl)</i>
10x Puffer	2,5
dNTP (10 mM)	0,5
Primer vorwärts (40 µM)	0,25
Primer rückwärts (40 µM)	0,25
HotStar Polymerase	0,13
RNase freies H ₂ O	20,37

Tabelle 16 PCR Zyklus mit den Einzelschritten Denaturierung, Annealing und Elongation

<i>Einzelschritte</i>	<i>Temperatur (°C)</i>	<i>Dauer (s)</i>
Denaturierung	94	30
Annealing	Primerabhängig	30
Elongation	72	90

2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die so erhaltenen DNA Produkte wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt und über einen Farbstoff, der in DNA interkaliert, visualisiert. Hierzu wurde für ein 2% (w/v) Agarosegel 1 g Agarose in 50 ml Tris-Acetat-EDTA Puffer erhitzt und nach Abkühlen 2,5 µl GelRed hinzugegeben. Die Agarosemischung wurde anschließend blasenfrei in einen Gelschlitten gegossen. Das abgekühlte Gel wurde in eine mit Tris-Acetat-EDTA Puffer befüllte Elektrophoresekammer gesetzt und mit den Proben beladen. Hierzu wurde je 5 µl Probe mit 1 µl Loading Dye vermischt und in die Taschen des Gels geladen. Als Größenstandard wurde 4 µl DNA Leiter mit 1 µl Loading Dye vermischt und ebenfalls auf das Gel geladen. Die DNA Fragmente wurden bei einer Spannung von 120 V für 50 min aufgetrennt und das Gel anschließend unter Anregung mit UV Licht mit einem Geldokumentationssystem bildlich festgehalten.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Auftrennung, Immobilisierung und Detektion phosphorylierter Proteine

Zellyse und Proteinmengenbestimmung nach Bradford

Nach Stimulation der Zellen wurden diese in einer auf 4 °C vorgekühlten Tischzentrifuge pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden auf Eis durch Zugabe von 100 µl (bei $3 \cdot 10^6$ KG1a) bzw. 30 µl (bei 10^5 HSPZ) kalten Lysepuffers aufgeschlossen. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde die in den Proben enthaltene DNA mittels Ultraschall geschert, um die Viskosität der Lysate zu verringern. Die Proben wurden gegebenenfalls aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die in den Proben enthaltene Proteinmenge wurde nach Bradford mittels Roti[®]-Nanoquant nach Herstelleranweisung in Mehrfachbestimmung ermittelt.

Proteinfraktionierung mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteinmischung nach Größe wurde eine eindimensionale Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) nach Lämmli durchgeführt [352]. Hierbei wird die Proteinmischung unabhängig von der Eigenladung, die durch den Zusatz von SDS überdeckt wird, in einem elektrischen Spannungsfeld nach Größe in einem diskontinuierlichen Acrylamid-Gel aufgetrennt. Zur Auftrennung der Proteine wurden handgegossene Gele mit einer Acrylamidkonzentration von 12% im Trenngel verwendet. Die gründlich gereinigten Glasplatten wurden hierfür in einen Halter eingespannt und auf dem mit Wasser durchdrungenen Schwamm des

Gießstandes befestigt. Anschließend wurden die Komponenten des Trenngels möglichst blasenfrei vermischt, zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Gelgrenzfläche zu erhalten. Nach Polymerisation des Gels wurden die Komponenten des Sammelgels vermischt und nach Entfernen der Isopropanol-Schicht auf das Trenngel pipettiert. Durch Fixieren eines Kunststoffkammes im Sammelgel wurden Geltaschen erhalten. Nach 30 min Polymerisation konnte das fertige Gel bis zur Verwendung für die SDS-PAGE in feuchte Tücher eingeschlagen bis zu 7 Tage bei 4 °C gelagert werden. Für die Elektrophorese wurde jeweils die gleiche Proteinmenge pro Tasche auf das Gel geladen. Hierzu wurden 10-20 µg Protein 1:4 mit 4x Lämmli-Puffer verdünnt und 5 min bei 95 °C gekocht, um die Proteine zu denaturieren. Nach Spülen der Geltaschen wurden die abgekühlten Proben zusammen mit 2,5 µl gefärbten Proteinmarker auf das Gel geladen und in der mit Laufpuffer bestückten Elektrophoresekammer bei 70 V im Sammelgel fokussiert. Nach Übertritt der Proteine in das Trenngel wurden diese bei 110 V fraktioniert, bis die 15 kDa Marke des Größenmarkers aus dem Gel gelaufen war.

Transfer der Proteine mittels Western Blot

Zur späteren Analyse von phosphorylierten Proteinen wurden diese auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran immobilisiert. Hierzu wurde diese in Methanol benetzt und die Membran sowie die SDS-Gele in Transferpuffer 10 min äquilibriert. Alternativ wurden Nitrozellulose Membranen eingesetzt. Diese wurden direkt in Transferpuffer benetzt und äquilibriert. Anschließend wurden die nach Größe aufgetrennten Proteine mittels Nassblot-Verfahren auf die Membran übertragen. Für den Übertrag wurde das Gel und die Membran luftblasenfrei zwischen zwei mit Transferpuffer durchdrängten Filterpapieren und Schwämmen eingespannt und in das mit Transferpuffer gefüllte Tank-Blot-System gestellt. Die Proteine wurden anschließend unter Kühlung für 75 min bei 100 V auf die Membran übertragen. Nach Proteinübertrag wurde diese mit ddH₂O gewaschen, um anhaftende Gelreste zu entfernen und anschließend bei RT zwischen zwei Filterpapieren getrocknet, um die Proteinhaltung auf der Membran zu verbessern. In trockenem Zustand konnten die Membranstücke zwischen zwei Filterpapieren einige Tage bei 4 °C gelagert werden.

Detektion der Proteine mittels enzymkonjugierter Antikörper

Nach Benetzung der Membran in Methanol wurde diese kurz in TBST geschwenkt und anschließend für 5 min in Ponceau Färbelösung inkubiert, um den gleichmäßigen Übertrag der Proteine auf die Membran zu überprüfen. Der rote Azofarbstoff Ponceau S bindet hierbei reversibel an positiv geladene Aminogruppen sowie nicht-kovalent an unpolare Regionen von

Proteinen [353]. Nach Auswaschen der Hintergrundfärbung mit ddH₂O wurde die Membran gegebenenfalls auf das Zielprotein zugeschnitten und die Membranstücke anschließend 1 h bei RT mit 5% BSA in TBST blockiert. Nach Spülen in TBST wurden die Membranstücke über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper in 5% BSA in TBST inkubiert. Anschließend wurden diese dreimal 5 min bei RT mit TBST gewaschen und mit dem Meerrettichperoxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper 1 h bei RT (1 : 20000 in 5% BSA in TBST) unter Bewegung der Membran auf einem Schwenktisch gefärbt. Durch erneutes Waschen (3 x 10 min) der Membran in TBST wurden ungebundene Antikörperkonjugate entfernt. Die Membranstücke wurden anschließend 5 min mit HRP-Substrat inkubiert und das Chemilumineszenz-Signal der enzymgekoppelten Sekundärantikörper mit Hilfe des Lumi-Imagers detektiert. Für erneute Antikörperfärbung der Membran konnten die gebundenen Antikörper von der PVDF Membran gelöst werden. Hierzu wurden die Membranstücke 30 min bei 50 °C in Stripping Puffer inkubiert und anschließend mit TBST gewaschen. Die Membran wurde anschließend erneut blockiert und gefärbt. Mittels SDS-PAGE fraktionierte Proteine, welche mittels Western Blot auf Membranen übertragen wurden und anschließend antikörperbasiert nachgewiesen wurden, werden im Weiteren als Protein-Immunblots bezeichnet.

Quantifizierung der Proteinmenge mittels ImageJ

Die Quantifizierung der erhaltenen Proteinbanden wurde mit Hilfe der ImageJ Software durchgeführt. Hierzu wurden Helligkeit und Kontrast der *grayscale* Bilder optimiert und die zu quantifizierenden Proteinbanden mit dem *select first lane* Befehl als Interessensbereich markiert. Mithilfe der Funktion *plot lanes* konnte das Grauwertprofil des Interessensbereiches erhalten und nach manuellem Einfügen von Basislinien das Flächensignal der Grauwerte ermittelt werden. Nach Quantifizierung der Proteinbanden der Ladekontrolle wurden die Signale der Zielproteine in einem Tabellenkalkulationsprogramm mit den Signalen der Ladekontrolle durch Bildung des Quotienten ins Verhältnis gesetzt und das so das rel. Grauwertsignal unabhängig von der Proteinmenge berechnet.

2.2.3.2 Enzymgekoppelter, kompetitiver Immunassay zur Bestimmung von intrazellulärem cGMP

Zur Detektion der intrazellulären cGMP Menge wurde ein kompetitiver Immunassay für cGMP verwendet. Bei diesem Test wird zusätzlich zur Probe ein markiertes Wettbewerber-Antigen aufgetragen, das mit der Zielspezies um einen Bindungsplatz der Antikörper konkurriert, die auf der Analyseplatte immobilisiert sind. Durch die enzymatische Markierung des Wettbewerber-Antigens korreliert der Substratumsatz umgekehrt mit der Analytkonzentration [354]. Nach

Herstellerprotokoll des Cyclic GMP XP[®] Assay Kits wurde dem Lysepuffer frisch 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid zugesetzt und 10⁵ Zellen nach Stimulation in serumfreiem Medium in 100 µl des Puffers aufgeschlossen. Zelluläre Trümmer wurden mittels Zentrifugation (5 min bei 10000 g, 4 °C) entfernt und die klaren Lysate bei -20 °C gelagert. Für die Durchführung der Messung wurden die Proben auf Eis aufgetaut und eine Standardverdünnungsreihe entsprechend Herstellerangaben in Lysepuffer mit 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid hergestellt. Je 40 µl der Lysate bzw. des cGMP Standards wurden gemeinsam mit 40 µl HRP-gekoppeltem cGMP auf die Analyseplatte aufgetragen und 3 h bei RT inkubiert. Nach Protokoll des Herstellers wurden die Vertiefungen der Analyseplatte anschließend viermal mit je 200 µl des mitgelieferten Puffers je Vertiefung gewaschen und abschließend das Substrat für die Enzymreaktion auf die Platte aufgebracht. Nach bis zu 20 min Inkubation bei RT wurde die Enzymreaktion durch Zugabe der im Kit enthaltenen Stop-Lösung unterbunden. Die OD der Proben und Standards wurde zeitnah bei 450 nm mit einem Plattenphotometer bestimmt und die Messwerte in Excel exportiert.

2.2.3.3 Bestimmung von S-Nitrosylierungsstellen mittels Protein-Immunblot

Zur Detektion von S-Nitrosylierungsstellen durch die Stimulation mit NO wurde das Pierce[™] S-Nitrosylation Western Blot Kit verwendet. Nach Stimulation der Zellen mit DETA/NO (siehe 2.2.5.7) wurden diese zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl des enthaltenen HENS-Puffers lysiert und eine Proteinmengenbestimmung mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit durchgeführt. Bei Einsatz von KG1a Zellen wurde je Probe 200 µg Protein verwendet, bei primären Zellen wurde aufgrund der limitierenden Zellzahl 50-100 µg Protein pro Probe benutzt, wobei für alle Proben eines Ansatzes die gleiche Proteinmenge eingesetzt wurde. Weitere Schritte wurden nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Zur Blockierung freier Cysteinreste wurden die Proben in gleichen Volumina aufgenommen, je 100 µl Probe mit 2 µl des im Kit enthaltenen 1 M MMTS (in Dimethylformamid) versetzt, gründlich durchmischt und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben in 6-fachem Probenvolumen eiskalten Acetons über Nacht gefällt. Nach Zentrifugation (10000 · g, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand dekantiert und die Proteinpellets nach Verdampfen des Acetons in je 100 µl HENS Puffer gelöst. Zur Reduktion und Markierung von S-Nitrosylierungsstellen mit einem Marker für die Massenspektrometrie (engl. *tandem mass tag*, TMT) wurden zu je 50 µl Probenvolumen 1 µl 20 mM iodoTMT Markierlösung (in Dimethylsulfoxid, DMSO) und 2 µl 1 M Natriumascorbat Lösung zugegeben, vermischt und 2 h bei RT inkubiert. Für Negativkontrollen wurde den Proben anstelle der Natriumascorbat Lösung ddH₂O zugesetzt. Anschließend

wurden die Proben erneut über Nacht in eiskaltem Aceton gefällt, die Proteine pelletiert und diese nach Verwerfen des Überstandes in 30-50 µl HENS Puffer gelöst.

25 µg der so markierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE nach Größe aufgetrennt und analog zu 2.2.3.1 mittels Western Blot auf Nitrozellulose übertagen. Die Membran wurde anschließend 1 h bei RT in 5% Magermilchpulver (engl. *non-fat dry milk*, NFDM) in TBST unter ständiger Bewegung blockiert. Nach Spülen der Membran mit TBST wurde diese mit einem murinen anti-TMT Antikörper (1:1000 in 5% NFDM in TBST) 1 h bei RT gefärbt. Anschließend wurde die Membran nach Herstellerangaben gewaschen und mit einem HRP-gekoppeltem anti-Maus Antikörper (1:20000 in 5% NFDM in TBST, 1 h bei RT) markiert. Nach erneutem gründlichem Waschen wurden die markierten Proteine mit HRP-Substrat inkubiert und die Chemilumineszenz mit Hilfe des Lumi-Imagers detektiert.

Nach Waschen der Membranstücke in TBST konnten von diesen, wie in 2.2.3.1 beschrieben, durch Inkubation mit Stripping Puffer für 30 min bei 50 °C gebundene Antikörper entfernt werden. Die Membran wurde in Folge erneut blockiert und zur Quantifizierung der geladenen Proteinmenge mit einem Antikörper gegen GAPDH (1:2000) oder Vinkulin (1:400) 1 h bei RT in 5% NFDM in TBST gefärbt. Nach gründlichem Waschen wurde die Membran mit einem HRP-gekoppelten anti-Maus Antikörper inkubiert (1 h bei RT, 1:20000 in 5% NFDM in TBST). Nach Abspülen ungebundener Antikörperkonjugate in TBST wurde die Chemilumineszenz der Proteinbanden der Ladekontrolle detektiert, das Grauwertsignal der S-Nitrosylierungsstellen sowie der Ladekontrolle mit ImageJ analog zu 2.2.3.1 quantifiziert und die Grauwertsignale auf die der Ladekontrolle normiert.

2.2.4 Herstellung und Analyse des NO freisetzenden Hydrogelsystems

2.2.4.1 Beschichtung von Oberflächen mit 3-Aminopropyltriethoxysilan

Zur kovalenten Anbindung von Heparin/sPEG Hydrogelen auf Deckgläsern bzw. Siliziumoberflächen wurden diese mit einem Silan beschichtet, welches ein Amin als Endgruppe trug und so während der Gelbildung kovalent in das Gel integriert werden konnte. Zunächst wurden die Oberflächen in Toluol, Ethylacetat, EtOH und ddH₂O je 30 s im Ultraschallbad gereinigt und anschließend in einem N₂ Strom getrocknet. Durch Behandlung mit einem O₂-Plasma für 20 min bei einem Druck von 0,5 mbar wurden die Oberflächen von organischen Rückständen befreit und aktiviert. Im Anschluss wurde eine 0,1% 3-Aminopropyltriethoxysilan Lösung in wasserfreiem Toluol mit je 1 Tropfen Triethylamin je 10 ml Lösung versetzt und die aktivierten

Oberflächen für 2 h bei RT in dieser Lösung inkubiert. Im Anschluss wurden die Gläschen gründlich mit reinem EtOH gespült und im N₂ Strom getrocknet. Um Restfeuchte zu entfernen wurden die Gläschen 2 h bei 80 °C getrocknet und direkt für die Immobilisierung von Heparin/sPEG Gelen verwendet.

2.2.4.2 Herstellung von Heparin basierten Hydrogelen

Zur Herstellung der Heparin/sPEG Hydrogele wurde je 100 µl Gelvolumen 4,44 mg Heparin und 8,89 mg sPEG-Amin in 45,3 µl und 33,3 µl ddH₂O in einem eisgekühlten Ultraschallbad gelöst. Anschließend wurde 1,36 mg 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid in 13,6 µl ddH₂O und 0,77 mg *N*-Hydroxysulfosuccinimid Natriumsalz in 7,7 µl ddH₂O gelöst und mit der Heparinlösung vermischt. Zur Aktivierung der freien Säuregruppen wurde die Lösung 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die sPEG Lösung zugegeben und die Komponenten für 15 min bei 900 rpm und 7 °C auf einem Kühlschüttler vermischt. Je 50 µl Tropfen der Gelmischung wurden anschließend auf Parafilm gegeben und je eine mit Aminopropyltriethoxysilan beschichtete Oberfläche auf den Tropfen gelegt. Die Gelierung erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei RT. Am Folgetag wurden die Gele fünfmal für 10 min mit PBS gewaschen und anschließend mehrere Stunden in PBS gequollen.

2.2.4.3 Postfunktionalisierung der Hydrogele mit dem NO freisetzenden Molekül

Zur Funktionalisierung der immobilisierten Gele wurden diese nach Schwellung in PBS in ddH₂O überführt und die Lösung dreimal nach je einer Stunde gewechselt, anschließend in je 5 ml mit HCl angesäuertem ddH₂O (pH ≈ 3) gelegt und einige Stunden äquilibriert. Alternativ wurden die Gele in 0,5 M Glukose in wässriger Lösung (abgeleitet von lat. *aqua*, aq.) oder 1 M LiCl aq. überführt. Zu jeder Probe wurde anschließend 2 mg 4-Nitro-3-(trifluoromethyl)anilin zugegeben und auf einem auf 18 °C temperierten Schwenktisch bei 500 rpm 15 min unter die Lösung gemischt. Danach wurde 12,4 µl einer 37% Formaldehyd Lösung zugefügt und nach weiteren 5 min 7,02 µl *tert*-Butyl isocyanid zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht durchgeführt und die Gele am Folgetag fünfmal mit DMSO und abschließend mit ddH₂O gewaschen.

2.2.4.4 Entwässerung und Trocknung der Proben

Zur Analyse mittels Sekundärionenmassenspektrometrie (engl. *Time-of-Flight secondary ion mass spectrometry*, ToF-SIMS) bzw. Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR-Spektroskopie) wurden die Gele zunächst in einer aufsteigenden EtOH Reihe entwässert (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 100%), wobei die Gele je 30 min in der Alkohollösung verblieben.

Anschließend wurden die Gele über Nacht bei -80 °C eingefroren und in der Folge gefriergetrocknet.

2.2.4.5 Analyse der Hydrogele über FTIR-Spektroskopie

Über FTIR-Spektroskopie kann die charakteristische Absorption einer Probe von Licht im Infrarot-Bereich (IR) gemessen werden. Eine Probe absorbiert dann Licht im IR, wenn hierdurch ein diskreter Schwingungs- oder Rotationszustand im Molekül angeregt wird, der das elektrische Dipolmoment des Gesamtmoleküls verändert [355]. Die Energie, bei der eine solche Anregung stattfindet, ist proportional zur Wellenzahl und u.a. von der Bindungsstärke der Atome sowie den Atommassen abhängig. In dieser Arbeit wurden nicht transparente Proben untersucht. Deshalb wurde im Modus der abgeschwächten Totalreflexion (engl. *attenuated total reflection*, ATR) gemessen. Hierbei wird IR-Strahlung durch einen Lichtwellenleiter mit hohem Brechungsindex, einen ATR Kristall, geleitet und trifft unter einem bestimmten Winkel auf die optisch dünnere Probe, sodass Totalreflexion auftritt [356, 357]. Hinter der Grenzfläche der beiden Medien bilden sich evaneszente Wellen, die sich in der Probe parallel zur Grenzfläche ausbreiten, anschließend wieder an der Grenzfläche austreten und den ATR Kristall durchdringen. Der Lichtstrahl wird bei der Totalreflexion in der Größenordnung von einer Wellenlänge seitlich verschoben (Goos-Hänchen-Effekt) [358]. Interagiert die evaneszente Welle mit den funktionellen Gruppen der Probe wird Strahlung absorbiert, sodass es zu einer Abschwächung der Totalreflexion kommt, welche messbar ist. Die Eindringtiefe der evaneszenten Welle und somit die Signalintensität ist dabei umgekehrt proportional zur Wellenzahl. Zur Messung wurde das Bruker Optics Tensor 27 Spektrometer mit einem Bruker Optics Platinum[®] ATR Zubehör (Diamant, 1 Refl. 45 °C) und einem deuterierten Triglycinsulfat (RTDTGS) Detektor eingesetzt. Die Spektren der getrockneten Proben wurden bei RT mit Luft als Hintergrund in einem Wellenzahlbereich von $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ mit 64 scans pro Probe aufgenommen. Die Spektren wurden anschließend mit Hilfe der OPUS Software basislinienkorrigiert und eine Korrektur der Restfeuchte durchgeführt.

2.2.4.6 Analyse der Hydrogele über ToF-SIMS

Die ToF-SIMS ist eine Methode der Oberflächenanalytik und erlaubt die Charakterisierung der chemischen Zusammensetzung einer Oberfläche [359]. Durch das Beschießen der Oberfläche mit einem Primärelektronenstrahl aus zum Beispiel Bi-Clustern oder C_{60} im Hochvakuum werden Teilchen aus den obersten Moleküllagen der zu untersuchenden Oberfläche geschlagen. Dabei kommt es zur Ionisierung eines Teils der Fragmente, welche als Sekundärionen in Richtung des Detektors beschleunigt werden. Durch einen vorgelagerten Flugzeitmassenanalysator

werden die Sekundärelektronen nach ihrem Masse- zu Ladungsverhältnis aufgetrennt und die benötigte Flugzeit für die gleiche Strecke für alle Teilchen detektiert. Die Signalintensität stellt dabei ein Maß für die Teilchenmenge dar, sodass die Zusammensetzung der Probenoberfläche nachgewiesen werden kann. Zusätzlich kann durch das Beschießen der Probenoberflächen mit einem zweiten Ionenstrahl hoher Energie (hier: Ar-Cluster) das Probenmaterial nach und nach abgetragen und so durch ToF-SIMS Messung der Proben im Erosionskrater ein Tiefenprofil erhalten werden [360]. Die Probenmessungen wurden von Alexander Welle (Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Funktionelle Grenzflächen) an einem TOF.SIMS5 durchgeführt.

2.2.4.7 Analyse der Hydrogele mittels UV/vis-Spektroskopie

Zum Nachweis des angebondenen, farbigen NO Spendermoleküls wurden Absorptionsspektren der Hydrogele mittels UV/vis Spektroskopie aufgezeichnet. Proben absorbieren dann Strahlung im sichtbaren (400-750 nm) oder ultravioletten (< 400 nm) Bereich des Spektrums, wenn hierdurch Valenzelektronen aus der Atomhülle in angeregte Zustände übergehen können [361]. Die Absorption des Lichtes führt zu einer Signalabschwächung im Vergleich mit einem Referenzkanal ohne Probe. UV/vis Spektren von Hydrogelstücken wurden im Wellenlängenbereich von 230 nm bis 800 nm in 200 µl PBS unter Verwendung von UV-Star® 96-Well Platten im Plattenphotometer gemessen. Hierbei wurde eine Schrittweite von 1 nm verwendet und die Spektren der funktionalisierten Gele mit denen der unfunktionalisierten Gele sowie PBS als Hintergrund verglichen.

2.2.4.8 Messung von NO in Lösung mit elektrochemischem NO Sensor

Zur Messung von freigesetztem NO in Lösung wurde der amiNO-700 Sensor über Nacht in ddH₂O äquilibriert und anschließend mit Hilfe eines Nitrit Standards und einer 0,01 M Schwefelsäurelösung mit 0,1% (w/v) NaI nach Herstellerprotokoll kalibriert. Anschließend wurde das flexible Ende der Elektrode in einer tiefen 12-Wellplatte in direkte Nähe der Geloberfläche gebracht und das Gel mit Hilfe eines Lichtleiterkabels und einer LED Lichtquelle mit Licht verschiedener Wellenlängen (365 nm, 400 nm, 460 nm, 530 nm und 640 nm) bestrahlt und der Stromfluss an der Elektrode sowie das Temperatursignal aufgezeichnet. Vor erneuter Belichtung wurde auf die Stabilisierung des Hintergrundsignals gewartet.

2.2.5 Zellbiologische Experimente

2.2.5.1 Überprüfung der Expression von NOS

Zur Überprüfung der Expression von NOS in hämatopoetischen Zellen wurde, wie in 2.2.2.1 beschrieben, RNA von CD34⁺ Zellen von fünf Spendern sowie von den Modellzelllinien KG1a und TF-1 isoliert. Des Weiteren wurde RNA von MSZ dreier Spender sowie der Zelllinien HaCat, Caco-2 sowie THP-1 gewonnen. Nach reverser Transkription (siehe 2.2.2.2) wurde die erhaltene cDNA unter Verwendung der spezifischen Primer für NOS1, NOS2 und NOS3 bei einer Annealingtemperatur von 60 °C (NOS1 und NOS3) sowie 62 °C (NOS2) mittels PCR vervielfältigt, wie in 2.2.2.3 dargelegt. Zur Detektion wurden die PCR-Produkte der jeweiligen Positivkontrolle, der hämatopoetischen Modellzelllinien sowie der primären Zellen auf ein Agarosegel aufgetragen und die Expression der NOS Isoformen qualitativ analysiert (siehe 2.2.2.4).

2.2.5.2 Evaluierung eines geeigneten Konzentrationsfensters für die Stimulation mit DETA/NO

Nach Isolation wurden je $2 \cdot 10^4$ HSPZ in 500 μ l zellspezifischem Medium in einer 48 Well Platte ausgesät und täglich mit bis zu 500 μ M DETA/NO stimuliert. An Tag 5 wurden die apoptotischen und nekrotischen Zellen mittels Annexin V und Sytox Färbung quantifiziert (siehe 2.2.1.4). Die vitale Zellpopulation (Annexin V⁻ und Sytox⁻) wurde in GraphPad Prism gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration von DETA/NO aufgetragen und der Kurvenverlauf durch eine Hill Funktion wie in Formel (2) angegeben interpoliert (log(Dosis) vs. Wirkung). Aus dieser konnte jeweils die mittlere effektive Konzentration (EC₅₀) und anschließend der Mittelwert der EC₅₀ sowie der Standardfehler des Mittelwertes aus n = 5 unabhängigen Experimenten bestimmt werden.

$$y = \frac{(A_1 - A_2)}{(1 + 10^{(\log(EC_{50}) - x)})} \quad (2)$$

2.2.5.3 Durchflusszytometrische Analyse der Proliferation und Differenzierung von HSPZ nach Stimulation mit DETA/NO

Zur Charakterisierung der Proliferation und Differenzierung von HSPZ in Gegenwart von DETA/NO wurden die Zellen nach Isolation mit CTV gefärbt, wie in 2.2.1.4 beschrieben, und in einer Dichte von je $4 \cdot 10^4$ HSPZ in 1 ml zellspezifischem Medium ausgesät. Zusätzlich wurde am Tag des Ansatzes $5 \cdot 10^4$ HSPZ mit dem Antikörperpanel gefärbt (siehe 2.2.1.4) und direkt analysiert. So wurde die initiale Fluoreszenzintensität der CTV Färbung sowie die Expression der untersuchten Antigene der Ursprungspopulation erhalten. Nach Stimulation der

HSPZ für 5 Tage mit DETA/NO wurden die Zellen erneut mit dem Antikörperpanel gefärbt und direkt durchflusszytometrisch analysiert.

Einteilung der Zellpopulation in Einzelgenerationen und Berechnung des Zellteilungsindex

Die ermittelten Rohdaten wurden in FlowJo analysiert. Hierzu wurde das gemessene CTV Fluoreszenzintensitätssignal der Einzelzellereignisse mit Hilfe des *proliferation tools* in FlowJo genähert. Die unterlagerten Signale der Einzelgenerationen jedes Spenders wurde ermittelt, indem das CTV Signal von Tag 0 als *peak 0* fixiert und die Anzahl der Einzelsignale sowie der Variationskoeffizient dieser konstant gehaltenen wurde. Die Zellereignisse in jeder Generation wurden anschließend in ein Tabellenkalkulationsprogramm übertragen und der Zellanteil in den jeweiligen Einzelgenerationen erhalten. Des Weiteren wurde als Maß für die Zellproliferation der Zellteilungsindex berechnet, der die durchschnittliche Anzahl der Zellteilungen angibt, den die Ursprungspopulation durchlaufen hat. Hierzu wurde zunächst über Formel (3) die Anzahl der Zellteilungen sowie mit Formel (4) die Anfangszellzahl berechnet, mit $\#G_i$ = Anzahl an Zellen in Generation i und j = Anzahl an Generationen. Anschließend wurde durch Division der Anzahl an Zellteilungen durch die Ursprungszellzahl der Zellteilungsindex erhalten.

$$\text{Anzahl an Zellteilungen} = \sum_{i=1}^j \left(\frac{\#G_i}{2^i} \right) \times i \quad (3)$$

$$\text{Ursprungszellzahl} = \sum_{i=0}^j \frac{\#G_i}{2^i} \quad (4)$$

Aufgrund der unterschiedlichen Proliferationsraten der Spender wurden die Daten zusätzlich auf die Lösemittelkontrolle normiert und so der rel. Zellteilungsindex berechnet. Mittels univariater Varianzanalyse (engl. *analysis of variance*, ANOVA) wurden die Mittelwerte der Zellanteile je Generation bzw. der Zellteilungsindex der mit DETA/NO stimulierten Bedingungen aus $n = 4$ unabhängigen Experimenten mit den entsprechenden Zellanteilen bzw. dem Zellteilungsindex in der Lösemittelkontrolle verglichen, wie in 2.2.6 beschrieben.

Einteilung der Zellen nach CD34 Expression

Da am Analysetag stets ca. 90% der vitalen Zellen den Marker CD34 exprimierten, wurden anhand der Fluoreszenzintensität dieses Markers Untergruppen für das Maß an CD34 Expression definiert. Hierzu wurden markierte Zellen mit einer Fluoreszenzintensität von mindestens $4 \cdot 10^4$ willkürlichen Einheiten (engl. *arbitrary units*, a.u.) als Zellpopulation mit hohem CD34 Expressionslevel (CD34^{hoch}) definiert. Markierte Zellen, die eine Fluoreszenzintensität von $4 \cdot 10^3$ a.u. bis $4 \cdot 10^4$ a.u. aufwiesen, wurden als Zellen mit mittlerem CD34 Expressionslevel

definiert. Zellen, deren Signal unter diesem lag, sich jedoch von der FMO Kontrolle unterschied, wurden als CD34⁺ Zellen mit geringem Expressionslevel (CD34^{gering}) definiert. Die Zellanteile in diesen Untergruppen wurden für jede Stimulationsbedingung und jeden Spender ermittelt und die Mittelwerte der einzelnen Bedingungen mittels ANOVA mit dem Mittelwert der Lösemittelkontrolle verglichen sowie zusätzlich auf Linearität mit steigender DETA/NO Konzentration überprüft. Zusätzlich wurde für jeden Spender der mittlere Fluoreszenzindex (MFI) der gesamten Zellpopulation für jede Stimulationsbedingung ermittelt. Außerdem wurde der MFI in jeder Zellgeneration ermittelt, um den Verlauf der CD34 Expression verfolgen zu können. Des Weiteren wurde der MFI von jeder Stimulationsbedingung auf die jeweilige Lösemittelkontrolle des Spenders normiert, um spenderabhängige Unterschiede der basalen CD34 Expressionslevel auszuschließen. Die MFI Werte wurden mittels ANOVA mit dem MFI der Lösemittelkontrolle verglichen (siehe 2.2.6).

Strategie zur Einteilung von Progenitorzellanteilen anhand der Färbung mit dem Antikörperpanel

Zur Analyse der Expression charakteristischer Antigene durch HSPZ wurden die Einzelzellereignisse zunächst als Dotplot der Kanäle PE-Cy7 gegen 7-AAD aufgetragen und mit Hilfe der Kontrollen für jede Bedingung die vitale CD34⁺ (CD34V) Fraktion erhalten, welche 7-AAD⁻ war. 7-AAD kann aufgrund seiner Größe nur in Zellen mit gestörter Integrität der Phospholipidmembran eindringen und markiert daher lediglich apoptotische und tote Zellen [349]. Aus dieser wurden durch Gegenüberstellung der Fluoreszenzkanäle APC-H7 und FITC mit Hilfe der jeweiligen FMO Kontrollen der HSZ/MPP Anteil als CD34⁺ 7-AAD⁻ CD38⁻ CD45RA⁻ erhalten. Durch zusätzliche Darstellung der CD34V Fraktion in den Fluoreszenzkanälen für APC-H7 gegen APC wurde zwischen CD34⁺ 7-AAD⁻ CD10⁺ CLPs und myeloiden Progenitoren (CD34⁺ 7-AAD⁻ CD38⁺ CD10⁻) unterschieden. Letztere Population wurde durch die Darstellung der Fluoreszenzkanäle PE gegen FITC in einzelne myeloide Zelltypen untergliedert. So waren GMPs CD34⁺ 7-AAD⁻ CD38⁺ CD10⁻ CD135⁺ CD45RA⁺, MEPs CD34⁺ 7-AAD⁻ CD38⁺ CD10⁻ CD135⁻ CD45RA⁻ und CMPs CD34⁺ 7-AAD⁻ CD38⁺ CD10⁻ CD135⁺ CD45RA⁻. Diese Einteilung wurde anschließend auf alle mittels FlowJo zugewiesenen Einzelgenerationen angewendet, sodass die jeweiligen Progenitoranteile in jeder Einzelgeneration aufgeschlüsselt wurden. Diese Anteile sowie die gesamten Progenitorzellanteile wurden für jede Bedingung aus FlowJo in ein Tabellenkalkulationsprogramm exportiert und die Mittelwerte der Zellanteile aus n = 4 unabhängigen Versuchen mittels GraphPad Prism analysiert. Zusätzlich wurden die jeweiligen Zellanteile auf die Lösemittelkontrolle des Spenders normiert, um spenderabhängige Effekte auszuschließen. Mittels ANOVA wurden die Mittelwerte jeder Stimulationsbedingung

mit der Lösemittelkontrolle verglichen und die Mittelwerte zusätzlich auf Linearität mit steigender DETA/NO Konzentration überprüft (siehe 2.2.6).

2.2.5.4 Einfluss der Stimulation mit DETA/NO auf myeloide Vorläuferzellen mittels CFU Assay

Zur Untersuchung des Einflusses von NO auf myeloide Vorläuferzellen wurden HSPZ nach der Isolation in einer Dichte von je $4 \cdot 10^4$ HSPZ in 1 ml zellspezifischem Medium in eine 24 Well Platte ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen von DETA/NO stimuliert. Parallel wurde an Tag 0 von unstimulierten Zellen ein CFU-Assay angesetzt. Nach täglichem Zusatz von DETA/NO wurde nach 5 Tagen die Zellzahl in allen Bedingungen ermittelt und anschließend je ein CFU-Assay angesetzt.

Es wurden lediglich Spender zur Auswertung herangezogen, welche mindestens 10 Kolonien gebildet hatten. Nach Auszählung der Kolonien wurde der Mittelwert aus den Koloniezahlen der technischen Triplikate gebildet. Um spenderabhängige Effekte auszuschließen, wurden diese zusätzlich auf die jeweiligen Koloniezahlen der Lösemittelkontrolle normiert. Die mittleren Koloniezahlen je 500 eingesetzter Zellen aus $n = 4$ unabhängigen Experimenten der stimulierten Bedingungen wurden mittels ANOVA jeweils mit den mittleren Koloniezahlen in der Lösemittelkontrolle verglichen (siehe 2.2.6).

2.2.5.5 Untersuchung des kanonischen NO Signalweges in hämatopoetischen Zellen über intrazelluläre cGMP Level

Zur Untersuchung des kanonischen NO Signalweges in hämatopoetischen Zellen wurde ein enzymgekoppelter, kompetitiver Immunassay verwendet, um den Anstieg der intrazellulären cGMP Konzentration nach NO-abhängiger Aktivierung der sGC zu überprüfen. Hierfür wurde KG1a als Modellzelllinie zur Etablierung verwendet. Je Bedingung wurden 10^5 Zellen zweimal mit warmem PBS gewaschen und pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml serumfreiem, zellspezifischen Medium aufgenommen und, wie in 2.2.1.3 beschrieben, mit bis zu $100 \mu\text{M}$ DETA/NO stimuliert. Nach 30 min Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen zentrifugiert und nach Herstellerprotokoll lysiert. Hierzu wurden die Zellen pelletiert, in 1 ml kaltem PBS gewaschen und das Zellpellet nach erneuter Zentrifugation in $100 \mu\text{l}$ des im Kit enthaltenen Lysepuffers aufgeschlossen. Zusätzlich wurden KG1a Zellen für 30 min mit 0, 1, 5 oder 25 Äquivalenten (bezogen auf die maximal freisetzbare NO Menge) des NO Fängermoleküls 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid (cPTIO) bzw. mit $1 \mu\text{M}$ des sGC Inhibitors 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-on (ODQ) bei

37 °C vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit DETA/NO stimuliert und ebenso lysiert. Der Assay wurde analog mit HSPZ wiederholt, die 24 h in einer Dichte von 10^5 Zellen \cdot ml⁻¹ vorkultiviert wurden, jedoch wurde hier mit maximal 25 μ M DETA/NO stimuliert, um zu den übrigen Zellversuchen mit HSPZ vergleichbare DETA/NO Konzentrationen zu gewährleisten. Zum Abfangen von freigesetztem NO wurden den HSPZ 25 Moläquivalente des Moleküls cPTIO (bezogen auf die maximal freisetzbare NO Menge) zugesetzt. Jedes Experiment wurde in n = 3 unabhängigen Experimenten durchgeführt.

Zur Analyse wurden die gemessenen OD Werte, welche dem Substratumsatz des gekoppelten Wettbewerber-Antigens entsprachen, eingesetzt. Hierzu wurden die Absorptionswerte der technischen Duplikate gemittelt und auf die jeweilige Lösemittelkontrolle normiert, um die Vergleichbarkeit aus mehreren Messungen zu gewährleisten. Mittels ANOVA wurden die Daten aus n = 3 unabhängigen Experimenten bezüglich der Unterschiede der mittleren Absorbanzwerte der Proben zur mittleren Absorbanz der Kontrollgruppe analysiert sowie auf Linearität der Werte mit steigender Konzentration der zur Stimulation eingesetzten Spezies getestet (siehe 2.2.6).

2.2.5.6 Untersuchung des kanonischen NO Signalweges in hämatopoetischen Zellen über die Phosphorylierung von VASP

In Vorversuchen mit KG1a und DEA/NO wurden optimale Konzentrationen für den Einsatz kleiner Moleküle ermittelt, die als Fänger-moleküle, Inhibitoren oder Analoga für Komponenten des Signalweges fungierten. Hierzu wurden Zellen 30 min mit 0-250 μ M cPTIO, 0-500 μ M ODQ oder 0-50 μ M des PKG Inhibitors DT-3 vorinkubiert, mit 10 μ M DEA/NO stimuliert und nach 15 min Inkubation im Brutschrank lysiert. Nach Inhibition der sGC durch ODQ wurden KG1a Zellen zusätzlich mit 0-500 μ M des membrangängigen cGMP Analogs 8-(4-Chlorphenylthio)-cGMP (8-pCPT-cGMP) inkubiert und die Zellen nach 30 min lysiert. Die Lysate wurden anschließend nach Größe aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine Membran übertragen. Zur Überprüfung der Aktivierung des Signalweges wurde eine Antikörperfärbung gegen die Phosphorylierung von VASP an Ser 239 bzw. Ser 157 sowie gegen Vinkulin oder GAPDH als Ladekontrolle durchgeführt. Nach Entfernen der gebundenen Antikörper wurde die Membran mit einem gegen VASP gerichteten Antikörper gefärbt.

Die so erhaltenen optimalen Konzentrationen wurden anschließend für Versuche mit HSPZ verwendet, welche 24 h in einer Dichte von 10^5 Zellen \cdot ml⁻¹ in Medium vorkultiviert wurden. Hierbei wurden je Bedingung 10^5 Zellen in 1 ml Medium resuspendiert und stimuliert. Für eine Konzentrationsreihe wurden die Zellen mit 0-20 μ M DETA/NO stimuliert und nach 30 min

Inkubation im Brutschrank in 30 μ l Lysepuffer aufgeschlossen. Zusätzlich wurden HSPZ für 30 min mit 1,25 mM cPTIO oder PBS (Lösemittelkontrolle) vorinkubiert und anschließend mit 10 μ M DETA/NO oder 1 mM NaOH (Lösemittelkontrolle) stimuliert und nach 30 min lysiert. Des Weiteren wurden die Zellen mit 1 μ M ODQ oder 50 μ M DT-3 30 min vorinkubiert und anschließend mit 500 μ M 8-pCPT-cGMP oder 10 μ M DETA/NO stimuliert. Zusätzlich wurden Kontrollen mitgeführt, bei denen Zellen lediglich mit den Lösemitteln oder nur mit DETA/NO, ODQ, 8-pCPT-cGMP oder DT-3 stimuliert. Die Lysate wurden analog zu den Vorversuchen nach mittels SDS-PAGE nach Größe aufgetrennt, mittels Western Blot auf PVDF immobilisiert und anschließend durch entsprechende Antikörperfärbungen auf die Phosphorylierung von VASP an Ser 239 bzw. Ser 157 überprüft. Zur Überprüfung der gleichmäßigen Proteinbeladung wurden die Membranstücke parallel mit Antikörpern gegen Vinkulin oder GAPDH gefärbt. Nach Entfernung der gebundenen Antikörper (Protokoll siehe 2.2.3.1) wurden die Membranstücke anschließend erneut gefärbt, um die Proteinmenge an VASP quantifizieren zu können. Alle Versuche mit HSPZ wurden in $n = 3$ unabhängigen Versuchen durchgeführt und die Mittelwerte des quantifizierten Grauwertsignals mittels ANOVA auf signifikante Unterschiede überprüft (für statistische Auswertung siehe 2.2.6).

2.2.5.7 Untersuchung der NO-abhängigen S-Nitrosylierung von Proteinen

Zur Quantifizierung der S-Nitrosylierung von Proteinen durch Stimulation mit NO wurden aufgrund der limitierten Zellzahl zunächst für jede Bedingung $2 \cdot 10^6$ KG1a Zellen in 2 ml Medium resuspendiert, mit bis zu 100 μ M DETA/NO stimuliert und nach 3 h Inkubation im Brutschrank lysiert. Zusätzlich wurden als Kontrollbedingungen Zellen nach Herstellerempfehlung mit 200 mM GSNO bzw. 200 mM GSH inkubiert und nach 30 min lysiert. Für Versuche mit Primärzellen wurden je $4 \cdot 10^4$ HSPZ nach Isolation 1 ml Medium in einer 24 Well Platte kultiviert und täglich mit bis zu 20 μ M DETA/NO stimuliert. Nach 5 Tagen wurden die Zellen nach Herstellerprotokoll lysiert.

Die auf die Ladekontrolle normierten Grauwertsignale der Proteinbanden der Protein-Immuno-blots wurden jeweils auf die Signale der Lösemittelkontrolle bezogen und die rel. S-Nitrosylierung der Proben verschiedener Spender so vergleichbar gemacht. Abschließend wurden signifikante Unterschiede zwischen den rel. S-Nitrosylierungs-Signalen und dem Signal der Kontrolle mittels ANOVA analysiert, wie in 2.2.6 beschrieben.

2.2.5.8 Überprüfung der Zytokompatibilität der funktionalisierten Hydrogel Plattform

Um zu überprüfen, ob die nachträgliche Funktionalisierung des Heparin/sPEG Hydrogels die Zytokompatibilität des Gelsystems beeinträchtigte, wurden HSPZ auf dieser kultiviert und anschließend mittels Lebend/Tot Färbung und Annexin V und Sytox Färbung analysiert. Alle Schritte wurden hierbei im Dunkeln durchgeführt, um eine Freisetzung von NO und damit verbundene Einflüsse auf die Zellen zu vermeiden. Nachträglich funktionalisierte und nicht funktionalisierte, auf Deckgläsern immobilisierte Hydrogele wurden hierzu 30 min mit 80% EtOH sterilisiert. Anschließend wurden die Gele 5 mal 5 min mit PBS gewaschen und anschließend 10 min in zellspezifischem Medium inkubiert. Pro Testoberfläche wurden $2 \cdot 10^4$ HSPZ nach 48 h Vorkultivierung in Duplikaten in 1 ml zellspezifischem Medium ausgesät. Als Referenzoberflächen wurde Zellkulturplastik (engl. *tissue-culture polystyrene*, TCPS) sowie TCPS mit 1% Triton X-100 eingesetzt. Nach Inkubation der Zellen für 72 h im Brutschrank wurden die Zellen für eine Lebend/Tot Färbung (siehe 2.2.1.6) bzw. Annexin V und Sytox Färbung (siehe 2.2.1.4) eingesetzt und direkt analysiert. Für jede Testoberfläche wurde der Mittelwert vitaler und toter Zellen sowie die Standardabweichung des Mittelwertes berechnet.

2.2.6 Graphische Darstellung und Statistik

Schematische Abbildungen wurden mit MS PowerPoint angefertigt. Erhobene Daten wurden mit Hilfe der Software MS Excel, GraphPad Prism und Origin analysiert und graphisch dargestellt. Statistische Analysen erhobener Daten wurden in GraphPad Prism durchgeführt. Hierzu wurde eine ANOVA unter der Berücksichtigung gepaarter Daten verwendet. Bei Gegenüberstellung von mehr als zwei experimentellen Bedingungen wurde jede untersuchte Gruppe mittels Dunnett Test mit einer Kontrollgruppe verglichen. Statistisch signifikante Unterschiede zweier ausgewählter Bedingungen mittels einfacher ANOVA wurden mit Hilfe des Sidak Tests ermittelt. Zur Ermittlung von statistisch signifikanten Unterschieden zwischen den Versuchsgruppen wurden Konfidenzintervalle von 95% abgeschätzt. Statistisch signifikante Unterschiede der Mittelwerte von Versuchsgruppen und einer Kontrollgruppe sind in vorliegender Arbeit durch Linien gekennzeichnet. Zusätzlich wurden die Mittelwerte der untersuchten Bedingungen im Rahmen einer einfachen, gepaarten ANOVA auf Linearität in Abhängigkeit der Konzentration der zugesetzten Stimulanz überprüft und gegebenenfalls durch geschweifte Klammern gekennzeichnet. Hierbei wurden P-Werte $\leq 0,05$ als statistisch signifikant angenommen und entsprechend Tabelle 17 markiert.

Tabelle 17 Symbole und entsprechende statistische Signifikanzniveaus

<i>Symbol</i>	<i>Bedeutung</i>
*	$P \leq 0,05$
**	$P \leq 0,01$
***	$P \leq 0,001$
****	$P \leq 0,0001$

3 Ergebnisse

3.1 HSPZ und MSZ exprimieren *in vitro* keine NOS Isoformen

Um zu überprüfen, ob verschiedene Zelltypen, die in der HSZ Nische vorkommen, zur autologen NO Produktion fähig waren, wurde eine Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) mit RNA aus HSPZ von fünf Spendern sowie aus MSZ dreier Spender unter Verwendung spezifischer Primer für die drei NOS Isoformen durchgeführt. Zusätzlich wurden die Zelllinien KG1a und TF-1 untersucht, um eine HSPZ Modellzelllinie zu identifizieren, welche den Primärzellen in ihrem NOS Expressionsprofil glich. Nach Auftrennung der DNA Fragmente über Agarose-Gelelektrophorese ließen sich die erwarteten RT-PCR Produkte anhand der verwendeten Positivkontrollen identifizieren. Wie in Abbildung 8 A) gezeigt, konnte ein DNA Fragment mit 175 Basenpaaren (bp) im RT-PCR Produkt von HaCat Zellen nachgewiesen werden, welches der erwarteten Produktgröße von NOS1 entsprach. Weiterhin enthielten die RT-PCR Produkte von Caco-2 Zellen bzw. THP-1 Zellen DNA-Fragmente der Größe 462 bp bzw. 128 bp und konnten NOS2 bzw. NOS3 zugeordnet werden, wie in Abbildung 8 B) bzw. C) erkennbar. HSPZ wiesen unabhängig vom Spender keine DNA Fragmente für eine der NOS Isoformen auf. Folglich waren humane HSPZ nach Isolation aus Nabelschnurblut nicht zur autologen NO Produktion fähig. Während TF-1 Zellen NOS3 exprimierten, wiesen die RT-PCR Produkte von KG1a Zellen keine vervielfältigten DNA Fragmente einer NOS Isoform auf und besaßen somit das gleiche Expressionsprofil wie HSPZ. Daher wurden für weitere Experimente, die aufgrund limitierter Zellzahl nicht mit HSPZ durchgeführt werden konnten, KG1a Zellen als Modellsystem verwendet. Aufgrund der fehlenden Expression der NOS Isoformen konnte auf eine Inhibition intrinsischer NO Produktion von hämatopoetischen Zellen, welche die Ergebnisse bei der Untersuchung des Einflusses von extern zugesetztem NO auf die Zellen verfälscht hätte, verzichtet werden. Bei MSZ, welche aus Knochenmark isoliert worden waren, konnte ebenfalls keine Expression einer NOS Isoform nachgewiesen werden, sodass dieser Zelltyp *in vitro* ohne weitere Stimulation keine Quelle für NO darstellte.

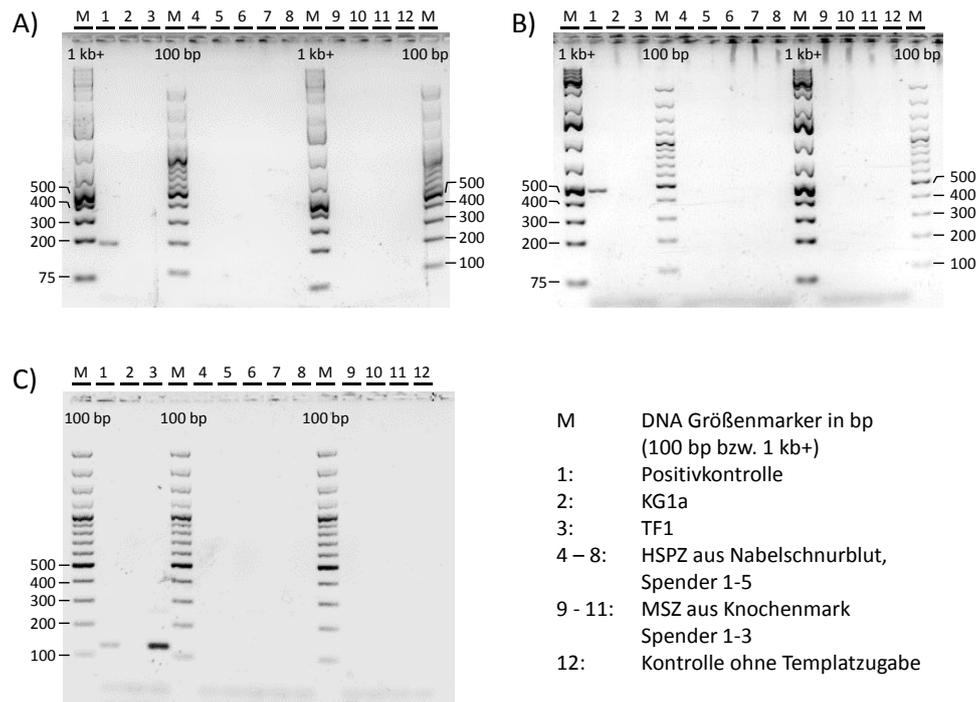


Abbildung 8 Überprüfung der Expression der drei NOS Isoformen A) NOS1, B) NOS2 und C) NOS3 in hämatopoetischen Zellen und MSZ mittels RT-PCR und Agarose-Gelelektrophorese. In Tasche 1 wurden jeweils die amplifizierten DNA Fragmente der Zelllinien HaCat, Caco-2 und THP-1 als Positivkontrollen für die Expression der Isoformen NOS1, NOS2 und NOS3 geladen. In Tasche 2 bzw. 3 befanden sich jeweils die RT-PCR Produkte der hämatopoetischen Modellzelllinien KG1a bzw. TF-1 sowie in Tasche 4-8 die PCR Produkte von HSPZ fünfer Spender. Tasche 9-11 enthielt jeweils vervielfältigte DNA Fragmente von MSZ dreier Spender aus Knochenmark, während in Tasche 12 jeweils die Kontrolle ohne Templateinsatz geladen war.

3.2 Auswirkungen der Stimulation mit NO-freisetzenden Molekülen auf HSPZ *in vitro*

Zur Freisetzung von NO in das Zellkulturmedium wurden NONOate eingesetzt, welche in basischer Umgebung stabil sind, bei Zusatz zu neutralen oder sauren Lösungen jedoch spontan unter NO Abgabe zerfallen [212]. Mit einer Halbwertszeit von 20 h in PBS bei 37 °C stellt das NO Spendermolekül DETA/NO die stabilste Verbindung dieser Gruppe dar und erlaubt so die Freisetzung geringer Konzentrationen an NO über einen großen Zeitraum. Die in den Versuchen verwendeten Konzentrationen von bis zu 100 µM DETA/NO korrelieren dabei mit pM bis nM Konzentrationen an freiem NO [292, 362].

3.2.1 Abschätzung eines geeigneten Konzentrationsfensters für die Stimulation von HSPZ mit DETA/NO

Während NO unter physiologischen Konzentrationen als wichtiges Signalmolekül fungiert, sind hohe Konzentrationen an NO mit zelltoxischen Effekten verbunden [141, 161]. Um das zellverträgliche Konzentrationsfenster von DETA/NO zu überprüfen, wurden HSPZ fünf Tage mit einer Konzentrationsreihe von DETA/NO zwischen 0 μM und 500 μM DETA/NO kultiviert und anschließend die Vitalität der Zellen mittels Annexin V/Sytox Färbung ermittelt. Wie in Abbildung 9 A) dargestellt, konnte der doppelnegative Zellanteil in Abhängigkeit des dekadischen Logarithmus der eingesetzten DETA/NO Konzentration durch eine Dosis-Wirkungs-Funktion mit sigmoidalem Kurvenverlauf angenähert werden. Die EC_{50} , bei der der vitale Zellanteil auf 50% des Anfangswertes gesunken war, lag im Mittel aus $n = 5$ unabhängigen Experimenten bei $31,5 \pm 2,1 \mu\text{M}$ DETA/NO. Der Anteil vitaler Zellen betrug bei Konzentrationen von DETA/NO unter 5 μM ca. 85% und verringerte sich, wie in Abbildung 9 B) ersichtlich, ab einer Konzentration von 25 μM signifikant auf 34,7% der Zellen. Die Gegenwart von 50 μM bzw. 100 μM DETA/NO reduzierte den vitalen Zellanteil auf 10,7% bzw. 8,8%. Für weitere Zellexperimente mit HSPZ wurden daher bis zu 20 μM DETA/NO eingesetzt, da die Zellen unter diesen Bedingungen morphologisch vital schienen und der Anteil der Annexin V⁻ Sytox⁻ Zellen nicht signifikant verringert war.

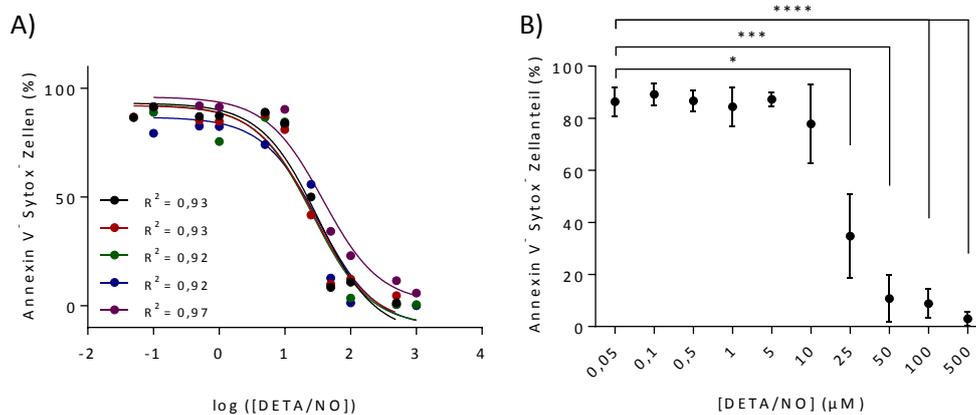


Abbildung 9 Anteil vitaler HSPZ (Annexin V⁻ Sytox⁻) nach fünftägiger Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen der NO-freisetzenden Verbindung DETA/NO. A) Auftragung des vitalen Zellanteils in Abhängigkeit des dekadischen Logarithmus der eingesetzten DETA/NO Konzentration. Die Messpunkte der einzelnen Spender wurden mit einer Dosis-Wirkungs-Funktion genähert. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) der Näherung ist für jeden Spender unten links vermerkt. B) Darstellung des mittleren, vitalen Zellanteils aus $n = 5$ unabhängigen Experimenten in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration von DETA/NO mit der Standardabweichung des Mittelwertes als Fehlerbalken. Statistische Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Stimulationsbedingungen und dem Mittelwert der geringsten DETA/NO Konzentration (0,05 μM) nach gepaarter ANOVA ist durch verbindende Linien gekennzeichnet. * = $p < 0,05$; *** = $0,0001 < p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

3.2.2 Stimulation mit DETA/NO beeinflusst das Proliferationsverhalten von HSPZ *in vitro*

Um den Einfluss von NO auf die Proliferation von HSPZ zu untersuchen, wurden die Zellen nach Isolation mit CTV gefärbt und anschließend fünf Tage in Anwesenheit von bis zu 20 μM DETA/NO kultiviert. In der Histogrammdarstellung in Abbildung 10 A) ist in grau die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen an Tag 0 gezeigt. Da mit jeder Zellteilung eine Farbstoffverdünnung von CTV einhergeht, konnte über die CTV Fluoreszenzintensität der HSPZ nach fünftägiger Kultur auf das Proliferationsverhalten der Zellpopulation rückgeschlossen werden. Anhand der Lösemittelkontrolle (0 μM) wurde deutlich, dass die Proliferationsrate von HSPZ spenderabhängig war. Spender B und D proliferierten im untersuchten Zeitraum stärker als Spender A und C. Dies war durch eine größere Anzahl von Zellen mit geringer CTV Fluoreszenzintensität gekennzeichnet. Ebenfalls war bei einzelnen Spendern eine Verschiebung zu geringer CTV Intensität verglichen mit der Lösemittelkontrolle zu beobachten, wenn HSPZ mit 5 μM DETA/NO kultiviert wurden. Dieser Effekt deutete auf eine höhere Anzahl an Zellteilungen in der HSPZ Population in Gegenwart des NO Spendermoleküls hin, jedoch war dieser Zusammenhang bei Betrachtung aller Spender nicht signifikant. Spenderunabhängig verschob sich das gemessene CTV Signal ab einer Konzentration von 10 μM DETA/NO zu höheren Fluoreszenzintensitäten und wies auf eine geringere Zellteilungsaktivität der HSPZ *in vitro* hin. Bei Betrachtung der Signale der einzelnen Zellgenerationen schienen sich zwei Untergruppen mit verschiedenem Proliferationsverhalten gebildet zu haben. Dabei schien eine Population entsprechend der Lösemittelkontrolle proliferiert zu haben, während eine zweite weniger Zellteilungen durchlaufen hatte und so ein höheres CTV Signal aufwies.

Die Annäherung der Kurvenverläufe in FlowJo ermöglichte die Bestimmung der Zellanteile in den einzelnen Generationen für jeden Spender. In Abbildung 10 B) sind die so errechneten mittleren Zellanteile aus $n = 4$ Versuchen in Abhängigkeit der zugesetzten Konzentration an DETA/NO gezeigt. Ohne Stimulation mit der NO-freisetzenden Verbindung lagen nach 5 Tagen im Mittel 1,1% bzw. 10,1% der HSPZ in Generation 1 bzw. Generation 2 vor. Die Mehrzahl der Zellen mit einem Anteil von je ca. 25% hatten 3-5 Zellteilungen durchlaufen. 13,7% der HSPZ hatten stark proliferiert und befanden sich in Generation 6. Durch Stimulation mit bis zu 1 μM DETA/NO veränderten sich die Zellanteile in den Einzelgenerationen im Mittel nicht. In Gegenwart von 5 μM des NO-freisetzenden Moleküls stieg der Zellanteil in Generation 6 auf 18,2%, während die Zellanteile in frühen Generationen nahezu konstant blieben. Allerdings war der Unterschied aufgrund der Variabilität der Spender im Mittel nicht signifikant.

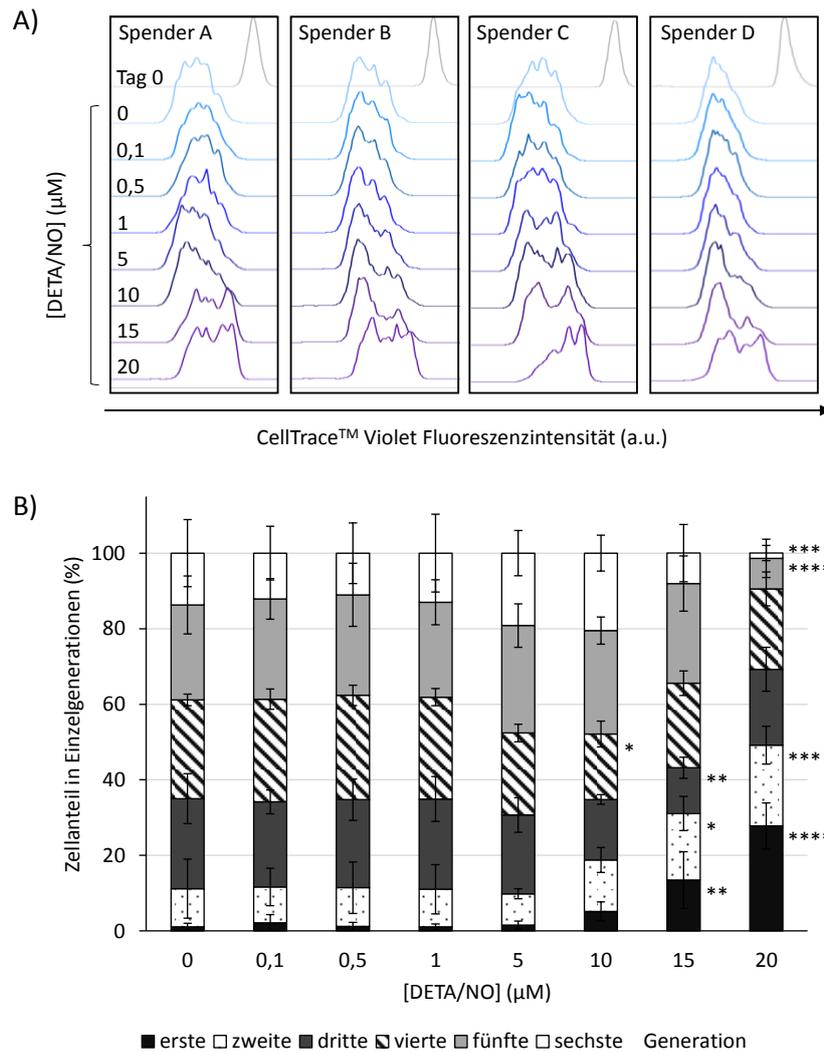


Abbildung 10 Einfluss verschiedener Konzentrationen an DETA/NO auf das Zellteilungsverhalten von HSPZ ermittelt durch Farbstoffverdünnung von CTV. A) Histogrammdarstellung der CTV Fluoreszenzintensität verschiedener Spender an Tag 0 (grau) sowie nach fünftägiger Stimulation mit bis zu 20 µM DETA/NO. B) Mittlere Zellanteile in verschiedenen Generationen in Abhängigkeit von der zugesetzten Konzentration an DETA/NO, wie durch Annäherung der CTV Fluoreszenzintensitätssignale erhalten. Balkendiagrammdarstellung der Mittelwerte aus $n = 4$ unabhängigen Versuchen mit der Standardabweichung der mittleren Zellanteile als Fehlerbalken. Statistisch signifikante Unterschiede der Zellanteile im Vergleich mit der jeweiligen Lösemittelkontrolle nach gepaarter ANOVA sind durch rechtsstehende Symbole verdeutlicht. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$; *** = $0,0001 < p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

Wenn HSPZ nicht mit CTV gefärbt wurden, zeigte sich ebenso ein verstärkender Einfluss von NO auf die Zellproliferation von $CD34^+$ Zellen bei Kultivierung mit niedrigen Konzentrationen an DETA/NO. Wie in Abbildung 11 gezeigt, betrug die Zellzahl an ungefärbten Zellen nach fünftägiger Stimulation mit 0,5 µM bzw. 1 µM DETA/NO durchschnittlich das 1,8-fache der Lösemittelkontrolle.

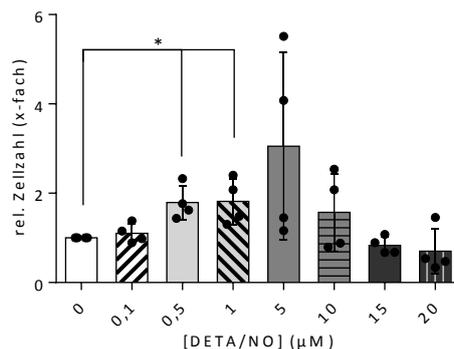


Abbildung 11 Einfluss der zugesetzten Konzentration an DETA/NO auf die rel. Zellzahl ungefärbter HSPZ bezogen auf die Lösemittelkontrolle nach fünftägiger Kultur mit bis zu 20 µM der NO-freisetzenden Verbindung. Balkendiagrammdarstellung der Mittelwerte aus $n = 4$ unabhängigen Versuchen mit der Standardabweichung des Mittelwertes als Fehlerbalken. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Lösemittelkontrolle wurden durch gepaarte ANOVA ermittelt und sind durch Linien angedeutet. * = $p < 0,05$.

Ab Zusatz von 10 µM DETA/NO veränderte sich das Proliferationsverhalten der CTV gefärbten HSPZ signifikant im Vergleich zur Lösemittelkontrolle. Während der HSPZ Anteil in den Generationen 1 und 2 anstieg, reduzierte sich der Zellanteil in Generation 4 signifikant auf 16,7%. Gleichermäßen schienen weniger HSPZ in Generation 3 vorzuliegen. Diese Abnahme war jedoch nicht signifikant. Ebenso führte die Stimulation mit 15 µM DETA/NO zusätzlich zur Zunahme der Zellanteile in Generation 1 und 2 zu einer Verringerung der Zellanteile in Generation 3. Die Zugabe von 20 µM DETA/NO führte im Vergleich mit der Kontrolle zu einem Anstieg der Zellanteile in Generation 1 und 2 auf Kosten der Zellanteile in Generation 5 und 6. Die Zellanteile in Generation 1 stiegen durch Zusatz von 15 µM bzw. 20 µM auf 13,3% bzw. 25,4% und in Generation 2 auf 19,3% bzw. 23,2%. Während der Zellzuwachs in frühen Generationen bei 15 µM DETA/NO mit einer signifikanten Reduktion der Zellanteile in Generation 3 auf 12,2% einherging, reduzierte sich in Gegenwart von 20 µM DETA/NO der Zellanteil in Generation 5 bzw. 6 signifikant auf 7,7% bzw. 0,4%. Zusammenfassend führte die Stimulation mit mehr als 10 µM der NO-freisetzenden Verbindung zu einer verringerten Proliferation von CTV gefärbten HSPZ, sodass mehr Zellen in frühen Generationen vorlagen.

Um die Anzahl der Zellteilungen zu ermitteln, die die Ursprungspopulation an HSPZ durchlaufen hatte, wurde der Zellteilungsindex aus den Ereignissen in den einzelnen Zellgenerationen berechnet. Wie in Abbildung 12 A) gezeigt, lag die Anzahl an Zellteilungen der Anfangspopulation in der Lösemittelkontrolle im Mittel bei 3,2 und wurde bei Zugabe von bis zu 5 µM DETA/NO nicht beeinflusst. Ab 10 µM DETA/NO im Zellkulturmedium schien der Zellteilungsindex abzunehmen. Bei Konzentrationen von 15 µM bzw. 20 µM DETA/NO sank der

Zellteilungsindex signifikant auf 2,1 bzw. 1,7 Zellteilungen. Indem die jeweiligen Zellanteile zur Lösemittelkontrolle des Spenders ins Verhältnis gesetzt wurden, konnte unter Ausschluss spenderabhängiger Variationen der Zellteilungsrate zusätzlich der rel. Zellteilungsindex (Abbildung 12 B)) erhalten werden. Bereits die Zugabe von 10 μM DETA/NO führte hier zu einer signifikanten Reduktion des rel. Zellteilungsindex. Die Anzahl der Zellteilungen der Ursprungspopulation verringerte sich verglichen mit der Lösemittelkontrolle auf das 0,83-fache, 0,68-fache und 0,55-fache durch Stimulation der HSPZ mit 10 μM , 15 μM und 20 μM der NO-freisetzenden Verbindung.

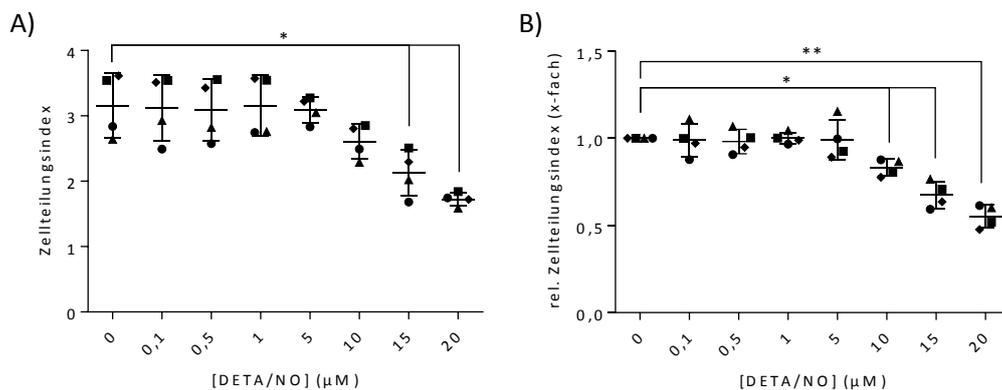


Abbildung 12 Einfluss verschiedener Konzentrationen von DETA/NO auf die im Mittel durchlaufenden Zellteilungen von CTV-gefärbten HSPZ nach fünftägiger Kultur. A) Darstellung des Zellteilungsindex in Abhängigkeit der zur Zellkultur zugesetzten Konzentration der NO-freisetzenden Verbindung. Der Zellteilungsindex wurde aus dem CTV Fluoreszenzprofil von HSPZ am Ende der Kultur erhalten. B) Auftragung des rel. Zellteilungsindex bezogen auf die jeweilige Lösemittelkontrolle in Abhängigkeit der Konzentration an DETA/NO. Punktdiagrammdarstellung der Messwerte aus $n = 4$ unabhängigen Experimenten, der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwertes sind als Linie mit Fehlerbalken gezeigt. Signifikante Unterschiede der Mittelwerte einzelner Stimulationsbedingungen im Vergleich zur Lösemittelkontrolle nach gepaarter ANOVA sind durch Linien kenntlich gemacht. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$.

Um zu ermitteln, ob in Gegenwart von NO das Proliferationsverhalten der gesamten Zellpopulation gleichermaßen beeinflusst wurde oder ob sie zum Erhalt einer Unterpopulation führte, wurde zusätzlich die Expression des HSPZ Oberflächenmarkers CD34 betrachtet.

3.2.3 Stimulation mit DETA/NO beeinflusst das Expressionsmaß des HSPZ Markers CD34

Durch zusätzliche Färbung der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörperkonjugaten konnten die CD34^+ Anteile nach fünftägiger Kultur in Gegenwart von DETA/NO ermittelt werden. Während am Tag der Isolation nahezu 100% der ausgesäten Zellen CD34 exprimierten, geht

mit der Differenzierung zu reifen Zelltypen ein Verlust des Markers einher. Da der CD34⁺ Anteil am Analysetag jedoch spenderunabhängig bei 90 – 95% lag, konnte kein Einfluss der Stimulation mit NO auf diesen ermittelt werden. Wie in Abbildung 13 A) für einen repräsentativen Spender gezeigt, schien das Expressionsmaß an CD34, welches mit der Fluoreszenzintensität korreliert, durch die Stimulation mit NO beeinflusst worden zu sein. Daher wurden HSPZ zur Quantifizierung der CD34 Expression anhand ihrer PE-Cy7 Fluoreszenzintensität in CD34^{hoch}, CD34^{mittel} und CD34^{gering} eingeteilt. Wie in Abbildung 13 B) dargestellt, ging mit steigender Konzentration an DETA/NO ein Zuwachs an Zellen mit hoher CD34 Expression einher, während der CD34^{gering} Anteil sank.

Um Aussagen über die CD34 Expression abhängig vom Proliferationsverhalten der HSPZ treffen zu können, wurde die MFI der Zellen im CD34 Kanal bestimmt und diese für jede Stimulationsbedingung abhängig von der Zellgeneration aufgetragen. Mit der Inkulturnahme von HSPZ ging eine Größenzunahme der Zellen einher (Anhang 1). Wie in Abbildung 14 A) gezeigt, wiesen HSPZ in der Lösemittelkontrolle nach 1-3 Zellteilungen ein konstantes Maß an CD34 Expression auf. Beim Übergang zu Generation 4 sank dieses im Vergleich zur ersten Generation signifikant von $5 \cdot 10^4$ a.u. auf $2,3 \cdot 10^4$ a.u. und nahm mit weiteren Zellteilungen ab. Auch bei Stimulation mit 0,1 μ M und 0,5 μ M DETA/NO wurde vorübergehend das Maß an CD34 Expression erhalten, welches beim Übergang zu Generation 4 signifikant absank, wie in Abbildung 14 B) und C) gezeigt. Bei Zusatz von 1 μ M DETA/NO konnte keine Zellteilung identifiziert werden, bei der das CD34 Expressionsmaß stark abfiel, jedoch reduzierte sich die CD34 MFI mit zunehmender Zellgeneration. Ab einer Konzentration von 5 μ M DETA/NO (Abbildung 14 E)) fiel die MFI im CD34 Kanal bereits nach wenigen Zellteilungen ab. So sank diese bei Stimulation mit 5 μ M DETA/NO bereits beim Übergang zu Generation 2 signifikant ab, während bei Zugabe von 10 μ M DETA/NO die Reduktion der MFI beim Übergang zu Generation 3 stattfand. Bei Konzentrationen von 15 μ M bzw. 20 μ M DETA/NO, aufgeführt in Abbildung 14 G) und H), nahm die MFI im CD34 Kanal, welche mit der CD34 Expression der Zellen korreliert, mit zunehmenden Zellteilungen kontinuierlich ab. Zusammengefasst schien der Abfall der Expressionsstärke von CD34, welche mit dem MFI in diesem Fluoreszenzkanal korreliert, durch Stimulation mit DETA/NO in hohen Konzentrationen früher stattzufinden. Gleichzeitig schien der Anteil an CD34⁺ Zellen, welcher durchwegs auf einem hohen Niveau lag, bei Stimulation mit 15 μ M bzw. 20 μ M DETA/NO bereits nach 2 Zellteilungen reduziert, während in der Lösemittelkontrolle sowie bei geringeren DETA/NO Konzentrationen diese Abnahme erst nach 3 Zellteilungen stattfand (Anhang 2). Dies war ein erster Hinweis darauf, dass die konzentrationsabhängige Zunahme an CD34^{hoch} Zellen durch Stimulation mit DETA/NO

(Abbildung 13 B)) nicht auf die reine Expansion von HSZ unter Erhalt von CD34⁺ hervorgerufen worden war, da dies mit dem Erhalt der CD34 Expressionsstärke sowie des CD34⁺ Zellanteils über mehr Zellteilungen einhergehen sollte. Stattdessen exprimierten unter dem Einfluss von 15 μM und 20 μM DETA/NO bereits in Generation 3 weniger HSPZ CD34. Zellen, die 5-6 Zellteilungen durchlaufen hatten, wiesen hingegen einen höheren Anteil an CD34⁺ Zellen auf.

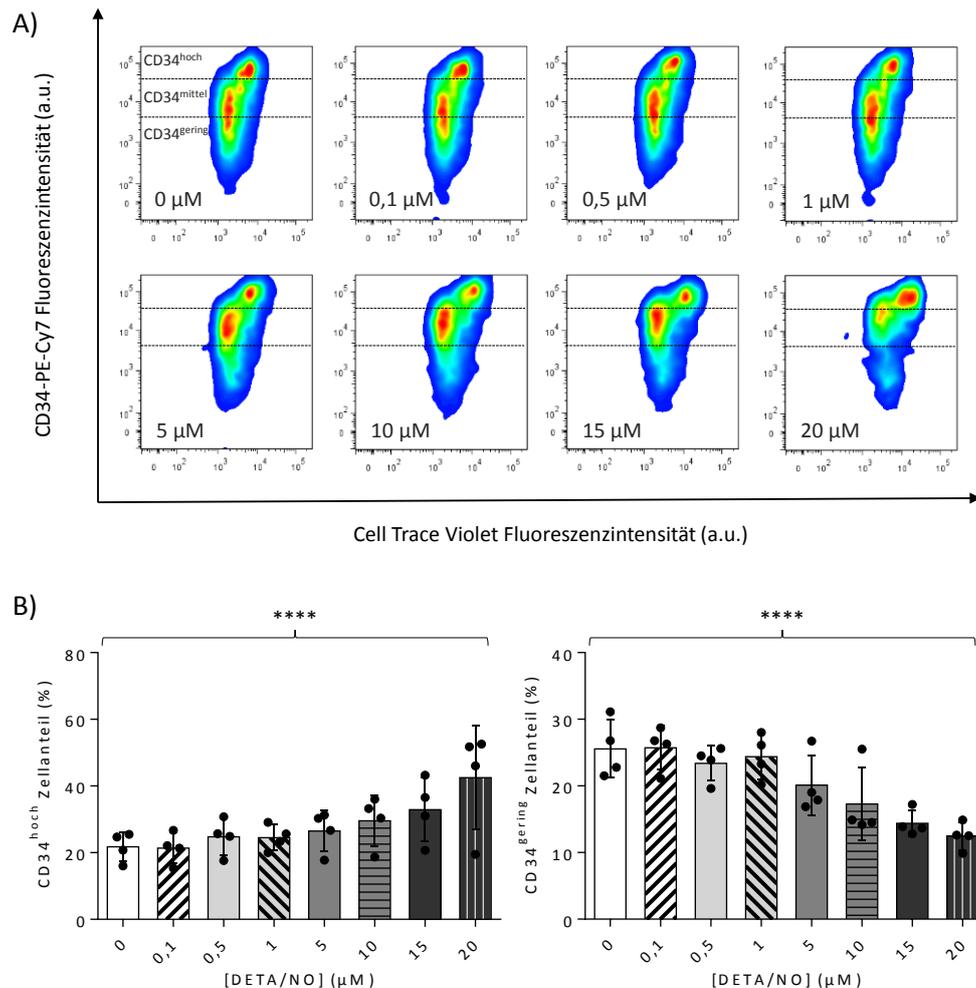


Abbildung 13 Einfluss der fünftägigen Stimulation mit bis zu 20 μM DETA/NO auf die CD34 Expression von HSPZ. A) Pseudokolorierte, geglättete Einzelzellereignisse von HSPZ eines repräsentativen Spenders nach fünftägiger Kultur in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der NO-freisetzenden Verbindung als Punktdiagrammdarstellung in den Kanälen PE-Cy7 und CTV. Zur Quantifizierung der CD34 Expression wurden die Zellen anhand ihrer PE-Cy7 Fluoreszenzintensität in CD34^{hoch}, CD34^{mittel} und CD34^{gering} eingeteilt. B) Balkendiagrammdarstellung der mittleren Zellanteile von CD34^{hoch} bzw. CD34^{gering} HSPZ aus $n = 4$ unabhängigen Experimenten in Abhängigkeit der zugesetzten Konzentration an DETA/NO. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar, geschweifte Klammern verdeutlichen lineare Trends mit steigender DETA/NO Konzentration nach gepaarter ANOVA. **** = $p < 0,0001$.

Bei Betrachtung der Expressionsstärke von CD34 nach fünftägiger Kultur mit verschiedenen Konzentrationen an DETA/NO bezogen auf die Expressionsstärke des Markers der Ursprungspopulation an Tag 0 fiel auf, dass die MFI im CD34 Kanal durch Stimulation mit DETA/NO erhöht war (Anhang 3). Ebenso verdeutlichte der Bezug der MFI im CD34 Kanal auf die MFI der Lösemittelkontrolle des jeweiligen Spenders, dass mit zunehmender Konzentration an DETA/NO im Zellkulturmedium eine erhöhte Expression an CD34 einherging, wie in Abbildung 15 gezeigt. Während bei Stimulation mit bis zu 0,5 μM DETA/NO kein signifikanter Einfluss auf die rel. CD34 MFI ersichtlich war (Abbildung 15 A), lag die CD34 MFI in Generation 2 durch Stimulation mit 1 μM DETA/NO signifikant auf das 1,3-fache der Lösemittelkontrolle erhöht vor. Durch Zusatz von 5 μM bzw. 10 μM der NO-freisetzenden Verbindung erhöhte sich die CD34 MFI in Generation 1 auf das 1,8-fache bzw. 1,5-fache der Lösemittelkontrolle (Abbildung 15 C) bzw. D)). Des Weiteren reduzierte sich die rel. MFI in Gegenwart von 15 μM bzw. 20 μM DETA/NO in Generation 3 auf das 0,7- bzw. 0,6-fache der Lösemittelkontrolle. Interessanterweise schien sich ab einer Konzentration von 5 μM DETA/NO ein Trend abzuzeichnen, der sich mit zunehmender Konzentration an DETA/NO verstärkte. So schien die CD34 MFI, bezogen auf die Lösemittelkontrolle, in Generation 1 und 2 erhöht, erreichte nach 3 Zellteilungen ihr Minimum und nahm dann bei Zellen in Generationen 4-6 wieder zu. Ein ähnlicher Verlauf wurde bei Betrachtung der CD34⁺ Anteile bei Stimulation mit 15 μM bzw. 20 μM DETA/NO (Abbildung 15 E) und F)) beobachtet. Dieses Expressionsverhalten wies auf die Bildung zweier Populationen hin, welche CD34 verstärkt exprimierten und unterschiedlich stark proliferierten.

Zusammenfassend fand die mit der Zellproliferation einhergehende Reduktion der CD34 Expression *in vitro* durch Stimulation mit 5 μM bzw. 10 μM DETA/NO ca. 1 Zellteilung früher statt verglichen mit der Lösemittelkontrolle. Jedoch war die Expressionsstärke von CD34 durch Stimulation von HSPZ mit DETA/NO im Vergleich zur Lösemittelkontrolle erhöht und resultierte so in einem Anstieg von CD34^{hoch} Zellen mit zunehmender Konzentration an DETA/NO. Die alleinige Analyse der CD34 Expression konnte nicht abschließend klären, ob diese Beobachtung durch Proliferation von HSPZ unter Erhalt des Stammzellpotentials oder durch Differenzierung der Zellen hervorgerufen wurde, gaben aber einen ersten Hinweis auf die Bildung von CD34⁺ Unterpopulationen, die ein unterschiedliches Proliferationsverhalten aufwiesen. Zur genaueren Identifikation der durch die Stimulation mit DETA/NO hervorgebrachten Unterpopulationen, wurden die Zellen durch Färbung mit einem Antikörperpanel charakterisiert.

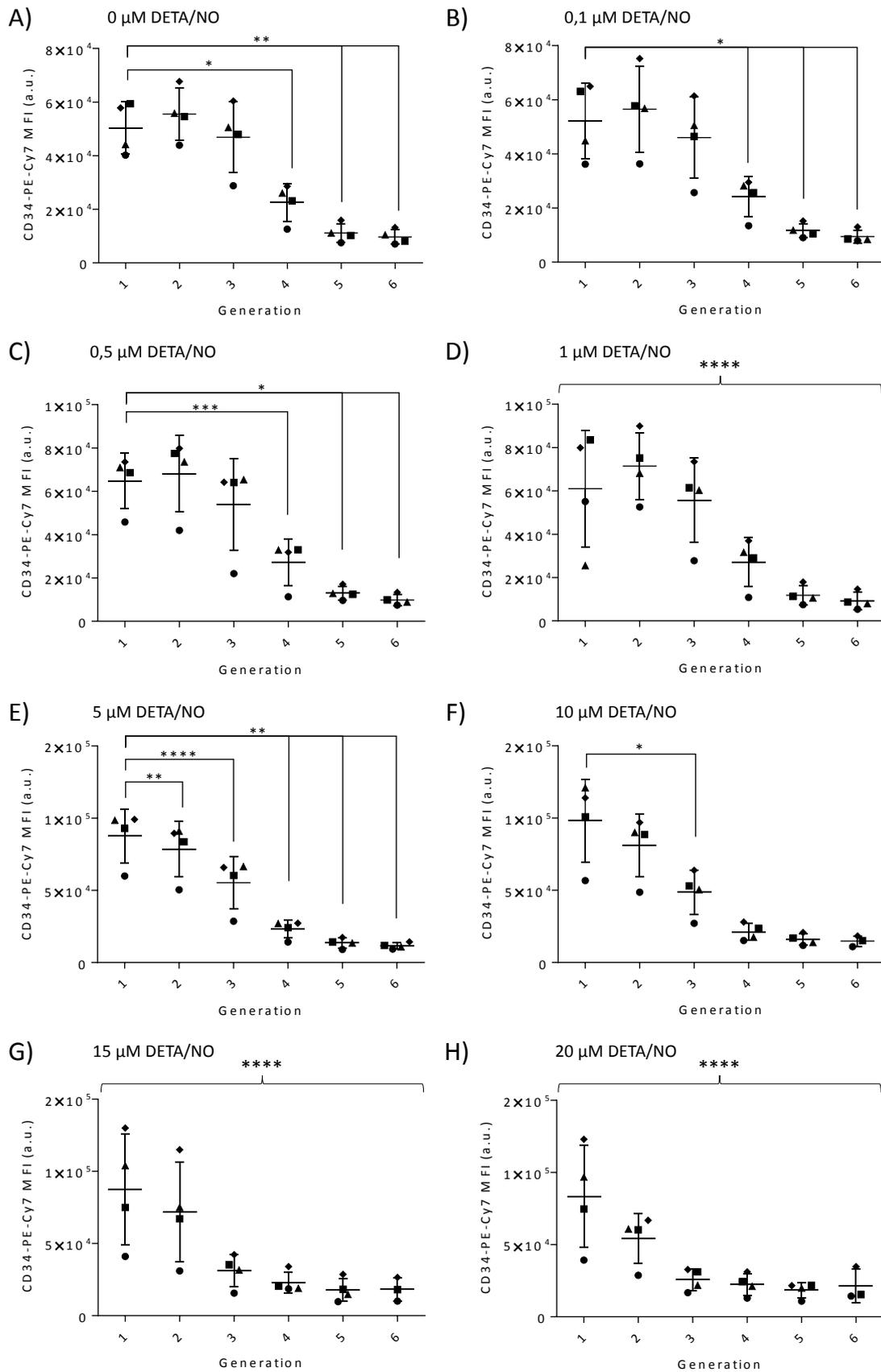


Abbildung 14 Entwicklung des mittleren CD34 Expressionsmaßes, dargestellt durch die MFI, in Abhängigkeit der durchlaufenen Zellteilungen (Generationen) von HSPZ. Die MFI im PE-Cy-7 Kanal ist in Abhängigkeit der Generation von HSPZ nach fünftägiger Stimulation mit A) 0 μM, B) 0,1 μM, C) 0,5 μM, D) 1 μM, E) 5 μM,

F) 10 μM , G) 15 μM und H) 20 μM DETA/NO gezeigt. Punktdiagrammdarstellung der Messwerte aus $n = 4$ unabhängigen Versuchen mit dem Mittelwert und der Standardabweichung der Mittelwerte als Linie mit Fehlerbalken. Statistische Unterschiede nach Vergleich der MFI der Einzelgenerationen mit der MFI der Generation 1 nach gepaarter ANOVA sind durch Linien verbunden. Zusätzlich wurden Daten auf Linearität mit zunehmender Generation geprüft (geschweifte Klammern). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$; *** = $0,0001 < p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

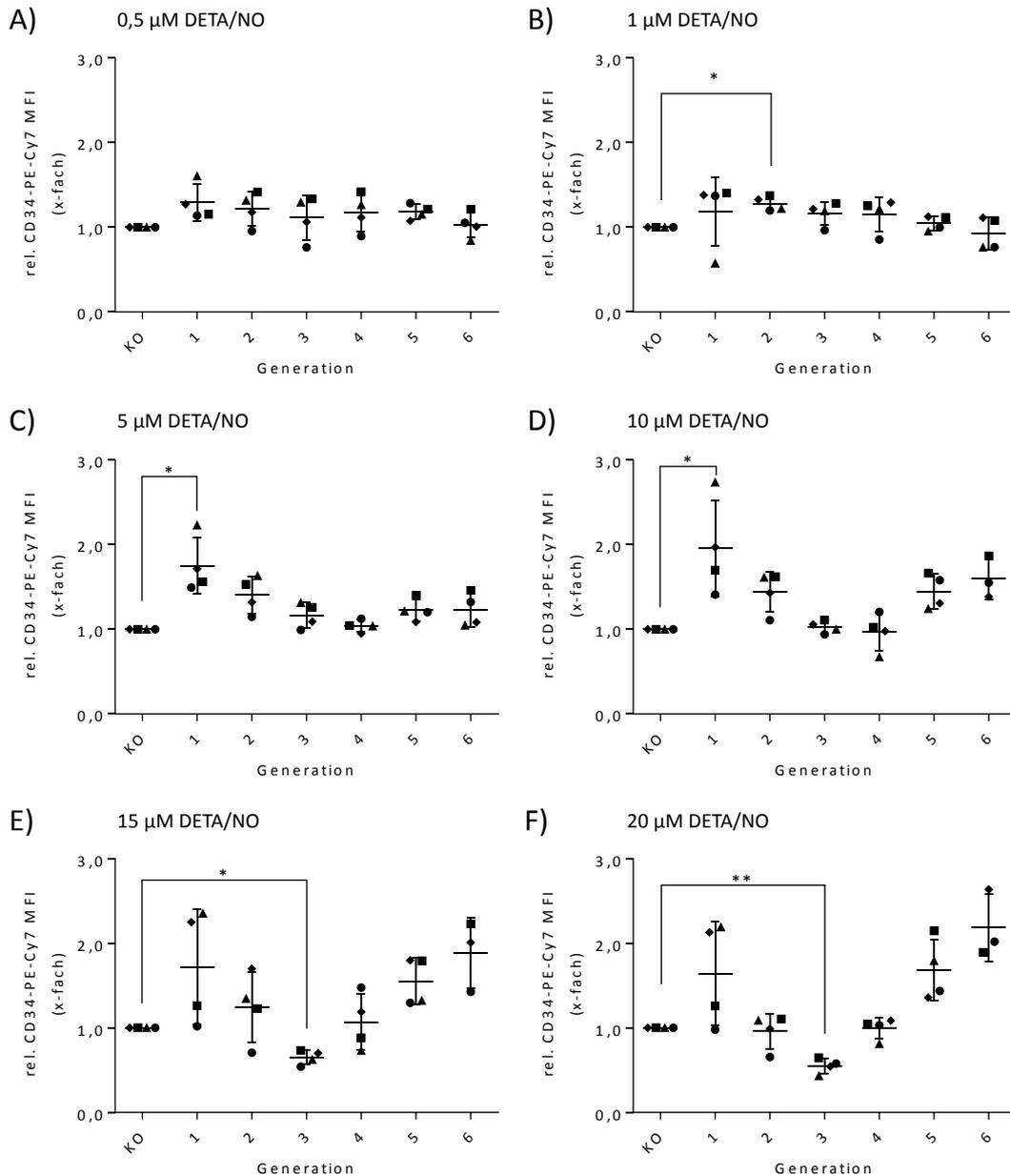


Abbildung 15 Verlauf des rel. Expressionsmaßes von CD34 in Abhängigkeit der Generation von HSPZ. Die MFI von HSPZ im PE-Cy7 Kanal bezogen auf die jeweilige MFI der Lösemittelkontrolle (KO) wurde nach fünf-tägiger Stimulation mit A) 0,5 μM , B) 1 μM , C) 5 μM , D) 10 μM , E) 15 μM bzw. F) 20 μM DETA/NO gemessen und ist in Abhängigkeit der durchlaufenen Zellteilungen dargestellt. Punktdiagramme stellen die Messwerte aus $n = 4$ unabhängigen Experimenten mit dem Mittelwert bzw. der Standardabweichung dieser als Linie bzw. Fehlerbalken dar. Signifikante Unterschiede zweier ausgewählter Bedingungen nach gepaarter ANOVA sind wie folgt verdeutlicht: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$.

3.2.4 Freigesetztes NO führt *in vitro* zu myeloider Differenzierung von HSPZ

Um Veränderungen der HSPZ Anteile nach fünftägiger Stimulation mit DETA/NO detektieren zu können, wurden die Zellen anschließend zusätzlich mit fluoreszenzmarkierten Antikörperkonjugaten gegen CD38, CD45RA, CD135 und CD10 gefärbt. Hierzu wurde aus den Einzelzellereignissen zunächst die vitale CD34 Population ermittelt und daraus der CD34⁺ CD38⁻ CD45RA⁻ Anteil erhalten, der charakteristisch für HSZ und MPPs ist (für Gatingstrategie siehe Anhang 4). Ohne Berücksichtigung des Proliferationsverhaltens der Zellen reduzierte sich die gesamte CD34⁺ CD38⁻ CD45RA⁻ Zellpopulation, wie in Abbildung 16 A) gezeigt, mit steigender Konzentration an DETA/NO in der Kultur. Hierbei sank der Anteil an HSZ und MPPs signifikant von 11,5% auf 9,6% bei Stimulation mit 10 µM DETA/NO verglichen mit der Lösemittelkontrolle und nahm rel. zu dieser auf das 0,83-fache ab. Eine solche konzentrationsabhängige Reduktion der HSZ und MPP Anteile war in späten Zellgenerationen nicht beobachtbar und konnte lediglich in wenig proliferativen Zellen gefunden werden. Wie in Abbildung 16 B) bzw. C) für Generation 2 bzw. 3 gezeigt, nahm der HSZ und MPP Anteil relativ zur Lösemittelkontrolle mit zunehmender Konzentration von DETA/NO auf das 0,49-fache bzw. 0,64-fache der Kontrolle ab. Zusätzlich sank der HSZ und MPP Anteil in Generation 2 in Gegenwart von 10 µM DETA/NO auf das 0,57-fache der Lösemittelkontrolle ab, in Generation 3 wurde bei dieser Konzentration eine Reduktion auf das 0,34-fache beobachtet. Bereits 5 µM DETA/NO führten in Zellen, welche 3 Zellteilungen durchlaufen hatten, zu einer Verringerung des HSZ und MPP Anteils auf das 0,54-fache der Kontrolle.

Anhand der Koexpression der Oberflächenmarker CD10 und CD34 wurden CLPs innerhalb der vitalen CD34⁺ Zellen identifiziert. Bei Betrachtung der gesamten Zellpopulation war aufgrund der Spendervariabilität kein signifikanter Einfluss der Stimulation mit DETA/NO auf den Anteil an CLPs detektierbar, wie in Abbildung 17 A) gezeigt. Nach Normierung der analysierten Zellanteile auf die jeweilige Lösemittelkontrolle schien durch Stimulation mit der höchsten Konzentration DETA/NO ein reduzierter Anteil an CLPs ersichtlich. Ein ähnlicher Effekt wurde bei wenig proliferativen Zellanteilen in Generation 1, 2 und 3 deutlich, wie in Abbildung 17 B), C) und D) erkennbar. Der Anteil von CLPs verringerte sich durch Stimulation mit 20 µM DETA/NO signifikant von 53,6% auf 14% in Generation 2 und von 43,5% auf 16% in Generation 3. Wurden die Zellanteile eines Spenders rel. zur jeweiligen Lösemittelkontrolle betrachtet, reduzierte sich der CLP Anteil auf das 0,36-fache, 0,24-fache und 0,33-fache der Kontrolle in Generation 1, 2 und 3.

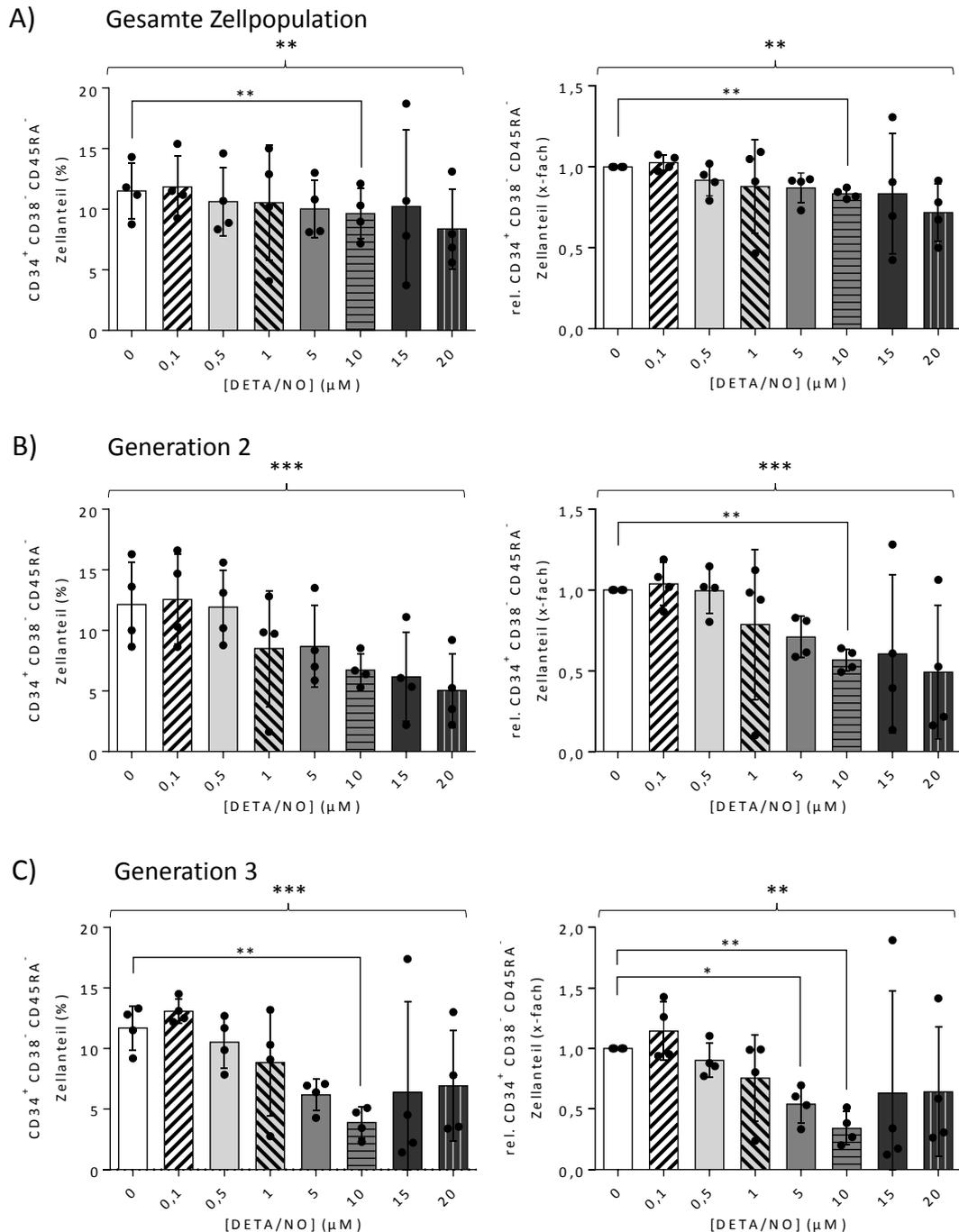
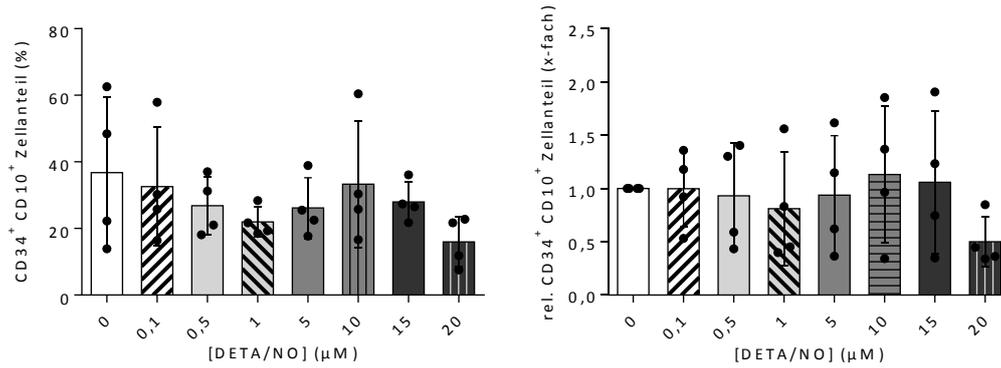


Abbildung 16 Einfluss von DETA/NO auf den Anteil an CD34⁺ CD38⁻ CD45RA⁻ HSZ und MPPs nach fünf-tägiger Kultur in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration der NO-freisetzenden Verbindung. Balkendiagramme zeigen die HSZ und MPP Zellanteile in A) der gesamten Zellpopulation unabhängig von der Anzahl der durchlaufenen Zellteilungen sowie in B) Generation 2 und C) Generation 3. Linke Diagramme stellen jeweils die ermittelten HSZ und MPP Anteile aus vitalen CD34⁺ Zellen dar, während rechte Diagramme die HSZ und MPP Anteile rel. zur jeweiligen Lösemittelkontrolle zeigen und so spenderabhängige Effekte ausschließen. Balken stellen die Mittelwerte aus n = 4 unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung der Mittelwerte als Fehlerbalken dar. Signifikante Unterschiede nach Vergleich der mittleren Zellanteile einer Bedingung mit den -anteilen der Lösemittelkontrolle nach gepaarter ANOVA sind durch Linien verbunden, während lineare Trends mit zunehmender DETA/NO Konzentration durch geschweifte Klammern verdeutlicht sind. * = p < 0,05; ** = p < 0,001; *** = 0,0001 < p < 0,001.

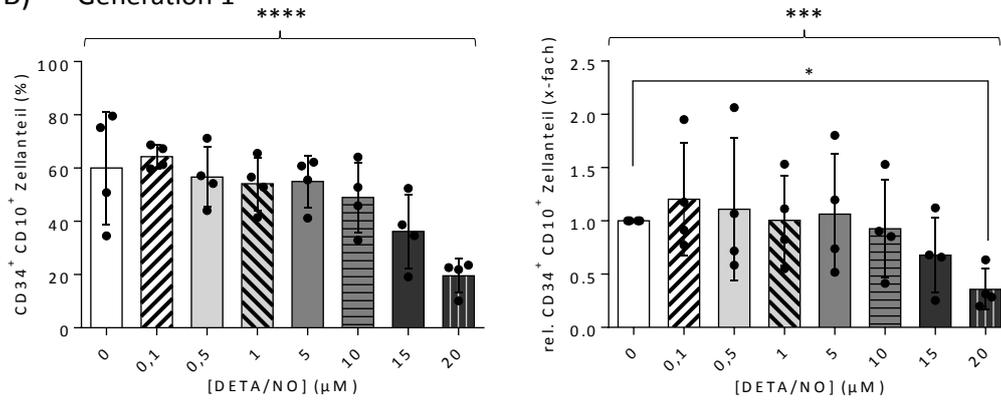
Bei Stimulation mit 20 μM DETA/NO waren die rel. CLP Anteile bezogen auf die Lösemittelkontrolle auch in stärker proliferierenden Zellpopulationen signifikant verringert (Anhang 6).

Im Gegensatz dazu zeigte sich eine andere Wirkung der DETA/NO Stimulation auf die Differenzierung von HSPZ in myeloide Progenitorzellen. $\text{CD}10^-$ Zellen, die $\text{CD}38$ und $\text{CD}34$ koexprimierten, waren frühe, myeloide Vorläufer und wurden mithilfe der zusätzlichen Marker $\text{CD}135$ und $\text{CD}45\text{RA}$ in CMPs, GMPs und MEPs untergliedert. Wie in Abbildung 18 A) gezeigt, nahm der rel. CMP Anteil, der $\text{CD}34^+ \text{CD}38^+ \text{CD}10^- \text{CD}135^+ \text{CD}45\text{RA}^-$ war, mit steigender Konzentration der NO-freisetzenden Verbindung auf das 2,9-fache der Lösemittelkontrolle zu. Während dieser Zusammenhang in frühen Zellgenerationen nicht vorlag (Anhang 8 sowie Abbildung 18 B)), war der Effekt nach 3, 4 und 5 Zellteilungen messbar, wie in Abbildung 18 C), D) und E) gezeigt. Hier erhöhte sich der rel. CMP Anteil mit steigender Konzentration an DETA/NO auf das 4,3-fache, das 3,5-fache und 9,1-fache in den Stimulationsbedingungen mit maximal zugesetzter NO Konzentration.

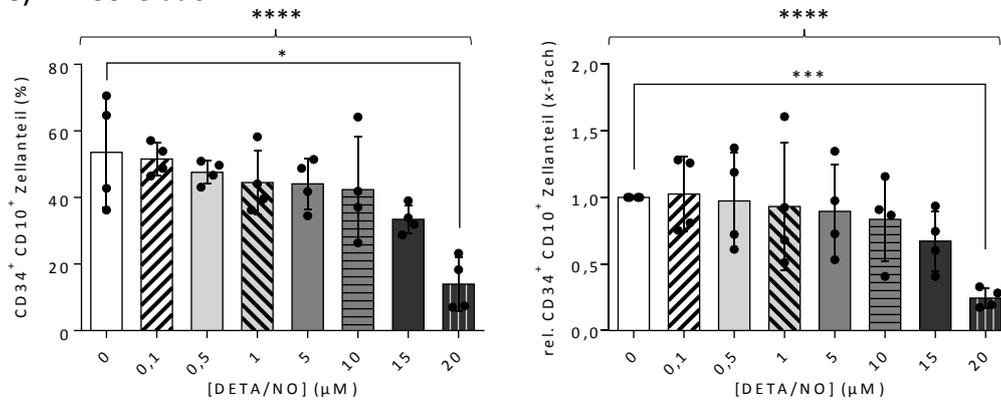
A) Gesamte Zellpopulation



B) Generation 1



C) Generation 2



D) Generation 3

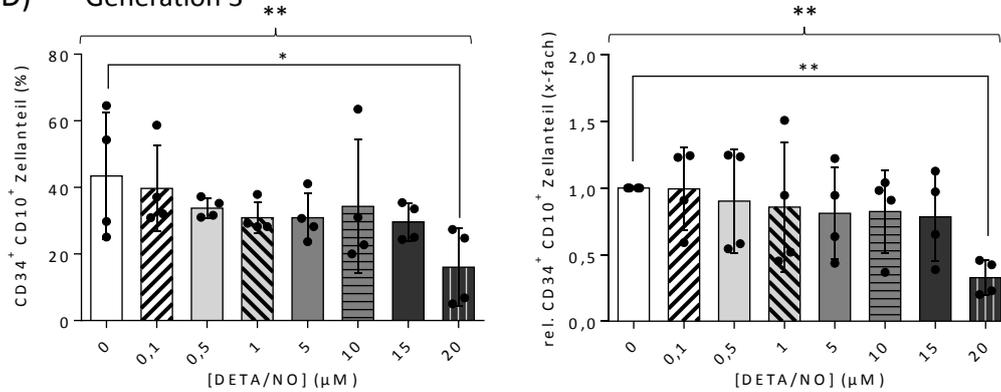


Abbildung 17 Auswirkung der fünftägigen Kultur von HSPZ mit verschiedenen Konzentrationen an DETA/NO auf den Anteil an CD34⁺ CD10⁺ CLPs. Abhängig von der eingesetzten Konzentration der NO-freisetzenden Verbindung ist der Anteil von CLPs in A) der gesamten Zellpopulation bzw. in B) Generation 1, C) Generation 2 und D) Generation 3 gezeigt. Während linke Diagramme jeweils die ermittelten CLP Anteile innerhalb des vitalen CD34⁺ Zellanteils veranschaulichen, verdeutlichen rechte Diagramme rel. CLP Anteile bezogen auf die jeweilige Lösemittelkontrolle des Spenders und erlauben so den Ausschluss spenderabhängiger Effekte. Balken stellen die Mittelwerte aus n = 4 unabhängigen Experimenten mit der jeweiligen Standardabweichung des Mittelwertes als Fehlerbalken dar. Signifikante Unterschiede der Mittelwerte im Vergleich zur jeweiligen Lösemittelkontrolle nach gepaarter ANOVA sind durch Linien verbunden, während lineare Abhängigkeiten der Zellanteile von der DETA/NO Konzentration durch geschweifte Klammern angezeigt sind. * = p < 0,05; ** = p < 0,001; *** = 0,0001 < p < 0,001; **** = p < 0,0001.

MEP Anteile (CD34⁺ CD38⁺ CD10⁻ CD135⁻ und CD45RA⁻) erhöhten sich mit steigender DETA/NO Konzentration in frühen Generationen, wie in Abbildung 19 B) und C) für Generation 1 und 2 gezeigt. Während bei Betrachtung der gesamten Zellpopulation kein Effekt auf MEP Anteile detektierbar war (Abbildung 19 A)), vergrößerte sich der MEP Anteil durch Stimulation mit 10 µM bzw. 20 µM DETA/NO von 16,4% in der Lösemittelkontrolle auf je ca. 50% in Generation 1 und von 20% auf 29% bzw. 37,4% in Generation 2.

GMP Anteile (CD34⁺ CD38⁺ CD10⁻ CD135⁺ CD45RA⁺) schienen aufgrund einer hohen Spendervariabilität bei Betrachtung der gesamten Zellpopulation nicht durch Stimulation mit DETA/NO beeinflusst worden zu sein. Durch Bezug auf die jeweilige Lösemittelkontrolle konnte jedoch eine konzentrationsabhängige Erhöhung des rel. GMP Anteils mit zunehmender Konzentration der NO-freisetzenden Verbindung in der gesamten Zellpopulation gefunden werden, wie in Abbildung 20 A) gezeigt. Abbildung 20 B), C) und D) zeigt die zur Lösemittelkontrolle rel. GMP Anteile nach 1, 3 und 5 Zellteilungen der Ursprungspopulation in Gegenwart von bis zu 20 µM DETA/NO. Während sich der Zellanteil nach einer Teilung durch Zugabe von 10 µM bzw. 20 µM auf das 0,41-fache bzw. 0,23-fache reduzierte und die GMP Fraktion in Generation 1 und 2 mit steigender Konzentration des NO freisetzenden Moleküls abnahm, konnte ein solcher Effekt in Generation 3 nicht nachgewiesen werden. Nach 4 bzw. 5 Zellteilungen lag der umgekehrte Effekt vor, sodass ein Zuwachs an GMPs mit steigender Konzentration an DETA/NO resultierte.

Zusammengefasst schienen die Zellen durch die Zugabe von NO *in vitro* zu myeloider Differenzierung angeregt, sodass in weniger proliferativen Zellpopulationen geringere CLP Anteile resultierten. Stattdessen lagen in diesen frühen Generationen mehr MEPs vor. Zellen mit hoher Proliferationsrate wiesen höhere Anteile an CMPs und GMPs auf.

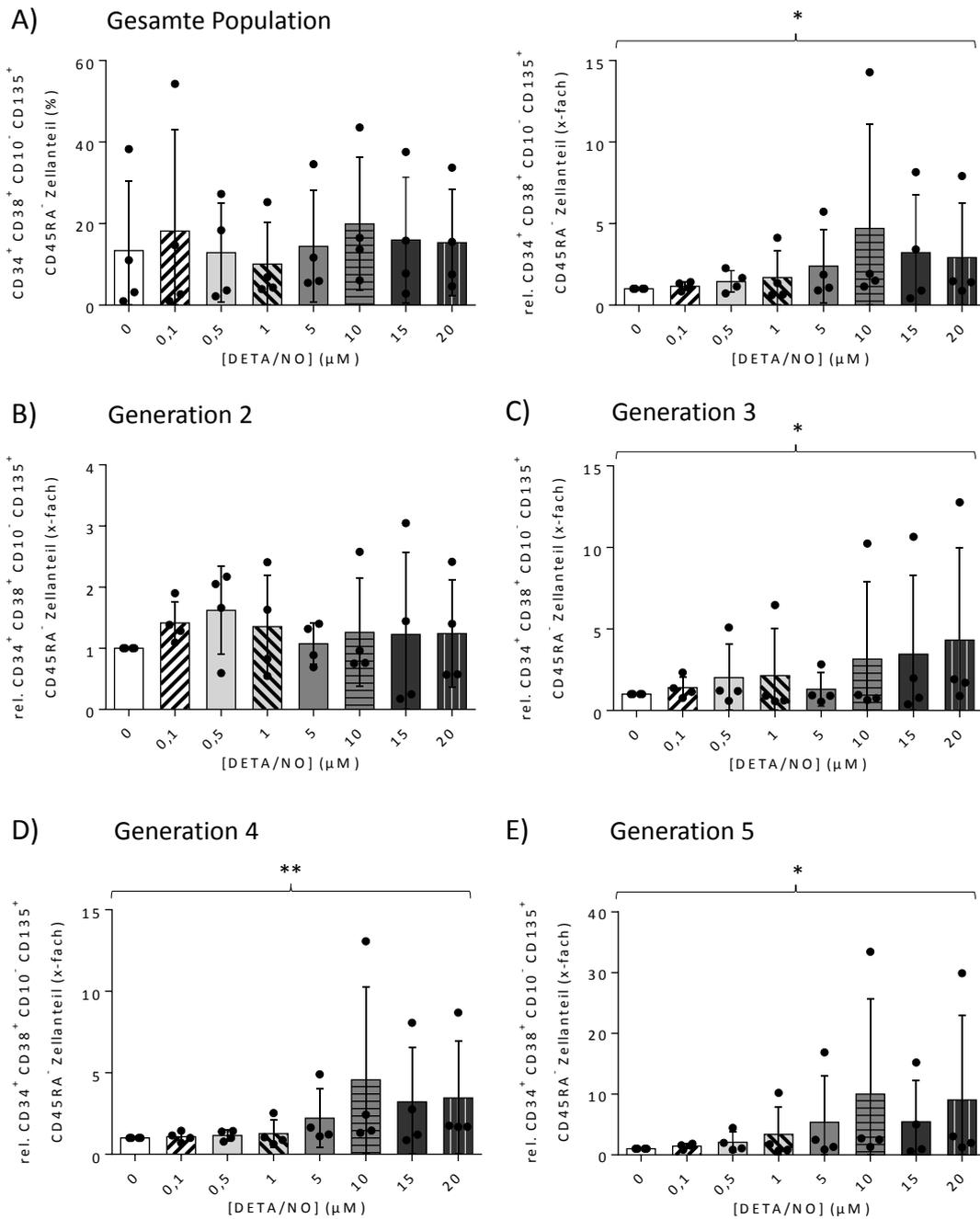


Abbildung 18 Einfluss der fünftägigen Kultur von HSPZ mit bis zu 20 μM DETA/NO auf den Anteil an $CD34^+ CD38^+ CD10^- CD135^+ CD45RA^-$ CMPs. A) Darstellung des konzentrationsabhängigen Einflusses von DETA/NO auf den Anteil von CMPs innerhalb der frühen, myeloiden Vorläuferpopulation (links) sowie des rel. CMP Anteils bezogen auf die jeweilige Lösemittelkontrolle des Spenders in der gesamten Zellpopulation (rechts). Übersicht der rel. CMP Anteile in B) Generation 2, C) Generation 3 und D) Generation 4 sowie E) Generation 5 nach fünftägiger Kultur in Abhängigkeit der Konzentration an DETA/NO. Balken stellen die Mittelwerte aus $n = 4$ unabhängigen Experimenten mit den Fehlerbalken als Standardabweichung der Mittelwerte dar. Lineare Zusammenhänge der CMP Anteile mit zunehmender Konzentration an DETA/NO nach gepaarter ANOVA sind durch geschweifte Klammern markiert. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$.

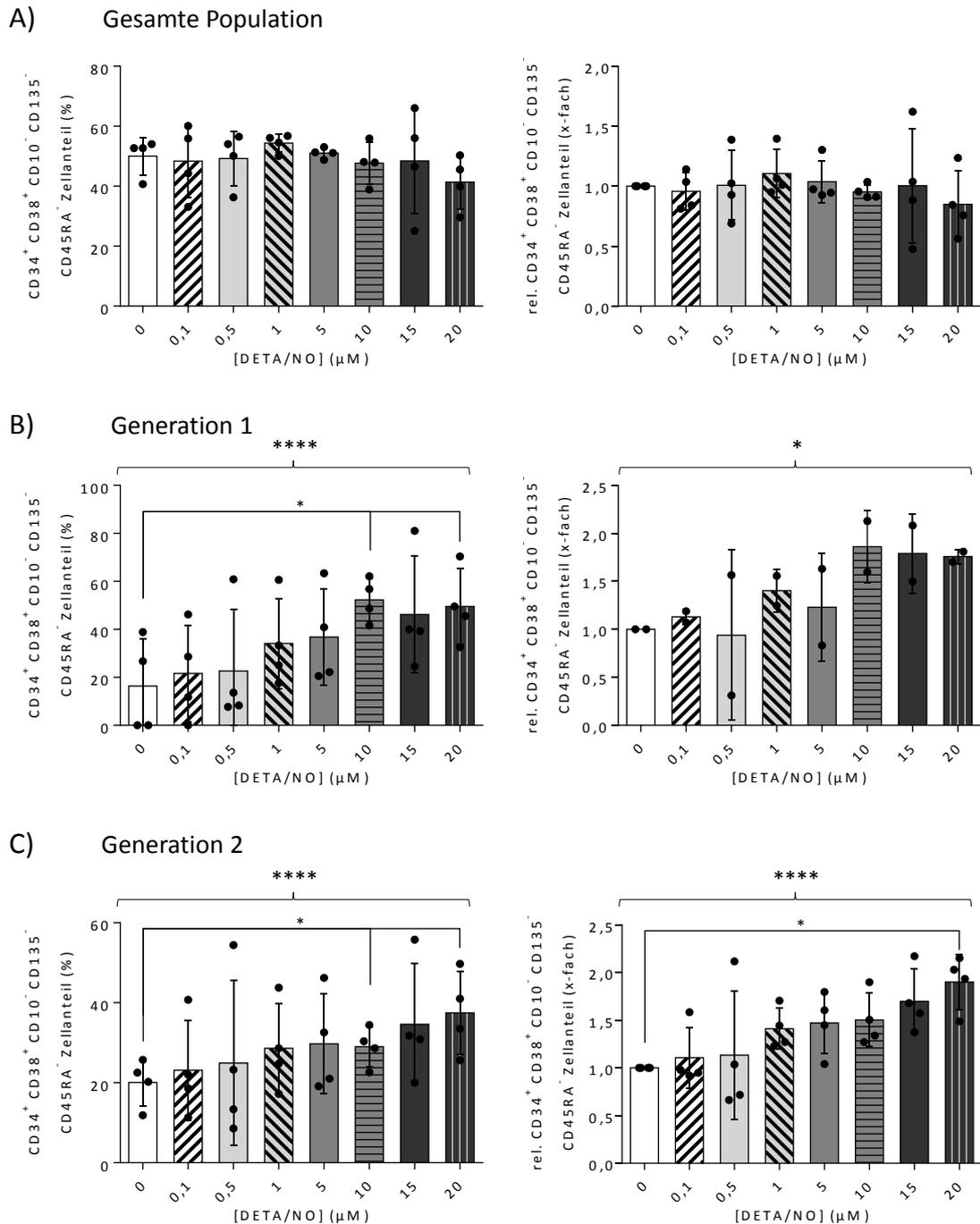


Abbildung 19 Einfluss der fünftägigen Kultur von HSPZ mit bis zu 20 μM DETA/NO auf den Anteil an $\text{CD34}^+ \text{CD38}^+ \text{CD10}^- \text{CD135}^- \text{CD45RA}^-$ MEPs. A) Darstellung des MEP Anteils der gesamten Zellpopulation innerhalb des frühen, myeloiden Vorläuferzellanteils in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration der NO-freisetzenden Verbindung (links) sowie des rel. MEP Anteils bezogen auf die jeweilige Lösemittelkontrolle des Spenders (rechts). Übersicht der MEP Anteile in B) Generation 1 und C) Generation 2 nach fünftägiger Kultur in Abhängigkeit von bis zu 20 μM DETA/NO als Zusatz zum Zellkulturmedium. Balken stellen die Mittelwerte aus $n = 4$ unabhängigen Experimenten mit den Fehlerbalken als Standardabweichung der Mittelwerte dar. Lineare Zusammenhänge der MEP Anteile mit zunehmender Konzentration an DETA/NO nach gepaarter ANOVA sind durch geschweifte Klammern markiert. * = $p < 0,05$; **** = $p < 0,0001$.

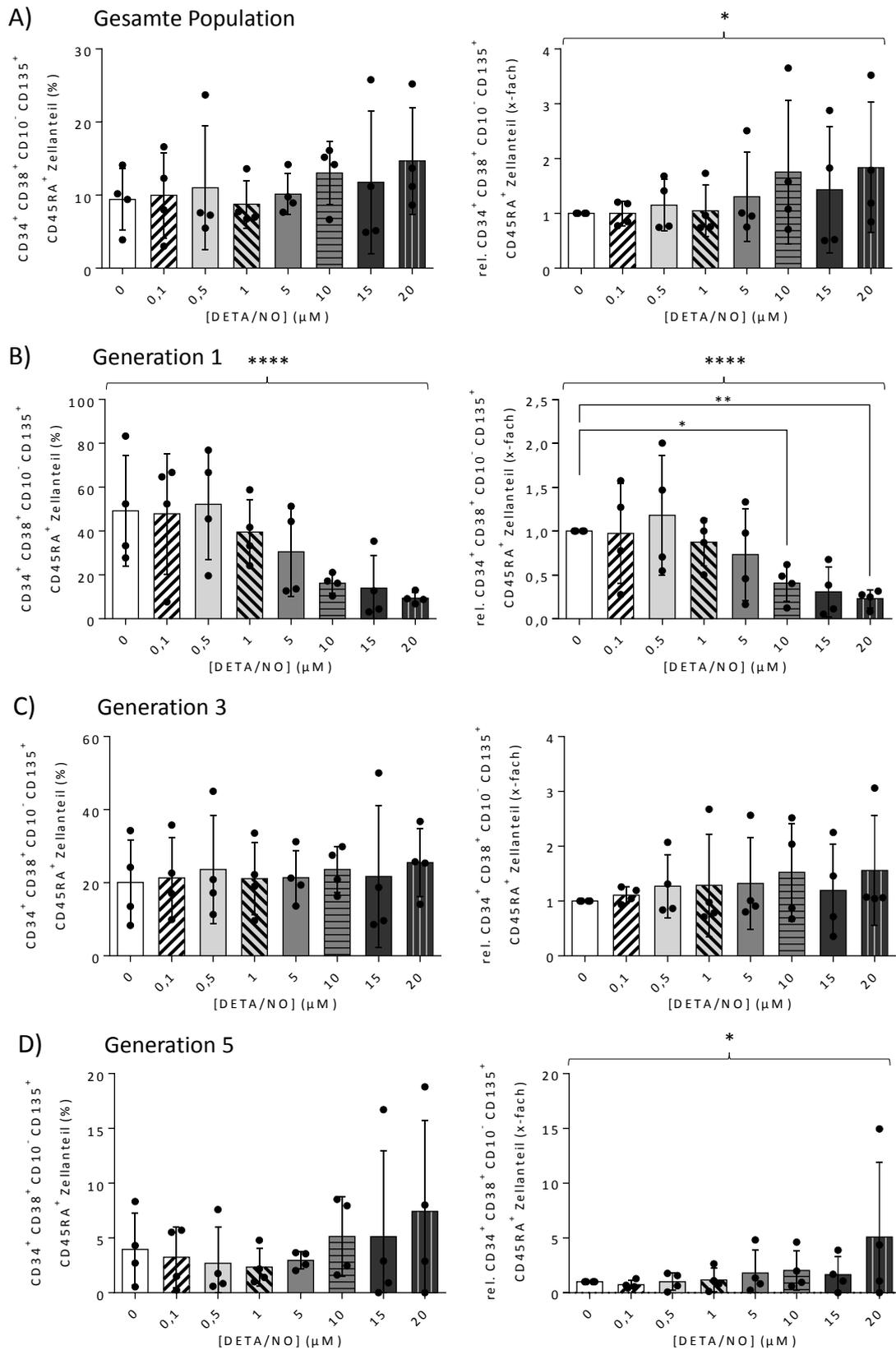


Abbildung 20 Auswirkung der fünftägigen Kultur von HSPZ unter Zusatz von bis zu 20 µM DETA/NO auf den Anteil an CD34⁺ CD38⁺ CD10⁻ CD135⁺ CD45RA⁺ GMPs. Darstellung des GMP Anteils innerhalb früher, myeloider Vorläuferzellen (links) sowie des rel. GMP Anteils bezogen auf die jeweilige Lösemittelkontrolle (rechts) in A) der gesamten Zellpopulation sowie in B) Generation 1, C) Generation 3 und D) Generation 5 am

Ende der Kultivierung in Abhängigkeit der zugesetzten Konzentration der NO-freisetzenden Verbindung. Balken stellen die Mittelwerte aus $n = 4$ unabhängigen Experimenten mit den Fehlerbalken als Standardabweichung der Mittelwerte dar. Lineare Zusammenhänge der MEP Anteile mit zunehmender Konzentration an DETA/NO nach gepaarter ANOVA sind durch geschweifte Klammern markiert. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

Um zu eruieren, ob dieser Effekt auch in funktionalen Assays nachweisbar war, wurden HSPZ nach fünftägiger Stimulation mit DETA/NO für CFU Assays eingesetzt und die gebildeten Kolonien nach 12 Tagen ausgezählt. Wie in Abbildung 21 dargestellt, konnte mit diesem Assay kein signifikanter Effekt auf eine frühe, myeloide Unterpopulation ermittelt werden. Bei Betrachtung der Gesamtzahl an gebildeten Kolonien pro 500 eingesetzten Zellen, die mit der Anzahl früher myeloider Vorläufer in den eingesetzten Zellen korreliert, wurde spenderabhängig ein Trend zu höheren Koloniezahlen nach Stimulation mit $5 \mu\text{M}$ DETA/NO sowie zu einer Verringerung der Koloniezahlen nach Kultur mit $15 \mu\text{M}$ bzw. $20 \mu\text{M}$ DETA/NO ersichtlich. Nach Mittelwertbildung aus $n = 4$ unabhängigen Versuchen (Abbildung 21 A)) waren diese Unterschiede jedoch nicht signifikant. Die spenderabhängige Beobachtung schien vor allem durch die Zunahme von BFU-E Kolonien bei Stimulation mit $5 - 10 \mu\text{M}$ DETA/NO hervorgerufen worden zu sein, wie in Abbildung 21 C) gezeigt. CFU-GM, CFU-G und CFU-M Koloniezahlen (Abbildung 21 D)) schienen durch Stimulation mit $15 \mu\text{M}$ bzw. $20 \mu\text{M}$ DETA/NO bei einzelnen Spendern reduziert. Jedoch waren die Effekte auf beide reiferen CFU-Typen bei Vergleich von vier Spendern nicht signifikant. Die Anzahl von CMPs, welche mit der Anzahl von CFU-GEMM Kolonien korreliert, wurde durch die Gegenwart von DETA/NO *in vitro* nicht beeinflusst (Abbildung 21 B)).

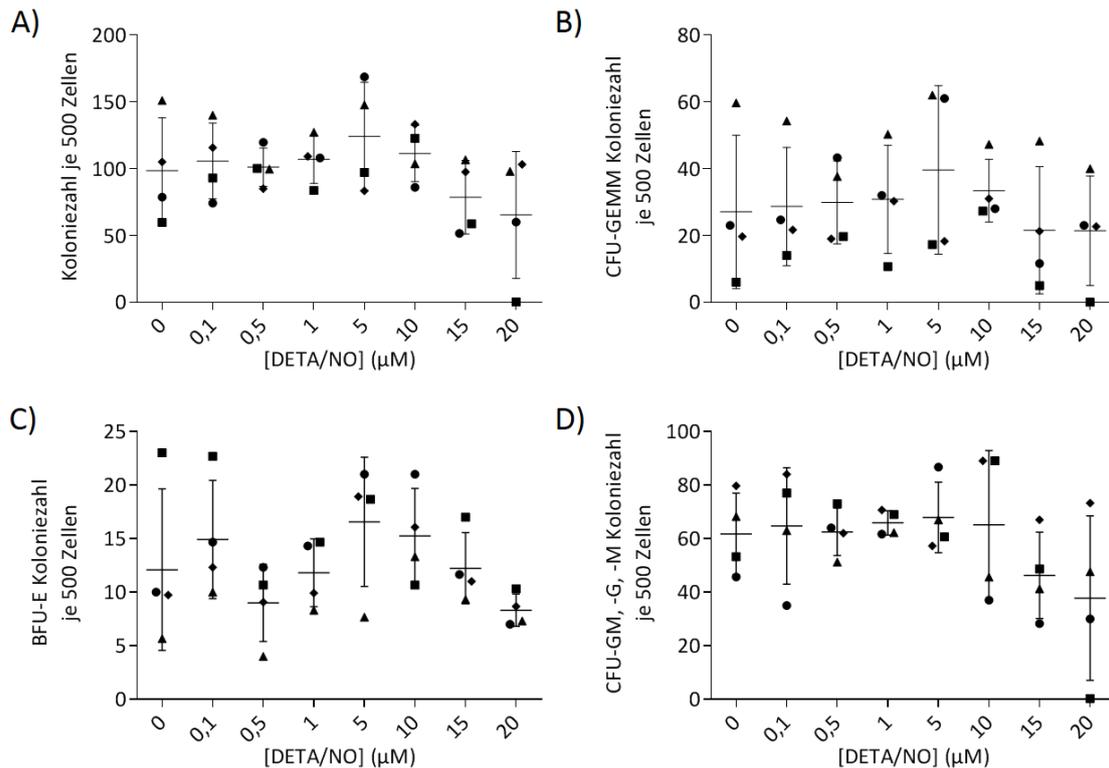


Abbildung 21 Auswirkung der fünftägigen Kultivierung von HSPZ mit bis zu 20 µM DETA/NO auf die Bildung früher, myeloider CFUs im CFU Assay. Punktdiagrammdarstellung der A) Anzahl an Kolonien sowie der Anzahl an B) CFU-GEMM, C) BFU-E oder D) CFU-GM, CFU-G oder CFU-M Kolonien je 500 eingesetzter Zellen in Abhängigkeit der Konzentration an DETA/NO, mit welcher HSPZ vor Ansatz des CFU Assays 5 Tage kultiviert worden waren. Linien und Fehlerbalken stellen den Mittelwert aus n = 4 unabhängigen Experimenten mit der jeweiligen Standardabweichung dar. Zur Untersuchung statistisch signifikanter Effekte wurde eine gepaarte ANOVA durchgeführt und die Daten zusätzlich auf Linearität mit steigender DETA/NO Konzentration geprüft.

3.2.5 Stimulation mit DETA/NO aktiviert den kanonischen NO/sGC/cGMP Signalweg

Bei physiologischen Konzentrationen von NO wird vorrangig der klassische NO Signalweg über die Bindung an die sGC und dem daraus resultierenden Anstieg an intrazellulärem cGMP aktiviert [161]. Diesem nachgelagert, phosphoryliert die cGMP-abhängige PKG eine Vielzahl an Proteinen, wie zum Beispiel VASP an der für die PKG charakteristischen Stelle Ser239. Um herauszufinden, ob dieser Signalweg durch die Stimulation mit DETA/NO in HSPZ aktiv war, wurde einerseits die Veränderung des intrazellulären cGMP Niveaus über einen kompetitiven Immunassay verfolgt und andererseits die Phosphorylierung von VASP mittels Western Blot überprüft.

3.2.5.1 DETA/NO verursacht einen Anstieg an intrazellulärem cGMP

Zur Überprüfung der intrazellulären cGMP Konzentration nach Stimulation mit NO wurde eine indirekte Methode gewählt, bei der den Zellysaten im gleichen Verhältnis ein enzymgekoppeltes cGMP-Konkurrenz-molekül zugesetzt wurde und die Immobilisierung dessen über den Substratumsatz detektiert wurde. Hierbei korrelierte die gemessene Absorbanz mit der Enzymaktivität und somit invers mit der cGMP Konzentration in den untersuchten Proben. Hierzu wurden zunächst KG1a Zellen mit DETA/NO stimuliert und anschließend lysiert. Wie in Abbildung 22 A) dargestellt, reduzierte sich die rel. Absorbanz des umgesetzten Substrates mit steigender Konzentration an DETA/NO und zeigte so einen Anstieg der intrazellulären cGMP Konzentration in KG1a Zellen durch Zugabe der NO-freisetzenden Verbindung an. Während die Absorbanz bei Zugabe von bis zu 5 μM DETA/NO lediglich um das 0,2-fache von der Lösemittelkontrolle abwich, sank der Wert ab 25 μM des NO-freisetzenden Moleküls deutlich auf das 0,5-fache der Lösemittelkontrolle ab. Eine signifikante Reduktion der rel. Absorbanz auf das 0,25-fache der Kontrolle lag erst bei Stimulation mit 100 μM DETA/NO vor. Über Vorinkubation der Zellen mit ODQ wurde die sGC inhibiert und die Zellen anschließend mit DETA/NO stimuliert (Abbildung 22 B)). Ohne Zusatz von ODQ reduzierte sich der Substratumsatz bei Stimulation mit 25 μM DETA/NO signifikant, wodurch auf einen Anstieg des intrazellulären cGMP Niveaus in Folge der NO-Behandlung geschlossen werden konnte. Dieser Effekt ließ sich durch Inhibition der sGC mit ODQ auffangen, wie sich bei gleichzeitigem Zusatz von ODQ und 25 μM DETA/NO zeigte. Hier konnte kein Unterschied zwischen der Absorbanz der behandelten Probe und der Kontrolle festgestellt werden. Die Stimulation mit DETA/NO geringerer Konzentrationen führte ebenfalls zu einer Verringerung der Absorbanz, die durch zusätzliche Inkubation mit ODQ abgeschwächt wurde, jedoch lagen hier keine signifikanten Unterschiede vor.

Analog wurden HSPZ mit Konzentrationen von bis zu 25 μM DETA/NO stimuliert und die Lysate für den kompetitiven cGMP Immunassay eingesetzt. HSPZ waren sensitiver gegenüber Stimulation mit NO als KG1a, wie in Abbildung 22 C) ersichtlich wird. Bis zu einer Konzentration von 1 μM DETA/NO zeigte sich kein Effekt auf die rel. Absorbanz im Vergleich mit der Lösemittelkontrolle, ab 5 μM der NO-freisetzenden Verbindung begann der Substratumsatz abzufallen. Bereits eine Stimulation mit 15 μM DETA/NO führte zu einer signifikanten Reduktion der rel. Absorbanz auf das 0,43-fache der Lösemittelkontrolle. Bei Zusatz von 20 μM bzw. 25 μM DETA/NO sank die Absorbanz auf das 0,34-fache bzw. das 0,26-fache der Werte der Kontrolle. Wie in Abbildung 22 D) gezeigt, konnte die signifikante Reduktion der Absorbanz bei Stimulation mit 25 μM DETA/NO von 0,96 a.u. auf 0,26 a.u. durch zusätzliche Inhibierung

der sGC mithilfe von ODQ in HSPZ abgefangen werden. Sie betrug bei gleichzeitiger Inhibition des NO Targets 0,76 a.u. und lag damit auf dem Niveau der unstimulierten Kontrolle. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die Reduktion der Absorbanz im kompetitiven cGMP Immunassay durch den Anstieg an intrazellulärem cGMP nach Stimulation der sGC durch NO verursacht wurde, da der Effekt durch Inhibition des primären NO Targets aufgefangen werden konnte.

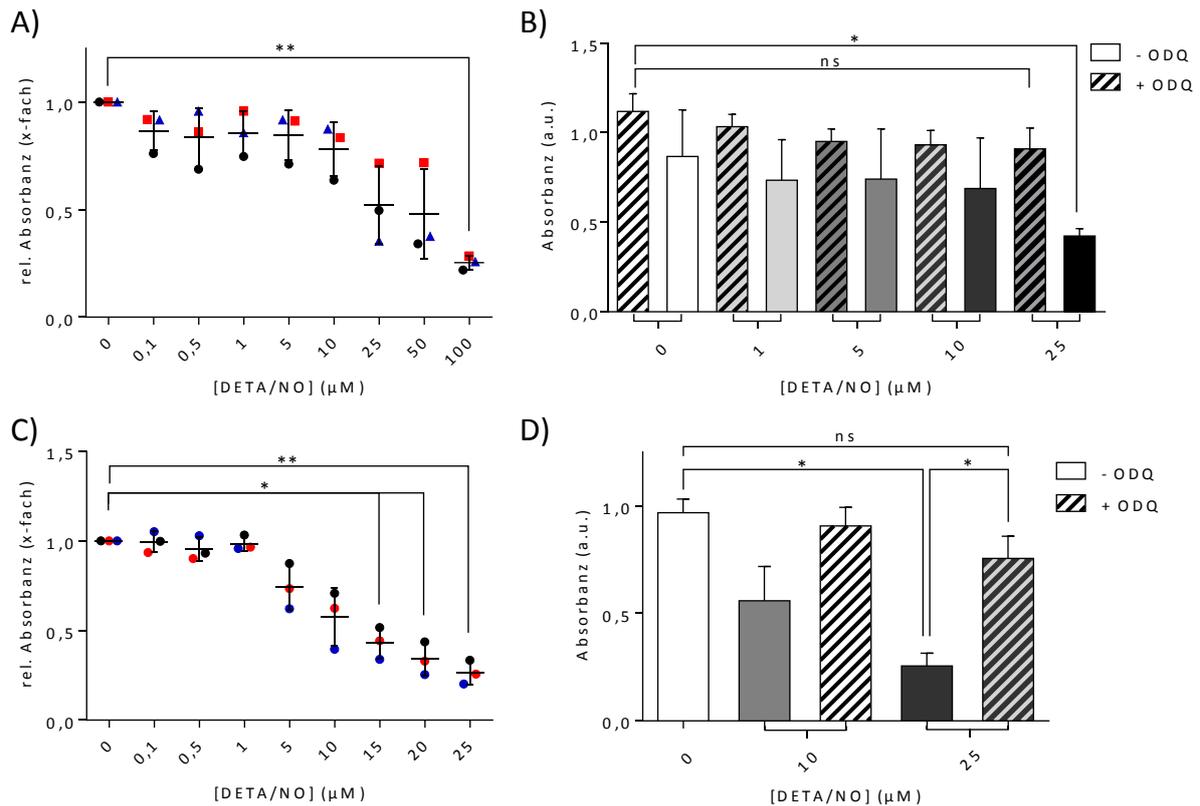


Abbildung 22 Auswirkung der Stimulation hämatopoetischer Zellen mit DETA/NO auf die intrazelluläre cGMP Konzentration ermittelt durch einen kompetitiven cGMP Immunassay. Hierbei korreliert ein erhöhter cGMP Anteil in den Lysaten mit einem verringerten Substratumsatz durch das im Volumenverhältnis 1:1 eingesetzte enzymgekoppelte Konkurrenz-molekül und somit mit einer reduzierten gemessenen Absorbanz des Substrates. A) bzw. C) Punktdiagrammdarstellung der rel. Absorbanz des umgesetzten Substrates nach Analyse der Lysate von KG1a Zellen bzw. HSPZ in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentrationen von DETA/NO bezogen auf die Absorbanz der Lösemittelkontrolle. Linien mit Fehlerbalken verdeutlichen die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte aus $n = 3$ unabhängigen Versuchen. B) bzw. D) Absorbanz des umgesetzten Substrates nach Analyse von Lysaten von KG1a Zellen bzw. HSPZ in Abhängigkeit der eingesetzten DETA/NO Konzentration. Zellen wurden vor der Stimulation mit DETA/NO mit dem sGC Inhibitor ODQ (gestreifte Balken) oder DMSO (Lösemittelkontrolle, ohne Muster) inkubiert. Balkendiagramme zeigen den Mittelwert der Absorbanz aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten, dabei ist die Standardabweichung der Mittelwerte als Fehlerbalken gezeigt. Signifikante Unterschiede im Vergleich mit einer Kontrollbedingung nach gepaarter ANOVA sind durch verbindende Linien gekennzeichnet. ns = nicht signifikant, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$.

Zusätzlich wurden beide Zelltypen vor Zusatz der NO-freisetzenden Verbindung mit dem NO Fängeremolekül cPTIO inkubiert. Mit der Stimulation von KG1a Zellen mit 25 μM DETA/NO war eine signifikante Reduktion der Absorbanz von 1,05 a.u. auf 0,6 a.u. verbunden, die durch den Anstieg an intrazellulärem cGMP verursacht wurde. Mit steigender Konzentration des vor der Stimulation mit DETA/NO zugesetzten Fängeremoleküls cPTIO nahm die Absorbanz von 0,6 a.u. auf 0,87 a.u. zu. Daher schien der durch NO verursachte Anstieg an intrazellulärem cGMP durch den Zusatz von bis zu 25 Stoffmengenäquivalenten cPTIO (bezogen auf die maximal von DETA/NO freisetzbare Menge an NO) abgeschwächt zu werden (Abbildung 23 A)). Bei Wiederholung der Versuche mit den sensitiveren HSPZ reduzierte sich die Absorbanz im kompetitiven cGMP Immunassay durch Stimulation mit 25 μM DETA/NO von 0,97 a.u. auf 0,26 a.u. (Abbildung 23 B)). Bei Zusatz von 25 Stoffmengenäquivalenten cPTIO stieg die Absorbanz signifikant auf 0,89 a.u. und näherte sich damit dem Niveau der unstimulierten Kontrolle an, von der sich der erhaltene Wert nicht signifikant unterschied.

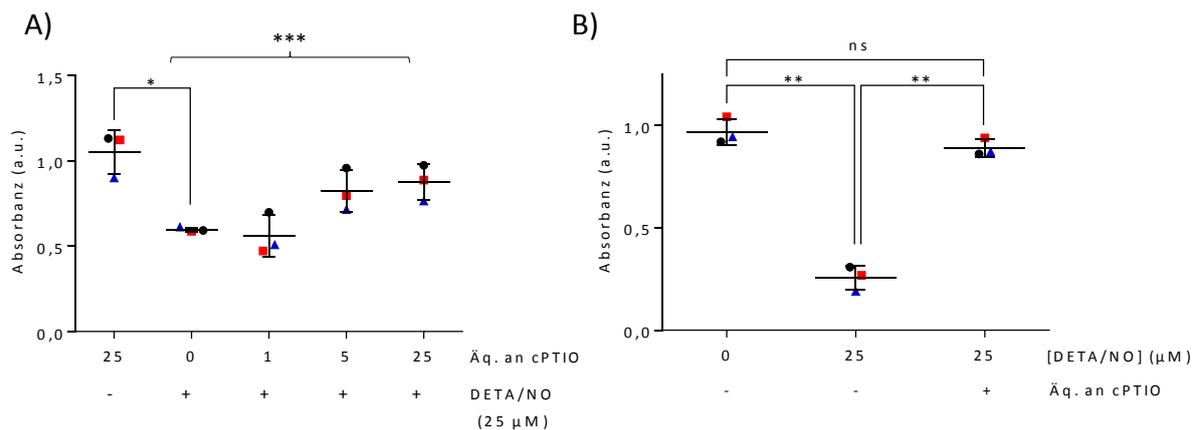


Abbildung 23 Einfluss der Stimulation von HSPZ mit DETA/NO und/oder dem NO Fängeremolekül cPTIO auf die intrazelluläre cGMP Konzentration ermittelt durch einen kompetitiven Immunassay. A) Absorbanz des enzymatisch umgesetzten Substrates nach Analyse der Lysate von KG1a Zellen, welche zusätzlich zur Stimulation mit DETA/NO mit 0, 1, 5 und 25 Stoffmengenäquivalenten cPTIO (bezogen auf die maximal freisetzbare Menge an NO) inkubiert wurden. B) Absorbanz des enzymatisch umgesetzten Substrates nach Analyse der Lysate von HSPZ, welche mit 25 Stoffmengenäquivalenten cPTIO (bezogen auf die maximal freisetzbare Menge an NO) inkubiert und anschließend mit DETA/NO stimuliert wurden. Punktdiagrammdarstellung aus $n = 3$ unabhängigen Versuchen mit Linien und Fehlerbalken als Mittelwert und Standardabweichung der Mittelwerte. Signifikante Unterschiede einzelner Stimulationsbedingungen und der nur mit DETA/NO stimulierten Bedingung nach gepaarter ANOVA sind durch verbindende Linien dargestellt, geschweifte Klammern kennzeichnen lineare Trends mit zunehmender cPTIO Konzentration. ns = nicht signifikant, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$; *** = $0,0001 < p < 0,001$.

Um sicherzustellen, dass diese Effekte unabhängig von der Wahl der NO-freisetzenden Verbindung waren, wurde der Assay analog mit DEA/NO und KG1a Zellen wiederholt. Durch Inkubation mit dieser Verbindung, die eine Halbwertszeit von wenigen Minuten aufwies, konnten analoge Effekte im Vergleich zu Experimenten mit DETA/NO erzielt werden (Anhang 9).

Zusammengefasst reagierten primäre HSPZ hinsichtlich der klassischen sGC-vermittelten Signaltransduktion deutlich sensitiver auf die Stimulation mit NO als die Modellzelllinie KG1a. Der Abfall der Absorbanz, der durch ein erhöhtes Niveau an intrazellulärem cGMP hervorgerufen wurde, war auf die Stimulation mit NO zurückzuführen, da dieser Effekt durch Zusatz eines NO Fänger-moleküls sowie durch Inhibition des NO Targets sGC abgeschwächt oder aufgefangen werden konnte. Die Aktivierung des klassischen Signalweges erfolgte laut des kompetitiven Immunassays bei Konzentrationen von ca. 25 μM DETA/NO bei KG1a Zellen und ca. 5 μM DETA/NO bei HSPZ.

3.2.5.2 DETA/NO führt zur PKG-abhängigen Phosphorylierung von VASP

Um die Aktivierung des klassischen Signalweges anhand einer Endpunktanalyse zu überprüfen, wurde die Phosphorylierung von VASP an der für die PKG bzw. PKA vorrangigen Stelle Ser239 bzw. Ser157 mittels Protein-Immunblot untersucht. Wie in Abbildung 24 A) gezeigt, war eine schwache Grundphosphorylierung von VASP an Ser239 ohne Stimulation mit DETA/NO ersichtlich, die mit zunehmender Konzentration von DETA/NO um den Faktor 3 signifikant zunahm (Abbildung 24 B)), während die Proteinmenge von VASP nicht signifikant verändert war (Anhang 10 A)). Bei Konzentrationen von 0,5 μM und 1 μM DETA/NO lag VASP an Ser239 phosphoryliert vor, ab einer Konzentration von 5 μM DETA/NO war zusätzlich die Bildung einer VASP Doppelbande ersichtlich. Diese zusätzliche Bande, die mit einer Veränderung der Proteinmobilität in der SDS-PAGE durch die Phosphorylierung von VASP an Ser157 einhergeht [363], deutete auf die teilweise Phosphorylierung beider Serinreste hin. Bei einer Konzentration von 20 μM DETA/NO war das pSer239 Signal beinahe vollständig zu höheren Proteingewichten verschoben und zeigte somit eine fast vollständige Phosphorylierung an Ser239 und Ser157 an. Die Kophosphorylierung ließ sich auch durch die entsprechende Antikörperfärbung von pSer157 bestätigen (Abbildung 24 C)). Während VASP an Ser157 in der Lösemittelkontrolle sowie bei Stimulation mit bis zu 1 μM DETA/NO nicht phosphoryliert vorlag, nahm das Phosphorylierungssignal ab 5 μM DETA/NO zu und erhöhte sich bei 20 μM DETA/NO auf das ca. 5-fache des Signals der Lösemittelkontrolle (Abbildung 24 D)).

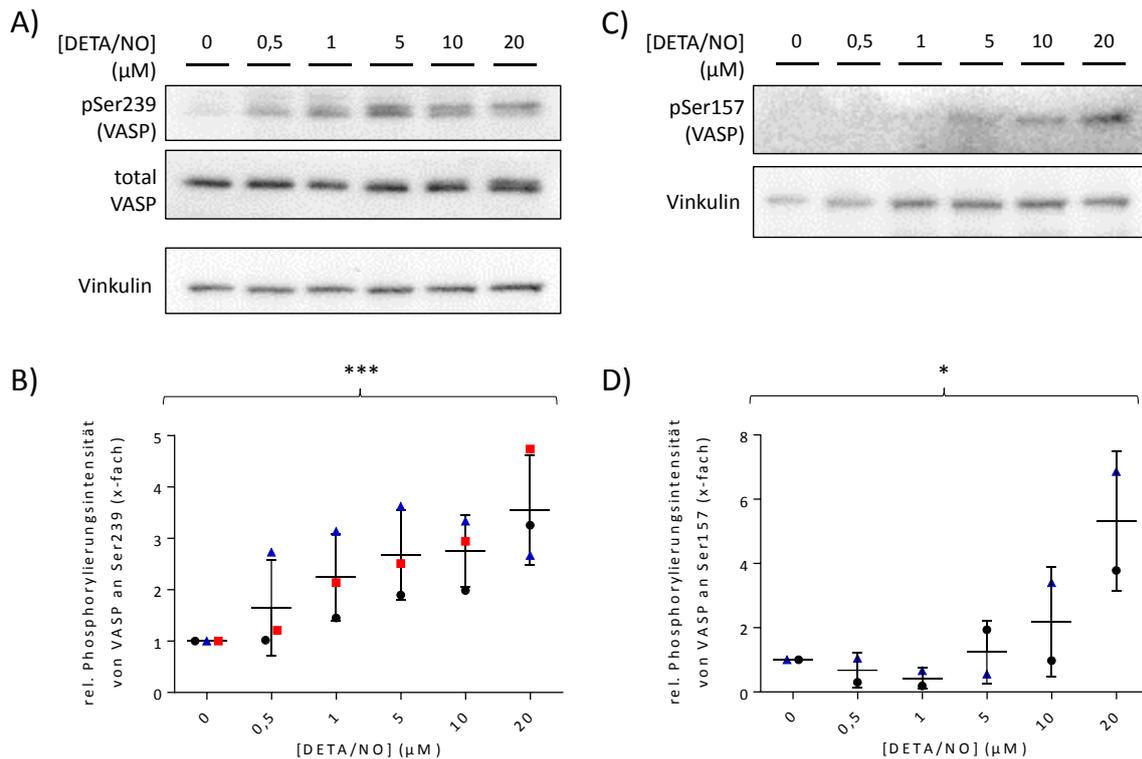


Abbildung 24 Protein-Immunblot der Auswirkung der Stimulation von HSPZ mit bis zu 20 μM DETA/NO auf die Phosphorylierung von VASP. A) bzw. C) Repräsentativer Protein-Immunblot der VASP Phosphorylierung an Ser239 bzw. Ser157 nach Stimulation von HSPZ mit einer Konzentrationsreihe der NO-freisetzenden Verbindung. B) bzw. D) rel. Phosphorylierungssignal von VASP an Ser239 bzw. Ser157 bezogen auf die geladene Proteinmenge in Abhängigkeit der Stimulation mit bis zu 20 μM DETA/NO. Die Phosphorylierung von VASP an Ser157 war nur bei 2 von 3 Spendern detektierbar. Punktdiagramme stellen die Grauwerte der Phosphorylierungsbanden aus n=3 unabhängigen Experimenten rel. zu denen der Ladekontrolle mit der Standardabweichung als Fehlerbalken dar. Geschweifte Klammern verdeutlichen lineare Trends mit zunehmender DETA/NO Konzentration nach gepaarter ANOVA. * = $p < 0,05$; *** = $0,0001 < p < 0,001$.

Um sicherzustellen, dass die Phosphorylierung von VASP durch die Stimulation mit NO ausgelöst worden war, wurden HSPZ zusätzlich mit cPTIO inkubiert. Während Zellen, die nicht oder nur mit dem NO Fängeremolekül inkubiert wurden, eine schwache Grundphosphorylierung von VASP an Ser239 aufwiesen, führte die Stimulation mit DETA/NO zu einer deutlichen Phosphorylierung von VASP an Ser239 und zusätzlich zu einer schwachen Phosphorylierung an Ser157, wie in Abbildung 25 A) und B) ersichtlich. Durch zusätzliche Inkubation mit cPTIO wurde die Phosphorylierung von VASP an Ser239 signifikant verringert. Zusätzlich reduzierte sich auch die Phosphorylierung an Ser157, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant (Abbildung 25 C) und D)). Die Proteinmenge an VASP schien durch Stimulation der Zellen reduziert, jedoch waren die Unterschiede der rel. Proteinmenge von VASP in Bezug auf die Ladekontrolle bei Stimulation mit DETA/NO im Vergleich mit der Lösemittelkontrolle nicht signifikant (Anhang 10 B)).

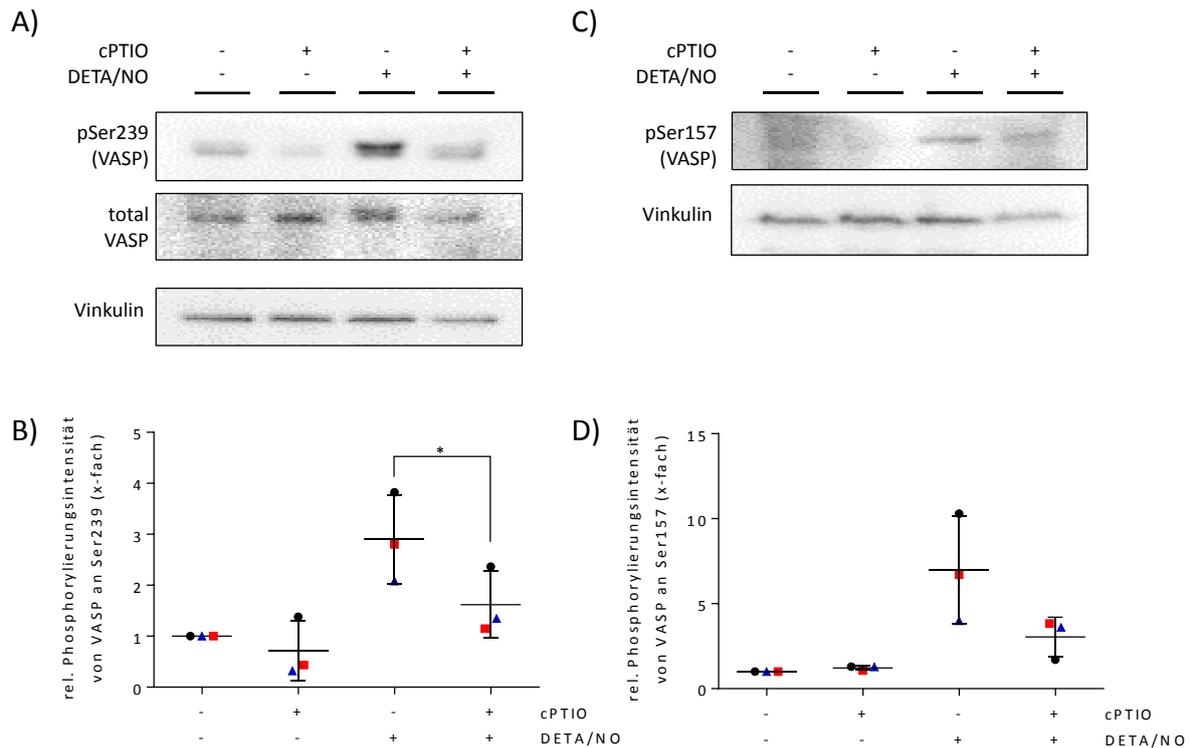


Abbildung 25 Protein-Immunblot der Phosphorylierung von VASP in HSPZ in Abhängigkeit der Stimulation mit DETA/NO und/oder der Inkubation mit cPTIO. A) bzw. C) Repräsentativer Blot der VASP Phosphorylierung an Ser239 bzw. Ser157 nach Stimulation von HSPZ mit 10 μ M DETA/NO und/oder 1,25 mM cPTIO. B) bzw. D) rel. Phosphorylierungsintensität von VASP an Ser239 bzw. Ser157 bezogen auf die geladene Proteinmenge nach Stimulation mit 10 μ M DETA/NO und/oder 1,25 mM cPTIO. Punktdiagramme stellen die Grauwerte der Phosphorylierungsbanden aus $n=3$ unabhängigen Experimenten rel. zur Ladekontrolle mit der Standardabweichung als Fehlerbalken dar. Signifikante Unterschiede der Mittelwerte der Phosphorylierungssignalintensität einzelner Bedingungen und der nur mit DETA/NO behandelten Bedingung nach gepaarter ANOVA sind durch verbindende Linien gekennzeichnet. * = $p < 0,05$.

Die Untersuchung der Phosphorylierung des in der Signalkaskade endständigen Proteins VASP erlaubte die Nachverfolgung des NO/sGC/cGMP Signalweges. Hierzu wurde zunächst die sGC als Target von NO inhibiert und anschließend überprüft, ob dies nach Stimulation mit DETA/NO zu einer Abschwächung der VASP Phosphorylierung führte. Um herauszufinden, ob die Phosphorylierung nach Inhibition der sGC durch ein membrangängiges Analogon von cGMP ausgelöst werden konnte, wurde den Zellen nach Inhibition mit ODQ zusätzlich 8-pCPT-cGMP zugesetzt. Durch Inhibition der PKG mit DT-3 wurde außerdem verfolgt, ob die PKG-abhängige Proteinphosphorylierung nach Stimulation mit DETA/NO oder 8-pCPT-cGMP unterbunden werden konnte. Wie in Abbildung 26 A) dargestellt, lag in der unstimulierten Kontrolle eine schwache Grundphosphorylierung von VASP an Ser239 vor, die durch Stimulation mit DETA/NO verstärkt wurde. Gleichzeitig führte die Zugabe von DETA/NO zur Phosphorylierung von VASP an Ser157. Bloße Inkubation der Zellen mit ODQ schien zu einer

schwachen Phosphorylierung von VASP an Ser239 zu führen. Wie erwartet resultierte die Stimulation mit 8-pCPT-cGMP in der Aktivierung der PKG und so in einem Anstieg der rel. Phosphorylierung von VASP an Ser239. Durch Inhibition der PKG mit DT-3 wurde die grundlegende Phosphorylierung von VASP an Ser239 unterbunden.

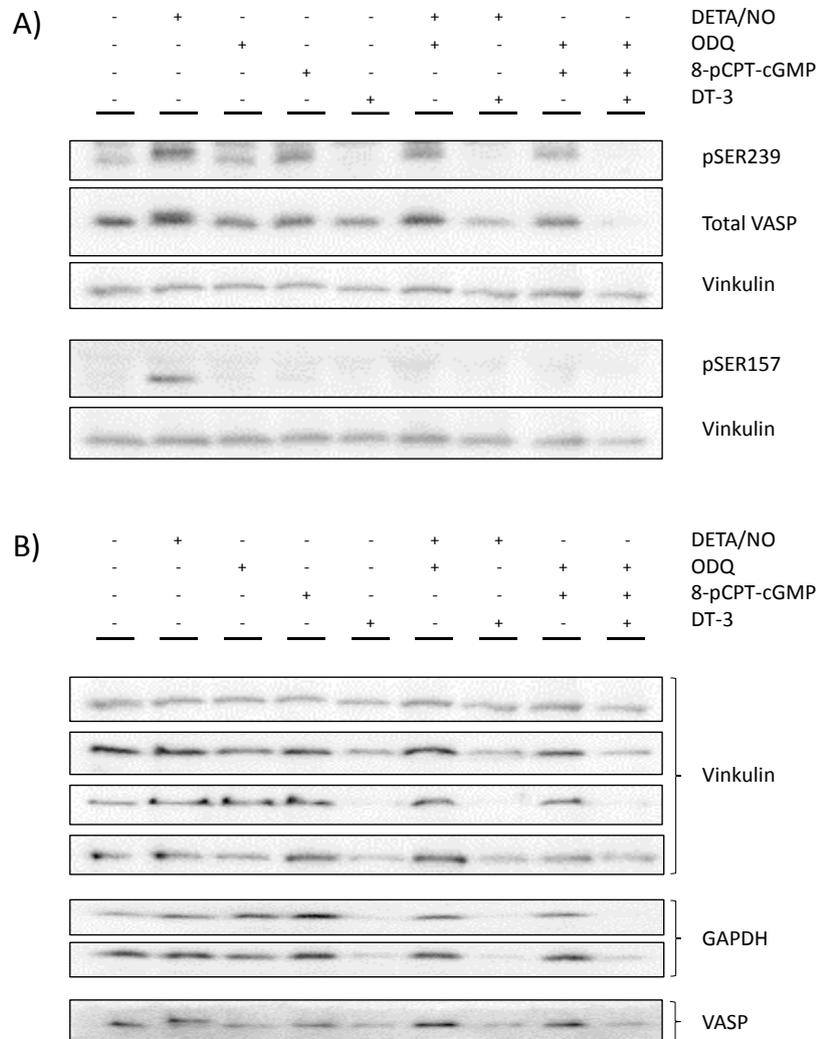


Abbildung 26 Protein-Immunblot zur Nachverfolgung des klassischen NO Signalweges durch Stimulation von HSPZ der NO-freisetzenden Verbindung DETA/NO oder dem cGMP Analogon unter Inhibition einzelner Komponenten des Signalweges. A) Protein-Immunblot der VASP Phosphorylierung an Ser239 bzw. Ser157 nach Stimulation von HSPZ mit 10 μ M DETA/NO, 1 μ M ODQ, 500 μ M 8-pCPT-cGMP und/oder 50 μ M DT-3. B) Vergleich der Ladekontrollen Vinkulin und GAPDH sowie des VASP Signals von Protein-Immunblots von n = 4 Spendern nach Stimulation von HSPZ mit 10 μ M DETA/NO, 1 μ M ODQ, 500 μ M 8-pCPT-cGMP und/oder 50 μ M DT-3.

Zur Quantifizierung der Phosphorylierung von VASP wurde das Phosphorylierungssignal mit dem Signal von VASP ins Verhältnis gesetzt. DT-3 behandelte Gruppen wurden jedoch von der Quantifizierung der Proteinphosphorylierung ausgenommen, da die Zugabe dieses Inhibitors bei vier von fünf Spendern zu einem reduzierten Signal der Ladekontrolle Vinkulin führte, wie in Abbildung 26 B) ersichtlich. Zusätzliche Färbung von GAPDH und VASP zeigte auch bei diesen Proteinbanden ein stark verringertes Signal. Aufgrund des verringerten Proteinsignales der Ladekontrollen wäre der Bezug des Phosphorylierungssignals von VASP auf diese Proteinbande stark fehlerbehaftet. Dennoch schien VASP in DT-3 behandelten Gruppen an Ser239 in unphosphorylierter Form vorzuliegen. Wie in Abbildung 27 A) dargestellt, erhöhte die bloße Inhibition der sGC in HSPZ die rel. Phosphorylierungssignalintensität von VASP an Ser239 nicht. Durch Stimulation mit dem cGMP Analogon 8-pCPT-cGMP zeigte sich im Vergleich zur Lösemittelkontrolle eine erhöhte Signalintensität der Phosphorylierung von VASP an Ser239 und demonstrierte so die cGMP-vermittelte Phosphorylierung an diesem Ser-Rest. Wie erwartet, änderte die vorherige Inhibition der sGC durch ODQ dieses Signal nicht, da cGMP ein der sGC nachgelagertes Signalmolekül darstellt. Ein Anstieg der Phosphorylierung von VASP an Ser157 war lediglich nach der Stimulation der Zellen mit DETA/NO nachweisbar (Abbildung 27 B)). Die gesamte Proteinmenge von VASP schien sich durch Zusatz des cGMP Analogons 8-pCPT-cGMP leicht zu erhöhen, wie in Abbildung 27 C) aufgeführt. Die Unterschiede der Signalintensität von VASP waren hier jedoch nicht signifikant.

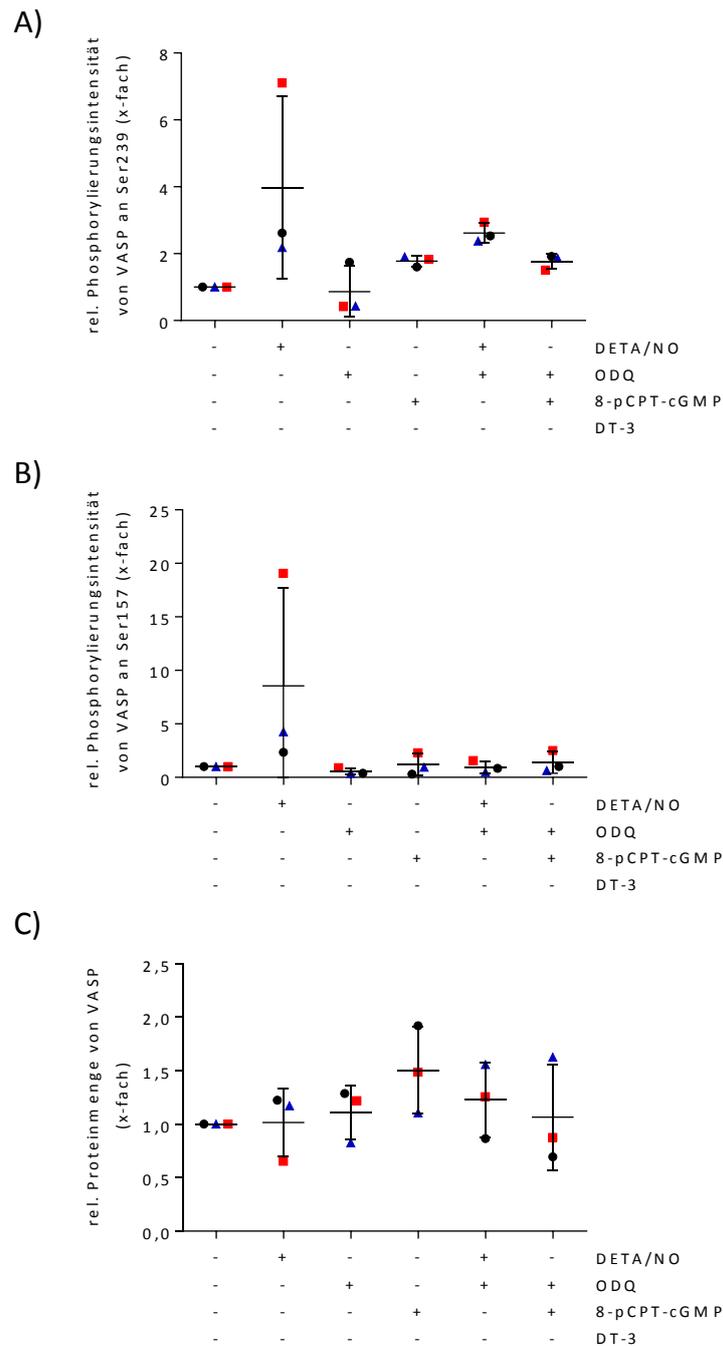


Abbildung 27 Rel. Phosphorylierungs- bzw. Proteinsignalintensität von VASP nach Quantifizierung von Protein-Immunooblots in Abhängigkeit der Stimulation von HSPZ mit 10 μ M DETA/NO, 1 μ M ODQ und/oder 500 μ M 8-pCPT-cGMP. Rel. Intensität des Phosphorylierungssignals von VASP an A) Ser239 bzw. B) Ser157 nach Stimulation von HSPZ mit DETA/NO bzw. dem cGMP Analogon 8-pCPT-cGMP und/oder dem sGC Inhibitor ODQ bezogen auf die Proteinmenge von VASP. C) Rel. Proteinmenge von VASP nach Stimulation von HSPZ mit DETA/NO bzw. 8-pCPT-cGMP und/oder ODQ bezogen auf die geladene Proteinmenge. Punktdiagramme aus $n = 3$ Experimenten zeigen Mittelwerte als Linien mit der Standardabweichung der Mittelwerte als Fehlerbalken. Nach gepaarter ANOVA wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede der Signalintensität einer Behandlungsgruppe zur Signalintensität der Lösemittelkontrolle gefunden.

3.2.6 S-Nitrosylierung von Proteinen in HSPZ erfolgt *in vitro* bei Stimulation mit 10 μ M DETA/NO

Neben der Aktivierung des kanonischen NO/sGC/cGMP Signalwegs kann NO auch über S-Nitrosylierung von Proteinen an physiologischen Prozessen beteiligt sein. Um herauszufinden, ob und ab welcher Konzentration dieser Signalweg aktiv war, wurden hämatopoetische Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von DETA/NO inkubiert und anschließend lysiert. Nach Schützen der freien Cysteinreste wurden die nitrosylierten Thiolreste markiert und mittels Protein-Immunblot analysiert. KG1a Zellen besaßen, wie in Abbildung 28 A) dargestellt, ohne weitere Stimulation ein Grundmaß an nitrosylierten Proteinthiolen, welches durch Zugabe von steigenden Konzentrationen an DETA/NO zunahm. Durch Behandlung der Kontrollgruppen mit GSNO bzw. reduziertem GSH wurde eine Positiv- bzw. Negativkontrolle erhalten, welche die Funktionalität der Methode zeigten. Rel. zur Lösemittelkontrolle erhöhte sich das Maß von S-Nitrosylierungen bei Behandlung von KG1a Zellen mit 1 μ M DETA/NO signifikant auf das 3,4-fache, erreichte bei Stimulation mit 10 μ M DETA/NO ein lokales Minimum (1,8-fache S-Nitrosylierung) und stieg bei höheren Konzentrationen an DETA/NO wieder an. HSPZ wiesen hingegen keine vorübergehende Erhöhung des S-Nitrosylierungsmaßes bei Stimulation mit geringen Konzentrationen an DETA/NO auf. Wie in Abbildung 28 B) ersichtlich, schien das Maß dieser Proteinmodifikation bis zu einer Konzentration von 5 μ M DETA/NO nahezu konstant zu sein. Bei Stimulation mit 10 μ M DETA/NO erhöhte sich das rel. S-Nitrosylierungssignal auf das 3,2-fache der Lösemittelkontrolle. Bei Stimulation mit 15 μ M DETA/NO betrug das Maß an S-Nitrosylierung das 1,6-fache der Kontrolle, während durch Stimulation mit 20 μ M der NO-freisetzenden Verbindung eine Verstärkung der S-Nitrosylierung auf das 3,3-fache der Lösemittelkontrolle einherging.

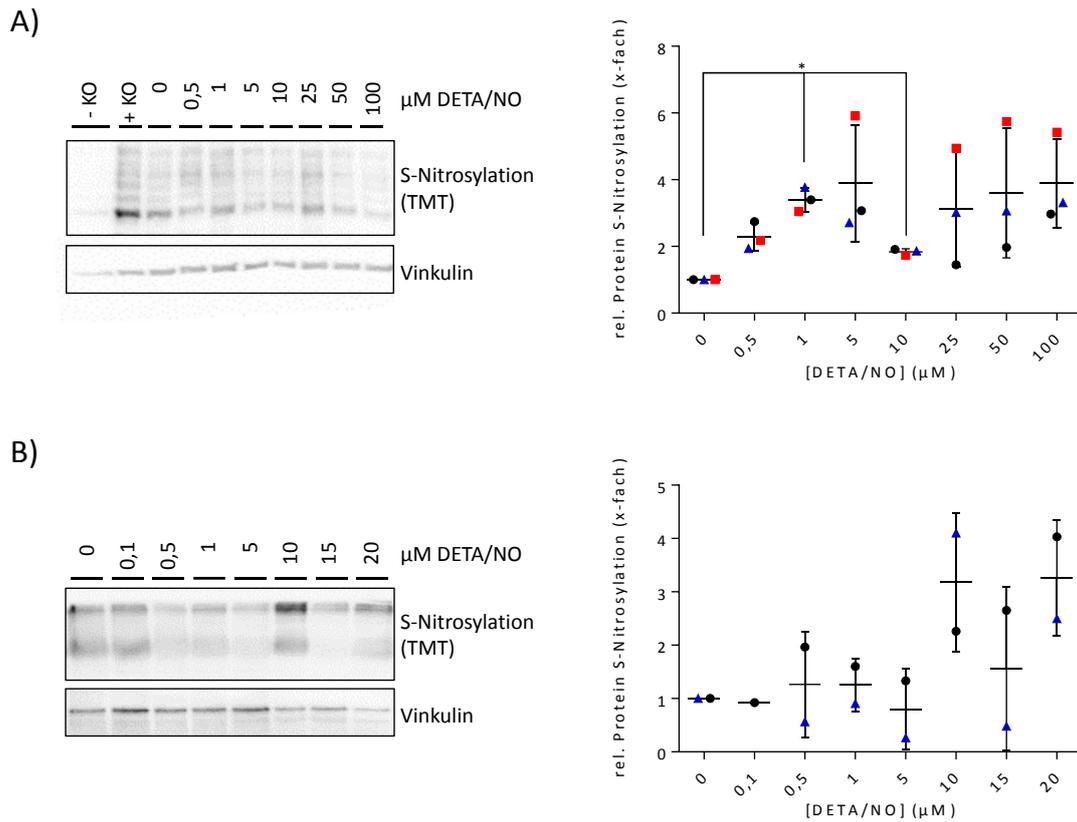


Abbildung 28 Immunblot von S-Nitrosylierten Proteinen nach Stimulation von hämatopoetischen Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an DETA/NO. A) Repräsentativer Blot der S-Nitrosylierung von KG1a Zellen nach Stimulation mit bis zu 100 μM DETA/NO. Positiv- bzw. Negativkontrollen wurden mit 200 μM GSNO bzw. reduziertem GSH behandelt. Die rel. Intensität der S-Nitrosylierungen bezogen auf die unstimulierte Kontrolle ist in Abhängigkeit der zur Stimulation der Zellen eingesetzten DETA/NO Konzentration gezeigt. B) Repräsentativer Blot der S-Nitrosylierung von HSPZ nach fünftägiger Kultur mit bis zu 20 μM DETA/NO und Darstellung der rel. Proteinnitrosylierung bezogen auf die unstimulierte Kontrolle abhängig von der eingesetzten Konzentration der NO-freisetzenden Bedingung. Punktdiagrammdarstellung aus A) $n = 3$ und B) $n = 2$ unabhängigen Versuchen mit dem Mittelwert und der jeweilige Standardabweichung des Mittelwerts als Linie mit Fehlerbalken. Signifikante Unterschiede nach gepaarter ANOVA im Vergleich mit der Lösemittelkontrolle sind durch verbindende Linien gekennzeichnet. * = $p < 0,05$.

3.3 Etablierung eines NO-freisetzenden Heparin/sPEG Hydrogelsystems

3.3.1 Funktionalisierung des Heparin/sPEG Hydrogels mittels Mehrkomponenten-Ugi-Reaktion mit einem photo-sensitiven Nitroanilinderivat

Mittels Mehrkomponenten-Kondensation nach Ugi, wie schematisch in Abbildung 29 dargestellt, wurde das photosensitive 4-Nitro-3-(trifluormethyl)anilin in ddH₂O, das mit HCl auf einen pH-Wert von ca. 3 gebracht wurde, an das Heparin/sPEG Hydrogel angebunden. Die erfolgreiche Bildung des α -Aminoacylamid-Derivates wurde anschließend durch FTIR-Spektroskopie im Modus der ATR überprüft.

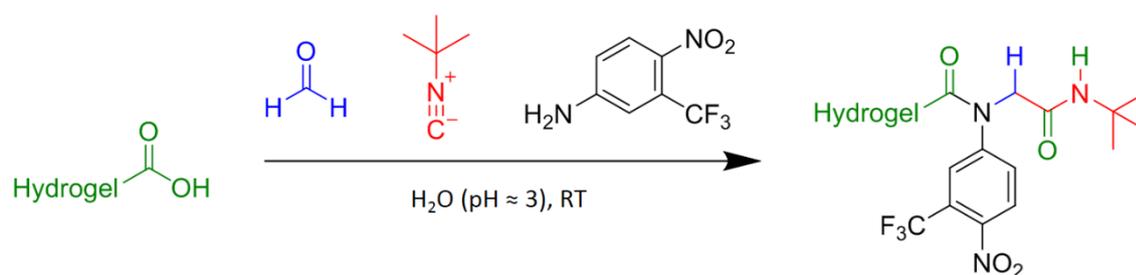


Abbildung 29 Schematische Darstellung der postsynthetischen Funktionalisierung des Heparin/sPEG Hydrogels mittels Mehrkomponenten-Ugi-Reaktion. Überschüssige Carbonsäure-Reste des Heparin/sPEG Hydrogels (grün) wurden bei RT in angesäuertem ddH₂O mit Formaldehyd (blau, 1,3 äq.), Tert-butylisocyanid (rot, 1,3 äq.) sowie 4-Nitro-3-(trifluormethyl)anilin (schwarz, 1 äq.) zu einem α -Aminoacylamid-Derivat reagiert.

Die Spektren, wie in Abbildung 30 A) gezeigt, wiesen nach Funktionalisierung im Vergleich zur Negativkontrolle eine geringere Absorbanz im Bereich von 3200 cm⁻¹ bis 3600 cm⁻¹ auf. Bei diesen Wellenzahlen absorbieren vorrangig O-H und N-H Streckschwingungen, sodass mit der Reaktion eine Reduktion dieser funktionellen Gruppen einherzugehen schien. Zusätzlich veränderten sich durch die Reaktion charakteristische Carbonylschwingungen. Während Banden bei 1621 cm⁻¹ bzw. 1415 cm⁻¹ nach der Reaktion verschwanden, nahm die Absorbanz bei 1745 cm⁻¹ zu. Bei letzterer Energie wird charakteristischerweise die C=O Streckschwingung von beispielsweise Estern oder Amiden angeregt, während die Absorbanz bei 1621 cm⁻¹ zum Beispiel durch die Anregung der asymmetrischen CO₂ Streckschwingung oder NH₂ Deformationsschwingungen hervorgerufen werden kann [364]. Die symmetrische CO₂ Streckschwingung wird bei Wellenzahlen von 1415 cm⁻¹ angeregt. Bei dieser Energie absorbieren jedoch auch C-H und O-H Gruppen, die zur Deformation angeregt werden. Folglich wiesen die mittels ATR erzielten Ergebnisse auf eine Zunahme an Carbonylverbindungen sowie eine Reduktion von OH bzw. NH Gruppen im Hydrogel nach Funktionalisierung mittels Ugi Reaktion hin. Ein

eindeutiger Rückschluss auf die Anbindung der Moleküle war jedoch nicht möglich. Mittels UV/vis Spektrometrie konnte ein weiterer Hinweis auf die Gegenwart des aromatischen Nitroanilin-Derivats erhalten werden, da die Absorbanz des untersuchten Hydrogels bei 370 nm im Vergleich zur Kontrolle deutlich zunahm und sich damit in einem Wellenlängenbereich befand, in dem auch 4-Nitro-3(trifluormethylnitro)anilin absorbierte, wie in Abbildung 30 B) gezeigt. Jedoch erlaubte auch diese Analyse keinen Nachweis für eine kovalente Anbindung des NO-freisetzenden Moleküls an das Heparin/sPEG Hydrogel.

Weiterhin wurden gefriergetrocknete Hydrogelproben mittels ToF-SIMS untersucht, wodurch die Zusammensetzung der obersten Moleküllagen ermittelt werden konnte. Zusätzlich zur Durchführung der Ugi-Reaktion in angesäuertem Wasser wurden Reaktionen in 1 M KCl (aq.) bzw. 1 M Glukose (aq.) durchgeführt, um die Schwellung der Hydrogele während der Funktionalisierung zu reduzieren. Wie in Abbildung 31 A) aufgeführt, konnten bei Hydrogelen, welche in angesäuertem ddH₂O bzw. 1 M Glukose (aq.) funktionalisiert wurden, deutliche NO₂ Signale detektiert werden. In der zugehörigen Negativkontrolle lagen lediglich schwache NO₂ Signale vor. Hydrogele, welche in 1 M KCl (aq.) reagiert wurden, zeigten ein geringes NO₂ Signal, welches eine ca. 1,8-fach höhere Signalintensität aufwies als die Kontrolle. Proben, welche in angesäuertem ddH₂O oder 1 M Glukose (aq.) funktionalisiert wurden, besaßen im Vergleich mit der Kontrolle ein deutlich verstärktes F⁻ Signal (Abbildung 31 B)). Dieser Unterschied war bei Proben, die in 1 M KCl reagiert wurden, nicht ersichtlich. Zusätzlich konnten Fragmente der Tert-butylgruppe (Abbildung 31 C) sowie des Nitroanilinderivats (Abbildung 31 D) in Hydrogelen, welche in angesäuertem ddH₂O bzw. 1 M Glukose (aq.) funktionalisiert wurden, nachgewiesen werden. In den zugehörigen Negativkontrollen waren diese ionisierten Bruchstücke nur geringfügig vorhanden. Die Auftrennung des CF₃-Fragmentes war aufgrund des ähnlichen Masse-zu-Ladungsverhältnisses von C₃O₂H (68,9952 m/z und 68,9977 m/z) nicht möglich. Dennoch konnte aufgrund der Datenlage gefolgert werden, dass die Funktionalisierung des Heparin/sPEG-Hydrogels via Ugi-Reaktion in angesäuertem ddH₂O bzw. 1 M Glukose (aq.) gelang, während die Durchführung in 1 M KCl (aq.) nicht erfolgreich war.

Um herauszufinden, ob die Anbindung der NO-freisetzenden Gruppe an das Hydrogel oberflächlich stattfand oder ob das gesamte Gelvolumen funktionalisiert worden war, wurde ein Tiefenprofil mittels ToF-SIMS durchgeführt. Hierzu wurde ein auf Si immobilisiertes Hydrogel eingesetzt, welches in angesäuertem ddH₂O funktionalisiert wurde. Wie in Abbildung 32 C) sichtbar, wurde während der Messung eine Fläche von 300×300 μm² mit Ar⁺ Clustern beschossen und so nach und nach das getrocknete Gel abgetragen, bis Si detektiert wurde.

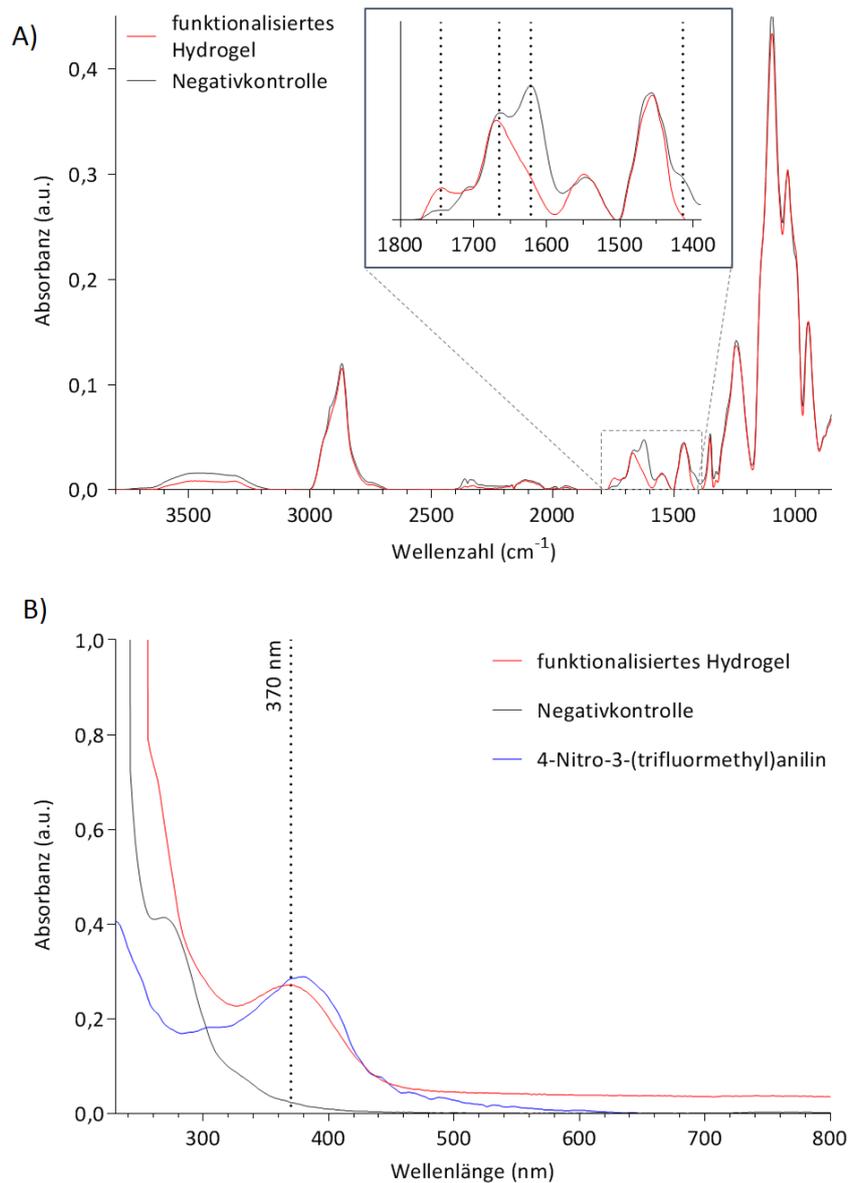


Abbildung 30 Spektroskopische Überprüfung der postsynthetischen Funktionalisierung des Heparin/sPEG Hydrogels mit dem 4-Nitro-3-(trifluormethyl)anilin. A) Repräsentative FTIR/ATR Spektren des funktionalisierten Hydrogels (rot) sowie der Negativkontrolle ohne Zusatz der Aldehyd- und Isocyanidkomponente (schwarz). Die Absorbanz des jeweiligen Materials ist hier in Abhängigkeit der analysierten Wellenzahl aufgetragen. Der vergrößerte Bildausschnitt zeigt den Wellenzahlbereich zwischen 1800 cm^{-1} und 1400 cm^{-1} , in dem typischerweise Carbonylverbindungen angeregt werden ($n = 2$). B) UV/vis Spektren des funktionalisierten Hydrogels (rot), der Negativkontrolle ohne Zugabe der Aldehyd- und Isocyanidkomponente (schwarz) sowie des ungekoppelten 4-Nitro-3-(trifluormethyl)anilins (blau) in PBS. Die Absorbanz des untersuchten Materials ist in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge aufgetragen ($n = 1$).

Aufgrund des großen Überschusses an Sulfatgruppen des Heparins, wurde das maximale Signal der jeweiligen detektierten Fragmente auf 1 gesetzt. Abbildung 32 A) zeigt, dass die Funktionalisierung mit dem Nitroanilin-Derivat im gesamten Gelvolumen stattgefunden hatte. Zwar

nahm die Intensität der NO_2^- - und F^- -Signale mit zunehmender Eindringtiefe in das Gel ab, jedoch konnten beide bis zum Übertritt zu Si nachgewiesen werden. Abbildung 32 B) zeigt die Intensität der für das 4-Nitro-3-(trifluormethyl)anilin charakteristischen Signale NO_2^- sowie F^- im direkten Vergleich des mittels Ugi-Reaktion funktionalisierten Hydrogels und der Negativkontrolle ohne Zusatz der Aldehyd- und Isocyanidkomponente. Beide Gelstücke wiesen eine ähnlich Schichtdicke auf, unterschieden sich jedoch maßgeblich bezüglich der Signalintensität von NO_2^- sowie F^- . Während die in angesäuertem ddH₂O reagierte Probe durchwegs ein deutliches F^- Signal aufwies, war in der Negativkontrolle lediglich ein schwaches Grundsignal des Ions detektierbar. Die Signalintensität von NO_2^- war verglichen mit F^- geringer, welches dadurch erklärbar ist, dass ein Molekül 4-Nitro-3-(trifluormethyl)anilin drei Fluoratome besitzt, aber nur eine licht-sensitive Nitrogruppe aufweist. Das Tiefenprofil der F^- Signalintensität durch das analysierte Gelvolumen verdeutlichte eine starke Funktionalisierung der Oberfläche, die mit zunehmender Eindringtiefe des Nitroanilin-Derivates in das Hydrogel abnahm.

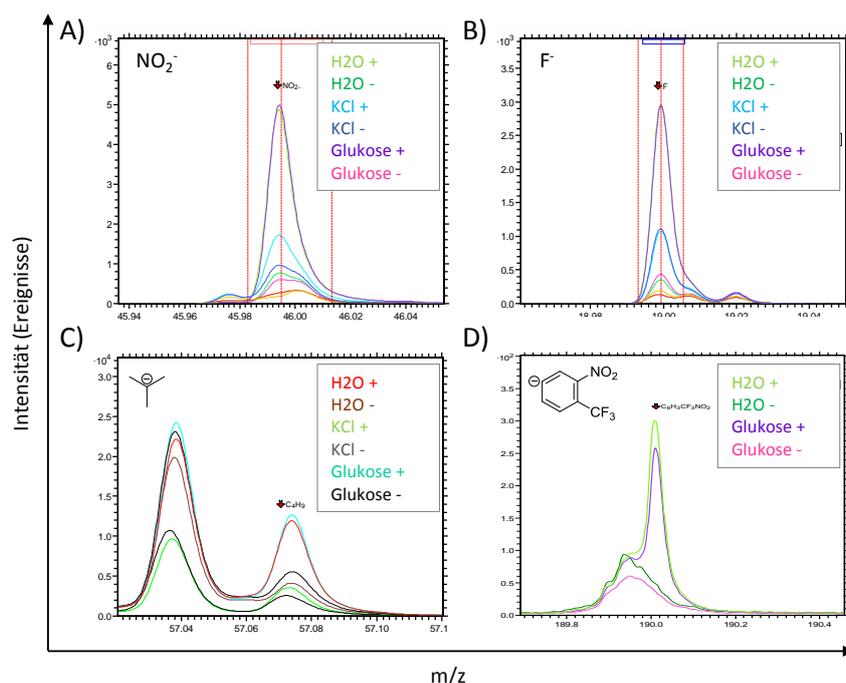


Abbildung 31 Massenspektrometrische Überprüfung der postsynthetischen Funktionalisierung des Heparin/sPEG Hydrogels mit dem 4-Nitro-3-(trifluormethyl)anilin mittelsToF-SIMS. Die Intensität der ionisierten Fragmente A) NO_2^- , B) F^- , C) C_4H_9^- , und D) $\text{C}_7\text{H}_3\text{F}_3\text{NO}_2^-$ ist jeweils in Abhängigkeit des Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) aufgetragen. Getrocknete Heparin/sPEG Hydrogele wurden nach Reaktion mit der 4-Nitro-3-(trifluormethyl)anilin Komponente in angesäuertem Wasser (H_2O^+), 1 M KCl (aq.) (KCl^+) oder 1 M Glukose (aq.) (Glukose^+) analysiert. Für Negativkontrollen wurden Hydrogele ohne Zusatz der Aldehyd- und Isocyanidkomponente mit der 4-Nitro-3-(trifluormethyl)anilin in angesäuertem Wasser (H_2O^-), 1 M KCl (aq.) (KCl^-) oder 1 M Glukose (aq.) (Glukose^-) mitgeführt (bezeichnet: H_2O^- , KCl^- , Glukose^-).

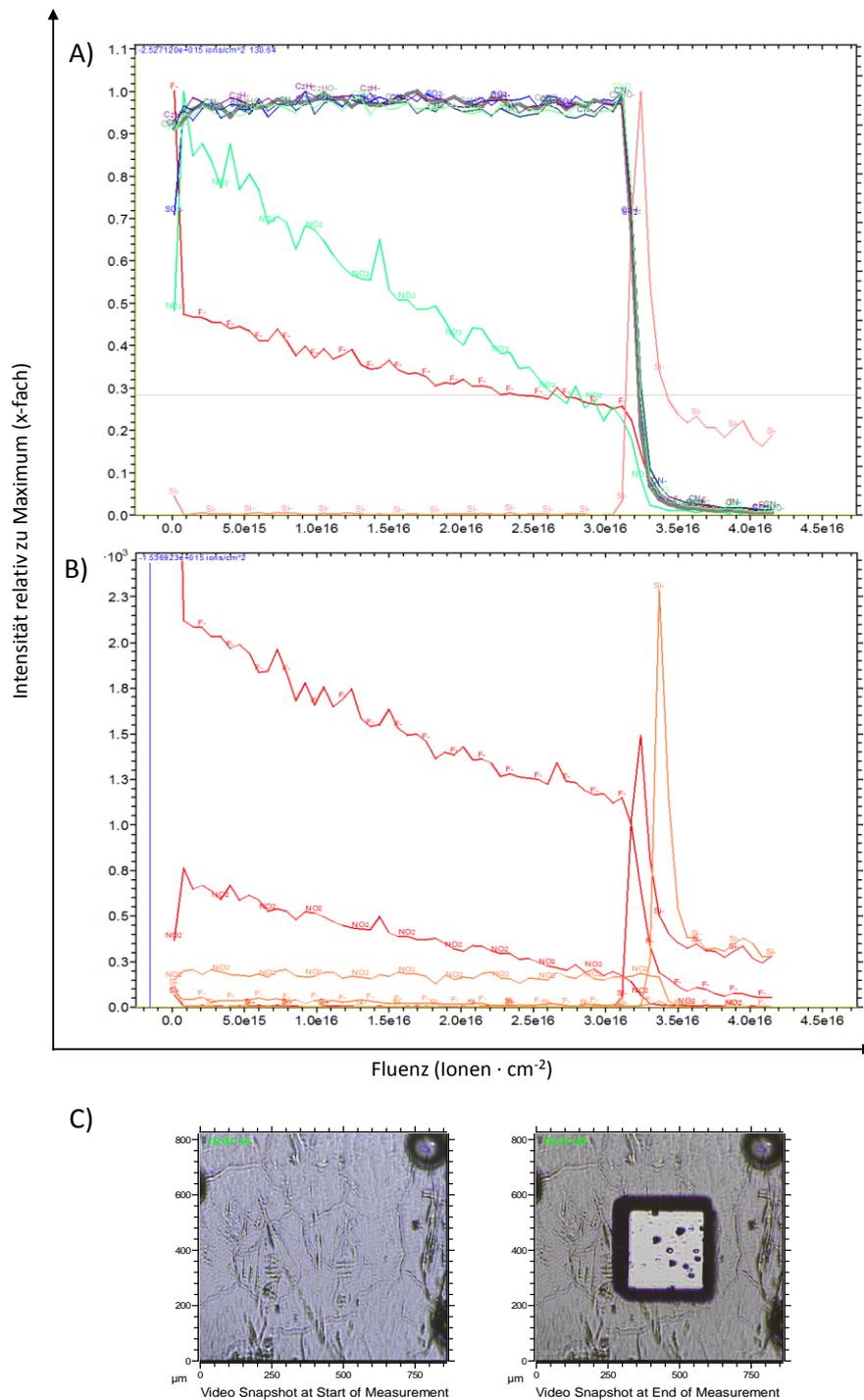


Abbildung 32 Massenspektrometrische Überprüfung der postsynthetischen Funktionalisierung des auf einer Si Oberfläche immobilisierten Heparin/sPEG Hydrogels im gesamten Gelvolumen durch eine Erosionsmessung mittels ToF-SIMS. A) ToF-SIMS Tiefenprofil eines in angesäuertem ddH₂O funktionalisierten Heparin/sPEG Hydrogels zeigt die zum Maximum rel. Intensität charakteristischer Gelfragmente wie SO₂⁻ (blau), C₂H⁻ (violett), C₂HO⁻ (grau), CNO⁻ (hellgrün) in Abhängigkeit der Fluenz, welche mit der Erosionstiefe korreliert. Charakteristische Fragmente des 4-Nitro-3-(trifluormethyl)anilins sind in grün (NO₂⁻) sowie rot (F⁻) dargestellt, während das Signal des unter dem Gel befindlichen Si-Wafers in rosa markiert ist. B) ToF-SIMS Tiefenprofil charakteristischer Fragmente des 4-Nitro-3-(trifluormethyl)anilins, NO₂⁻ und F⁻, eines in angesäuertem ddH₂O funktionalisierten Heparin/sPEG Hydrogels (rot) im Vergleich mit der zugehörigen Negativkontrolle (orange)

ohne Zusatz der Aldehyd- und Isocyanidkomponente. C) Mikroskopische Aufnahmen des Hydrogelstücks (800 x 800 μm) vor und nach der Messung zeigt den Erosionskrater durch Beschuss der Probe mit Ar^+ Clustern.

3.3.2 Elektrochemischer Nachweis der Funktionalität des photosensitiven Heparin/sPEG Hydrogels

Zum Nachweis der Funktionalität des NO-freisetzenden Hydrogels wurde ein elektrochemischer NO Sensor in direkte Nähe zur Geloberfläche gebracht und das Gel mit Licht verschiedener Wellenlängen bestrahlt. Der durch die Detektion von NO an der Elektrode gemessene Stromfluss ist in Abbildung 33 A) gezeigt. Während Licht der Wellenlängen 640 nm und 530 nm keinen nennenswerten Stromfluss induzierte, stieg das Signal bei Belichtung mit Licht im blauen und UV Wellenlängenbereich deutlich an. Nach Abschalten der Lichtquelle (schwarze Linie) sank das detektierte Signal auf den jeweiligen Grundwert zurück. Wie in Abbildung 33 B) dargestellt, wurde auch durch Belichtung des unfunktionalisierten Heparin/sPEG Gels mit Licht der Wellenlängen 455 nm, 400 nm und 365 nm ein Hintergrundsignal erhalten, das von den Messwerten subtrahiert werden musste. So führte beispielsweise eine Belichtung des photo-sensitiven Hydrogels zu einer Freisetzung von 38,2 nM NO nach Abzug des Hintergrundes bei Belichtung mit einer 365 nm Lichtquelle (Abbildung 33 C)). Da die Ergebnisse auf ein Experiment gestützt sind, handelt es sich um vorläufige Daten, die in weiteren Experimenten verifiziert werden müssen.

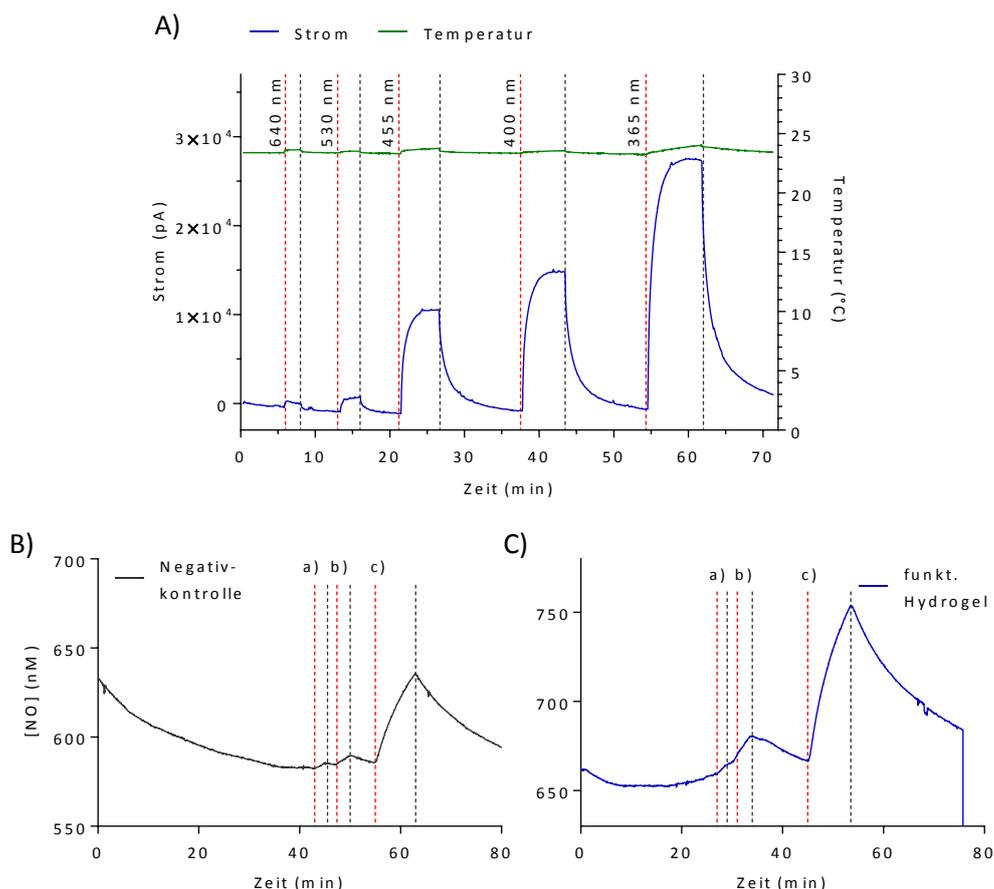


Abbildung 33 Elektrochemische Messung der lichtinduzierten Freisetzung von NO mittels einer NO-sensitiven Elektrode in PBS. A) An der Elektrode gemessener Strom (blau) an der Oberfläche des funktionalisierten Heparin/sPEG Hydrogels durch NO Freisetzung sowie die gemessene Temperatur (grün) in Abhängigkeit der Messzeit. Belichtung mit LEDs der Wellenlängen 640 nm, 530 nm, 455 nm, 400 nm und 365 nm sind durch gestrichelte Linien markiert. Rote bzw. schwarze Striche verdeutlichen den Zeitpunkt des An- bzw. Abschaltens der Lichtquelle ($n = 1$). B) bzw. C) Errechnete Konzentration von freigesetztem NO (aus gemessenem Strom) an der Oberfläche eines unfunktionalisierten bzw. funktionalisierten Heparin/sPEG Hydrogels in Abhängigkeit der Messzeit. Durch Kalibrierung der Elektrode mit Nitrit wurde die Umrechnung des gemessenen Stromes in die Konzentration von NO ermöglicht. Gestrichelte Linien verdeutlichen das Einschalten (rot) bzw. Abschalten (schwarz) der Lichtquelle mit den Wellenlängen a) 455 nm, b) 400 nm und c) 365 nm ($n = 1$).

3.3.3 NO-freisetzendes Heparin/sPEG Hydrogel ist zellverträglich

Um zu untersuchen, ob die Funktionalisierung des Heparin/sPEG Hydrogels einen negativen Effekt auf die Zytokompatibilität der Gele gegenüber HSPZ hatte, wurden HSPZ für 72 h auf funktionalisierten und nicht funktionalisierten Hydrogelen sowie Referenzoberflächen kultiviert. Die Zellen wurden anschließend über eine Lebend/Tot Färbung sowie durchflusszytometrisch mittels Annexin V/Sytox Färbung analysiert. Abbildung 34 A) zeigt, dass HSPZ auf beiden Hydrogeltypen ähnlich stoffwechselaktiv waren und kaum tote Zellen detektierbar waren.

Dieses Verhalten konnte auch in der Negativkontrolle (TCPS) beobachtet werden. Die Funktionalität des Assays wurde durch die TCPS Kontrolle nachgewiesen, der 1% Triton X-100 zugesetzt wurde. Die Beobachtungen deckten sich mit den Ergebnissen der Annexin V/Sytox Färbung, wie in Abbildung 34 B) dargestellt. Hier lag der vitale Zellanteil an HSPZ, welche auf Hydrogelen kultiviert wurden, bei ca. 93%, während auf TCPS 87,5% doppelnegative Zellen vorlagen. Folglich beeinflusste die Funktionalisierung der Hydrogele mittels Ugi Reaktion die Zellverträglichkeit der Heparin/sPEG Hydrogele nicht. Die Ergebnisse basieren auf einem Versuch, sodass weitere Wiederholungen nötig sind, um eine abschließende Aussage zu treffen.

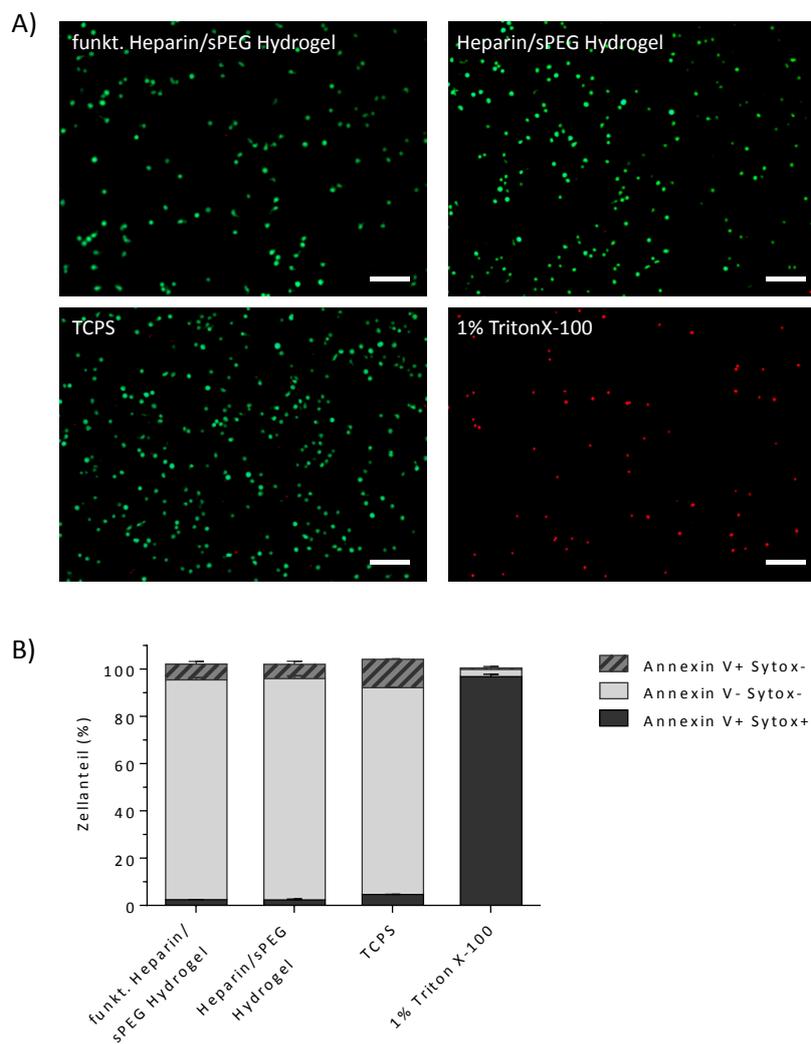


Abbildung 34 Überprüfung der Zytokompatibilität unfunktionalisierter und funktionalisierter Heparin/sPEG Hydrogele gegenüber HSPZ. A) Lebend/Tot Färbung von HSPZ nach 72 h Kultur auf den Testoberflächen sowie TCPS bzw. TCPS + 1% TritonX-100 als Referenzoberflächen. Metabolisch aktive Zellen erscheinen durch die Färbung mit Calcein AM grün, während tote Zellen eine permeable Zellmembran aufweisen und rot gefärbt sind. B) Annexin V/Sytox Färbung von HSPZ nach 72 h Kultur auf funktionalisierten und unfunktionalisierten Heparin/sPEG Hydrogelen bzw. TCPS bzw. TCPS + 1% Triton X-100 (Negativ- bzw. Positivkontrolle). Annexin V⁻ Sytox⁻ (hellgrau) Zellen sind vital, während apoptotische bzw. tote Zellen Annexin V⁺ Sytox⁻ (gestreift) bzw. Annexin V⁺ Sytox⁺ (dunkelgrau) sind. Mittelwert aus einem technischen Duplikat (n = 1), Maßstab = 100 μ M.

4 Diskussion

Ziel vorliegender Arbeit war die Untersuchung des konzentrationsabhängigen Einflusses von NO auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten humaner HSPZ *in vitro*. Hierzu sollte zunächst eruiert werden, ob NO ein Signalmolekül darstellt, welches von HSPZ selbst generiert werden kann.

4.1 HSPZ aus Nabelschnurblut und MSZ aus Knochenmark produzieren *in vitro* kein NO

Um die Wirkung von NO auf die Differenzierung und Proliferation von HSPZ untersuchen zu können, war die Kontrolle der freien Konzentration an NO essentiell. Hierfür wurde eine NO-freisetzende Verbindung verwendet, welche in definiertem Maß geringe Konzentrationen an NO über lange Zeiträume freisetzt. Eine zusätzliche autologe Produktion von NO durch HSPZ könnte dabei beobachtete Effekte verfälschen. Da durch den genetischen *knock-out* oder die pharmakologische Inhibition von NOS ein Einfluss auf die Aktivität muriner HSZ beobachtet wurde [316] und zusätzlich gezeigt wurde, dass die Inkubation muriner, hämatopoetischer Progenitorzellen mit einem NO Fänger-molekül die Proliferation der Zellen beeinflusste [315], konnte die autologe NO Produktion durch HSPZ nicht von Anfang an ausgeschlossen werden. Entgegen dieser Studien, welche auf murinem Zellmaterial basierten, konnte in vorliegender Arbeit in humanen CD34⁺ HSPZ keine Expression einer der drei NOS Isoformen mittels RT-PCR nachgewiesen werden, sodass HSPZ nach Isolation aus Nabelschnurblut nicht zur autologen NO Produktion fähig waren.

Während in Zebrafischen gezeigt wurde, dass die NOS2 Isoform durch entzündliche Zytokine in HSZ induziert wird [318], wurde auch in der Mehrzahl der Arbeiten mit murinen Zellen ein parakriner Einfluss von NO auf HSZ postuliert. Im Menschen exprimieren reife, hämatopoetische Zellen, wie Granulozyten, Megakaryozyten und Blutplättchen [365], Neutrophile [366] und Makrophagen NOS Isoformen [367] und könnten so als Nischenelemente zur Regulation von HSZ durch NO beitragen. Zusätzlich produzieren Osteoblasten NO [368], abhängig von der mechanischen Beanspruchung oder Östrogen-abhängigen Signalwegen und stellen somit potentiell Quellen von NO in der HSZ Nische dar. Parakrine Einflüsse von NO auf murine HSZ basierten oft auf der Produktion des Signalmoleküls durch Nischenzellen, wie Endothelzellen oder MSZ [77, 317, 337, 369-372]. In vorliegender Arbeit wurde daher zusätzlich mittels RT-

PCR die NOS Expression in humanen MSZ aus Knochenmark überprüft. Während die Expression der NOS Isoformen NOS1, NOS2 und NOS3 in den jeweiligen Kontrollen HaCat, Caco-2 und THP-1 eindeutig nachgewiesen werden konnte, war in humanen MSZ von drei Spendern *in vitro* keine Expression einer NOS Isoform detektierbar.

Im murinen Knochenmark wurde freies NO gemessen, dessen Produktion auf die Expression der NOS3 sowie zum Teil auf die Expression von NOS2 zurückgeführt wurde [328]. Andere Veröffentlichungen identifizierten mRNA jeder NOS Isoform im murinen Knochenmark [316, 320]. Die fehlende Expression von NOS in humanen MSZ aus Knochenmark könnte auf speziesspezifische Unterschiede zwischen dem murinen und humanen System hinweisen. So wurde am Beispiel von Makrophagen gezeigt, dass die NOS2 in humanen Zellen nur schwer induzierbar ist, während murine Zellen leicht zur Produktion von NO angeregt werden können [367]. Auch die freigesetzten NO Konzentrationen wichen hier deutlich voneinander ab. Zusätzlich wurden in oben genannten Studien eine Mischung verschiedenster Zelltypen aus dem murinen Knochenmark analysiert, welche potentiell Quellen für NO darstellen könnten, während in vorliegender Arbeit lediglich MSZ untersucht wurden. Daher scheinen im humanen System andere Nischenzellen, wie reife, hämatopoetische Zellen oder Endothelzellen die NO Produktion in der HSZ Nische sicherzustellen. Auch im murinen Modellsystem vermittelt letzterer Zelltyp indirekte Effekte von NO auf HSZ [369, 370]. Die Expression von NOS Isoformen in humanen Endothelzellen aus Knochenmark wurde in vorliegender Arbeit nicht überprüft. Grundsätzlich stellt Endothel eines der Zellsysteme dar, welches im humanen System typischerweise zur NO Produktion *in vivo* beiträgt [107]. Auch *in vitro* produzieren viele Endothelzelltypen NO [294, 373-376]. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint NO kein autokrin wirkendes Signalmolekül darzustellen, sondern parakrin zu wirken und von Nischenkomponenten, wie Endothelzellen oder reifen hämatopoetischen Zellen, generiert zu werden.

4.2 Bis zu 20 μM DETA/NO sind für HSPZ verträglich und setzen *in vitro* physiologisch relevante NO Konzentrationen frei

Frühe Studien, welche NO-abhängige Effekte auf humane CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut oder Knochenmark untersuchten, verwendeten für *in vitro* Versuche hohe Konzentrationen von bis zu 1000 μM DETA/NO [314, 332]. Von den eingesetzten Konzentrationen der NO-freisetzenden Verbindung auf die real vorliegende NO Konzentration zu schließen ist nicht trivial. Pro mol DETA/NO werden 2 mol NO generiert, die Halbwertszeit des Zerfalls der NO-freiset-

zenden Verbindung wurde bei 37 °C in PBS auf 20 h bestimmt [212]. Die Zerfallskinetik löslicher NO-generierender Moleküle in PBS lässt sich jedoch nicht direkt auf die Rate der NO-Generation *in vitro* übertragen, da sich in Zellkulturexperimenten ein komplexes Gleichgewicht von Mediumkomponenten, der freisetzen Verbindung und NO selbst einstellt [362]. Die freie Dosis von NO, welcher die Zellen ausgesetzt sind, wird durch die Veränderung des Gleichgewichtes während der Freisetzung verschoben u.a. durch die abnehmende Konzentration der freisetzen Spezies. Des Weiteren ist die Lebensdauer von freiem NO abhängig von der Konzentration und den Umgebungsbedingungen, wie der lokalen O₂ Konzentration, und variiert entsprechend von wenigen Millisekunden bis zu einigen Sekunden [377, 378]. Mittels einer speziellen Messkammer wurde freies NO unter Zellkulturbedingungen gemessen, welches durch eine gaspermeable Membran unterhalb der Zellkultureinheit diffundieren und anschließend über Chemilumineszenz nach Reaktion mit Ozon detektiert werden konnte [362]. Hier setzten 25 µM DETA/NO in PBS über 24 h niedrige Konzentrationen an NO in konstantem Maß frei ($8,11 \cdot 10^{-14}$ mol/cm²/s). In serumhaltigem DMEM bei 37 °C verringerte sich die Freisetzung um eine Größenordnung ($7,22 \cdot 10^{-15}$ mol/cm²/s), während sich die Freisetzungskinetik durch zusätzliche Gegenwart von 5% CO₂ deutlich veränderte und verstärkt NO generiert wurde ($1,32 \cdot 10^{-13}$ mol/cm²/s) [362]. Die Freisetzung von NO war hier nicht länger konstant sondern reduzierte sich kontinuierlich [362]. Diese Messung verdeutlicht, dass die Abschätzung der NO-Freisetzungskinetik durch lösliche Verbindungen wie NONOate maßgeblich von den Zellkulturbedingungen beeinflusst wird und von der einfachen Zerfallskinetik in PBS abweicht. Bei einer in der Literatur oft verwendeten Abschätzung der Lebensdauer von NO von wenigen Sekunden entspricht die Freisetzung durch 25 µM DETA/NO in serumhaltigem Medium unter 5% CO₂ Atmosphäre wenigen pM NO. Da in jener Studie nur die Konzentration von freigesetztem NO bestimmt wurde, die den Boden des Zellkulturgefäßes erreichte, wurde die gesamte freigesetzte NO-Konzentration im Medium unterschätzt. In einer anderen Publikation, welche die Freisetzung von NO durch DETA/NO über Chemilumineszenz-Messung in Zellkulturmedium bestimmte, korrelierten 10 µM, 30 µM und 60 µM DETA/NO mit einer freien NO-Konzentration von jeweils 2 nM, 33 nM und 52 nM und wurden daher auf ca. 1 Tausendstel der eingesetzten DETA/NO-Konzentration abgeschätzt [292]. Dieser Einschätzung wurde auch in vorliegender Arbeit gefolgt.

Die in frühen Studien mit HSPZ eingesetzten Konzentrationen von bis zu 1000 µM DETA/NO korrelierten daher basierend auf dieser Abschätzung mit freien Konzentrationen von ca. 1 µM NO und stellen so keine physiologisch relevanten Konzentrationen des Signalmoleküls dar [133]. Grundlegend exprimierte NOS-Isoformen produzieren NO im Konzentrationsbereich

von pM bis wenigen nM, während die Expression der NOS2 diese Konzentrationen übersteigt und NO im erhöhten nM Bereich freisetzt [133]. Um einen physiologisch relevanten Konzentrationsbereich zu untersuchen, wurden in vorliegender Arbeit 0,05 μM bis 500 μM DETA/NO eingesetzt, welche laut der oben ausgeführten Abschätzung mit NO Konzentrationen von ca. 50 pM bis 500 nM korrelieren sollten. Mittels Annexin V/Sytox Färbung wurde nach fünftägiger Kultur die EC_{50} bezogen auf den vitalen Zellanteil auf 31,5 μM DETA/NO bestimmt. Diese Konzentration lag deutlich unter der Konzentration von 1 mM DETA/NO, welche in der Literatur für $CD34^+$ Zellen aus Nabelschnurblut als toxisch beschrieben wurde [332]. In diesen Versuchen wurden Zellen jedoch lediglich bis zu 4 h mit der NO-freisetzenden Verbindung inkubiert, sodass vermutet werden kann, dass höhere NO Konzentrationen von HSPZ für kürzere Zeitspannen toleriert werden können. Andere Veröffentlichungen zeigten, dass 100 μM DETA/NO in humanen $CD34^+$ Zellen aus dem Knochenmark zur Einleitung von Apoptoseprozessen und zur DNA Fragmentierung führte [314]. Im Einklang mit diesen Daten wurden bei dieser Konzentration in vorliegender Arbeit nach fünftägiger Kultur kaum vitale Zellen gefunden.

In verschiedenen Übersichtsartikeln wurde das Konzentrationsfenster für physiologisch relevante Signalwege basierend auf *in vitro* Versuchen auf bis zu 50 nM NO abgeschätzt, während nitrosativer Stress ab ca. 1 μM NO angenommen wurde [98, 141]. Effekte auf humane HSPZ wurden jedoch bereits bei geringeren Konzentrationen von NO beobachtet. Ein Grund für die erhöhte Sensitivität von HSPZ im Vergleich zu anderen Zelltypen, welche für diese *in vitro* Studien herangezogen wurden, könnten die in Stammzellen stark regulierten Apoptoseprozesse sein [379, 380]. Andauernder Stress sowie die Gegenwart von reaktiven Spezies, wie ROS und RNS, erhöhen das Risiko von DNA-Schäden und damit einhergehenden malignen Transformationen. Das Einleiten von Apoptoseprozessen in derart geschädigten Zellen sichert das Überleben des Organismus, indem es einer möglichen Tumorentstehung vorbeugt [381]. Dies lässt darauf schließen, dass HSPZ sensitiver als andere Zelltypen auf erhöhte NO Konzentrationen reagieren, wie sie von 50 μM DETA/NO oder höher frei werden. Konzentrationen von 30 μM und höher, bei denen toxische Effekte auf HSPZ beobachtet wurden, könnten durch nitrosative Spezies wie N_2O_3 vermittelt worden sein, da diese reaktiven Spezies mit der Zytotoxizität hoher Konzentrationen von DETA/NO in Verbindung gebracht wird [382]. NO in diesem Konzentrationsbereich übersteigt höchstwahrscheinlich NO Konzentrationen, wie sie *in vivo* von NOS3 synthetisiert werden [133]. Basierend auf Literaturrecherche und mathematischer Modellierung wurden in dieser Veröffentlichung die *in vivo* vorliegenden Konzentrationen an NO, welche

physiologische Prozesse vermitteln, auf 100 pM bis 5 nM abgeschätzt [133]. Dieser Konzentrationsbereich korreliert gut mit dem in vorliegender Arbeit bestimmten Stimulationsfenster, wenn näherungsweise von einer Konzentration an freiem NO ausgegangen wird, welches um drei Größenordnungen geringer ist als die gewählte DETA/NO Konzentration. Niedrige Konzentrationen von DETA/NO bis ca. 10 μM waren spenderunabhängig zellverträglich und entsprachen Konzentrationen von wenigen nM NO. Der steile Abfall der ermittelten Dosis-Wirkungs-Kurven verdeutlicht dabei, dass in diesem Übergangsbereich bereits geringfügige Änderungen der Konzentration einen erheblichen Einfluss auf die Vitalität der Zellen haben kann. Daher resultierten bei NO Konzentrationen in diesem Übergangsbereich, wie durch Stimulation mit 25 μM DETA/NO, hohe Standardabweichungen des vitalen Zellanteils.

Zusammenfassend wurde in vorliegender Arbeit ein Konzentrationsfenster von DETA/NO ermittelt, welches physiologisch relevante Konzentrationsbereiche von NO abdeckte. Während Konzentrationen von über 30 μM DETA/NO über RNS wie N_2O_3 wahrscheinlich nitrosativen Stress auf HSPZ ausübten und so toxisch für Zellen waren, waren DETA/NO Konzentrationen bis ca. 10 μM über mehrere Tage zellverträglich und nicht mit der Einleitung von Apoptoseprozessen verbunden. Dieses Konzentrationsfenster bis 5-10 μM DETA/NO sollte dabei mit NO Konzentrationen korrelieren, welche durch konstitutiv exprimierte NOS Isoformen produziert werden [133], während höhere Konzentrationen solchen entsprechen könnten, wie sie von NOS2 nach Induktion durch entzündliche Zytokine freigesetzt werden [98, 141].

4.3 NO beeinflusst die Proliferation von HSPZ *in vitro* in biphasischer Art und Weise

Um die Auswirkung der NO Stimulation auf das Proliferationsverhalten von HSPZ zu untersuchen, wurden die Zellen mit CTV gefärbt und die Farbstoffverdünnung durch Zellteilungsergebnisse durchflusszytometrisch analysiert. Bei einzelnen Spendern wurde in Gegenwart von 5 μM DETA/NO eine Zunahme der Zellproliferation beobachtet. Ebenso resultierten bei fünf-tägiger Kultur ungefärbter HSPZ mit geringen Konzentrationen von DETA/NO (0,5 μM bis 5 μM) erhöhte Zellzahlen. Die bloße Erhöhung der Zellzahl an ungefärbten Zellen reicht nicht aus, um auf die im Vergleich zur Kontrolle vermehrte Proliferation der Zellen zu schließen, da auch indirekte Effekte, wie verringerte Apoptoseprozesse in der Zellpopulation zu einer Zunahme der Zellzahl rel. zur Kontrolle führen könnte. So erhöhte in einer Studie zu embryonalen Stammzellen die Stimulation mit 2-20 μM DETA/NO die Zellzahl durch die NO-vermittelte Unterdrückung von Apoptoseprozessen [298]. Auch in humanen, mononukleären Zellen aus

Nabelschnurblut wurde gezeigt, dass NO Apoptosevorgänge unterdrücken kann [383]. Jedoch weisen die in vorliegender Arbeit spenderabhängig beobachteten, erhöhten Anteile an Zellen mit geringer CTV Fluoreszenzintensität auf eine erhöhte Zellteilungsaktivität von HSPZ hin. Ähnliche Effekte wurden in murinen HSPZ beschrieben, welche zusammen mit 10 μM bzw. 100 μM der NO-freisetzenden Verbindung S-Nitroso-N-Acetyl-Penicillamin kultiviert wurden. Hier führte exogen zugeführtes NO zu einer erhöhten Anzahl von HSZ und hämatopoetischen Progenitorzellen (HPZ), welche aktiv proliferierten [322]. Dies wurde an Tag 1 und 2 der Kultur durch den verstärkten Einbau des Thymidinanalogs BrdU in die zelluläre DNA, die Zunahme an Ki-67⁺ Zellen sowie durch Zellzyklusanalysen zur Bestimmung des DNA-Gehaltes in Gegenwart von NO gezeigt. Die Beobachtungen aus diesen Studien unterstützen die Schlussfolgerung aus den oben beschriebenen Daten der vorliegenden Arbeit, dass geringe Konzentrationen an DETA/NO die Anzahl an HSPZ in Kultur erhöhen, indem die Zellen durch NO verstärkt zur Proliferation angeregt werden.

Die DETA/NO Konzentrationen, bei denen ein Anstieg der HSPZ Proliferation beobachtet wurde, korrelieren mit Konzentrationsbereichen, bei denen der klassische NO-Signalweg aktiviert wurde, wie anhand der NO-abhängigen Phosphorylierung von VASP gezeigt. Es wurden verschiedenste Interaktionspartner von NO beschrieben, welche in den Zellzyklus oder mitogene Signalwege eingreifen können. So wurden verschiedene redox-sensitive Modifikationen, wie S-Nitrosylierung von Proteinen, beschrieben, welche die Proliferation von Zellen verstärkten. In Brustkrebszelllinien beeinflusste NO beispielsweise das Zellteilungsverhalten durch verstärkte Translation von Zellzyklusregulatoren, wie Cyclin D1 und der Ornithin Decarboxylase [292]. Diese wurden durch mitogene Signalwege, wie den Raf/MEK/ERK oder PI3K/Akt Signalweg vermittelt, indem 30-60 μM DETA/NO cGMP-unabhängig Ras aktivierte. Weiterhin wurde die Aktivierung von Ras durch S-Nitrosylierung in HeLa und HUVEC Zellen beschrieben [294]. In der Promyelozyten-Zelllinie HL-60 wurde durch Stimulation mit 10 μM bis 50 μM DETA/NO eine erhöhte Expression von Zellzyklusregulatoren wie der Cdk2 und den Cyclinen B und E festgestellt [293]. Auch dieser Effekt war redox-sensitiv und wurde daher auf die Aktivierung der Cdk2 durch S-Nitrosylierung zurückgeführt. Ein Großteil der in diesen Studien beschriebenen Effekte basiert auf der Arbeit mit Tumorzelllinien. Die hierbei identifizierten Angriffspunkte und Signalwege sind nicht zwangsläufig auf Primärzellen aus gesundem Gewebe übertragbar, da regulatorische Proteine des Zellzyklus in Krebszellen durch Mutationen verloren sind oder überexprimiert vorliegen [384]. Es wurden ebenfalls proliferative Effekte beschrieben, die auf den klassischen NO-vermittelten Signalweg zurückgeführt wurden. Beispielsweise wurde in murinen, neuronalen Stammzellen ein langfristiger proliferativer Effekt

von DETA/NO über cGMP-abhängige Signalwege beschrieben, da die Inhibition der sGC die Proliferation der Zellen unterband, während ein cGMP Analogon die Proliferation der Zellen erhöhte [296].

Aufgrund der lediglich bruchstückhaft verstandenen unterstützenden Wirkung von NO auf die Proliferation von Zellen ist es schwierig einen Mechanismus für die Vermittlung der proliferationsfördernden Effekte von NO zu postulieren. Aufgrund des niedrigen Konzentrationsbereiches der beobachteten proliferationsfördernden Effekte liegt die Vermutung nahe, dass die erhöhte Proliferation von HSPZ über den klassischen NO Signalweg vermittelt wurde, da die S-Nitrosylierung von Proteinen erhöhte NO Konzentrationen erfordert [161]. Der Beweis für den direkten Zusammenhang muss allerdings noch durch den Verlust des beobachteten Effektes nach Inhibition der sGC oder die vermehrte Proliferation von HSPZ durch Stimulation mit einem cGMP Analogon erbracht werden. Ob NO in vorliegender Arbeit cGMP-abhängig mitogene Signalwege, wie den MAPK Signalweg, beeinflusste, muss durch weitere Versuche gezeigt werden. Nichtsdestotrotz lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit den Schluss zu, dass geringe Konzentrationen von NO, wie sie von 0,5-5 μM DETA/NO freigesetzt werden, über die Aktivierung des klassischen NO-Signalweges cGMP-abhängig die Proliferation von HSPZ fördern.

Neben dem proliferationsvermittelnden Einfluss von NO bei niedrigen Konzentrationen von DETA/NO wurde in dieser Arbeit in höheren Konzentrationsbereichen eine durch NO induzierte verringerte Proliferation humaner HSPZ gefunden. Dies wurde durch erhöhte Zellanteile deutlich, welche lediglich eine oder zwei Zellteilungen durchlaufen hatten. Die Berechnung des Proliferationsindex zeigte, dass die Ursprungspopulation von HSPZ durch Stimulation mit 15 μM bis 20 μM DETA/NO im Mittel eine Zellteilung weniger durchlief. Dieser Effekt wurde bei Ausschluss des spenderabhängigen Proliferationsverhaltens durch Normierung der Daten auf die Kontrollen bereits bei Stimulation mit 10 μM DETA/NO ersichtlich. In ungefärbten HSPZ wurde durch Zusatz von 15 μM bzw. 20 μM ein schwächerer Einfluss auf die Zellteilungsrate ungefärbter HSPZ verglichen mit CTV-gefärbten Zellen gefunden. Die Zellzahl nach fünftägiger Kultur mit 15 μM DETA/NO lag bei ungefärbten HSPZ auf dem Niveau der Lösemittelkontrolle. Durch Gegenwart von 20 μM DETA/NO reduzierte sich die Zellzahl im Vergleich zur Lösemittelkontrolle jedoch auch in ungefärbten HSPZ. Der Vergleich von anti-proliferativen Effekten von NO aus der Literatur ist dadurch erschwert, dass in diesen Veröffentlichungen häufig in toxischen Konzentrationsbereichen gearbeitet wurde und der proliferative Arrest der Zellen in Verbindung mit der Induktion von Apoptose beschrieben wurde. So

fürte beispielsweise die Stimulation humaner CD34⁺ Zellen aus dem Knochenmark mit 100 µM DETA/NO zu einer verringerten Anzahl an CFUs und ging mit der erhöhten Apoptose der Zellen einher [314]. Diese Effekte wurden in vorliegender Arbeit jedoch durch die Bestimmung eines geeigneten, nicht zelltoxischen Konzentrationsfensters ausgeschlossen. Wie in 3.2.1 gezeigt, waren die in dieser Arbeit für Zellversuche eingesetzten Konzentrationen an DETA/NO nicht mit der Einleitung von Apoptose verbunden. Bei Konzentrationen von NO, welche unterhalb der Konzentrationen lag, die Apoptose induzierten, wurde in anderen Zelltypen Zellzyklusarrest beschrieben [282, 297]. In vorliegender Arbeit wurde jedoch kein vollständiger Zellzyklusarrest beobachtet, da CTV gefärbte Zellen auch mit 20 µM DETA/NO bis zu sechs Zellteilungen durchliefen. Die Geschwindigkeit bzw. die Zellteilungsaktivität war jedoch im Vergleich mit der Lösemittelkontrolle verringert. Anti-proliferative Effekte durch NO wurden in murinen HSPZ indirekt durch pharmakologische Inhibition von NOS beobachtet, welche mit einer erhöhten HSPZ Anzahl im Knochenmark sowie einer erhöhten Anzahl an LTC-IC [316] einherging. Ebenso wurde bei der Differenzierung von CD34⁺ Zellen in dendritische Zellen ein proliferationshemmender Einfluss von NO durch Stimulation mit 50 nM der NO-freisetzenden Verbindung Natriumnitroprussid gefunden [325]. Ein direkter Vergleich dieser Beobachtungen mit den in vorliegender Arbeit beobachteten Effekten ist aufgrund der Unterschiede der Freisetzungskinetik der NO-freisetzenden Verbindungen nicht möglich.

Interessanterweise wurden auch in anderen Zelltypen biphasische Effekte von NO auf die Proliferation von Zellen beschrieben [385]. Epidermale Stammzellen waren zum Beispiel durch Stimulation mit 100 µM S-Nitroso-N-Acetyl-Penicillamin und 10 µM Spermin NONOat verstärkt teilungsaktiv, während höhere Konzentrationen der Verbindungen gegenteilige Effekte verursachten [299]. Auch in vorliegender Arbeit war die Wirkung von NO auf die Proliferation von HSPZ aus Nabelschnurblut abhängig von der gewählten Konzentration und zeigte eine pro-proliferative Wirkung in niedrigen Konzentrationsbereichen, während höhere Konzentrationen die Zellteilungsaktivität reduzierte. Der stimulierende Effekt von NO auf die Proliferation von HSPZ bei niedrigen Konzentrationen von DETA/NO war nur in ungefärbten Zellen signifikant. Dennoch wurden ähnliche Effekte bei CTV gefärbten Zellen bei 50% der Spender beobachtet. Auch bei ungefärbten Zellen wurde besonders bei 5 µM DETA/NO deutlich, dass die Sensitivität von HSPZ gegenüber dem pro-proliferativen Stimulus von NO in diesem Konzentrationsbereich spenderabhängig war, da manche Spender eine um den Faktor 5 im Vergleich zur Lösemittelkontrolle erhöhte Zellzahl aufwiesen, während andere lediglich um den Faktor 1,3 bis 1,5 mehr proliferiert hatten. Es schien daher eine Variabilität in der Empfänglichkeit der Spender gegenüber der Stimulation mit geringen Konzentrationen an DETA/NO vorzuliegen.

Zusätzlich könnte die unterschiedliche Sensitivität von CTV-gefärbten und ungefärbten HSPZ auf die Beeinträchtigung der Zellen durch die Färbung zurückgeführt werden. Der Farbstoff bindet an Amine von zytosolischen Proteinen in lebenden Zellen [386] und kann so das Proliferationsverhalten der Zellen beeinträchtigen [387]. Für die Färbung wurde die minimal mögliche Konzentration des Farbstoffes eingesetzt. Dennoch könnte durch die Färbung ein im Vergleich zu ungefärbten Zellen verlangsamtes Proliferationsverhalten resultiert haben. Diese verringerte Zellteilungsrate könnte in CTV-gefärbten Zellen zu einer Abschwächung der NO-vermittelten, erhöhten Zellproliferation geführt haben. Außerdem könnte die Färbung HSPZ gegenüber erhöhten NO Konzentrationen als potentielle Stressoren sensibilisiert haben, sodass anti-proliferative Effekte im Vergleich zu ungefärbten HSPZ bereits früher beobachtet wurden.

Spenderunabhängig konnte in CTV gefärbten Zellen, welche mit 10 μM DETA/NO kultiviert wurden, eine Abnahme der Zellproliferationsrate gezeigt werden. Interessanterweise verringerte sich jedoch die Proliferation der Zellen nicht gleichmäßig. Stattdessen wies eine Zellpopulation, welche in geringerem Maße proliferiert hatte, eine höhere CTV Fluoreszenzintensität auf, während sich die andere Zellpopulation ähnlich den Zellen der Lösemittelkontrolle geteilt hatte. Dies wurde auch nach Quantifizierung der CTV-Signale durch eine signifikante Reduktion der Zellanteile in Generation 4 bei Stimulation mit 10 μM DETA/NO deutlich, während die Zellanteile in Generation 1-2 bzw. 5-6 im Vergleich zur Lösemittelkontrolle erhöht schienen. Durch Erhöhung der DETA/NO Konzentration auf 15 μM DETA/NO lagen ebenfalls mehr Zellen vor, die sich lediglich 1- oder 2-mal geteilt hatten, während die Zellanteile in Generation 3 deutlich zurückgingen.

Diese Bildung von Unterpopulationen könnte mehrere Ursachen haben. Einerseits könnte ein Teil der HSPZ, wie frühere Vorläuferzellen, sensitiver gegenüber NO reagieren und diese durch NO in Zellzyklusarrest gebracht werden. Ein NO-vermittelter Zellzyklusarrest wurde sowohl am G1/S Übergang wie auch am G2/M Übergang beschrieben [297]. Ein NO-induzierter, vollständiger Zellzyklusarrest von HSPZ kann in vorliegender Arbeit ausgeschlossen werden, da die verschiedenen HSPZ Populationen im Vergleich zur Ursprungspopulation in Gegenwart von DETA/NO mindestens 1-2 Zellteilungen durchlaufen hatten, wie anhand der CTV Fluoreszenzintensität verfolgbar. Grundsätzlich wäre jedoch denkbar, dass das veränderte Proliferationsverhalten dieser Zellen auf eine verlangsamte Zellzyklusrate zurückgeführt werden könnte. Dies könnte durch eingeleitete Reparaturmechanismen verursacht werden, wenn bei diesen DETA/NO Konzentrationen durch die Entstehung von RNS DNA Schäden hervorgerufen würden [388-390]. Andererseits könnte das veränderte Proliferationsverhalten auf die NO-

induzierte Beeinflussung von HSPZ Differenzierungsentscheidungen zurückgeführt werden. Mit verschiedenen Differenzierungsstadien von HSZ in unterschiedliche Progenitorzelltypen geht eine veränderte Proliferationsrate der Zellpopulationen einher [391]. Bei der Untersuchung neuronaler Stammzellen, MSZ aus Knochenmark oder embryonalen Stammzellen wurde NO als Faktor postuliert, welcher die Proliferation der Zellen einschränkt und gleichzeitig die Differenzierung der Zellen herbeiführt [280, 298, 309, 392-395]. Des Weiteren hemmt NO in der Organentwicklung in Modellorganismen wie *Drosophila melanogaster* oder *Xenopus laevis* die Proliferation der Zellen während es u.a. die Differenzierung der Zellen vermittelt [304-307, 396]. Auch in murinen HSPZ stellt NO einen Regulator der HSZ Proliferation und Differenzierung dar. So unterstützten NOS2-exprimierende M1-polarisierte Makrophagen *in vitro* die Expansion von HPZ, jedoch nicht die früher HSZ [321].

Die Ergebnisse in vorliegender Arbeit weisen darauf hin, dass NO spenderabhängig in niedrigen Konzentrationen die vermehrte Proliferation von HSPZ vermittelte, während höhere Konzentrationen mit einem veränderten Proliferationsverhalten der Zellen einhergingen. Aufgrund der Zellverträglichkeit des gewählten DETA/NO Konzentrationsfensters schien die reduzierte Proliferation von HSPZ bei höheren NO Konzentrationen nicht auf einen NO-induzierten Zellzyklusarrest zurückführbar zu sein. Um zu eruieren, ob das veränderte Proliferationsverhalten durch Erhalt einer HSPZ Unterpopulation hervorgerufen wurde oder mit einer veränderten Differenzierung der Zellen einherging, wurden HSPZ mittels antikörperbasierter Färbung weiter charakterisiert.

4.4 NO beeinflusst die Differenzierung von HSPZ *in vitro* und vermittelt die verstärkte Bildung myeloider Vorläuferzellen

In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass NO für die Differenzierung von humanen HPZ in dendritische Zellen [325] und während der murinen Megakaryopoese [397] essentiell ist. Dies legt die Vermutung nahe, dass NO auch in vorliegender Arbeit die Differenzierung humaner HSPZ beeinflusst haben könnte. Um zu untersuchen, ob die in einer HSPZ Unterpopulation beobachtete, verringerte Proliferationsrate mit einer veränderten Differenzierung der Zellen einherging, wurde die CD34 Expression der Zellen nach fünftägiger Kultur bestimmt. Als klinisch relevanter Marker, welcher für die Isolation von HSPZ eingesetzt wird, kennzeichnet CD34 frühe HSZ und ist außerdem auf Progenitorzelltypen wie GMPs, Myeloblasten, Monoblasten und MEPs vorhanden [398]. Die Differenzierung in reife, hämatopoetische Zellen geht mit dem Verlust der CD34 Expression einher. Interessanterweise führte die Stimulation

mit DETA/NO zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der CD34 Expressionsstärke bezogen auf die gesamte Zellpopulation, während der Anteil an CD34⁺ Zellen auf einem hohen Maß konstant blieb. Dieser Effekt könnte theoretisch durch die Expansion von CD34^{hoch} exprimierenden HSZ und MPP unter Stammzellerhalt hervorgerufen worden sein. Diese sollte verglichen mit der Lösemittelkontrolle mit dem Erhalt des CD34⁺ Zellanteils über mehr Generationen einhergehen. Das Gegenteil wurde jedoch durch Stimulation mit erhöhten Konzentrationen an DETA/NO beobachtet. Sowohl die Expressionsstärke von CD34 als auch der Anteil an CD34⁺ Zellen sank durch Stimulation mit 15-20 µM DETA/NO bereits nach 3 Zellteilungen, während die Reduktion beider Parameter bei Zellen in der Lösemittelkontrolle oder in Gegenwart niedriger Konzentrationen an DETA/NO erst nach vier Zellteilungen erfolgte.

Die Erhöhung der CD34 Expressionsstärke könnte alternativ durch die NO-abhängige Induktion des HSPZ Markers hervorgerufen worden sein. Beim Vergleich der CD34 Expressionsstärke rel. zur Lösemittelkontrolle wurde durch Stimulation mit mehr als 1 µM DETA/NO eine erhöhte CD34 Expression auf wenig proliferative Zellen gefunden. Daher schien NO-vermittelt ein geringfügig proliferativer Zellanteil erhalten zu werden, welcher vermehrt CD34 exprimierte. Durch Stimulation mit 5 µM DETA/NO erhöhte sich zusätzlich das Maß der CD34 Expression in Generationen 4-6 bezogen auf die Lösemittelkontrolle. Dabei stieg die MFI mit zunehmender Zahl an durchlaufenen Zellteilungen an. Dies kann durch Unterpopulationen von HSPZ erklärt werden, welche sich in ihrem Ausmaß an CD34 Expression unterscheiden und ein unterschiedliches proliferatives Verhalten zeigen. Die Zunahme der CD34 Expressionsstärke mit der erhöhten Anzahl an Zellteilung weist auf die NO-vermittelte, vermehrte Differenzierung der Zellen in hoch proliferative CD34⁺ Progenitorzellen hin. Rel. zur CD34 Expressionsstärke der Ursprungspopulation wurde auch in der Lösemittelkontrolle unabhängig von der Stimulation mit NO ein Anstieg der CD34 Expression auf wenig proliferative HSPZ gefunden. Dieser war jedoch geringer als die NO-induzierte Zunahme der CD34 Expression. Da CD34 Expression in HSZ als Kennzeichen für den Eintritt in den Zellzyklus und die metabolische Aktivierung der Zellen postuliert wurde [399], könnte dies auf den metabolisch aktiven Zustand der Zellen hinweisen. Nach Isolation aus dem Nabelschnurblut befindet sich die Mehrzahl an HSPZ in einem metabolisch inaktiven Zustand und tritt durch *in vitro* Kultur in Gegenwart der im Zellkulturmedium vorliegenden Wachstumsfaktoren in den Zellzyklus ein. Während dieses Eintritts in den Zellzyklus nehmen HSPZ an Größe zu, sodass die vermehrte CD34 Expression der Zellen zusätzlich auf die vergrößerte Oberfläche der Zellen rückgeführt werden könnte. Stärker proliferative Zellen ab Generation 4 exprimierten in der Lösemittelkontrolle CD34 in geringerem Maße und waren wahrscheinlich reifere Vorläuferzellen.

Die Funktion von CD34 als Transmembranprotein der Sialomucin Familie ist nicht abschließend geklärt. Als Ligand für E-Selektin spielt es in reifen, hämatopoetischen Zellen eine Rolle in der Zelladhäsion und Migration [400]. So weisen CD34 *knock-out* Daten auf eine Rolle als anti-adhäsives Oberflächenmolekül hin, welches die unspezifische Adhäsion an Endothel unterbindet und eine wichtige Rolle bei der initialen Adhäsion von reifen, hämatopoetischen E-Selektin⁺ Zellen an CD34⁺ Endothel vermittelt [401]. Auch in HSZ könnte CD34 eine Rolle bei der Adhäsion der Zellen an Knochenmarksstroma spielen, wie durch die ektope Expression von humanem CD34 auf murinen HSZ angedeutet, welche vermehrt in die HSZ Nische im Knochenmark einwanderten [402]. In humanen und murinen Knochenmark exprimieren Endothelzellen E- und P-Selektin [403] und die Migration von HSPZ in das Knochenmark findet in E-Selektin⁺ Mikroumgebungen statt [404]. Ohne Expression von E- oder P-Selektin durch Endothelzellen wurde ein verringertes Einwandern von HSZ in das Knochenmark beschrieben [405]. Diese Daten weisen auf eine adhäsionsvermittelnde Rolle von CD34 an das Knochenmarksstroma hin bzw. betonen eine migrationsvermittelnde Rolle von CD34. Analog zu anderen zellmembranständigen Molekülen, welche für die Verortung von HSPZ in der Knochenmarksnische zentral sind und durch NO reguliert werden, könnte CD34 durch NO Stimulation induziert werden und die Migration bzw. Mobilisierung der Zellen vermitteln. So erhält beispielsweise CXCR4 unter Homöostase HSZ über CXCL12⁺ Stromazellen in der Knochenmarksnische. *In vitro* und *in vivo* wird die CXCR4 Expression auf HSPZ durch NO verstärkt [332, 335, 406] und vermittelt so die Mobilisierung von HSPZ in den Blutkreislauf. Diese zunächst widersprüchlich erscheinende Erhöhung der CXCR4 Expression sensibilisiert HSPZ hierbei für die Umkehrung des CXCL12 Gradienten durch verstärkt sekretiertes CXCL12, das mit der Mobilisierung in den Blutkreislauf einhergeht [407]. Des Weiteren reguliert NO die Mobilisierung von HSPZ durch die Modulation der VLA4 Affinität. Während der aPC/EPCR/PAR1 Signalweg unter Homöostase EPCR⁺ HSZ durch Einschränkung der endothelialen NO Produktion und durch erhöhte VLA4 Aktivität im Knochenmark verankert, vermittelt NO unter akutem Stress die Mobilisierung der Zellen in das Blutsystem. Hierbei bindet Thrombin an PAR1 und vermittelt so durch Phosphorylierung von NOS3 eine erhöhte Produktion von NO [77, 407]. Diese geht neben der verstärkten Expression von CXCR4 mit einer verringerten Affinität von VLA4, der Aktivierung der Cdc42 und der proteolytischen Abspaltung des aPC Rezeptors EPCR einher. Auch in murinen HSPZ wurde durch Stimulation mit Natriumnitroprussid eine gesteigerte Expression von CD34 beschrieben [335]. Ähnlich den in vorliegender Arbeit erhobenen Daten wurde der NO-vermittelte Anstieg in dieser Publikation ebenfalls nicht durch die Proliferation von CD34⁺ Zellen hervorgerufen, sondern wurde durch

vermehrte Induktion des Markers auf CD34⁻ HSZ verursacht. In HSZ junger Spender ging dieser Anstieg mit dem Erhalt der Stammzeleigenschaften und dem verbesserten *Homing* der Zellen nach der Transplantation einher. Daher könnte die NO-vermittelte, verstärkte Expression von CD34 die Zellen für die Mobilisierung in das Blutsystem vorbereiten, indem es die Migration zu E-Selektin⁺ Endothel vermitteln könnte. Alternativ könnte CD34 den Wiedereintritt in die HSZ Nische erleichtern, indem es zur transendothelialen Migration der Zellen beiträgt.

Andererseits ist CD34 auf einer Vielzahl an HPZ exprimiert, sodass die beobachtete NO-induzierte, verstärkte Expression von CD34 ebenfalls durch die Differenzierung der eingesetzten HSPZ in diese Progenitorstadien hervorgerufen worden sein könnte. In HSZ aus älteren Mäusen (10-12 Wochen) war die NO-vermittelte Steigerung der CD34 Expression stärker ausgeprägt als in HSZ aus jungen Mäusen (6-8 Wochen) und mit der myeloiden Differenzierung der Zellen verbunden, welche durch die Überexpression der Transkriptionsfaktoren *c-Myb* und *PU.1* gekennzeichnet war [335]. Anders als im Menschen sind murine frühe HSZ CD34⁻ CD38⁺ während reifere Vorläuferzellen CD34⁺ CD38⁻ aufweisen [2, 408]. Daher könnte die Zunahme von CD34 durch NO hier grundsätzlich mit der Induktion der Zelldifferenzierung einhergehen. Allerdings wurde CD34 ebenfalls mit einer möglichen regulatorischen Rolle in Bezug auf die myeloide Differenzierung von HSPZ in Verbindung gebracht, da die Gen-Stillegung des HSPZ Markers die Differenzierung von humanen HSPZ in Granulozyten und Megakaryozyten auf Kosten der erythroiden Differenzierungslinie verursachte [409]. Retrovirale Überexpression von CD34 ging entsprechend mit einem Anstieg von erythroiden Vorläuferzellen und der verringerten Bildung von Granulozyten-Vorläuferzellen einher [409]. Auch Vorläuferzelltypen wie MEPs exprimieren CD34 in hohem Maße [398]. Zusätzlich nahm in vorliegender Arbeit bei Stimulation mit hohen Konzentrationen DETA/NO die CD34 Expressionsstärke in Zellen, welche sich 4-6-mal geteilt hatten, mit der Anzahl der durchlaufenen Zellteilungen zu. Auf Basis dieser Beobachtung und den oben genannten Veröffentlichungen ist der Schluss möglich, dass hohe Konzentrationen an DETA/NO die Differenzierung in hoch proliferative Vorläuferzellen unterstützt, welche eine gesteigerte Expression von CD34 aufweisen. Ob die verstärkte Expression von CD34 einen Einfluss auf die Differenzierung hatte oder lediglich als Begleiterscheinung zu werten ist, kann hier nicht abschließend geklärt werden.

Um die NO-vermittelte Differenzierung von HSPZ zu überprüfen, wurden die Anteile an HSZ und MPPs, CLPs sowie der myeloiden Vorläuferzelltypen CMP, GMP und MEP nach fünftägiger Kultur mit DETA/NO bestimmt. Mit steigender Konzentration von DETA/NO wurde ein

verringertes Anteil an HSZ und MPPs in der Kultur identifiziert, welcher insbesondere in Zellanteilen deutlich war, die nur 2-3 Zellteilungen durchlaufen hatten. Daher schien exogen zugeführtes NO den Erhalt von HSZ und MPPs negativ zu beeinflussen und mit der Differenzierung der Zellen einherzugehen. Ähnliche Effekte wurden durch die Inhibition von NOS oder das Abfangen von freiem NO beschrieben [314-316]. Auch durch Kokultur mit NOS2 exprimierenden Makrophagen wurde eine Reduktion an HSZ gefunden, die mit einer Zunahme an Vorläuferzellen einherging [321]. DETA/NO führte zusätzlich zu einem konzentrationsabhängigen Abfall von CLPs. Dies wurde durch signifikant verringerte CLP Anteile bei Stimulation mit 20 μ M DETA/NO in frühen Generationen gefunden, rel. zur Lösemittelkontrolle zeigte sich jedoch über alle Zellgenerationen ein verringerter CLP Anteil bei Stimulation mit hohen DETA/NO Konzentrationen. Damit einhergehend wurde mit steigender Konzentration von DETA/NO die myeloide Differenzierung von HSPZ beobachtet. Interessanterweise waren die GMP Zellanteile in frühen Generationen durch Stimulation mit DETA/NO reduziert, während sie in Generation 3 unverändert waren. Zellen, die 5 oder 6 Zellteilungen durchlaufen hatten, wiesen DETA/NO-abhängig höhere GMP Anteile auf. Daher schienen GMPs NO-induziert stärker proliferiert zu haben. Mit steigender Konzentration der NO-freisetzenden Verbindung wurden ebenfalls erhöhte CMP Anteile unter höher proliferativen Zellen gefunden, die 3 oder mehr Zellteilungen durchlaufen hatten. Hingegen waren MEP Anteile vor allem in wenig proliferativen Zellen erhöht, die nur 1-2 Zellteilungen durchlaufen hatten.

Diese Daten weisen auf die NO-vermittelte Differenzierung von HSZ in myeloide und erythroide Vorläufertypen hin, welche vor allem bei der höchsten DETA/NO Konzentration auf Kosten von CLPs verlief. Dabei schienen die unterschiedlichen Vorläufertypen ein unterschiedliches Proliferationsverhalten aufzuweisen. MEPs schienen sich unabhängig von CMPs und GMPs entwickelt zu haben, da sich diese erhöhten Zellanteile in einer Zellpopulation von Zellen befanden, welche kaum proliferiert hatten. Stattdessen schien dieser Zelltyp direkt aus MPPs entstanden zu sein, übereinstimmend mit neueren Erkenntnissen, die postulieren, dass sich erythroide und myeloide Differenzierungslinien bereits nach dem MPP Stadium trennen [410]. MEPs weisen eine hohe Expression von CD34 auf [398] und könnten daher für die erhöhte CD34 Expression in frühen Generationen unter Stimulation mit höheren Konzentrationen an DETA/NO verantwortlich sein. Andere myeloide Zelltypen wie CMPs und GMPs waren vor allem in der teilungsaktiveren Population der analysierten Zellen verstärkt vorhanden und könnten zur DETA/NO induzierten CD34 Expression in späteren Generationen beigetragen haben. Diese Ergebnisse aus vorliegender Arbeit decken sich mit Veröffentlichungen, welche den proliferativen Status von verschiedenen HSPZ Populationen eruierten. Hier wurde in der

myeloiden Differenzierungslinie die maximale Proliferationsrate in GMPs detektiert, gefolgt von CMPs, während MEPs die am wenigsten proliferative Zellfraktion darstellten [391]. Zusammenfassend schien NO die myeloide Differenzierung von HSPZ zu induzieren. Ähnliche Effekte wurden in murinen HSZ beobachtet. Hier wurde vielfach die NO-vermittelte myeloide Differenzierung beschrieben [321, 322, 335]. Interessanterweise ging in adulten murinen HSZ die myeloide Differenzierung der Zellen mit einer Steigerung der CD34 Expression einher [335]. HSZ, welche durch Stimulation von Endothelzellen mit NO *in vitro* kultiviert wurden, zeigten ebenfalls myeloide Differenzierung, die in der Abnahme von HSZ Anteilen und der Zunahme an CMP und GMP Anteilen resultierte [322]. Hingegen wurde durch Stimulation mit NO *in vivo* eine proliferative Antwort von HSZ gefunden, die mit der Induktion verschiedener Zellzyklusregulatoren verbunden war und so die stress-induzierte Expansion von HSPZ imitiert haben könnte, welche *in vitro* jedoch nicht beobachtet werden konnte [322]. Zusätzliche Faktoren scheinen daher nötig, um die NO-induzierte Expansion von HSPZ *in vitro* zu erlauben. Langfristige Stimulation mit NO-freisetzenden Verbindungen für mehr als 2 Tage führte auch *in vivo* zu einer verstärkten myeloiden Differenzierung der Zellen [322]. *In vitro* und *in vivo* wurde gezeigt, dass MSZ NOS2-abhängig mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark zur myeloiden Differenzierung anregen, ohne dass inflammatorische Zytokine an diesem Prozess beteiligt sind. Diese myeloiden Zellen ähnelten in ihrem funktionalen und molekularen Profil Gewebemakrophagen, welche bei Kotransfusion das Anwachsen des HSZ Transplantates verbesserten [337].

Um zu überprüfen, ob die Differenzierung der Zellen in vorliegender Arbeit sich auch in funktionalen Assays niederschlug, wurden frühe myeloide Vorläuferzellen nach der Kultur mit der NO-freisetzenden Verbindung mittels CFU-Assay quantifiziert. Entgegen der Ergebnisse, welche durch die Färbung charakteristischer Oberflächenmarker erhalten wurden, konnte mittels CFU Assay im Mittel kein Einfluss auf eine myeloide Vorläuferzellpopulation gefunden werden. Dies muss jedoch nicht zwangsläufig einen Widerspruch darstellen. Da die Stimulation mit DETA/NO laut der Einteilung durch charakteristische Oberflächenmarker zu erhöhten Zellanteilen an CMPs, MEPs und GMPs führte, schien keine myeloide Population bevorzugt durch die Stimulation mit DETA/NO expandiert zu haben. Daher ließ sich auch im CFU-Assay kein einzelner Vorläuferzelltyp identifizieren, welcher besonders durch NO beeinflusst wurde. Da lediglich ein Teil der Spender gegenüber der Stimulation mit DETA/NO sensitiv war, resultierten in diesem Assay großen Standardabweichungen der mittleren Koloniezahlen, sodass signifikante Unterschiede im Mittel nicht beobachtet wurden.

Bei einzelnen Spendern war jedoch ein Trend zur bevorzugten Bildung bestimmter CFUs erkennbar. Einhergehend mit der erhöhten Anzahl an MEPs durch Stimulation mit DETA/NO nach Charakterisierung durch das CD Marker Panel schien die Kultur mit 5 μM DETA/NO spenderabhängig zu einem Anstieg der BFU-E Kolonien pro 500 eingesetzter Zellen geführt zu haben. Durch *in vitro* und *in vivo* Experimente in Mäusen wurde NO-vermittelt eine verstärkte Differenzierung in Erythrozyten beobachtet, welche durch den NO/sGC/cGMP Signalweg vermittelt wurde und auf Kosten anderer myeloider Zellen stattfand [324]. Ein Vergleich mit den Experimenten in vorliegender Arbeit ist durch die unbekannte freie Konzentration von NO erschwert, da NO für diese *in vivo* Experimente über die Atemwege verabreicht wurde und daher unklar ist, welchen NO Konzentrationen die HSPZ ausgesetzt waren. Für *in vitro* Experimente wurde der klassische NO Signalweg über die Überexpression von sGC aktiviert, sodass auch hier kein direkter Vergleich der Daten möglich war. Nichtsdestotrotz führte die Aktivierung des cGMP-abhängigen Signalweges unter bestimmten Bedingungen zu einer vermehrten Expression von Transkriptionsfaktoren für die erythroide Differenzierung, wie GATA-1, KLF-1 und c-Myb, während Transkriptionsfaktoren für die myeloide Differenzierung, wie c/EBP α und PU.1, herunterreguliert waren [324].

Murine HSZ wiesen nach Kultur mit NO-freisetzenden Verbindungen eine erhöhte Anzahl an CFU-GM Kolonien auf, während die Anzahl von CFU-G, CFU-M, CFU-GEMM oder BFU-E Kolonien nicht verändert war [322]. In vorliegender Arbeit wurde aus praktischen Gründen bei der Auszählung der Kolonien nicht zwischen CFU-G, CFU-M und CFU-GM unterschieden, sodass ein solcher Effekt nicht beobachtet werden konnte. Bei DETA/NO Konzentrationen von 15 μM oder 20 μM wurde in vorliegender Arbeit ein spenderabhängiger Trend zur Reduktion des Anteils an CFU-GM, CFU-G und CFU-M festgestellt. Diese Population korreliert mit GMPs, welche in weniger proliferativen Zellanteilen reduziert vorlagen, jedoch in stärker proliferativen Zellanteilen vermehrt gefunden wurden. Die Vorläuferzellen könnten zum Teil durch die vermehrte Proliferation bereits zu reiferen Vorläufern differenziert sein, welche immer noch die getesteten Oberflächenmarker exprimierten, durch den CFU-Assay aber nicht mehr erfasst wurden und so zu einem verringerten Anteil dieser CFUs geführt haben.

Zusammenfassend führte die Stimulation mit DETA/NO zu einer erhöhten Expression von CD34 und der myeloiden Differenzierung von HSPZ, welche bei erhöhten Konzentrationen an DETA/NO auf Kosten von CLPs verlief. Da NO-vermittelte Mobilisierung von HSPZ in das Blutssystem *in vivo* u.a. über die Modulation der VLA4 Affinität eine wichtige Rolle spielt,

könnten die beobachteten Effekte durch höhere Konzentrationen an DETA/NO Effekten ähneln, welche mit der Mobilisierung von HSPZ unter akutem Stress einhergehen. Im Knochenmark wird der Übertritt von der endostealen Nische, in welcher quieszente HSZ vorliegen, in die vaskuläre Nische, in der Zellen metabolisch aktiver sind und in das Blutsystem übertreten können, mit der myeloiden Differenzierung der Zellen in Verbindung gebracht [411]. An sinusoidalen Blutgefäßen befinden sich ebenfalls vermehrt Megakaryozyten, welche eine potenzielle Quelle von NO darstellen und an welchen HSZ mit myeloider Tendenz kolokalisiert vorliegen [412]. Zusätzlich zur Regulation von HSZ durch diese Nischenelemente über das C-X-C Motiv Chemokin 4 [412], könnte NO ein Faktor sein, der HSZ beeinflusst und je nach Konzentration und Dauer von freigesetztem NO die Mobilisierung und Differenzierung der Zellen vermittelt.

Um zu eruieren, ob die verstärkte myeloide Differenzierung von HSPZ, die verstärkte Expression von CD34 und der konzentrationsabhängige Einfluss von NO auf die Proliferation von HSPZ mit der Aktivierung von typischen NO-vermittelten Signalwegen korrelierte, wurde in vorliegender Arbeit die Konzentration an DETA/NO bestimmt, bei der der klassische NO-vermittelte Signalweg aktiviert ist oder verstärkte S-Nitrosylierung beobachtet wurde.

4.5 Geringe DETA/NO Konzentrationen aktivieren den klassischen NO Signalweg in HSPZ während höhere DETA/NO Konzentrationen *in vitro* mit der S-Nitrosylierung von Proteinen einhergehen

Um zu überprüfen, welche Signalwege in HSPZ nach Stimulation mit DETA/NO aktiv waren, wurde zunächst der klassische NO Signalweg untersucht. Die Bindung von NO an das Hämzentrum der sGC aktiviert diese und führt zur vermehrten Bildung von intrazellulärem cGMP, welches u.a. über die cGMP-abhängige PKG eine Vielzahl an Zielmolekülen phosphoryliert und so die meisten physiologischen Effekte von NO vermittelt, wie zum Beispiel die Einstellung der Blutgefäßweite [147]. Die Aktivierung des Signalweges wurde in vorliegender Arbeit zum einen über den Anstieg von intrazellulärem cGMP und zum anderen über PKG-abhängige Phosphorylierung von VASP an Ser239 nachverfolgt. KG1a Zellen zeigten im Vergleich mit HSPZ bei Stimulation mit der NO-freisetzenden Verbindung DETA/NO eine geringe Sensitivität für die Aktivierung des klassischen NO-vermittelten Signalwegs. Laut kompetitivem Immunassay für cGMP schien die Aktivierung des klassischen NO Signalweges in der Modellzelllinie ab einer Konzentration von ca. 25 μM DETA/NO zu beginnen. Auch die Phosphorylierung von VASP an Ser239 war in KG1a Zellen erst ab einer Konzentration von ca. 50 μM

DETA/NO beobachtbar (Anhang 11). Dieser Konzentrationsbereich korreliert mit ca. 25-100 nM NO und liegt damit über den Konzentrationen, welche für die Aktivierung der sGC beschrieben sind [144, 413]. Primäre HSPZ waren sensitiver für die Aktivierung der sGC durch NO und zeigten bereits bei Konzentrationen von ca. 5 μ M DETA/NO eine Verringerung der rel. Absorbanz im kompetitiven Immunassay und so einen Anstieg an intrazellulärem cGMP an.

In einem Enzym-gekoppelten Rezeptor-Modell wurde die EC_{50} für die Aktivierung der sGC unter Berücksichtigung intrazellulärer ATP und GTP Konzentrationen auf 4 nM bestimmt [414]. In Blutplättchen und neuronalen Zellen wurde eine EC_{50} von ca. 10 nM gemessen [415]. Diese Werte könnten jedoch die Aktivierung der sGC unter physiologischen Bedingungen unterschätzen, da die sGC Aktivität über einen breiten Konzentrationsbereich von NO gesteuert wird. Dabei wird diese zunächst durch Bindung von NO an das Hämzentrum des Zielmoleküls aktiviert und die Aktivität bei Überschuss von NO zusätzlich über S-Nitrosylierungsreaktionen gesteigert [144]. Daher übersteigen *in vitro* Messungen, welche Konzentrationsbereiche über verschiedene Größenordnungen an NO abdecken, physiologisch relevante Konzentrationen und unterschätzen so möglicherweise die Sensitivität der sGC. So waren NO-vermittelte Effekte, zum Beispiel die PKG-abhängige Phosphorylierung von VASP, in Blutplättchen bereits bei 3 nM NO maximal und lagen damit unter der *in vitro* gemessenen EC_{50} für diesen Zelltyp [416]. Da die sGC das primäre Zielmolekül von NO darstellt und physiologischen Konzentrationen an NO durch die konstitutiv exprimierten NOS Isoformen auf 100 pM bis ca. 5 nM abgeschätzt wurden [133], sollte die Aktivierung des Zielmoleküls durch NO ebenfalls in diesem Konzentrationsbereich liegen. Somit liegt der beobachtete, NO-induzierte Anstieg von intrazellulärem cGMP bei HSPZ am oberen Rand des erwarteten Konzentrationsbereichs.

Da der Assay für adhärenzte Zellen entwickelt wurde, könnte die intrazelluläre cGMP Konzentration in hämatopoetischen Zellen unterschätzt worden sein, da das Protokoll für Suspensionszellen modifiziert werden musste. Die Aktivierung und Deaktivierung des klassischen NO-vermittelten Signalweges erfolgt sehr rasch [417] und ist von der freien Konzentration an cGMP abhängig, welche durch die sGC-induzierte Produktion und den Abbau durch PDE gesteuert wird [418]. Zwischen Stimulation der Zellen und der Lyse war ein Waschschriff mit PBS erforderlich, um den Hintergrund bei der Messung zu minimieren. Aufgrund der schwachen Adhärenz der Zellen, mussten diese zusätzlich zentrifugiert werden, sodass in diesem Zeitraum bereits der Abbau des cyclischen Nukleotids durch PDEs eingesetzt haben könnte. Entsprechend wies die Phosphorylierung des nachgelagerten Zielmoleküls VASP auf die Aktivierung des

klassischen NO-Signalweges bei geringeren Konzentrationen von DETA/NO hin. Hier wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Phosphorylierung von VASP an Ser239 beobachtet, welcher bereits bei 0,5 μM DETA/NO einsetzte. Durch die Mobilitätsverschiebung während der SDS-PAGE, welche mit der Phosphorylierung von Ser157 einhergeht [363], sowie durch den antikörperbasierten Nachweis wurde gezeigt, dass die PKG bei Konzentrationen ab ca. 5 μM DETA/NO zusätzlich VASP an Ser157 phosphorylierte. Theoretisch könnten beide untersuchten Ser-Reste ebenfalls durch die PKA phosphoryliert werden. Die Reihenfolge der Phosphorylierung, welche zunächst an Ser239 und anschließend zusätzlich an Ser157 erfolgte, deutet jedoch auf die Aktivität der PKG hin [158].

Die Phosphorylierungen von VASP durch verschiedene Kinasen fungieren als ein Schalter, der die Zellbeweglichkeit reguliert. So verringert die Phosphorylierung an Ser239 die Ansammlung und Bündelung von F-Aktin und unterbindet die Bildung von fokalen Adhäsionen [156, 157]. Die Phosphorylierung an Ser157 hingegen dient als Signal für die Verortung von VASP an der Zellmembran oder der Zellvorderseite bei der Bewegung von Zellen [156]. In glatten Muskelzellen wurde beispielsweise gezeigt, dass die Zelladhäsion und –ausbreitung durch PKG-abhängige Phosphorylierung inhibiert werden [419]. Zusätzlich wurde in CD34⁺ endothelialen Vorläuferzellen aus Diabetespatienten eine verringerte migratorische Fähigkeit zu CXCL12 beobachtet, was in einer schlechteren Wundheilung resultierte. Exogen zugesetztes NO fing diese reduzierte migratorische Fähigkeit auf, indem es die Deformierbarkeit der Zellen verbesserte und die Zellmotilität durch VASP Phosphorylierung regulierte [420]. Daher scheint die Phosphorylierung von VASP für die normale Migration von Zellen eine entscheidende Rolle zu spielen und könnte ebenfalls auf eine vermittelnde Rolle von NO bei der Motilität von HSPZ hindeuten.

Mittels Inhibition der sGC durch ODQ und dem Einsatz des stöchiometrischen NO Fängermoleküls cPTIO wurde die Aktivierung des klassischen NO Signalweges in HSPZ durch NO demonstriert. So verhinderte die Inhibition der sGC in KG1a Zellen und HSPZ den durch 25 μM DETA/NO vermittelten Anstieg an intrazellulärem cGMP. Auch das NO-Fängermolekül cPTIO führte im Überschuss zu einer Abschwächung des NO-vermittelten Anstieges an intrazellulärem cGMP bei KG1a Zellen und verhinderte diesen in primären Zellen vollständig. Analog konnte durch eine andere NO-freisetzende Verbindung (DEA/NO; Anhang 12) die Aktivierung der sGC durch NO in KG1a Zellen demonstriert werden. Durch antikörperbasierten Nachweis der VASP Phosphorylierungen an Ser239 und Ser157 mittels Western Blot wurde ebenfalls demonstriert, dass die Phosphorylierung von VASP durch NO ausgelöst wurde, da der

Zusatz des Fänger-moleküls das detektierte Signal abschwächte. Zusätzlich führte die Inhibition der sGC zur Reduktion des Phosphorylierungssignals von VASP an Ser239, während das Phosphorylierungssignal von Ser157 auf das Basisniveau sank. Die Inhibition von sGC durch ODQ schien daher bei der eingesetzten Konzentration nicht vollständig stattgefunden zu haben. ODQ inhibiert die NO-Sensitivität durch Oxidation der Hämgruppe, die basale Aktivität bleibt jedoch intakt [421]. Da die Phosphorylierung von Ser157 im Vergleich zu der an Ser239 erst bei höheren Konzentrationen von NO und damit verbundener, höherer cGMP Aktivität erfolgte, führte die unvollständige Inhibition von sGC durch ODQ wahrscheinlich zu verringerten cGMP Konzentrationen, bei welchen die PKG selektiv nur Ser239 phosphorylierte. Zusätzlich konnte die PKG-abhängige VASP Phosphorylierung an Ser239 durch das zellmembrangängige cGMP Analogon 8-pCPT-cGMP herbeigeführt werden, während hierdurch keine Phosphorylierung an Ser157 ausgelöst wurde. Auch dieses Ergebnis deutet auf eine selektive Phosphorylierung von Ser239 bei geringeren Konzentrationen von cGMP und der damit vermittelten, selektiven Kinaseaktivität hin. Durch exogenen Zusatz an NO wird die Aktivität der sGC um das 100-200-fache gesteigert [418] und so wahrscheinlich eine cGMP Konzentration produziert, die höher als die Konzentration ist, welche durch den exogenen Zusatz des cGMP Analogons erreicht wurde. Entsprechend der Erwartungen veränderte die zusätzliche Inhibition der sGC durch ODQ das Phosphorylierungssignal von 8-pCPT-cGMP nicht, da sich cGMP im Signalweg der sGC nachgelagert befindet [161]. Zusätzlich wurde der PKG Inhibitor DT-3 eingesetzt, um die Aktivität der endständigen Kinase zu unterbinden. Hierbei wurde ein stark spenderabhängiger Effekt beobachtet. Während DT-3 bei allen Spendern die Phosphorylierung von VASP unterband, führte die Behandlung mit dem Inhibitor bei einigen Spendern zu einem verringerten Proteingehalt der Lysate. Dies zeigte sich besonders in den Ladekontrollen Vinkulin und GAPDH, wurde jedoch auch bei Betrachtung des VASP Proteinsignals sichtbar. Die PKG, die eine Vielzahl an Substraten, wie den IP3 Rezeptor, Vimentin, Phosphatase Inhibitor G Substrat und die Untereinheiten der Myosin Leichtkettenphosphatase phosphoryliert, ist an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt und mit vielen anderen Signalwegen verflochten [146-148]. Die Inhibition einer solch zentralen Kinase kann daher in verschiedenste Signalwege eingreifen und das Zellverhalten modifizieren.

Zusammenfassend konnte die Aktivierung des klassischen NO Signalweges in HSPZ bereits durch niedrige Konzentrationen von DETA/NO nachgewiesen werden. KG1a Zellen schienen im Vergleich zu HSPZ deutlich weniger sensitiv für die Aktivierung des Signalweges, sodass höhere Konzentrationen an NO zur Aktivierung des klassischen Signalweges in diesem Zelltyp nötig waren. Ein möglicher Grund für die unterschiedliche Sensitivität gegenüber NO könnte

in einer anderen Expressionsstärke der sGC in KG1a Zellen begründet sein. In Melanomzellen wurde gezeigt, dass metastasierende Zellen für die Stimulation des cGMP-abhängigen Signalweges desensibilisiert waren, da sie die $\beta 1$ -Untereinheit der sGC nicht exprimierten [422]. Eine weitere Möglichkeit könnte die mangelnde Expression der PKG in KG1a Zellen darstellen. Bei hohen Konzentrationen von NO können sich *downstream* Ziele von cGMP und cAMP überschneiden, sodass durch hohe Konzentrationen von cGMP auch die PKA aktiviert werden kann und Signalwege vermittelt, welche typischerweise cAMP nachgelagert stattfinden [147]. Die PKA phosphoryliert VASP typischerweise zunächst an Ser157 und anschließend an Ser239. Dies lässt den Schluss zu, dass in KG1a Zellen erhöhte Konzentrationen von NO nötig waren, welche durch Ansammlung von cGMP die PKA aktiviert und dadurch VASP in umgekehrter Reihenfolge phosphoryliert haben könnte, verglichen mit der VASP Phosphorylierung durch die PKG.

Durch die Nachverfolgung des klassischen NO-vermittelten Signalweges in HSPZ mittels Western Blot wurde gezeigt, dass bereits geringe Konzentrationen von DETA/NO ausreichen, um die intrazelluläre cGMP Konzentration zu erhöhen. Ein direkter Rückschluss auf vorliegende cGMP Konzentrationen war durch den kompetitiven Immunassay nicht möglich. Zwar wurde stets eine Konzentrationsreihe von cGMP Standards auf den Analyseplatten mitgeführt, jedoch lagen die Absorbanzwerte von Lysaten, welche nur geringfügig cGMP aufwiesen, stets über dem Standardwert ohne cGMP. Bei dieser Methode wurden Lysate der behandelten Zellen zusammen mit einem kompetitiven Enzym-gekoppelten cGMP auf die Analyseplatten aufgebracht und so durch die kompetitive Bindung der enzymgekoppelten Spezies und dem damit verbundenen Substratumsatz auf die Konzentration in den Lysaten rückgeschlossen. Um mögliche unspezifische Reaktionen zu vermeiden, wurden die Zellen in serumfreiem Medium stimuliert und zusätzlich vor der Zellyse mit PBS gewaschen. Dennoch könnten interferierende Substanzen in den Lysaten verblieben sein, die die Enzymreaktion beeinflusst haben könnten. Nichtsdestotrotz sind die Daten durch den Vergleich mit der jeweiligen Lösemittelkontrolle valide, da das Ziel dieser Analyse nicht die Bestimmung des absoluten cGMP Gehalts war, sondern lediglich die DETA/NO Konzentration identifiziert werden sollte, welche zu einer Aktivierung der sGC führte. Verschiedene physiologische Prozesse, die für die Migration und Mobilisierung von HSPZ relevant sind, werden über den klassischen NO Signalweg vermittelt. Hierzu zählen die NO-abhängige Reduktion der VLA4 Affinität, welche die De-Adhäsion der Zellen vermittelt [334] und die NO-induzierte verstärkte *in vitro* Migration von HSPZ zu CXCL12 [423]. Zusätzlich wurden Effekte von NO auf die Proliferation und Differenzierung von HSPZ auf den cGMP-vermittelten Signalweg zurückgeführt. Beispielsweise verhinderte

cGMP in niedrigen Konzentrationen die Proliferation von humanen HPZ und stimulierte die Differenzierung in Megakaryozyten, während die Differenzierung in Granulozyten dosisabhängig durch cGMP inhibiert wurde [424]. Die NO-vermittelte vermehrte Differenzierung in Erythrozyten wurde ebenfalls der cGMP-abhängigen Modulation verschiedener Transkriptionsfaktoren zugeschrieben [324].

Zusätzlich zur Beeinflussung des HSPZ Verhaltens durch den klassischen NO Signalweg wurde die cGMP-unabhängige Beeinflussung von HSPZ Eigenschaften durch S-Nitrosylierung postuliert. Dieser post-translationalen Modifikation wurde beispielsweise die NO-vermittelte Induktion der CD34 Expression auf murine HSPZ [335] sowie die Zunahme der CXCR4 Genexpression durch exogen zugesetztes NO zugeschrieben [332]. Um zu überprüfen, ob diese Modifikationen mit den in vorliegender Arbeit beobachteten Effekten korrelierten, wurde über eine indirekte Nachweismethode die Konzentration von DETA/NO ermittelt, ab welcher vermehrt S-Nitrosylierung von Proteinen beobachtbar war. Da S-Nitrosylierungen lichtsensibel, labile Proteinmodifikationen sind, ist ein direkter Nachweis nicht möglich [425]. Für den Nachweis wurden nitrosylierte Thiole nach der Blockierung freier Cysteinreste gezielt reduziert und mit einem TMT markiert, welcher sich antikörperbasiert nachweisen ließ. KG1a Zellen, welche kurzzeitig mit DETA/NO inkubiert wurden, zeigten bereits bei geringen Konzentrationen der NO-freisetzenden Verbindung ein erhöhtes Maß an S-Nitrosylierungen. Diese Zunahme war bei 1 μM DETA/NO maximal, bei höheren Konzentrationen vorübergehend reduziert und stieg ab 15 μM DETA/NO wieder an. HSPZ wiesen im Gegensatz dazu nach fünftägiger Kultur in Anwesenheit von bis ca. 5 μM DETA/NO keine vermehrte S-Nitrosylierung auf. Ab dem Zusatz von 10 μM DETA/NO wurden diese bei HSPZ verstärkt gefunden.

Die im Vergleich zur Aktivierung des klassischen NO Signalweges erhöhten Konzentrationen, bei welchen in HSPZ vermehrt S-Nitrosylierungen nachgewiesen werden konnten, entsprachen den Erwartungen. Während bereits geringe Konzentrationen an NO ausreichen, um den klassischen NO Signalweg durch die direkte Reaktion von NO mit der prosthetischen Hämgruppe der sGC zu aktivieren, erfordern S-Nitrosylierungen erhöhte Konzentrationen von NO [161]. Diese sind erforderlich, da NO nur indirekt über die Bildung von Nitrosonium-Ionen an dieser post-translationalen Modifikation teilnimmt. Die Spezifität von einzelnen S-Nitrosylierungsreaktionen wird *in vivo* über spezielle zelluläre Mechanismen vermittelt [172]. Solche spezifischen Modifikationen sind mittels Western Blot aus Lysaten ganzer Zellen nur schwer nachvollziehbar, da sich hier nur die Gesamtheit der S-Nitrosylierungsstellen zeigen lässt. Für spe-

zifischere Untersuchungen bestimmter Proteine müssten die TMT-markierten Proben zusätzlich massenspektrometrisch untersucht werden. Anders als *in vivo*, zeigt NO *in vitro* eine vielfältige Aktivität gegenüber Thiolen und die Modifikation scheint weniger selektiv stattzufinden [172]. Daher ist die starke Zunahme von S-Nitrosylierungsreaktionen ab 10 μ M DETA/NO zu erklären, welche in den Lysaten von HSPZ gleichmäßig zu finden war. Da dieser Assay lediglich bei zwei Spendern durchgeführt wurde, ist die resultierende Standardabweichung der S-Nitrosylierungssignalintensität hier relativ groß. Dennoch korrelierte bei beiden Spendern das erhöhte Maß der S-Nitrosylierungen mit der vermehrten myeloiden Differenzierung von HSPZ durch Stimulation mit DETA/NO. Daher kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die in vorliegender Arbeit beobachtete, veränderte Proliferation der Zellen sowie die Vermittlung der myeloiden Differenzierung durch S-Nitrosylierungsreaktionen hervorgerufen wurde. So könnte ab 10 μ M DETA/NO der Beginn der unspezifischen Proteinmodifikation durch NO gekennzeichnet sein, wie er mit einer stress-induzierten Antwort einhergehen könnte. Hierzu müssen jedoch weitere Versuche zeigen, ob die myeloide Differenzierung durch Zusatz eines Reduktionsmittels abgeschwächt wird, um den Einfluss oxidativer Thiolmodifikationen zu belegen.

Die abweichende Sensitivität von KG1a Zellen und HSPZ gegenüber S-Nitrosylierungen lässt sich durch die verschiedenen Zeitspannen der Kultur in Gegenwart von DETA/NO sowie die unterschiedlichen Zellsysteme erklären. Während KG1a nur kurzzeitig mit DETA/NO stimuliert wurden, wurden HSPZ nach fünftägiger Kultur in Gegenwart von DETA/NO für den Assay verwendet. Der Redox-Status von HSPZ wurde bereits mit der Regulation vieler zentraler Eigenschaften, wie Proliferation und Differenzierung der Zellen in Verbindung gebracht [61, 426]. Quieszente HSPZ weisen durch ihren auf Glykolyse beruhenden Stoffwechsel in hypoxischer Umgebung reduzierte ROS Gehalte auf, während HSPZ bei Proliferation und Eintritt in den Zellzyklus oxidative Phosphorylierung betreiben und so höhere Gehalte an ROS produzieren [427]. Um dennoch die Stammzeleigenschaften zu erhalten, besitzen sie Redox-Regulatoren, zu denen GSH als wichtigstes Antioxidanz zählt [428, 429]. In MSZ aus Knochenmark wurde gezeigt, dass Zellen abhängig von oxidativem Stress den GSH Gehalt in Zellen und Organellen dynamisch regulieren können und so GSH als Redox-Puffer fungiert [428]. Hierbei waren MSZ, welche eine erhöhte Koloniebildungsfähigkeit und therapeutische Funktionalität aufwiesen, durch höhere Konzentrationen an GSH gekennzeichnet [428]. Da die Wahrscheinlichkeit der Nitrosothiol-Bildung von der Konzentration intrazellulärer Reduktionsmittel wie GSH abhängt [425], könnten in vorliegender Arbeit HSPZ die Produktion von GSH angepasst

haben, um überschüssiges NO zu binden bzw. die labilen, reversiblen Nitrosylierungsreaktionen durch Transnitrosylierung zu unterbinden. KG1a Zellen hingegen waren vor der Zelllyse nur kurzzeitig mit DETA/NO in Kontakt und konnten unter Umständen aufgrund der kurzen Zeitspanne die GSH Synthese nicht auf die erhöhte Anwesenheit nitrosylierender Spezies anpassen. Weiterhin könnten Stammzellen einen höheren Speicher an intrazellulären Anti-Oxidationsmitteln, wie GSH, aufweisen, da die Redoxregulation und somit die Eindämmung unspezifischer Proteinmodifikationen für den Stammzellerhalt essentiell scheint. Die starke Zunahme von S-Nitrosylierungen ab 10 μ M DETA/NO in HSPZ könnte zusätzlich eine schützende Proteinmodifikation für redox-sensitive Thiole darstellen. Solche Schutzmechanismen wurden beispielsweise im Kontext der Immunantwort diskutiert [430]. Indem durch reversible S-Nitrosylierungen stärkere, irreversible Oxidationen von redox-sensitiven Thiolen verhindert werden, könnten redox-sensitive Gruppen geschützt werden [425] oder andere post-translationale Modifikationen vermieden und so die Signalübertragung in Zellen moduliert werden [425].

Durch die reaktive Natur von ROS und RNS überschneiden sich viele im Zusammenhang mit diesen Spezies beobachtete Effekte. So geht ein Überschuss von ROS mit dem Zellzyklusarrest von HSPZ einher und vermittelt Apoptose, während ROS grundsätzlich für die normale Differenzierung von HSZ essentiell sind [61]. Interessanterweise führt der erhöhte Gehalt von ROS in HSPZ zur vermehrten myeloiden Differenzierung, analog den in vorliegender Arbeit für NO beschriebenen Effekten durch erhöhte DETA/NO Konzentrationen. Da ROS sowohl als Signalmoleküle dienen, als auch ein metabolisches Profil darstellen, ist nicht immer zweifelsfrei trennbar, ob ROS mit der aktiven Zellzyklusprogression einhergehen oder diese verursachen. Jedoch weist beispielsweise die Beobachtung, dass MSZ HSZ in einem quieszenten Zustand erhalten, indem sie ROS in HSZ über Connexine ausschleusen, darauf hin, dass ROS nicht nur ein Nebenprodukt des Zellzyklus darstellen, sondern eine Rolle im Stammzellerhalt und der Funktion von HSZ aufweisen [61]. Analog scheinen niedrige Konzentrationen von NO *in vivo* HSZ zu erhalten, während höhere Konzentrationen mit der Expansion von HSPZ und der Mobilisierung der Zellen einhergehen [78, 322, 334, 372]. Diese Effekte lassen sich *in vitro* jedoch nur teilweise erzielen. So wurde *in vitro* die NO-induzierte myeloide Differenzierung von HSPZ beobachtet, während *in vivo* vorübergehend eine NO-abhängige Expansion von HSZ beobachtet wurde [322]. Daher scheinen zusätzlich Faktoren nötig, um *in vivo* beobachtete Effekte von NO reproduzieren zu können.

Die Routine-Zellkultur von HSPZ mit NO-freisetzenden Verbindungen stellt die durch NO-induzierten Signale *in vivo* nur stark vereinfacht dar. Neben fehlenden zentralen Nischenkomponenten wie MSZ, die HSPZ NO-vermittelt parakrin beeinflussen [336], fehlt hier eine EZM-ähnliche Struktur, welche mechanische Reize übertragen kann und die Fähigkeit bietet, Wachstumsfaktoren zu binden. Zusätzlich besitzen lösliche NO-freisetzende Verbindungen inhärente Limitationen. Im Gegensatz zu anderen NO-freisetzenden Verbindungen bieten NONOate ein gewisses Maß an Kontrolle bezüglich ihrer NO Freisetzungskinetik, da sie nicht von enzymatischer Beteiligung abhängt [212, 431]. Jedoch modifizieren beispielsweise der Zusatz von Serum oder Kulturbedingungen, wie 5% CO₂ Atmosphäre, das Profil der NO Freisetzung [362]. Zwar lässt sich der initiale Zeitpunkt des Zerfalls von NONOaten durch das Anbringen enzymatisch abspaltbarer Schutzgruppen steuern [213, 215, 216], allerdings erfolgt auch in diesen Fällen die Freisetzung von NO nach Abspaltung dieser Gruppen spontan. Durch lichtgesteuerte Freisetzung von NO kann dieses Hindernis umgangen werden und zeitliche Kontrolle über die NO Freisetzung erhalten werden [201, 217, 219-221, 223, 260, 262, 432, 433]. Jedoch bietet die alleinige Verwendung von lichtinduzierbaren, NO-freisetzenden Verbindungen keine räumliche Kontrolle der NO Freisetzung, da diese im Zellkulturmedium homogen verteilt vorliegen und NO im gesamten Kulturvolumen freisetzen [226]. Zusätzlich könnten die Reste der Verbindungen nach NO Abspaltung im Medium verbleiben. *In vivo* wird NO parakrin von Nischenzellen wie Endothelzellen freigesetzt. Mit zunehmender Diffusionslänge des Signalmoleküls verringert sich die freie Konzentration an NO durch Bildung von Nitrit und Nitrat in wässriger Lösung [98, 434]. Der in HSPZ aktivierte, konzentrationsabhängige Signalweg hängt somit auch von der Diffusionslänge des Signalmoleküls ab [98]. HSPZ, welche direkt an Blutgefäßen lokalisieren, wären dadurch höheren Konzentrationen an NO ausgesetzt als HSPZ, welche weiter entfernt von der NO Quelle sind. Die spezifische Beeinflussung von HSPZ durch einen NO Gradienten kann *in vitro* durch lösliche Verbindungen nur unzureichend dargestellt werden und könnte ein Grund für den Unterschied der beobachteten NO-vermittelten Effekte *in vivo* und *in vitro* sein.

4.6 Machbarkeitsnachweis eines photo-responsiven NO-freisetzenden Heparin/sPEG Hydrogels

Durch Anbindung photo-induzierter NO-freisetzender Verbindungen an ein Materialsystem könnte die räumliche und zeitliche Kontrolle über die NO Freisetzung erlangt werden. In vorliegender Arbeit wurde hierzu die licht-sensitive NO-Quelle 4-Nitro-3-(trifluoromethyl)anilin

kovalent an ein Hydrogel auf Basis von Heparin angebunden. Hydrogele, welche auf biologischen Komponenten basieren, eignen sich durch ihre hohe Porosität und ihre inhärente Biokompatibilität als Freisetzungssysteme für die Zellkultur [435]. Durch kovalente Anbindung der NO-freisetzenden Moleküle sollten nach der Freisetzung gebildete Nebenprodukte am Material angebunden bleiben. Gleichzeitig sollte die Freisetzung von NO aus einer funktionellen Oberfläche die Bildung eines Konzentrationsgradienten an NO ermöglichen, welcher die Situation *in vivo* besser widerspiegelt. In vorliegender Arbeit wurde als solche Materialplattform ein Hydrogelsystem gewählt, welches aus einer biologischen und einer synthetischen Komponente aufgebaut ist [339, 436, 437]. Bei diesem von *Freudenberg et al.* entwickelten Hydrogelsystem wird das Glykosaminoglykan Heparin mit einem vierarmigen sPEG nach Aktivierung durch 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid und *N*-Hydroxysulfosuccinimid quervernetzt. Durch das molare Verhältnis der Heparin und sPEG-Komponente können die mechanischen Eigenschaften, wie die Steifigkeit und das Schwellverhalten des Materials angepasst werden [339, 438]. In vorliegender Arbeit wurde sPEG im dreifachen molaren Überschuss eingesetzt, sodass nach theoretisch maximaler Quervernetzung noch 55% der Säuregruppen des Heparins ungebunden vorlagen. Diese wurden anschließend verwendet, um die photo-sensitive Einheit in das Gelsystem einzubringen. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit dieser Komponente war die Anbindung des Nitroanilin-Derivates nicht durch häufig für Hydrogele verwendete Carbodiimid-Kupplungen möglich. Stattdessen wurde eine Mehrkomponenten-Ugi-Reaktion in wässriger Lösung durchgeführt [439]. Diese Reaktion basiert im ersten Schritt auf der Bildung eines Imins durch die Kondensation eines Amins mit einem Aldehyd. Im zweiten Schritt reagiert das protonierte Imin und eine freie Säuregruppe mit einem Isocyanid zu einem α -(Acylamin)amid [440]. Während diese Reaktionen typischerweise in polaren, aprotischen Lösungsmitteln durchgeführt werden, konnten in wässriger Umgebung basierend auf dieser Reaktion ionische Polysaccharid-Hydrogele hergestellt werden [441-443]. Weiterhin wurde gezeigt, dass diese Reaktionen in Wasser beschleunigt stattfinden [444]. Dies wurde u.a. der Reaktion an der Grenzfläche zu Wasser durch den hydrophoben Effekt zugeschrieben. Da der hydrophobe Effekt durch den Zusatz von ionischen, gelösten Stoffen verstärkt werden kann [445] und die Schwellung des Hydrogels beeinflusst, wurde die Reaktion in angesäuertem ddH₂O sowie in 1 M KCl (aq.) oder 1 M Glukose (aq.) Lösung durchgeführt. Mittels FTIR-Spektroskopie im Modus der ATR und UV/vis Spektroskopie wurden erste Hinweise auf eine erfolgreiche Funktionalisierung des Heparin/sPEG Hydrogels erhalten. ATR Spektren zeigten durch Veränderung von typischen Carbonylschwingungen, dass die Säuregruppen des Heparins reagiert hatten. Jedoch war hierdurch nicht abzuleiten, ob die NO-freisetzende Verbindung

kovalent an das Hydrogel angebunden war, oder ob die Veränderung der Carbonylschwingungen einer Nebenreaktion der hoch-reaktiven Isocyanid Spezies mit der Heparinkomponente des Hydrogels zuzuschreiben war. Durch Messung eines UV/vis Spektrums wurde gezeigt, dass das funktionalisierte Hydrogel in seinen Absorptionseigenschaften denen des Nitroanilin-Derivates ähnelte. Dies gab einen weiteren Hinweis auf die Anbindung der NO-freisetzenden Verbindung. Um die erfolgreiche Funktionalisierung des Hydrogels zu demonstrieren, wurden ToF-SIMS Analysen durchgeführt. Oberflächenanalysen zeigten Fragmente der tert-butyl-Gruppe sowie des Nitroanilin-Derivates. Zusätzlich konnten im gesamten Gelvolumen charakteristische Fragmente des Nitroanilin-Derivates nachgewiesen werden, wie F^- und NO_2^- . Hierbei war die Reaktion in angesäuertem Wasser und 1 M Glukoselösung gleichermaßen effektiv, die Ugi-Reaktion in KCl Lösung schien hingegen weniger effizient stattgefunden zu haben. Die Ursache könnte hier, neben der Beeinflussung des hydrophoben Effekts, die erhöhte Ionenkonzentration in der Lösung sein, welche die negativen Ladungen des sulfatierten Heparins abgeschirmt haben könnte und so zu einer reduzierten Schwellung des Hydrogels verglichen mit angesäuertem Wasser beigetragen haben könnte. Hierdurch könnte die Reaktion hauptsächlich an der Hydrogeloberfläche stattgefunden haben.

In einem ersten Versuch konnte die licht-induzierte Freisetzung von NO aus dem funktionalisierten Hydrogelsystem abhängig von der Wellenlänge des eingestrahlt Lichts mittels eines elektrochemischen NO-Sensors gezeigt werden. Jedoch wurde auch in nicht funktionalisierten Kontrollen ein licht-induziertes Signal bei Wellenlängen von 455 nm, 405 nm und 365 nm detektiert, welches auf ein gemessenes, unspezifisches Hintergrundsignal hinweist. Dies könnte auf einen thermischen Effekt durch Absorption des höherenergetischen Lichtes zurückgeführt werden. Des Weiteren könnte das gemessene Hintergrundsignal durch Beeinflussung der Elektrodenmembran durch blaues Licht erklärt werden. Durch Abzug des gemessenen Hintergrundsignals wurde die freigesetzte NO Konzentration an der Oberfläche des Hydrogels bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 365 nm auf ca. 40 nM bestimmt. Diese Konzentration liegt damit leicht über dem angestrebten Bereich der NO Freisetzung und war vergleichbar mit lichtinduzierter NO Freisetzung aus anderen porösen Beschichtungen [266, 268]. Wie in vorliegender Arbeit demonstriert, wurden NO-vermittelte Effekte im niedrigen nM Konzentrationsbereich beobachtet, während höhere Konzentrationen toxisch für HSPZ waren. Durch Variation der Wellenlänge oder Reduktion der Lichtintensität kann die freigesetzte Konzentration von NO reduziert werden. Andere Materialsysteme zeigten im Vergleich eine erhöhte Freisetzung von NO [258, 269, 446-448], da sie als anti-mikrobielle oder anti-tumorale Wirksysteme

vorgeschlagen wurden und für diese Anwendung höhere Konzentrationen von NO aufgebracht werden müssen [449, 450].

Weitere Versuche müssen zeigen, ob die NO Konzentrationen, welche durch längerwelliges Licht freigesetzt werden, ausreichen, um physiologisch relevante Konzentrationen von ca. 100 pM bis 5 nM NO aus dem Hydrogel freizusetzen. Zwar wurde hier bei Belichtung mit UV-Licht eine Freisetzung von ca. 40 nM NO erreicht, allerdings sind Wellenlängen im UV-Bereich bzw. im blauen Wirkungsspektrum aufgrund der hochenergetischen Strahlung und der hierdurch produzierten ROS nur begrenzt zellverträglich [451, 452]. Mögliche Abhilfe könnte das Einbringen eines aromatischen Verbindungsmolekül zwischen der NO-freisetzenden Einheit und dem Gelsystem schaffen, welches die Absorption der lichtsensitiven Einheit bathochrom verschieben könnte [221]. Zusätzlich könnte die zur Freisetzung von NO nötige Energiedifferenz anstelle von einem hochenergetischen Photon durch zwei Photonen halber Energie aufgebracht werden. Dieser Effekt der Zwei-Photonen-Anregung wurde auch in einer anderen Veröffentlichungen ausgenutzt [267], um anstelle von UV-Licht die Zellen mit Licht im NIR zu belichten, welches eine höhere Zellverträglichkeit aufweist.

Der Nachweis von NO in diesem niedrigen Konzentrationsbereich ist nicht trivial. Fluoreszente Farbstoffe, welche in Zellen aufgenommen werden und durch Reaktion mit NO von einer gering fluoreszierenden Spezies in eine stark emittierende Spezies umgewandelt werden [453], weisen geringe Sensitivität und Selektivität auf [454]. Des Weiteren kann NO durch Chemilumineszenz gemessen werden, da durch Reaktion von NO mit Ozon NO_2 entsteht, welches in einem angeregten Zustand vorliegt. Bei Übergang in den Grundzustand wird ein Photon emittiert und ermöglicht die Detektion von NO [455]. Alternativ lassen sich Radikale wie NO aufgrund ihres ungepaarten Elektrons über Elektronenspinresonanz nachweisen [456-458]. Beide Techniken bedürfen jedoch kostenintensiver instrumenteller Technik. In jüngster Zeit wurden genetisch kodierte NO Sensoren entwickelt, die durch Reaktion mit NO eine verringerte Fluoreszenzemission zeigen [459, 460]. So erlauben die Sensoren eine Nachverfolgung von NO Generation in Echtzeit auf zellulärer Ebene. Jedoch erfordert auch diese Methode die Nutzung NO unsensitiver Kontrollkonstrukte und die vorherige Transfektion der Zellen. Daher war der elektrochemische Nachweis für erste Tests die zuverlässigste und kostengünstigste Messmethode. Die mögliche Beeinträchtigung der Messgenauigkeit durch Hintergrundsignale könnte durch eine indirekte Messung des in der wässrigen Lösung durch NO Freisetzung angesammelten Nitrits und Nitrats umgangen werden.

Um zu überprüfen, ob die Biokompatibilität des Heparin-basierten Hydrogelsystems [339], durch die Funktionalisierung mittels Ugi-Reaktion beeinträchtigt worden war, wurden funktionalisierte Hydrogele zusammen mit nicht funktionalisierten Kontrollen und Referenzoberflächen Zytotoxizitätstests unterzogen. Mittels Lebend/Tot und AnnexinV/Sytox Färbung konnte gezeigt werden, dass sowohl funktionalisierte als auch unfunktionalisierte Hydrogele äquivalent zu TCPS als Referenzoberfläche waren.

Während die erfolgreiche Funktionalisierung der Heparin/sPEG Hydrogele in zwei unabhängigen Versuchen mittels ToF-SIMS nachgewiesen wurde, basieren die Daten, welche die lichtinduzierte Freisetzung von NO sowie die Zytokompatibilität des funktionalisierten Hydrogels zeigen, auf lediglich einem Versuch. Aufgrund von Variationen in der Reproduzierbarkeit der Funktionalisierung des Hydrogels konnten diese bisher nicht wiederholt werden. Deshalb sollten die molaren Verhältnisse der Reaktanden, die Reaktionszeiten, -temperaturen sowie der pH Wert des Lösungsmittels variiert werden, um die optimalen Bedingungen für die Ugi-Reaktion an Heparin zu identifizieren und so eine möglichst reproduzierbare Funktionalisierung des Hydrogeles zu erreichen. Eine mögliche Quelle der unterschiedlich beobachteten Funktionalisierung könnte auch die Batch-zu-Batch-Variation der biologischen Komponente Heparin sein. Durch veränderte Sulfatierungsmuster kann die lokale Ladungsdichte des Heparins variieren, welche die Ugi-Reaktion beeinflussen könnte.

Nichtsdestotrotz wurde in vorliegender Arbeit der Machbarkeitsbeweis erbracht, dass Heparin/sPEG Hydrogele durch Einbau einer licht-sensitiven NO-freisetzenden Einheit als Stimulus-responsives Hydrogel dienen können und zellverträglich gegenüber HSPZ aus Nabelschnurblut sind. Im Gegensatz zu anderen NO-freisetzenden Materialien, welche zur Immobilisierung in PDMS gegossen werden müssen [266, 267] oder auf inerten synthetischen Polymeren basieren [258, 264, 461], bietet dieses System durch den Aufbau aus der biologischen Komponente Heparin die Möglichkeit, das Hydrogel zusätzlich mit für HSPZ relevanten Wachstumsfaktoren zu beladen. Dabei ermöglicht die inhärente hohe negative Ladungsdichte des Glykosaminoglykans die Anbindung von durch Aminogruppen positiv geladenen Proteine durch Coulombsche Wechselwirkungen [462, 463]. So kann das hier entwickelte NO-Freisetzungssystem im Vergleich zu aktuell verfügbaren Systemen die NO Signalgebung in der HSPZ Nische besser nachahmen und zukünftig helfen, die Beeinflussung von HSPZ durch einen NO Gradienten, wie er zum Beispiel durch Endothelzellen an Blutgefäßen freigesetzt werden sollte, besser untersuchen zu können.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Wie einleitend eingeführt, wurden in der Literatur eine Vielzahl von Einflüssen von NO auf das Differenzierungs- und Proliferationsverhalten von HSZ beschrieben, die zu einer teils widersprüchlichen Datenlage führten. Neben den unterschiedlichen betrachteten HSPZ Populationen und möglichen Speziesunterschieden liegt dies vor allem in der unterschiedlichen Wahl und Konzentration der NO-freisetzenden Moleküle. Diese variieren in ihrer Freisetzungskinetik und einhergehend in der Konzentration an freiem NO, sodass erzielte Ergebnisse nur schwer vergleichbar sind. Daher sollte in vorliegender Arbeit der konzentrationsabhängige Einfluss von NO auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten humaner CD34⁺ Zellen *in vitro* systematisch untersucht werden und so die Frage beantwortet werden, ob NO einen Faktor darstellt, mit dem *in vitro* das Verhalten humaner HSPZ gezielt beeinflusst werden kann.

Die Kernergebnisse, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielt wurden, sind in Abbildung 35 schematisch gezeigt. Mittels PCR wurde zunächst nachgewiesen, dass humane CD34⁺ Zellen nach Isolation aus Nabelschnurblut und humane MSZ aus dem Knochenmark keine der NOS Isoformen exprimierten und so *in vitro* die freie NO Konzentration nicht beeinflussten. Wie in Abbildung 35 A) gezeigt, scheint NO basierend auf diesen Ergebnissen in der humanen HSZ Nische nicht als autokrines Signalmolekül zu fungieren. Auch MSZ als wichtige Komponenten in der HSZ Nische scheinen unter Homöostase keine NO Quelle darzustellen. Einhergehend mit der aktuellen wissenschaftlichen Datenlage könnten Endothelzellen oder reife hämatopoetische Zellen, wie Makrophagen, eine mögliche Quelle von NO darstellen und HSPZ parakrin beeinflussen.

Mit Hilfe der NO-freisetzenden Verbindung DETA/NO, die nach Zusatz zum Zellkulturmedium kontinuierlich NO freisetzt, wurde das HSPZ Verhalten in einem breiten Konzentrationsbereich von NO untersucht. Diese Verbindung generiert *in vitro* NO mit einer Konzentration, die ca. einem Tausendstel der NO-freisetzenden Verbindung entspricht. In vorliegender Arbeit wurde die EC₅₀ von DETA/NO bei langfristiger Stimulation auf 31,5 µM bestimmt. Wie in Abbildung 35 B) gezeigt, waren Konzentrationen, welche diese überstiegen, toxisch für HSPZ und vermittelten NO-induziert Zelltod.

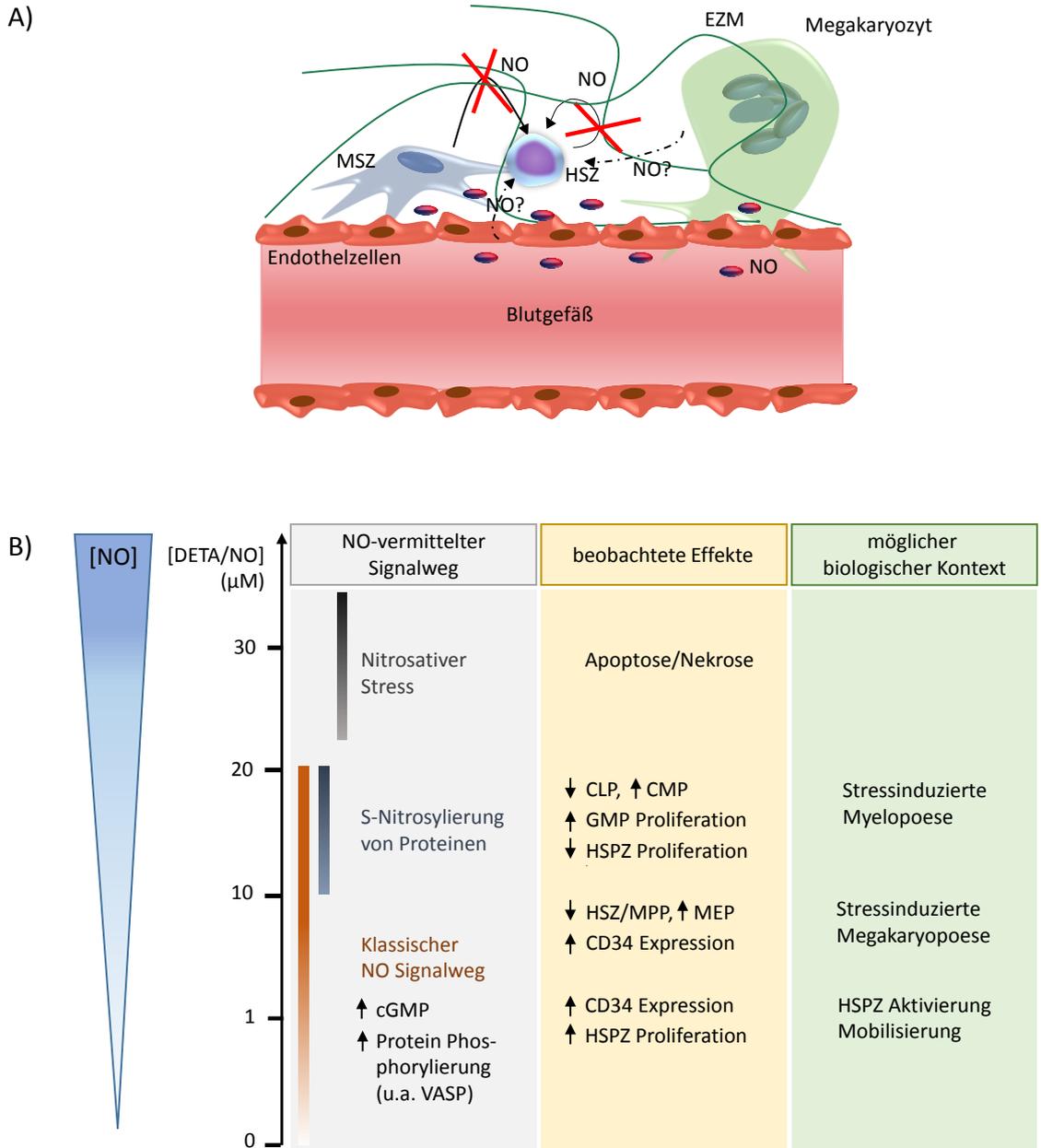


Abbildung 35 Schematische Darstellung der Ergebnisse aus vorliegender Arbeit und Einordnung der Ergebnisse in einen möglichen biologischen Kontext. A) HSZ (violett) befinden sich in der Nische im Knochenmark in der Nähe von Blutgefäßen, welche mit Endothelzellen (rot) ausgekleidet sind. Weitere Nischenelemente sind MSZ (blau) und reife hämatopoetische Zellen, wie Megakaryozyten (grün). Humane HSPZ nach Isolation aus Nabelschnurblut sowie humane MSZ aus Knochenmark exprimierten keine der NOS Isoformen und stellten daher keine NO Quelle dar (durchgestrichene Pfeile). Endothelzellen könnten in der Knochenmarksnische als NO Quelle dienen, zusätzlich könnten Megakaryozyten NO produzieren (gestrichelte Linie). B) Zur Freisetzung von NO wurden in vorliegender Arbeit verschiedene Konzentrationen von DETA/NO eingesetzt (linker Bildabschnitt). Hierbei wird die durch DETA/NO freigesetzte Menge an NO auf ein Tausendstel der Konzentration dieser Verbindung abgeschätzt. In grau hinterlegt sind, basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, den eingesetzten Konzentrationen an DETA/NO NO-vermittelte Signalwege zugeordnet. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, welche mit bestimmten Konzentrationsbereichen von DETA/NO und aktivierten NO-vermittelten Signalwegen korrelierten, sind gelb hinterlegt. Zur Einordnung in einen möglichen biologischen Kontext sind den erzielten Ergebnissen, aufgrund der aktuellen wissenschaftlichen Datenlage mögliche, *in vivo* relevante Prozesse gegenübergestellt (grün hinterlegt).

Geringe Konzentrationen von DETA/NO stimulierten in dieser Arbeit in humanen HSPZ NO-vermittelt den klassischen NO Signalweg durch Bindung von NO an die sGC, wie anhand des Anstieges an intrazellulärem cGMP und der Phosphorylierung des *downstream* Zieles VASP an Ser239 gezeigt wurde. Diese NO Konzentrationen bis ca. 5 μ M DETA/NO korrelierten mit der vermehrten Proliferation von HSPZ sowie der erhöhten CD34 Expression in wenig proliferativen HSPZ. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der klassische NO Signalweg die vermehrte Proliferation und CD34 Expression von HSPZ vermittelt. Ein Nachweis dieses direkten Zusammenhanges steht allerdings noch aus und muss in weiteren Versuchen gezeigt werden. *In vivo* könnte NO in diesem Konzentrationsbereich HSPZ aktivieren und bei der Mobilisierung von HSPZ aus der Knochenmarksnische in das Blutsystem eine Rolle spielen. Zur Identifikation von Effekten, welche durch die Aktivierung des klassischen NO Signalweges herbeigeführt wurden, sollte überprüft werden, ob die NO-vermittelten Effekte durch Inhibition der sGC, zum Beispiel mittels ODQ, abgeschwächt werden können. Zusätzlich sollte ein NO-unabhängiger Aktivator der sGC, wie BAY-41-8543, sowie ein zellpermeables cGMP Analogon eingesetzt werden, um zu überprüfen, ob mit Hilfe dieser Moleküle die verstärkte Proliferation von HSPZ reproduziert werden kann.

Während in dieser Arbeit bei niedrigen DETA/NO Konzentrationen eine vermehrte Proliferation von HSPZ beobachtet wurde, hemmten Konzentrationen ab ca. 10 μ M DETA/NO die Proliferation von HSPZ. Gleichzeitig vermittelte NO konzentrationsabhängig die verstärkte myeloide Differenzierung der Zellen. Dies zeigte sich bei hohen Konzentrationen von DETA/NO anhand einer Reduktion an CLP Anteilen, welche mit der Erhöhung von CMP Anteilen in stärker teilungsaktiven Zellen und der Proliferation von GMPs einherging. Daher scheint NO *in vitro* an der Regulation der Balance von Proliferation und Differenzierung von HSPZ beteiligt zu sein. *In vivo* könnte NO bei akutem Stress, zum Beispiel durch eine Infektion, die Produktion myeloider Zellen anregen, welche für die Bekämpfung des Stressors erforderlich sind. Myeloide Differenzierung der HSPZ wurde besonders bei höheren Konzentrationen von DETA/NO beobachtet, welche mit einem Anstieg an S-Nitrosylierten Proteinen *in vitro* korrelierten. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass erhöhte Konzentrationen von NO *in vitro* über die posttranslationale Proteinmodifikation S-Nitrosylierung, cGMP-unabhängig die myeloide Differenzierung von HSPZ vermittelt, welche in vorliegender Arbeit in einem veränderten Proliferationsverhalten der Zellpopulation resultierte. Um diese Hypothese zu überprüfen und den Anteil von Signalen zu ermitteln, welche durch S-Nitrosylierungen von Proteinen herbeigeführt wurde, könnte den Zellen zusätzlich zur Behandlung mit DETA/NO ein Reduk-

tionsmittel wie Dithiothreitol zugesetzt werden. Dies erlaubt zwar nicht die Identifikation spezifischer S-Nitrosylierungsvorgänge, gibt jedoch einen Hinweis auf die Beteiligung von Redoxsensitiven Proteinthiolen an den beobachteten Effekten.

Einige beobachtete NO-vermittelte Effekte, wie der verringerte Anteil an HSZ und MPP in weniger proliferativen Zellen, welcher mit der konzentrationsabhängigen Erhöhung von MEP Anteilen und einer gesteigerten CD34 Expression in höher proliferativen Zellanteilen einhergehend, schien bereits bei niedrigeren Konzentrationen von DETA/NO (ca. 5 μ M) einzusetzen und mit zunehmender DETA/NO Konzentration verstärkt zu werden. Auch hier kann durch Inhibition der sGC der klassische NO Signalweg unterbunden werden, um Effekte, welche NO-abhängig durch andere Signalwege wie S-Nitrosylierung vermittelt worden sind von Signalen zu trennen, die mit der Aktivierung des klassischen NO Signalweges einhergingen.

Zusammenfassend wurde in vorliegender Arbeit der Einfluss von NO auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten humaner HSPZ *in vitro* in einer konzentrationsabhängigen Art und Weise untersucht. Auf Basis der Ergebnisse dieser Arbeit kann die eingangs gestellte Frage, ob NO ein Faktor zur gezielten Steuerung von HSPZ *in vitro* darstellt, positiv beantwortet werden. So führt der Zusatz von NO konzentrationsabhängig zur Stimulation bzw. Reduktion der HSPZ Proliferation und verstärkt mit zunehmender Konzentration an NO die Differenzierung in myeloide Vorläuferzellen. Mit diesen Beobachtungen trägt die vorliegende Arbeit zum besseren Verständnis der NO-induzierten Signalwege und NO-vermittelter Effekte in humanen HSPZ *in vitro* bei.

Um die Rolle des Signalmoleküls *in vivo* besser nachbilden zu können und um zu überprüfen, ob die durch DETA/NO induzierten Effekte auch durch einen NO Gradienten in HSPZ vermittelt werden, wurde in vorliegender Arbeit ein stimulus-responsives Hydrogel auf Basis von Heparin und sPEG entwickelt. Ein solches Freisetzungssystem sollte durch kovalente Anbindung der NO-freisetzenden Spezies die, mit dem Einsatz löslicher NO-freisetzende Verbindungen einhergehende, Ansammlung von Nebenprodukten im Zellkulturmedium verhindern und zusätzlich die Kontrolle über die zeitliche und räumliche Freisetzung von NO sicherstellen. Dies wurde durch die postsynthetische Anbindung eines photo-sensitiven Nitroanilin-Derivates an freie Carboxylgruppen des Heparins über eine Mehrkomponenten-Ugi-Reaktion erreicht. Mittels FTIR und UV/vis Spektroskopie sowie mittels ToF-SIMS wurde die Anbindung der responsiven Einheit an die Hydrogelmatrix nachgewiesen und gezeigt, dass das Gel im gesamten Gelvolumen funktionalisiert wurde. Erste Versuche zur licht-induzierten Freisetzung von

NO durch blaues bzw. UV Licht zeigten die Freisetzung von NO in einem physiologisch relevanten Konzentrationsbereich. Des Weiteren war das erhaltene funktionalisierte Hydrogel zellverträglich für HSPZ. In zukünftigen Versuchen sollte gezeigt werden, dass die Funktionalisierung des Hydrogels reproduzierbar erreicht werden kann.

Da NO ein kurzlebiges, lokal agierendes Signalmolekül ist, wurden in der Literatur unterschiedliche NO-vermittelte Effekte auf HSPZ *in vivo* und *in vitro* beobachtet. Dies liegt in der stark vereinfachten Zellumgebung *in vitro* begründet, die NO-vermittelte Signalwege in der HSPZ Nische nur unzureichend nachbildet. Mit zunehmender Diffusionslänge nimmt die freie Konzentration von NO ab, indem es in wässriger Umgebung zu Nitrit und Nitrat reagiert. Daher entscheidet der Abstand zur NO Quelle über die Konzentration, welcher Zellen ausgesetzt sind, und so über die aktivierten Signalwege und beobachteten NO-vermittelten Effekte. Aufgrund der Komplexität der HSPZ Nische und der eng verflochtenen Signalwege von NO lassen sich *in vivo* beobachtete Effekte nur schwer nachverfolgen. Zusätzlich sind speziesspezifische Unterschiede der NOS Expression bekannt, sodass NO Konzentrationen und damit aktivierte Signalwege, welche in Mäusen aktiv sind, nicht zwangsläufig dieselben Wirkungen auf humane HSPZ haben müssen. Das hier entwickelte Materialsystem, welches durch die licht-induzierte Freisetzung die räumliche und zeitliche Kontrolle über NO Konzentrationen verspricht, könnte daher ein wichtiger Schritt sein, um *in vitro* den Einfluss von NO auf humane HSPZ unter Homöostase *in vivo* besser zu verstehen. Zukünftig kann die ionische Heparinkomponente durch Beladung mit Wachstumsfaktoren über nicht-kovalente Kräfte oder durch die Anbindung adhäsionsvermittelnder Peptidsequenzen funktionalisiert werden. So ermöglicht das hier weiterentwickelte Hydrogelsystem die Einführung einer zusätzlichen Komplexitätsebene, um die Wirkung von NO auf HSPZ *in vitro* weitergehend analysieren zu können. Zusätzlich können durch Einbringen zentraler Nischenelemente, wie MSZ, indirekte NO-vermittelte Effekte auf HSPZ untersucht werden. Durch Kokultur auf dem funktionalisierten Hydrogel könnten so NO-induzierte Signale von beispielsweise Endothelzellen auf MSZ imitiert werden und so die indirekte Beeinflussung von HSPZ besser verstanden werden.

Zusammenfassend konnte in vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass NO ein Signalmolekül ist, mit dem das Verhalten humaner HSPZ *in vitro* gezielt beeinflusst werden kann. Hierbei lassen sich die NO-vermittelten Effekte durch die Wahl der eingesetzten NO Konzentration steuern. Durch Abbildung eines breiten Konzentrationsbereiches wurden HSPZ Antworten untersucht, wie sie *in vivo* unter Homöostase und Stress eine Rolle spielen könnten. Niedrige

Konzentrationen an DETA/NO schienen Antworten zu vermitteln, wie sie *in vivo* mit der Aktivierung und Mobilisierung von HSPZ einhergehen könnten, während höhere Konzentrationen von DETA/NO ein HSPZ Verhalten induzierten, das *in vivo* in der Stressantwort der Zellen eine Rolle spielen könnte. Zukünftig sollte durch Kultur von HSPZ auf einem stimulus-responsiven NO-freisetzenden Hydrogel die mögliche NO Signalgebung in der HSZ Nische besser nachgebildet werden. Hierzu wurde in vorliegender Arbeit ein erster Machbarkeitsnachweis erbracht und gezeigt, dass NO zeitlich kontrolliert aus einem Hydrogel freigesetzt werden kann. Die Verwendung eines solchen Hydrogelsystems bietet neben der Funktionalisierung mit Wachstumsfaktoren die Möglichkeit, NO lokal kontrolliert freizusetzen und so die mögliche parakrine Beeinflussung durch Nischenzellen wie Endothelzellen *in vivo* besser nachzubilden. So könnte das hier entwickelte System eine Brücke zwischen einfachen *in vitro* Untersuchungen und *in vivo* Studien in Modellorganismen darstellen.

6 Literatur

1. Rieger, M.A. and T. Schroeder, *Hematopoiesis*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(12).
2. Osawa, M., et al., *Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell*. Science, 1996. **273**(5272): p. 242-5.
3. Morrison, S.J. and I.L. Weissman, *The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype*. Immunity, 1994. **1**(8): p. 661-73.
4. Beckmann, J., et al., *Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins*. Blood, 2007. **109**(12): p. 5494-501.
5. Ivanovs, A., et al., *Highly potent human hematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros region*. J Exp Med, 2011. **208**(12): p. 2417-27.
6. Ottersbach, K. and E. Dzierzak, *The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region*. Dev Cell, 2005. **8**(3): p. 377-87.
7. Eilken, H.M., S. Nishikawa, and T. Schroeder, *Continuous single-cell imaging of blood generation from haemogenic endothelium*. Nature, 2009. **457**(7231): p. 896-900.
8. North, T.E., et al., *Hematopoietic stem cell development is dependent on blood flow*. Cell, 2009. **137**(4): p. 736-48.
9. Seita, J. and I.L. Weissman, *Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2010. **2**(6): p. 640-53.
10. Wang, J.C.Y., M. Doedens, and J.E. Dick, *Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay*. Blood, 1997. **89**: p. 3919-24.
11. Civin, C.I., et al., *Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells*. J Immunol, 1984. **133**(1): p. 157-65.
12. Lansdorp, P.M., H.J. Sutherland, and C.J. Eaves, *Selective expression of CD45 isoforms on functional subpopulations of CD34+ hemopoietic cells from human bone marrow*. J Exp Med, 1990. **172**(1): p. 363-6.
13. Bhatia, M., et al., *Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(10): p. 5320-5.
14. Conneally, E., et al., *Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(18): p. 9836-41.
15. Notta, F., et al., *Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment*. Science, 2011. **333**(6039): p. 218-21.
16. Majeti, R., C.Y. Park, and I.L. Weissman, *Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(6): p. 635-45.
17. Doulatov, S., et al., *Hematopoiesis: a human perspective*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(2): p. 120-36.
18. Velten, L., et al., *Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process*. Nat Cell Biol, 2017. **19**(4): p. 271-81.

19. Haas, S., A. Trumpp, and M.D. Milsom, *Causes and consequences of hematopoietic stem cell heterogeneity*. Cell Stem Cell, 2018. **22**(5): p. 627-38.
20. Goardon, N., et al., *Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia*. Cancer Cell, 2011. **19**(1): p. 138-52.
21. Ichii, M., et al., *The density of CD10 corresponds to commitment and progression in the human B lymphoid lineage*. PLoS One, 2010. **5**(9): p. e12954.
22. Berardi, A.C., et al., *Individual CD34+CD38lowCD19-CD10- progenitor cells from human cord blood generate B lymphocytes and granulocytes*. Blood, 1997. **89**(10): p. 3554-64.
23. Doulatov, S., et al., *Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development*. Nat Immunol, 2010. **11**(7): p. 585-93.
24. Manz, M.G., et al., *Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11872-7.
25. Galy, A., et al., *Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset*. Immunity, 1995. **3**(4): p. 459-73.
26. Six, E.M., et al., *A human postnatal lymphoid progenitor capable of circulating and seeding the thymus*. J Exp Med, 2007. **204**(13): p. 3085-93.
27. Karamitros, D., et al., *Single-cell analysis reveals the continuum of human lymphomyeloid progenitor cells*. Nat Immunol, 2018. **19**(1): p. 85-97.
28. Miyamoto, T., et al., *Myeloid or lymphoid promiscuity as a critical step in hematopoietic lineage commitment*. Dev Cell, 2002. **3**(1): p. 137-47.
29. Hattangadi, S.M., et al., *From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications*. Blood, 2011. **118**(24): p. 6258-68.
30. Schofield, R., *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haematopoietic stem cell*. Blood Cells, 1978. **4**(1-2): p. 7-25.
31. Morrison, S.J. and D.T. Scadden, *The bone marrow niche for haematopoietic stem cells*. Nature, 2014. **505**(7483): p. 327-34.
32. Wilson, A., et al., *c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation*. Genes Dev, 2004. **18**(22): p. 2747-63.
33. Nilsson, S.K., H.M. Johnston, and J.A. Coverdale, *Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: Inferences for the localization of stem cell niches*. Blood, 2001. **97**(8): p. 2293-9.
34. Calvi, L.M., et al., *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 841-6.
35. Zhang, J., et al., *Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 836-41.
36. Arai, F., et al., *Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche*. Cell, 2004. **118**(2): p. 149-61.
37. Kiel, M.J., et al., *SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells*. Cell, 2005. **121**(7): p. 1109-21.
38. Lo Celso, C., et al., *Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche*. Nature, 2009. **457**(7225): p. 92-6.
39. Barrett, O., R. Sottocornola, and C. Lo Celso, *In vivo imaging of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche*. Methods Mol Biol, 2012. **916**: p. 231-42.
40. Nombela-Arrieta, C., et al., *Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(5): p. 533-43.

41. Itkin, T., et al., *Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis*. *Nature*, 2016. **532**(7599): p. 323-8.
42. Ramasamy, S.K., et al., *Regulation of hematopoiesis and osteogenesis by blood vessel-derived signals*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2016. **32**: p. 649-75.
43. Kunisaki, Y., et al., *Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence*. *Nature*, 2013. **502**(7473): p. 637-43.
44. Xie, Y., et al., *Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging*. *Nature*, 2009. **457**(7225): p. 97-101.
45. Kim, S., et al., *Extended time-lapse in vivo imaging of tibia bone marrow to visualize dynamic hematopoietic stem cell engraftment*. *Leukemia*, 2017. **31**(7): p. 1582-92.
46. Kusumbe, A.P., S.K. Ramasamy, and R.H. Adams, *Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone*. *Nature*, 2014. **507**(7492): p. 323-8.
47. Krause, D.S., D.T. Scadden, and F.I. Preffer, *The hematopoietic stem cell niche--home for friend and foe?* *Cytometry B Clin Cytom*, 2013. **84**(1): p. 7-20.
48. Sugiyama, T., et al., *Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches*. *Immunity*, 2006. **25**(6): p. 977-88.
49. Ding, L., et al., *Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells*. *Nature*, 2012. **481**(7382): p. 457-62.
50. Hooper, A.T., et al., *Engraftment and reconstitution of hematopoiesis is dependent on VEGFR2-mediated regeneration of sinusoidal endothelial cells*. *Cell Stem Cell*, 2009. **4**(3): p. 263-74.
51. Guezguez, B., et al., *Regional localization within the bone marrow influences the functional capacity of human HSCs*. *Cell Stem Cell*, 2013. **13**(2): p. 175-89.
52. Ludin, A., et al., *Monocytes-macrophages that express alpha-smooth muscle actin preserve primitive hematopoietic cells in the bone marrow*. *Nat Immunol*, 2012. **13**(11): p. 1072-82.
53. Yamazaki, S., et al., *Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche*. *Cell*, 2011. **147**(5): p. 1146-58.
54. Yamazaki, S., et al., *TGF- β as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation*. *Blood*, 2009. **113**(6): p. 1250-6.
55. Ding, L. and S.J. Morrison, *Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches*. *Nature*, 2013. **495**(7440): p. 231-5.
56. Kiel, M.J., G.L. Radice, and S.J. Morrison, *Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance*. *Cell Stem Cell*, 2007. **1**(2): p. 204-17.
57. Zhu, J., et al., *Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells*. *Blood*, 2007. **109**(9): p. 3706-12.
58. Yu, V.W. and D.T. Scadden, *Hematopoietic stem cell and its bone marrow niche*. *Curr Top Dev Biol*, 2016. **118**: p. 21-44.
59. Yu, V.W., et al., *Distinctive mesenchymal-parenchymal cell pairings govern B cell differentiation in the bone marrow*. *Stem Cell Reports*, 2016. **7**(2): p. 220-35.
60. Yu, V.W., et al., *Specific bone cells produce DLL4 to generate thymus-seeding progenitors from bone marrow*. *J Exp Med*, 2015. **212**(5): p. 759-74.
61. Ludin, A., et al., *Reactive oxygen species regulate hematopoietic stem cell self-renewal, migration and development, as well as their bone marrow microenvironment*. *Antioxid Redox Signal*, 2014. **21**(11): p. 1605-19.
62. Golan, K., et al., *SIP promotes murine progenitor cell egress and mobilization via SIP1-mediated ROS signaling and SDF-1 release*. *Blood*, 2012. **119**(11): p. 2478-88.

63. Dar, A., et al., *Rapid mobilization of hematopoietic progenitors by AMD3100 and catecholamines is mediated by CXCR4-dependent SDF-1 release from bone marrow stromal cells*. *Leukemia*, 2011. **25**(8): p. 1286-96.
64. Greenbaum, A., et al., *CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance*. *Nature*, 2013. **495**(7440): p. 227-30.
65. Craddock, C.F., et al., *Antibodies to VLA4 integrin mobilize long-term repopulating cells and augment cytokine-induced mobilization in primates and mice*. *Blood*, 1997. **90**(12): p. 4779-88.
66. Doan, P.L., et al., *Epidermal growth factor regulates hematopoietic regeneration after radiation injury*. *Nat Med*, 2013. **19**(3): p. 295-304.
67. Poulos, M.G., et al., *Endothelial Jagged-1 is necessary for homeostatic and regenerative hematopoiesis*. *Cell Rep*, 2013. **4**(5): p. 1022-34.
68. Butler, J.M., et al., *Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells*. *Cell Stem Cell*, 2010. **6**(3): p. 251-64.
69. Lee-Thedieck, C. and J.P. Spatz, *Biophysical regulation of hematopoietic stem cells*. *Biomater. Sci.*, 2014. **2**(11): p. 1548-61.
70. Papy-Garcia, D. and P. Albanese, *Heparan sulfate proteoglycans as key regulators of the mesenchymal niche of hematopoietic stem cells*. *Glycoconj J*, 2017. **34**(3): p. 377-91.
71. Saez, B., et al., *Inhibiting stromal cell heparan sulfate synthesis improves stem cell mobilization and enables engraftment without cytotoxic conditioning*. *Blood*, 2014. **124**(19): p. 2937-47.
72. Mendez-Ferrer, S., et al., *Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations*. *Nature*, 2008. **452**(7186): p. 442-7.
73. Kollet, O., et al., *Physiologic corticosterone oscillations regulate murine hematopoietic stem/progenitor cell proliferation and CXCL12 expression by bone marrow stromal progenitors*. *Leukemia*, 2013. **27**(10): p. 2006-15.
74. Mendez-Ferrer, S., et al., *Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche*. *Nature*, 2010. **466**(7308): p. 829-34.
75. Golan, K., et al., *Daily onset of light and darkness differentially controls hematopoietic stem cell differentiation and maintenance*. *Cell Stem Cell*, 2018. **23**(4): p. 572-85 e7.
76. Katayama, Y., et al., *Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow*. *Cell*, 2006. **124**(2): p. 407-21.
77. Gur-Cohen, S., et al., *PAR1 signaling regulates the retention and recruitment of EPCR-expressing bone marrow hematopoietic stem cells*. *Nat Med*, 2015. **21**(11): p. 1307-17.
78. Gur-Cohen, S., et al., *Regulation of long-term repopulating hematopoietic stem cells by EPCR/PAR1 signaling*. *Ann N Y Acad Sci*, 2016. **1370**(1): p. 65-81.
79. Gur-Cohen, S., et al., *EPCR guides hematopoietic stem cells homing to the bone marrow independently of niche clearance*. *Blood*, 2016. **128**(22): p. 4538.
80. Chow, A., et al., *Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche*. *J Exp Med*, 2011. **208**(2): p. 261-71.
81. Albiero, M., et al., *Bone marrow macrophages contribute to diabetic stem cell mobilopathy by producing Oncostatin M*. *Diabetes*, 2015. **64**(8): p. 2957-68.
82. Bruns, I., et al., *Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion*. *Nat Med*, 2014. **20**(11): p. 1315-20.
83. Nakamura-Ishizu, A., et al., *CLEC-2 in megakaryocytes is critical for maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow*. *J Exp Med*, 2015. **212**(12): p. 2133-46.

84. Zhao, M., et al., *Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells*. Nat Med, 2014. **20**(11): p. 1321-6.
85. Zhao, M., et al., *FGF signaling facilitates postinjury recovery of mouse hematopoietic system*. Blood, 2012. **120**(9): p. 1831-42.
86. Gillette, J.M., et al., *Intercellular transfer to signalling endosomes regulates an ex vivo bone marrow niche*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(3): p. 303-11.
87. Tamplin, O.J., et al., *Hematopoietic stem cell arrival triggers dynamic remodeling of the perivascular niche*. Cell, 2015. **160**(1-2): p. 241-52.
88. Hoggatt, J., Y. Kfoury, and D.T. Scadden, *Hematopoietic stem cell niche in health and disease*. Annu Rev Pathol, 2016. **11**: p. 555-81.
89. Wei, Q. and P.S. Frenette, *Niches for hematopoietic stem cells and their progeny*. Immunity, 2018. **48**(4): p. 632-48.
90. Ignarro, L.J., et al., *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric-oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9265-9.
91. 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.
92. Noble, M.A., et al., *Potentiometric analysis of the flavin cofactors of neuronal nitric oxide synthase*. Biochemistry, 1999. **38**(50): p. 16413-8.
93. Crane, B.R., et al., *Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate*. Science, 1998. **279**(5359): p. 2121-6.
94. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 3): p. 593-615.
95. Stuehr, D., S. Pou, and G.M. Rosen, *Oxygen reduction by nitric-oxide synthases*. J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 14533-6.
96. Shiva, S., *Nitrite: A physiological store of nitric oxide and modulator of mitochondrial function*. Redox Biol, 2013. **1**(1): p. 40-44.
97. van Faassen, E.E., et al., *Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology*. Medicinal Research Reviews, 2009. **29**(5): p. 683-741.
98. Thomas, D.D., *Breathing new life into nitric oxide signaling: A brief overview of the interplay between oxygen and nitric oxide*. Redox Biol, 2015. **5**: p. 225-33.
99. Stuehr, D.J., *Structure-function aspects in the nitric oxide synthases*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1997. **37**(1): p. 339-59.
100. Hemmens, B. and B. Mayer, *Enzymology of nitric oxide synthases*. Methods Mol Biol, 1998. **100**: p. 1-32.
101. Cho, H.J., et al., *Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages*. J Exp Med, 1992. **176**(2): p. 599-604.
102. Roberts, P.J., et al., *The physiological expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human colon*. J Clin Pathol, 2001. **54**(4): p. 293-7.
103. Forstermann, U. and H. Kleinert, *Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1995. **352**(4): p. 351-64.
104. Forstermann, U., J.P. Boissel, and H. Kleinert, *Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III)*. FASEB J, 1998. **12**(10): p. 773-90.
105. MacMicking, J., Q.W. Xie, and C. Nathan, *Nitric oxide and macrophage function*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 323-50.
106. Coleman, J.W., *Nitric oxide in immunity and inflammation*. Int Immunopharmacol, 2001. **1**(8): p. 1397-406.
107. Forstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function*. Eur Heart J, 2012. **33**(7): p. 829-37, 837a-837d.

108. Balligand, J.L., et al., *Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (Type-III) nitric-oxide synthase in cardiac myocytes*. J Biol Chem 1995. **270**(24): p. 14582-6.
109. Sase, K. and T. Michel, *Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets*. Life Sci, 1995. **57**(22): p. 2049-55.
110. Garcia-Cardena, G., et al., *Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90*. Nature, 1998. **392**(6678): p. 821-4.
111. Ju, H., et al., *Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity*. J Biol Chem, 1997. **272**(30): p. 18522-5.
112. Michel, J.B., et al., *Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin*. J Biol Chem, 1997. **272**(25): p. 15583-6.
113. Gratton, J.P., et al., *Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1*. J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 22268-72.
114. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 601-5.
115. Fulton, D., et al., *Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 597-601.
116. Morales-Ruiz, M., et al., *Sphingosine 1-phosphate activates Akt, nitric oxide production, and chemotaxis through a G-protein/phosphoinositide 3-kinase pathway in endothelial cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 19672-7.
117. Hisamoto, K., et al., *Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3459-67.
118. Boo, Y.C., et al., *Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms role of protein kinase A*. J Biol Chem, 2002. **277**(5): p. 3388-96.
119. Rapoport, R.M., M.B. Draznin, and F. Murad, *Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein-phosphorylation*. Nature, 1983. **306**(5939): p. 174-6.
120. Alheid, U., I. Reichwehr, and U. Forstermann, *Human endothelial cells inhibit platelet aggregation by separately stimulating platelet cyclic AMP and cyclic GMP*. Eur J Pharmacol, 1989. **164**(1): p. 103-10.
121. Busse, R., A. Luckhoff, and E. Bassenge, *Endothelium-derived relaxant factor inhibits platelet activation*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1987. **336**(5): p. 566-71.
122. Duda, D.G., D. Fukumura, and R.K. Jain, *Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells*. Trends Mol Med, 2004. **10**(4): p. 143-5.
123. Zhou, L. and D.Y. Zhu, *Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications*. Nitric Oxide, 2009. **20**(4): p. 223-30.
124. Izumi, Y., D.B. Clifford, and C.F. Zorumski, *Inhibition of long-term potentiation by NMDA-mediated nitric oxide release*. Science, 1992. **257**(5074): p. 1273-6.
125. Izumi, Y. and C.F. Zorumski, *Nitric oxide and long-term synaptic depression in the rat hippocampus*. Neuroreport, 1993. **4**(9): p. 1131-4.
126. Schuman, E.M. and D.V. Madison, *A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation*. Science, 1991. **254**(5037): p. 1503-6.
127. Forstermann, U., et al., *Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions*. Hypertension, 1994. **23**(6 Pt 2): p. 1121-31.
128. Melikian, N., et al., *Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation*. Trends Cardiovasc Med, 2009. **19**(8): p. 256-62.

129. Giulivi, C., *Characterization and function of mitochondrial nitric-oxide synthase*. Free Radic Biol Med, 2003. **34**(4): p. 397-408.
130. Miller, M.R. and I.L. Megson, *Recent developments in nitric oxide donor drugs*. Br J Pharmacol, 2007. **151**(3): p. 305-21.
131. Thomas, D.D., et al., *The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(1): p. 355-60.
132. Thomas, D.D., et al., *The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(1): p. 18-31.
133. Hall, C.N. and J. Garthwaite, *What is the real physiological NO concentration in vivo?* Nitric Oxide, 2009. **21**(2): p. 92-103.
134. Bellamy, T.C., C. Griffiths, and J. Garthwaite, *Differential sensitivity of guanylyl cyclase and mitochondrial respiration to nitric oxide measured using clamped concentrations*. J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 31801-7.
135. Kamisaki, Y., et al., *Soluble guanylate-cyclase from rat lung exists as a heterodimer*. J Biol Chem, 1986. **261**(16): p. 7236-41.
136. Gerzer, R., et al., *Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper*. FEBS Lett, 1981. **132**(1): p. 71-4.
137. Wedel, B., et al., *Mutation of His-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(7): p. 2592-6.
138. Makino, R., et al., *EPR characterization of axial bond in metal center of native and cobalt-substituted guanylate cyclase*. J Biol Chem, 1999. **274**(12): p. 7714-23.
139. Zhao, Y., et al., *A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(26): p. 14753-8.
140. Hasan, S., et al., *Controlled and localized nitric oxide precursor delivery from chitosan gels to staphylococcus aureus biofilms*. J Pharm Sci, 2017. **106**(12): p. 3556-63.
141. Thomas, D.D., et al., *Signaling and stress: The redox landscape in NOS2 biology*. Free Radic Biol Med, 2015. **87**: p. 204-25.
142. Russwurm, M. and D. Koesling, *NO activation of guanylyl cyclase*. EMBO J, 2004. **23**(22): p. 4443-50.
143. Fernhoff, N.B., E.R. Derbyshire, and M.A. Marletta, *A nitric oxide/cysteine interaction mediates the activation of soluble guanylate cyclase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(51): p. 21602-7.
144. Sayed, N., et al., *Desensitization of soluble guanylyl cyclase, the NO receptor, by S-nitrosylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(30): p. 12312-7.
145. Ahern, G.P., V.A. Klyachko, and M.B. Jackson, *cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO*. Trends Neurosci, 2002. **25**(10): p. 510-7.
146. Hofmann, F., *The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases*. J Biol Chem, 2005. **280**(1): p. 1-4.
147. Francis, S.H., et al., *cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action*. Pharmacol Rev, 2010. **62**(3): p. 525-63.
148. Hofmann, F., et al., *cGMP regulated protein kinases (cGK)*. Handb Exp Pharmacol, 2009(191): p. 137-62.
149. Trichet, L., C. Sykes, and J. Plastino, *Relaxing the actin cytoskeleton for adhesion and movement with Ena/VASP*. J Cell Biol, 2008. **181**(1): p. 19-25.
150. Thomson, D.M., et al., *Phosphorylation of VASP by AMPK alters actin binding and occurs at a novel site*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **414**(1): p. 215-9.

151. Doppler, H.R., et al., *Protein kinase D1-mediated phosphorylations regulate vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) localization and cell migration*. J Biol Chem, 2013. **288**(34): p. 24382-93.
152. Ball, L.J., et al., *Dual epitope recognition by the VASP EVH1 domain modulates polyproline ligand specificity and binding affinity*. EMBO J, 2000. **19**(18): p. 4903-14.
153. Benz, P.M., et al., *Cytoskeleton assembly at endothelial cell-cell contacts is regulated by alphaII-spectrin-VASP complexes*. J Cell Biol, 2008. **180**(1): p. 205-19.
154. Lambrechts, A., et al., *cAMP-dependent protein kinase phosphorylation of EVL, a Mena/VASP relative, regulates its interaction with actin and SH3 domains*. J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 36143-51.
155. Bachmann, C., et al., *The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation*. J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 23549-57.
156. Doppler, H. and P. Storz, *Regulation of VASP by phosphorylation: consequences for cell migration*. Cell Adh Migr, 2013. **7**(6): p. 482-6.
157. Benz, P.M., et al., *Differential VASP phosphorylation controls remodeling of the actin cytoskeleton*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 21): p. 3954-65.
158. Zhuang, S., et al., *Vasodilator-stimulated phosphoprotein activation of serum-response element-dependent transcription occurs downstream of RhoA and is inhibited by cGMP-dependent protein kinase phosphorylation*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 10397-407.
159. Zuzga, D.S., et al., *Phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein Ser239 suppresses filopodia and invadopodia in colon cancer*. Int J Cancer, 2012. **130**(11): p. 2539-48.
160. Bear, J.E. and F.B. Gertler, *Ena/VASP: towards resolving a pointed controversy at the barbed end*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 12): p. 1947-53.
161. Martinez-Ruiz, A., S. Cadenas, and S. Lamas, *Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms*. Free Radic Biol Med, 2011. **51**(1): p. 17-29.
162. Yuan Ze University, A.S., *dbSNO database of cysteine S-nitrosylation*.
163. Beigi, F., et al., *Dynamic denitrosylation via S-nitrosoglutathione reductase regulates cardiovascular function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(11): p. 4314-9.
164. Zamorano, P., et al., *Galectin-8 induces endothelial hyperpermeability through the eNOS pathway involving S-nitrosylation-mediated adherens junction disassembly*. Carcinogenesis, 2019: p. [Epub ahead of print].
165. Zhou, H.L., et al., *Metabolic reprogramming by the S-nitroso-CoA reductase system protects against kidney injury*. Nature, 2019. **565**(7737): p. 96-100.
166. Chen, Y.J., et al., *Nitrite protects neurons against hypoxic damage through S-nitrosylation of caspase-6*. Antioxid Redox Signal, 2018.
167. Vielma, A.Z., et al., *Nitric oxide synthase 1 modulates basal and beta-adrenergic-stimulated contractility by rapid and reversible redox-dependent S-nitrosylation of the heart*. PLoS One, 2016. **11**(8): p. e0160813.
168. Nakamura, T., et al., *Aberrant protein S-nitrosylation contributes to the pathophysiology of neurodegenerative diseases*. Neurobiol Dis, 2015. **84**: p. 99-108.
169. Foster, M.W., D.T. Hess, and J.S. Stamler, *Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective*. Trends Mol Med, 2009. **15**(9): p. 391-404.
170. Choi, M.S., *Pathophysiological role of S-nitrosylation and transnitrosylation depending on S-nitrosoglutathione levels regulated by S-nitrosoglutathione reductase*. Biomol Ther, 2018. **26**(6): p. 533-8.
171. Blaise, G.A., et al., *Nitric oxide, cell signaling and cell death*. Toxicology, 2005. **208**(2): p. 177-92.

172. Wynia-Smith, S.L. and B.C. Smith, *Nitrosothiol formation and S-nitrosation signaling through nitric oxide synthases*. Nitric Oxide, 2017. **63**: p. 52-60.
173. Derakhshan, B., P.C. Wille, and S.S. Gross, *Unbiased identification of cysteine S-nitrosylation sites on proteins*. Nat Protoc, 2007. **2**(7): p. 1685-91.
174. Mannick, J.B. and C.M. Schonhoff, *NO means no and yes: Regulation of cell signaling by protein nitrosylation*. Free Radic Res, 2009. **38**(1): p. 1-7.
175. Hao, G., et al., *SNOSID, a proteomic method for identification of cysteine S-nitrosylation sites in complex protein mixtures*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(4): p. 1012-7.
176. Seth, D., et al., *A multiplex enzymatic machinery for cellular protein S-nitrosylation*. Mol Cell, 2018. **69**(3): p. 451-64.
177. Forrester, M.T., et al., *Proteomic analysis of S-nitrosylation and denitrosylation by resin-assisted capture*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(6): p. 557-9.
178. Doulias, P.T., et al., *Structural profiling of endogenous S-nitrosocysteine residues reveals unique features that accommodate diverse mechanisms for protein S-nitrosylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(39): p. 16958-63.
179. Marino, S.M. and V.N. Gladyshev, *Structural analysis of cysteine S-nitrosylation: a modified acid-based motif and the emerging role of trans-nitrosylation*. J Mol Biol, 2010. **395**(4): p. 844-59.
180. Gould, N., et al., *Regulation of protein function and signaling by reversible cysteine S-nitrosylation*. J Biol Chem, 2013. **288**(37): p. 26473-9.
181. Stamler, J.S., *Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide*. Cell, 1994. **78**(6): p. 931-6.
182. Stomberski, C.T., D.T. Hess, and J.S. Stamler, *Protein S-nitrosylation: Determinants of specificity and enzymatic regulation of S-nitrosothiol-based signaling*. Antioxid Redox Signal, 2019. **30**(10): p. 1331-51.
183. Zhou, H.L., C.T. Stomberski, and J.S. Stamler, *Cross talk between S-nitrosylation and phosphorylation involving kinases and nitrosylases*. Circ Res, 2018. **122**(11): p. 1485-7.
184. Wolhuter, K., et al., *Evidence against stable protein S-nitrosylation as a widespread mechanism of post-translational regulation*. Mol Cell, 2018. **69**(3): p. 438-50.
185. Brown, G.C., *Nitric oxide and mitochondrial respiration*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1411**(2-3): p. 351-69.
186. Clementi, E., et al., *On the mechanism by which vascular endothelial cells regulate their oxygen consumption*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(4): p. 1559-1562.
187. Erusalimsky, J.D. and S. Moncada, *Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(12): p. 2524-31.
188. Wink, D.A., et al., *DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors*. Science, 1991. **254**(5034): p. 1001-3.
189. Fehsel, K., et al., *Islet cell DNA is a target of inflammatory attack by nitric oxide*. Diabetes, 1993. **42**(3): p. 496-500.
190. Ischiropoulos, H., *Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **305**(3): p. 776-83.
191. Radi, R., *Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(12): p. 4003-8.
192. Souza, J.M., G. Peluffo, and R. Radi, *Protein tyrosine nitration--functional alteration or just a biomarker?* Free Radic Biol Med, 2008. **45**(4): p. 357-66.

193. Abello, N., et al., *Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins*. J Proteome Res, 2009. **8**(7): p. 3222-38.
194. Batthyany, C., et al., *Tyrosine-nitrated proteins: Proteomic and bioanalytical aspects*. Antioxid Redox Signal, 2017. **26**(7): p. 313-28.
195. Vasudevan, D., R.C. Bovee, and D.D. Thomas, *Nitric oxide, the new architect of epigenetic landscapes*. Nitric Oxide, 2016. **59**(Supplement C): p. 54-62.
196. Socco, S., et al., *Epigenetics: The third pillar of nitric oxide signaling*. Pharmacol Res, 2017. **121**(Supplement C): p. 52-8.
197. Vasudevan, D., et al., *Nitric oxide regulates gene expression in cancers by controlling histone posttranslational modifications*. Cancer Res, 2015. **75**(24): p. 5299-308.
198. Doctorovich, F., et al., *Reactions of HNO with metal porphyrins: Underscoring the biological relevance of HNO*. Acc Chem Res, 2014. **47**(10): p. 2907-16.
199. Miao, Z. and S.B. King, *Recent advances in the chemical biology of nitroxyl (HNO) detection and generation*. Nitric Oxide, 2016. **57**: p. 1-14.
200. Nichols, S.P., et al., *Local delivery of nitric oxide: targeted delivery of therapeutics to bone and connective tissues*. Adv Drug Deliv Rev, 2012. **64**(12): p. 1177-88.
201. Rose, M.J. and P.K. Mascharak, *Photoactive ruthenium nitrosyls: Effects of light and potential application as NO donors*. Coord Chem Rev, 2008. **252**(18-20): p. 2093-114.
202. Fry, N.L. and P.K. Mascharak, *Photoactive ruthenium nitrosyls as NO donors: how to sensitize them toward visible light*. Acc Chem Res, 2011. **44**(4): p. 289-98.
203. Ford, P.C., et al., *Photochemistry of metal nitrosyl complexes. Delivery of nitric oxide to biological targets*. Coord Chem Rev, 1998. **171**: p. 185-202.
204. de Lima, R.G., et al., *Ruthenium complexes as NO donors for vascular relaxation induction*. Molecules, 2014. **19**(7): p. 9628-54.
205. Thomas, D.D., et al., *Guide for the use of nitric oxide (NO) donors as probes of the chemistry of NO and related redox species in biological systems*. Methods Enzymol, 2002. **359**: p. 84-105.
206. Haitham, A. and A. Ferro, *S-Nitrosothiols: A class of nitric oxide-donor drugs*. Clin Sci (Lond), 2000. **98**(5): p. 507-20.
207. Askew, S.C., et al., *Catalysis by Cu²⁺ of nitric oxide release from S-nitrosothiols (RSNO)*. J Chem Soc, Perkin Trans 2, 1995(4): p. 741.
208. Williams, D.L.H., *Identification of Cu⁺ as the effective reagent in nitric oxide formation from S-nitrosothiols (RSNO)*. J Chem Soc, Perkin Trans 2, 1996(4): p. 481-7.
209. Williams, D.L.H., *The chemistry of S-nitrosothiols*. Acc Chem Res, 1999. **32**(10): p. 869-76.
210. Arnelle, D.R. and J.S. Stamler, *NO⁺, NO, and NO⁻ donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation*. Arch Biochem Biophys, 1995. **318**(2): p. 279-85.
211. Hickok, J.R., et al., *Is S-nitrosocysteine a true surrogate for nitric oxide?* Antioxid Redox Signal, 2012. **17**(7): p. 962-8.
212. Keefer, L.K., et al., *"NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: Convenient nitric oxide dosage forms*. Methods Enzymol, 1996. **268**: p. 281-93.
213. Saavedra, J.E., et al., *Esterase-sensitive nitric oxide donors of the diazeniumdiolate family: in vitro antileukemic activity*. J Med Chem, 2000. **43**(2): p. 261-9.
214. Shami, P.J., et al., *JS-K, a glutathione/glutathione S-transferase-activated nitric oxide donor of the diazeniumdiolate class with potent antineoplastic activity*. Mol Cancer Ther, 2003. **2**(4): p. 409-17.

215. Chen, C., et al., *Delivery of nitric oxide released from beta-Gal-NONOate activation by beta-galactosidase and its activity against Escherichia coli*. Biol Pharm Bull, 2006. **29**(6): p. 1239-41.
216. Bedell, B.J., et al., *Novel β -galactosidase-specific O₂-glycosylated diazeniumdiolate probes*. Can J Chem, 2010. **88**(9): p. 969-80.
217. Nakagawa, H., *Photocontrollable nitric oxide (NO) and nitroxyl (HNO) donors and their release mechanisms*. Nitric Oxide, 2011. **25**(2): p. 195-200.
218. Namiki, S., et al., *Bis-N-nitroso-caged nitric oxides: photochemistry and biological performance test by rat aorta vasorelaxation*. Bioorg Med Chem, 1999. **7**(8): p. 1695-702.
219. Hishikawa, K., et al., *Photoinduced nitric oxide release from a hindered nitrobenzene derivative by two-photon excitation*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(22): p. 7488-9.
220. Ieda, N., et al., *A double bond-conjugated dimethylnitrobenzene-type photolabile nitric oxide donor with improved two-photon cross section*. Bioorg Med Chem Lett, 2015. **25**(16): p. 3172-5.
221. Suzuki, T., et al., *Photoinduced nitric oxide release from nitrobenzene derivatives*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(33): p. 11720-6.
222. Callari, F.L. and S. Sortino, *Amplified nitric oxide photorelease in DNA proximity*. Chem Commun (Camb), 2008(17): p. 1971-3.
223. Hishikawa, K., et al., *Multiple bond-conjugated photoinduced nitric oxide releaser working with two-photon excitation*. Bioorg Med Chem Lett, 2010. **20**(1): p. 302-5.
224. Nakagawa, H., et al., *Fine spatiotemporal control of nitric oxide release by infrared pulse-laser irradiation of a photolabile donor*. ACS Chem Biol, 2013. **8**(11): p. 2493-500.
225. Riccio, D.A. and M.H. Schoenfisch, *Nitric oxide release: part I. Macromolecular scaffolds*. Chem Soc Rev, 2012. **41**(10): p. 3731-41.
226. Yang, T., A.N. Zelikin, and R. Chandrawati, *Progress and promise of nitric oxide-releasing platforms*. Adv Sci (Weinh), 2018. **5**(6): p. 1701043.
227. Seabra, A.B. and N. Duran, *Nanoparticulated nitric oxide donors and their biomedical applications*. Mini Rev Med Chem, 2017. **17**(3): p. 216-23.
228. Zhou, X., et al., *Nitric oxide-releasing biomaterials for biomedical applications*. Curr Med Chem, 2016. **23**(24): p. 2579-601.
229. Gregg, S.T., et al., *Functionalised solids delivering bioactive nitric oxide gas for therapeutic applications*. Mater Today Commun, 2017. **12**: p. 95-105.
230. Yang, Y., et al., *Nitric oxide based strategies for applications of biomedical devices*. Biosurface Biotribol, 2015. **1**(3): p. 177-201.
231. Pelegrino, M.T., D.R. de Araujo, and A.B. Seabra, *S-nitrosoglutathione-containing chitosan nanoparticles dispersed in Pluronic F-127 hydrogel: Potential uses in topical applications*. J Drug Deliv Sci Technol, 2018. **43**: p. 211-20.
232. Hlaing, S.P., et al., *S-Nitrosoglutathione loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for prolonged nitric oxide release and enhanced healing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus-infected wounds*. Eur J Pharm Biopharm, 2018. **132**: p. 94-102.
233. Cabrales, P., et al., *Sustained release nitric oxide from long-lived circulating nanoparticles*. Free Radic Biol Med, 2010. **49**(4): p. 530-8.
234. Champeau, M., et al., *Supramolecular poly(acrylic acid)/F127 hydrogel with hydration-controlled nitric oxide release for enhancing wound healing*. Acta Biomater, 2018. **74**: p. 312-25.
235. Yao, X., et al., *Nitric oxide releasing hydrogel enhances the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells for myocardial infarction*. Biomaterials, 2015. **60**: p. 130-40.

236. Schanuel, F.S., et al., *Combined nitric oxide-releasing poly(vinyl alcohol) film/F127 hydrogel for accelerating wound healing*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2015. **130**: p. 182-91.
237. Gao, J., et al., *Enzyme-controllable delivery of nitric oxide from a molecular hydrogel*. Chem Commun (Camb), 2013. **49**(80): p. 9173-5.
238. Seabra, A.B., et al., *S-nitrosoglutathione incorporated in poly(ethylene glycol) matrix: potential use for topical nitric oxide delivery*. Nitric Oxide, 2004. **11**(3): p. 263-72.
239. Ji, Y., et al., *Cross-linked branched polyethylenimine used as a nitric oxide donor for prolonged nitric oxide release*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017. **81**: p. 492-9.
240. Zhao, Q., et al., *Polysaccharide-based biomaterials with on-demand nitric oxide releasing property regulated by enzyme catalysis*. Biomaterials, 2013. **34**(33): p. 8450-8.
241. Park, J., et al., *Nitric oxide integrated polyethylenimine-based tri-block copolymer for efficient antibacterial activity*. Biomaterials, 2013. **34**(34): p. 8766-75.
242. Reynolds, M.M., et al., *Tailored synthesis of nitric oxide-releasing polyurethanes using o-protected diazeniumdiolated chain extenders*. J Mater Chem, 2010. **20**(15): p. 3107-14.
243. Taite, L.J., et al., *Nitric oxide-releasing polyurethane-PEG copolymer containing the YIGSR peptide promotes endothelialization with decreased platelet adhesion*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2008. **84**(1): p. 108-16.
244. Zhou, Z. and M.E. Meyerhoff, *Preparation and characterization of polymeric coatings with combined nitric oxide release and immobilized active heparin*. Biomaterials, 2005. **26**(33): p. 6506-17.
245. Wang, X., et al., *Nitric oxide-releasing semi-crystalline thermoplastic polymers: preparation, characterization and application to devise anti-inflammatory and bactericidal implants*. Biomater Sci, 2018. **6**(12): p. 3189-201.
246. Baldim, V. and M.G. de Oliveira, *Poly- ϵ -caprolactone/polysulfhydrylated polyester blend: A platform for topical and degradable nitric oxide-releasing materials*. Eur Polym J, 2018. **109**: p. 143-52.
247. Jo, Y.S., et al., *Micelles for delivery of nitric oxide*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(40): p. 14413-8.
248. Lowe, A., et al., *Electrospun nitric oxide releasing bandage with enhanced wound healing*. Acta Biomater, 2015. **13**: p. 121-30.
249. Kushwaha, M., et al., *A nitric oxide releasing, self assembled peptide amphiphile matrix that mimics native endothelium for coating implantable cardiovascular devices*. Biomaterials, 2010. **31**(7): p. 1502-8.
250. Backlund, C.J., B.V. Worley, and M.H. Schoenfisch, *Anti-biofilm action of nitric oxide-releasing alkyl-modified poly(amidoamine) dendrimers against Streptococcus mutans*. Acta Biomater, 2016. **29**: p. 198-205.
251. Johnson, T.A., et al., *Reduced ischemia/reperfusion injury via glutathione-initiated nitric oxide-releasing dendrimers*. Nitric Oxide, 2010. **22**(1): p. 30-6.
252. Stasko, N.A. and M.H. Schoenfisch, *Dendrimers as a scaffold for nitric oxide release*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(25): p. 8265-71.
253. Neidrauer, M., et al., *Antimicrobial efficacy and wound-healing property of a topical ointment containing nitric-oxide-loaded zeolites*. J Med Microbiol, 2014. **63**(Pt 2): p. 203-9.
254. Wheatley, P.S., et al., *NO-releasing zeolites and their antithrombotic properties*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(2): p. 502-9.
255. Peikert, K., et al., *Tuning the nitric oxide release behavior of amino functionalized HKUST-1*. Microporous Mesoporous Mater, 2015. **216**: p. 118-26.

256. Lowe, A., et al., *Storage and delivery of nitric oxide via diazeniumdiolated metal organic framework*. Microporous Mesoporous Mater, 2013. **181**: p. 17-22.
257. Nguyen, J.G., K.K. Tanabe, and S.M. Cohen, *Postsynthetic diazeniumdiolate formation and NO release from MOFs*. CrystEngComm, 2010. **12**(8): p. 2335-8.
258. Halpenny, G.M., et al., *Characterization of pHEMA-based hydrogels that exhibit light-induced bactericidal effect via release of NO*. J Mater Sci Mater Med, 2009. **20**(11): p. 2353-60.
259. de Santana, D.C., et al., *Nitric oxide photorelease from hydrogels and from skin containing a nitro-ruthenium complex*. Int J Pharm, 2010. **391**(1-2): p. 21-8.
260. Sauaia, M.G., et al., *Photoinduced NO release by visible light irradiation from pyrazine-bridged nitrosyl ruthenium complexes*. J Am Chem Soc, 2003. **125**(48): p. 14718-9.
261. Marquele-Oliveira, F., et al., *Development of nitrosyl ruthenium complex-loaded lipid carriers for topical administration: improvement in skin stability and in nitric oxide release by visible light irradiation*. J Pharm Biomed Anal, 2010. **53**(4): p. 843-51.
262. Eroy-Reveles, A.A., et al., *Near-infrared light activated release of nitric oxide from designed photoactive manganese nitrosyls: strategy, design, and potential as NO donors*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(13): p. 4447-58.
263. Eroy-Reveles, A.A., Y. Leung, and P.K. Mascharak, *Release of nitric oxide from a sol-gel hybrid material containing a photoactive manganese nitrosyl upon illumination with visible light*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(22): p. 7166-7.
264. Lourenco, S.D. and M.G. de Oliveira, *Topical photochemical nitric oxide release from porous poly(vinyl alcohol) membrane for visible light modulation of dermal vasodilation*. J Photochem Photobiol A Chem, 2017. **346**: p. 548-58.
265. Shishido, S.M., et al., *Thermal and photochemical nitric oxide release from S-nitrosothiols incorporated in Pluronic F127 gel: potential uses for local and controlled nitric oxide release*. Biomaterials, 2003. **24**(20): p. 3543-53.
266. Burks, P.T., et al., *Nitric oxide releasing materials triggered by near-infrared excitation through tissue filters*. J Am Chem Soc, 2013. **135**(48): p. 18145-52.
267. Diring, S., et al., *Localized cell stimulation by nitric oxide using a photoactive porous coordination polymer platform*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2684.
268. Kim, C., et al., *Light-induced nitric oxide release from physiologically stable porous coordination polymers*. Dalton Trans, 2015. **44**(34): p. 15324-33.
269. Kandoth, N., et al., *A NO photoreleasing supramolecular hydrogel with bactericidal action*. J Mat Chem B, 2013. **1**(28): p. 3458-63.
270. Kanayama, N., K. Yamaguchi, and Y. Nagasaki, *PEGylated polymer micelle-based nitric oxide (NO) photodonor with NO-mediated antitumor activity*. Chem Lett, 2010. **39**(9): p. 1008-9.
271. Fraix, A., et al., *A multicomponent gel for nitric oxide photorelease with fluorescence reporting*. Asian J Org Chem, 2015. **4**(3): p. 256-61.
272. Ishida, A., et al., *Tumor suppressor p53 but not cGMP mediates NO-induced expression of p21(Waf1/Cip1/Sdi1) in vascular smooth muscle cells*. Mol Pharmacol, 1999. **56**(5): p. 938-46.
273. Tanner, F., et al., *Nitric oxide modulates expression of cell cycle regulatory proteins A cytostatic strategy for inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation*. Circulation, 2000. **101**: p. 1982-9.
274. Stotz, W.H., D. Li, and R.A. Johns, *Exogenous nitric oxide upregulates p21(waf1/cip1) in pulmonary microvascular smooth muscle cells*. J Vasc Res, 2004. **41**(3): p. 211-9.
275. Kibbe, M.R., et al., *Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression upregulates p21 and inhibits vascular smooth muscle cell proliferation through p42/44 mitogen-*

- activated protein kinase activation and independent of p53 and cyclic guanosine monophosphate.* J Vasc Surg, 2000. **31**(6): p. 1214-28.
276. Cui, X., et al., *cGMP-independent nitric oxide signaling and regulation of the cell cycle.* BMC Genomics, 2005. **6**(1): p. 151.
277. Gu, M., J. Lynch, and P. Brecher, *Nitric oxide increases p21(Waf1/Cip1) expression by a cGMP-dependent pathway that includes activation of extracellular signal-regulated kinase and p70(S6k).* J Biol Chem, 2000. **275**(15): p. 11389-96.
278. Bauer, P.M., et al., *Nitric oxide inhibits ornithine decarboxylase via S-nitrosylation of cysteine 360 in the active site of the enzyme.* J Biol Chem, 2001. **276**(37): p. 34458-64.
279. Wedgwood, S. and S.M. Black, *Molecular mechanisms of nitric oxide-induced growth arrest and apoptosis in fetal pulmonary arterial smooth muscle cells.* Nitric Oxide, 2003. **9**(4): p. 201-10.
280. Ciani, E., et al., *Nitric oxide negatively regulates proliferation and promotes neuronal differentiation through N-Myc downregulation.* J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 20): p. 4727-37.
281. Wu, C.L., et al., *In vivo association of E2F and DP family proteins.* Mol Cell Biol, 1995. **15**(5): p. 2536-46.
282. Pervin, S., R. Singh, and G. Chaudhuri, *Nitric oxide-induced cytostasis and cell cycle arrest of a human breast cancer cell line (MDA-MB-231): potential role of cyclin D1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3583-8.
283. Sharma, R.V., et al., *NOS gene transfer inhibits expression of cell cycle regulatory molecules in vascular smooth muscle cells.* Am J Physiol, 1999. **276**(5): p. 1450-9.
284. Guo, K., V. Andres, and K. Walsh, *Nitric oxide-induced downregulation of Cdk2 activity and cyclin A gene transcription in vascular smooth muscle cells.* Circulation, 1998. **97**(20): p. 2066-72.
285. Chen, L., et al., *Vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates proliferation and growth inhibition by nitric oxide in vascular smooth muscle cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(8): p. 1403-8.
286. Maeda, Y., et al., *Endogenously generated nitric oxide by nitric-oxide synthase gene transfer inhibits cellular proliferation.* J Pharmacol Exp Ther, 2000. **292**(1): p. 387-93.
287. Murillo-Carretero, M., et al., *S-Nitrosylation of the epidermal growth factor receptor: a regulatory mechanism of receptor tyrosine kinase activity.* Free Radic Biol Med, 2009. **46**(4): p. 471-9.
288. Villalobo, A., *Nitric oxide and cell proliferation.* FEBS J, 2006. **273**(11): p. 2329-44.
289. Kim, S.A., et al., *Laminar shear stress suppresses vascular smooth muscle cell proliferation through nitric oxide-AMPK pathway.* Biochem Biophys Res Commun, 2017. **490**(4): p. 1369-74.
290. Gooch, K.J., C.A. Dangler, and J.A. Frangos, *Exogenous, basal, and flow-induced nitric oxide production and endothelial cell proliferation.* J Cell Physiol, 1997. **171**(3): p. 252-8.
291. Buga, G.M., et al., *NG-hydroxy-L-arginine and nitric oxide inhibit Caco-2 tumor cell proliferation by distinct mechanisms.* Am J Physiol, 1998. **275**(4): p. R1256-64.
292. Pervin, S., et al., *Nitric oxide in physiologic concentrations targets the translational machinery to increase the proliferation of human breast cancer cells: involvement of mammalian target of rapamycin/eIF4E pathway.* Cancer Res, 2007. **67**(1): p. 289-99.
293. Kumar, S., M.K. Barthwal, and M. Dikshit, *Cdk2 nitrosylation and loss of mitochondrial potential mediate NO-dependent biphasic effect on HL-60 cell cycle.* Free Radic Biol Med, 2010. **48**(6): p. 851-61.

294. Batista, W.L., et al., *S-nitrosoglutathione and endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide regulate compartmentalized ras S-nitrosylation and stimulate cell proliferation*. *Antioxid Redox Signal*, 2013. **18**(3): p. 221-38.
295. Napoli, C., et al., *Effects of nitric oxide on cell proliferation: Novel insights*. *J Am Coll Cardiol*, 2013. **62**(2): p. 89-95.
296. Carreira, B.P., et al., *Differential contribution of the guanylyl cyclase-cyclic GMP-protein kinase G pathway to the proliferation of neural stem cells stimulated by nitric oxide*. *Neurosignals*, 2013. **21**(1-2): p. 1-13.
297. Napoli, C., et al., *Effects of Nitric Oxide on Cell Proliferation: Novel Insights*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2013. **62**(2): p. 89-95.
298. Tejedo, J.R., et al., *Low concentrations of nitric oxide delay the differentiation of embryonic stem cells and promote their survival*. *Cell Death Dis*, 2010. **1**: p. e80.
299. Zhan, R., et al., *Nitric oxide promotes epidermal stem cell proliferation via FOXG1-c-Myc signalling*. *Nitric Oxide*, 2018. **73**: p. 1-8.
300. Wong, J.C. and R.R. Fiscus, *Essential roles of the nitric oxide (no)/cGMP/protein kinase G type-Ialpha (PKG-Ialpha) signaling pathway and the atrial natriuretic peptide (ANP)/cGMP/PKG-Ialpha autocrine loop in promoting proliferation and cell survival of OP9 bone marrow stromal cells*. *J Cell Biochem*, 2011. **112**(3): p. 829-39.
301. Lv, H., et al., *Puerarin enhances proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells via a nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate signaling pathway*. *Mol Med Rep*, 2015. **12**(2): p. 2283-90.
302. Douguet, L., et al., *Nitric oxide synthase 2 improves proliferation and glycolysis of peripheral gammadelta T cells*. *PLoS One*, 2016. **11**(11): p. e0165639.
303. Lepic, E., et al., *Lack of endothelial nitric oxide synthase decreases cardiomyocyte proliferation and delays cardiac maturation*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006. **291**(6): p. C1240-6.
304. Enikolopov, G., J. Banerji, and B. Kuzin, *Nitric oxide and Drosophila development*. *Cell Death Differ*, 1999. **6**(10): p. 956-63.
305. Peunova, N., et al., *Nitric oxide is an essential negative regulator of cell proliferation in Xenopus brain*. *J Neurosci*, 2001. **21**(22): p. 8809-18.
306. Peunova, N., et al., *Nitric oxide coordinates cell proliferation and cell movements during early development of Xenopus*. *Cell Cycle*, 2007. **6**(24): p. 3132-44.
307. Gibbs, S.M., *Regulation of neuronal proliferation and differentiation by nitric oxide*. *Mol Neurobiol*, 2003. **27**(2): p. 107-20.
308. Estrada, C. and M. Murillo-Carretero, *Nitric oxide and adult neurogenesis in health and disease*. *Neuroscientist*, 2005. **11**(4): p. 294-307.
309. Tapia-Limonchi, R., et al., *Nitric oxide prevents mouse embryonic stem cell differentiation through regulation of gene expression, cell signaling, and control of cell proliferation*. *J Cell Biochem*, 2016. **117**(9): p. 2078-88.
310. Schonhoff, C.M., B. Gaston, and J.B. Mannick, *Nitrosylation of cytochrome c during apoptosis*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(20): p. 18265-70.
311. Brune, B., *Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON?* *Cell Death Differ*, 2003. **10**(8): p. 864-9.
312. Liu, L. and J.S. Stamler, *NO: an inhibitor of cell death*. *Cell Death Differ*, 1999. **6**(10): p. 937-42.
313. Wang, Y., et al., *Nitric oxide: promoter or suppressor of programmed cell death?* *Protein Cell*, 2010. **1**(2): p. 133-42.
314. Maciejewski, J.P., et al., *Nitric oxide suppression of human hematopoiesis in vitro. Contribution to inhibitory action of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha*. *J Clin Invest*, 1995. **96**(2): p. 1085-92.

315. Kashiwakura, I., et al., *Effect of carboxy-PTIO, a nitric oxide scavenger, on the proliferation of murine hematopoietic progenitor cells in vitro*. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 1998. **99**(3): p. 329-37.
316. Michurina, T., et al., *Nitric oxide is a regulator of hematopoietic stem cell activity*. Mol Ther, 2004. **10**(2): p. 241-8.
317. 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.
318. Hall, C.J., et al., *Infection-responsive expansion of the hematopoietic stem and progenitor cell compartment in zebrafish is dependent upon inducible nitric oxide*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(2): p. 198-209.
319. Herbomel, P., *Infection-induced hematopoiesis: a zebrafish perspective*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(2): p. 105-6.
320. Krasnov, P., et al., *Neuronal nitric oxide synthase contributes to the regulation of hematopoiesis*. Mol Med, 2008. **14**(3-4): p. 141-9.
321. Luo, Y., et al., *M1 and M2 macrophages differentially regulate hematopoietic stem cell self-renewal and ex vivo expansion*. Blood Adv, 2018. **2**(8): p. 859-70.
322. Nogueira-Pedro, A., et al., *Nitric oxide-induced murine hematopoietic stem cell fate involves multiple signaling proteins, gene expression, and redox modulation*. Stem Cells, 2014. **32**(11): p. 2949-60.
323. Shami, P.J. and J.B. Weinberg, *Differential effects of nitric oxide on erythroid and myeloid colony growth from CD34+ human bone marrow cells*. Blood, 1996. **87**(3): p. 977-82.
324. Ikuta, T., et al., *Nitric oxide-cGMP signaling stimulates erythropoiesis through multiple lineage-specific transcription factors: Clinical implications and a novel target for erythropoiesis*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0144561.
325. Tiribuzi, R., et al., *Nitric oxide depletion alters hematopoietic stem cell commitment toward immunogenic dendritic cells*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(3): p. 2830-8.
326. Aicher, A., C. Heeschen, and S. Dimmeler, *The role of NOS3 in stem cell mobilization*. Trends Mol Med, 2004. **10**(9): p. 421-5.
327. 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.
328. Aleksinskaya, M.A., et al., *Identification of free nitric oxide radicals in rat bone marrow: Implications for progenitor cell mobilization in hypertension*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e57761.
329. Adamiak, M., et al., *Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is a novel negative regulator of hematopoietic stem/progenitor cell trafficking*. Stem Cell Rev, 2017. **13**(1): p. 92-103.
330. Di Lorenzo, A., et al., *eNOS-derived nitric oxide regulates endothelial barrier function through VE-cadherin and Rho GTPases*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 24): p. 5541-52.
331. Yang, B., et al., *Nitric oxide increases arterial endothelial permeability through mediating VE-Cadherin expression during arteriogenesis*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0127931.
332. Zhang, Y., et al., *Identification of CXCR4 as a new nitric oxide-regulated gene in human CD34+ cells*. Stem Cells, 2007. **25**(1): p. 211-9.
333. Jujo, K., et al., *CXC-chemokine receptor 4 antagonist AMD3100 promotes cardiac functional recovery after ischemia/reperfusion injury via endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism*. Circulation, 2013. **127**(1): p. 63-73.

334. Chigaev, A., Y. Smagley, and L.A. Sklar, *Nitric oxide/cGMP pathway signaling actively down-regulates alpha4beta1-integrin affinity: an unexpected mechanism for inducing cell de-adhesion*. BMC Immunol, 2011. **12**: p. 28.
335. Jalnapurkar, S., et al., *Nitric oxide has contrasting age-dependent effects on the functionality of murine hematopoietic stem cells*. Stem Cell Res Ther, 2016. **7**(1): p. 171.
336. Jalnapurkar, S., et al., *Microvesicles secreted by nitric oxide-primed mesenchymal stromal cells boost the engraftment potential of hematopoietic stem cells*. Stem Cells, 2019. **37**(1): p. 128-38.
337. Trento, C., et al., *Bone marrow mesenchymal stromal cells induce nitric oxide synthase-dependent differentiation of CD11b(+) cells that expedite hematopoietic recovery*. Haematologica, 2017. **102**(5): p. 818-25.
338. Schneemann, M. and G. Schoedon, *Species differences in macrophage NO production are important*. Nat Immunol, 2002. **3**(2): p. 102.
339. Freudenberg, U., et al., *A star-PEG-heparin hydrogel platform to aid cell replacement therapies for neurodegenerative diseases*. Biomaterials, 2009. **30**(28): p. 5049-60.
340. Koeffler, H.P., et al., *An undifferentiated variant derived from the human acute myelogenous leukemia cell line (KG-1)*. Blood, 1980. **56**(2): p. 265-73.
341. Kitamura, T., et al., *Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin*. J Cell Physiol, 1989. **140**(2): p. 323-34.
342. Boukamp, P., et al., *Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line*. J Cell Biol, 1988. **106**(3): p. 761-71.
343. Tsuchiya, S., et al., *Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)*. Int J Cancer, 1980. **26**(2): p. 171-6.
344. Strober, W., *Trypan blue exclusion test of cell viability*. Curr Protoc Immunol, 2001. **Appendix 3**: p. Appendix 3B.
345. Jaatinen, T. and J. Laine, *Isolation of mononuclear cells from human cord blood by Ficoll-Paque density gradient*. Curr Protoc Stem Cell Biol, 2007. **2**(1): p. Unit 2A 1.
346. Swinehart, D.F., *The Beer-Lambert Law*. Journal of Chemical Education, 1962. **39**(7): p. 333.
347. Koopman, G., et al., *Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis*. Blood, 1994. **84**(5): p. 1415-20.
348. Roth, B.L., et al., *Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain*. Appl Environ Microbiol, 1997. **63**(6): p. 2421-31.
349. Philpott, N.J., et al., *The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: Simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques*. Blood, 1996. **87**(6): p. 2244-51.
350. Wognum, B., et al., *Colony forming cell assays for human hematopoietic progenitor cells*, in *Basic Cell Culture Protocols*, C.D. Helgason and C.L. Miller, Editors. 2013, Humana Press: Totowa, NJ. p. 267-83.
351. Garibyan, L. and N. Avashia, *Polymerase chain reaction*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(3): p. 1-4.
352. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
353. Salinovich, O. and R.C. Montelaro, *Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*. Anal Biochem, 1986. **156**(2): p. 341-7.
354. Aydin, S., *A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA*. Peptides, 2015. **72**: p. 4-15.

355. Guenzler, H. and H.-U. Gremlich, *IR-Spektroskopie: Eine Einführung*. 2012: John Wiley & Sons. 2.5.
356. Harrick, N.J., *Surface chemistry from spectral analysis of totally internally reflected radiation*. J Phys Chem, 1960. **64**(9): p. 1110-4.
357. Fahrenfort, J., *Attenuated total reflection: A new principle for the production of useful infra-red reflection spectra of organic compounds*. Spectrochim Acta, 1961. **17**(7): p. 698-709.
358. Goos, F. and H. Hänchen, *Ein neuer und fundamentaler Versuch zur Totalreflexion*. Ann Phys, 1947. **436**(7-8): p. 333-46.
359. Benninghoven, A., *Chemical analysis of inorganic and organic surfaces and thin films by static time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS)*. Angew Chem Int Ed Engl, 1994. **33**(10): p. 1023-43.
360. Sodhi, R.N.S., *Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS):— versatility in chemical and imaging surface analysis*. Analyst, 2004. **129**(6): p. 483-7.
361. Skoog, D.A., F.J. Holler, and S.R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*. Vol. 7. 2017: Cengage Learning. 332.
362. He, W. and M.C. Frost, *Direct measurement of actual levels of nitric oxide (NO) in cell culture conditions using soluble NO donors*. Redox Biol, 2016. **9**: p. 1-14.
363. Halbrugge, M., et al., *Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kda protein in human platelets in response to cGMP-elevating and cAMP-elevating vasodilators*. J Biol Chem, 1990. **265**(6): p. 3088-93.
364. Pretsch, E., P. Bühlmann, and M. Badertscher, *Structure determination of organic compounds: Tables of spectral data*. Vol. 4. 2009: Springer Berlin Heidelberg. 433.
365. Wallerath, T., et al., *Identification of the NO synthase isoforms expressed in human neutrophil granulocytes, megakaryocytes and platelets*. J Thromb Haemost, 1997. **77**(1): p. 163-7.
366. Amin, A.R., et al., *Expression of nitric oxide synthase in human peripheral blood mononuclear cells and neutrophils*. J Inflamm, 1995. **47**(4): p. 190-205.
367. Gross, T.J., et al., *Epigenetic silencing of the human NOS2 gene: rethinking the role of nitric oxide in human macrophage inflammatory responses*. J Immunol, 2014. **192**(5): p. 2326-38.
368. Kalyanaraman, H., N. Schall, and R.B. Pilz, *Nitric oxide and cyclic GMP functions in bone*. Nitric Oxide, 2018. **76**: p. 62-70.
369. Recalde, A., et al., *Sympathetic nervous system regulates bone marrow-derived cell egress through endothelial nitric oxide synthase activation: role in postischemic tissue remodeling*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(3): p. 643-53.
370. Cai, X., et al., *Effects of Schwann cells promoting nitric oxide secretion of bone marrow mesenchymal stem cells derived endothelial cells*. Zhongguo Xue Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2014. **28**(8): p. 998-1003.
371. Lykov, A.P., et al., *Proliferation, migration, and production of nitric oxide by bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells from Wistar rats in hypoxia and hyperglycemia*. Bull Exp Biol Med, 2015. **159**(4): p. 443-5.
372. Cohen, S.G., et al., *EPCR limits nitric oxide levels, mediating human and murine stem cell adhesion and retention in the bone marrow, by conjugating PAR1 and CXCR4 signaling*. Blood, 2013. **122**(21): p. 795.
373. Noris, M., et al., *Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions*. Circ Res, 1995. **76**(4): p. 536-43.
374. Hood, J. and H.J. Granger, *Protein kinase G mediates vascular endothelial growth factor-induced Raf-1 activation and proliferation in human endothelial cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(36): p. 23504-8.

375. Andrews, A.M., et al., *Direct, real-time measurement of shear stress-induced nitric oxide produced from endothelial cells in vitro*. Nitric Oxide, 2010. **23**(4): p. 335-42.
376. Zippel, N., et al., *Endothelial AMP-activated kinase α 1 phosphorylates eNOS on Thr495 and decreases endothelial NO formation*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(9): p. 2753.
377. Hill, B.G., et al., *What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology*. J Biol Chem, 2010. **285**(26): p. 19699-704.
378. Owusu, B.Y., R. Stapley, and R.P. Patel, *Nitric oxide formation versus scavenging: the red blood cell balancing act*. J Physiol, 2012. **590**(20): p. 4993-5000.
379. Wyles, S.P., E.B. Brandt, and T.J. Nelson, *Stem cells: the pursuit of genomic stability*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(11): p. 20948-67.
380. Biechonski, S., et al., *Attenuated DNA damage responses and increased apoptosis characterize human hematopoietic stem cells exposed to irradiation*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 6071.
381. Bergmann, A. and H. Steller, *Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration*. Sci Signal, 2010. **3**(145): p. re8.
382. Ali, A.A., et al., *The contribution of N(2)O(3) to the cytotoxicity of the nitric oxide donor DETA/NO: an emerging role for S-nitrosylation*. Biosci Rep, 2013. **33**(2): p. e00031.
383. Kajume, T., et al., *Protection of hematopoietic progenitor cells by nitric oxide*. J Hematother Stem Cell Res, 2000. **9**(2): p. 215-7.
384. Diaz-Moralli, S., et al., *Targeting cell cycle regulation in cancer therapy*. Pharmacol Ther, 2013. **138**(2): p. 255-71.
385. Krischel, V., et al., *Biphasic effect of exogenous nitric oxide on proliferation and differentiation in skin derived keratinocytes but not fibroblasts*. J Invest Dermatol, 1998. **111**(2): p. 286-91.
386. Lyons, A.B., S.J. Blake, and K.V. Doherty, *Flow cytometric analysis of cell division by dilution of CFSE and related dyes*. Curr Protoc Cytom, 2013. **9**: p. 11.
387. Tario, J.D., Jr., et al., *Monitoring cell proliferation by dye dilution: Considerations for probe selection*. Methods Mol Biol, 2018. **1678**: p. 249-99.
388. Foyer, C.H., M.H. Wilson, and M.H. Wright, *Redox regulation of cell proliferation: Bioinformatics and redox proteomics approaches to identify redox-sensitive cell cycle regulators*. Free Radic Biol Med, 2018. **122**: p. 137-49.
389. Chiu, J. and I.W. Dawes, *Redox control of cell proliferation*. Trends Cell Biol, 2012. **22**(11): p. 592-601.
390. Ren, F., et al., *New insights into redox regulation of stem cell self-renewal and differentiation*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1850**(8): p. 1518-26.
391. Passegue, E., et al., *Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates*. J Exp Med, 2005. **202**(11): p. 1599-611.
392. Beltran-Povea, A., et al., *Role of nitric oxide in the maintenance of pluripotency and regulation of the hypoxia response in stem cells*. World J Stem Cells, 2015. **7**(3): p. 605-17.
393. Bonafe, F., C. Guarnieri, and C. Muscari, *Nitric oxide regulates multiple functions and fate of adult progenitor and stem cells*. J Physiol Biochem, 2015. **71**(1): p. 141-53.
394. Fuseler, J.W. and M.T. Valarmathi, *Modulation of the migration and differentiation potential of adult bone marrow stromal stem cells by nitric oxide*. Biomaterials, 2012. **33**(4): p. 1032-43.
395. Mora-Castilla, S., et al., *Nitric oxide repression of Nanog promotes mouse embryonic stem cell differentiation*. Cell Death Differ, 2010. **17**(6): p. 1025-33.
396. Ciau-Uitz, A., F. Liu, and R. Patient, *Genetic control of hematopoietic development in Xenopus and zebrafish*. Int J Dev Biol, 2010. **54**(6-7): p. 1139-49.

397. Krumsiek, J., et al., *Hierarchical differentiation of myeloid progenitors is encoded in the transcription factor network*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e22649.
398. Attar, A., *Changes in the cell surface markers during normal hematopoiesis: a guide to cell isolation*. Global J Hematol Blood Transfu, 2014. **1**: p. 20-8.
399. Manfredini, R., et al., *The kinetic status of hematopoietic stem cell subpopulations underlies a differential expression of genes involved in self-renewal, commitment, and engraftment*. Stem Cells, 2005. **23**(4): p. 496-506.
400. AbuSamra, D.B., et al., *Not just a marker: CD34 on human hematopoietic stem/progenitor cells dominates vascular selectin binding along with CD44*. Blood Adv, 2017. **1**(27): p. 2799-816.
401. Nielsen, J.S. and K.M. McNagny, *CD34 is a key regulator of hematopoietic stem cell trafficking to bone marrow and mast cell progenitor trafficking in the periphery*. Microcirculation, 2009. **16**(6): p. 487-96.
402. Healy, L., et al., *The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(26): p. 12240-4.
403. Schweitzer, K.M., et al., *Constitutive expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues*. Am J Pathol, 1996. **148**(1): p. 165-75.
404. Sipkins, D.A., et al., *In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment*. Nature, 2005. **435**(7044): p. 969-73.
405. Nabors, L.K., et al., *Overlapping roles for endothelial selectins in murine hematopoietic stem/progenitor cell homing to bone marrow*. Exp Hematol, 2013. **41**(7): p. 588-96.
406. Cohen, S.G., et al., *PARI signaling regulates the retention and recruitment of EPCR-expressing bone marrow hematopoietic stem cells*. Nat Med, 2015. **21**(11): p. 1307-17.
407. Nguyen, T.S., T. Lapidot, and W. Ruf, *Extravascular coagulation in hematopoietic stem and progenitor cell regulation*. Blood, 2018. **132**(2): p. 123-31.
408. Randall, T.D., et al., *Expression of murine CD38 defines a population of long-term reconstituting hematopoietic stem cells*. Blood, 1996. **87**(10): p. 4057-67.
409. Salati, S., et al., *Role of CD34 antigen in myeloid differentiation of human hematopoietic progenitor cells*. Stem Cells, 2008. **26**(4): p. 950-9.
410. Perié, L., et al., *The Branching Point in Erythro-Myeloid Differentiation*. Cell, 2015. **163**(7): p. 1655-1662.
411. Kopp, H.G., et al., *The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization*. Physiology (Bethesda), 2005. **20**: p. 349-56.
412. Pinho, S., et al., *Lineage-biased hematopoietic stem cells are regulated by distinct niches*. Dev Cell, 2018. **44**(5): p. 634-41.
413. Montfort, W.R., J.A. Wales, and A. Weichsel, *Structure and activation of soluble guanylyl cyclase, the nitric oxide sensor*. Antioxid Redox Signal, 2017. **26**(3): p. 107-21.
414. Roy, B., E.J. Halvey, and J. Garthwaite, *An enzyme-linked receptor mechanism for nitric oxide-activated guanylyl cyclase*. J Biol Chem, 2008. **283**(27): p. 18841-51.
415. Roy, B. and J. Garthwaite, *Nitric oxide activation of guanylyl cyclase in cells revisited*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(32): p. 12185-90.
416. Mo, E., et al., *Kinetics of a cellular nitric oxide/cGMP/phosphodiesterase-5 pathway*. J Biol Chem, 2004. **279**(25): p. 26149-58.
417. Derbyshire, E.R. and M.A. Marletta, *Structure and regulation of soluble guanylate cyclase*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**(1): p. 533-59.
418. Bellamy, T.C., J. Wood, and J. Garthwaite, *On the activation of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 507-10.

419. Defawe, O.D., et al., *VASP phosphorylation at serine239 regulates the effects of NO on smooth muscle cell invasion and contraction of collagen*. *J Cell Physiol*, 2010. **222**(1): p. 230-7.
420. Segal, M.S., et al., *Nitric oxide cytoskeletal-induced alterations reverse the endothelial progenitor cell migratory defect associated with diabetes*. *Diabetes*, 2006. **55**(1): p. 102-9.
421. Zhao, Y., et al., *Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ*. *Biochemistry*, 2000. **39**(35): p. 10848-54.
422. Ivanova, K., et al., *Differential expression of functional guanylyl cyclases in melanocytes: absence of nitric-oxide-sensitive isoform in metastatic cells*. *J Invest Dermatol*, 2001. **116**(3): p. 409-16.
423. Huang, X.X., et al., *Nitric oxide promotes human hematopoietic stem cell homing and engraftment via cGMP-PKG signaling*. *Blood*, 2018. **132**(Suppl 1): p. 807.
424. Kobsar, A., et al., *Cyclic nucleotide-regulated proliferation and differentiation vary in human hematopoietic progenitor cells derived from healthy persons, tumor patients, and chronic myelocytic leukemia patients*. *Stem Cells Dev*, 2008. **17**(1): p. 81-91.
425. Evangelista, A.M., M.J. Kohr, and E. Murphy, *S-nitrosylation: specificity, occupancy, and interaction with other post-translational modifications*. *Antioxid Redox Signal*, 2013. **19**(11): p. 1209-19.
426. Wang, K., et al., *Redox homeostasis: the linchpin in stem cell self-renewal and differentiation*. *Cell Death Dis*, 2013. **4**: p. e537.
427. Zhang, C.C. and H.A. Sadek, *Hypoxia and metabolic properties of hematopoietic stem cells*. *Antioxid Redox Signal*, 2014. **20**(12): p. 1891-901.
428. Jeong, E.M., et al., *Real-time monitoring of glutathione in living cells reveals that high glutathione levels are required to maintain stem cell function*. *Stem Cell Reports*, 2018. **10**(2): p. 600-14.
429. Lu, S.C., *Glutathione synthesis*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1830**(5): p. 3143-53.
430. Hernansanz-Agustin, P., et al., *Nitrosothiols in the immune system: signaling and protection*. *Antioxid Redox Signal*, 2013. **18**(3): p. 288-308.
431. Keefer, L.K., *Nitric oxide (NO)- and nitroxyl (HNO)-generating diazeniumdiolates (NONOates): emerging commercial opportunities*. *Curr Top Med Chem*, 2005. **5**(7): p. 625-36.
432. Blangetti, M., et al., *A nonmetal-containing nitric oxide donor activated with single-photon green light*. *Chemistry*, 2017. **23**(38): p. 9026-9.
433. Kitamura, K., et al., *Visible light-induced nitric oxide release from a novel nitrobenzene derivative cross-conjugated with a coumarin fluorophore*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014. **24**(24): p. 5660-2.
434. Ignarro, L.J., et al., *Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(17): p. 8103-7.
435. Li, J. and D.J. Mooney, *Designing hydrogels for controlled drug delivery*. *Nat Rev Mater*, 2016. **1**(12): p. 16071.
436. Binner, M., et al., *Cell-instructive starPEG-heparin-collagen composite matrices*. *Acta Biomater*, 2017. **53**(Supplement C): p. 70-80.
437. Kurth, I., et al., *Extracellular matrix functionalized microcavities to control hematopoietic stem and progenitor cell fate*. *Macromol Biosci*, 2011. **11**(6): p. 739-47.
438. Welzel, P.B., et al., *Modulating biofunctional starPEG heparin hydrogels by varying size and ratio of the constituents*. *Polymers*, 2011. **3**(1): p. 602-20.
439. Ugi, I., S. Lohberger, and R. Karl, *The Passerini and Ugi reactions*, in *Comprehensive Organic Synthesis*, B.M. Trost and I. Fleming, Editors. 1991, Pergamon: Oxford. p. 1083-109.

440. Cheron, N., et al., *Challenging 50 years of established views on Ugi reaction: a theoretical approach*. J Org Chem, 2012. **77**(3): p. 1361-6.
441. de Nooy, A.E., et al., *Ionic polysaccharide hydrogels via the Passerini and Ugi multicomponent condensations: synthesis, behavior and solid-state NMR characterization*. Biomacromolecules, 2000. **1**(2): p. 259-67.
442. Crescenzi, V., et al., *Hyaluronan networking via Ugi's condensation using lysine as cross-linker diamine*. Carbohydr Polym, 2003. **53**(3): p. 311-6.
443. Bu, H., et al., *Rheological and structural properties of aqueous alginate during gelation via the Ugi multicomponent condensation reaction*. Biomacromolecules, 2004. **5**(4): p. 1470-9.
444. Pirrung, M.C. and K.D. Sarma, *Multicomponent reactions are accelerated in water*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(2): p. 444-5.
445. Kool, E.T. and R. Breslow, *Dichotomous salt effects in the hydrophobic acceleration of the benzoin condensation*. J Am Chem Soc, 1988. **110**(5): p. 1596-7.
446. Heilman, B.J., et al., *Light-triggered eradication of Acinetobacter baumannii by means of NO delivery from a porous material with an entrapped metal nitrosyl*. J Am Chem Soc, 2012. **134**(28): p. 11573-82.
447. Heilman, B. and P.K. Mascharak, *Light-triggered nitric oxide delivery to malignant sites and infection*. Philos Trans A Math Phys Eng Sci, 2013. **371**(1995): p. 20120368.
448. Halpenny, G.M., K.R. Gandhi, and P.K. Mascharak, *Eradication of pathogenic bacteria by remote delivery of nitric oxide via light-triggering of nitrosyl-containing materials*. ACS Med Chem Lett, 2010. **1**(4): p. 180-3.
449. Schairer, D.O., et al., *The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents*. Virulence, 2012. **3**(3): p. 271-9.
450. Huerta, S., *Nitric oxide for cancer therapy*. Future Sci OA, 2015. **1**(1): p. 44.
451. Ramakrishnan, P., et al., *Cytotoxic responses to 405nm light exposure in mammalian and bacterial cells: Involvement of reactive oxygen species*. Toxicol In Vitro, 2016. **33**: p. 54-62.
452. Malcic, A.I., et al., *The effects of bluephase LED light on fibroblasts*. Eur J Dent, 2012. **6**(3): p. 311-7.
453. Li, H. and A. Wan, *Fluorescent probes for real-time measurement of nitric oxide in living cells*. Analyst, 2015. **140**(21): p. 7129-41.
454. Ye, X., S.S. Rubakhin, and J.V. Sweedler, *Detection of nitric oxide in single cells*. Analyst, 2008. **133**(4): p. 423-33.
455. He, W. and M.C. Frost, *CellNO trap: Novel device for quantitative, real-time, direct measurement of nitric oxide from cultured RAW 267.4 macrophages*. Redox Biol, 2016. **8**: p. 383-97.
456. Hogg, N., *Detection of nitric oxide by electron paramagnetic resonance spectroscopy*. Free Radic Biol Med, 2010. **49**(2): p. 122-9.
457. Davies, M.J., *Detection and characterisation of radicals using electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping and related methods*. Methods, 2016. **109**(Supplement C): p. 21-30.
458. Hawkins, C.L. and M.J. Davies, *Detection and characterisation of radicals in biological materials using EPR methodology*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(2): p. 708-21.
459. Eroglu, E., et al., *Real-time visualization of distinct nitric oxide generation of nitric oxide synthase isoforms in single cells*. Nitric Oxide, 2017. **70**: p. 59-67.
460. Eroglu, E., et al., *Genetic biosensors for imaging nitric oxide in single cells*. Free Radic Biol Med, 2018. **128**: p. 50-8.

461. Halpenny, G.M., M.M. Olmstead, and P.K. Mascharak, *Incorporation of a designed ruthenium nitrosyl in PolyHEMA hydrogel and light-activated delivery of NO to myoglobin*. *Inorg Chem*, 2007. **46**(16): p. 6601-6.
462. Capila, I. and R.J. Linhardt, *Heparin-protein interactions*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2002. **41**(3): p. 391-412.
463. Freudenberg, U., et al., *Glycosaminoglycan-based biohybrid hydrogels: A sweet and smart choice for multifunctional biomaterials*. *Adv Mater*, 2016. **28**(40): p. 8861-91.

Danksagung

Ich möchte diese Gelegenheit nutzen, um mich bei einigen Menschen zu bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran Prof. Dr. Cornelia Lee-Thedieck: Vielen Dank, dass ich meine Dissertation unter deiner Betreuung anfertigen durfte. Ich habe mich von Anfang an in deiner Gruppe sehr wohl gefühlt. Bei Fragen hast du mir stets mit unterstützenden Anregungen und aufmunternden Worten zur Seite gestanden und mir das nötige Vertrauen entgegengebracht, um eigene Ideen umzusetzen. Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Hartmut Gliemann, für die Unterstützung und die Mitbetreuung meines Projekts vor allem zu Beginn meiner Doktorarbeit. Ebenso gilt mein Dank Dr. Manuel Tsotsalas für die Ratschläge und Unterstützung im ersten Jahr meiner Arbeit. Prof. Christof Wöll möchte ich besonders für die Möglichkeit danken, diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können und für sein Engagement und Interesse an meinem Projekt.

Weiterhin danke ich Prof. Matthias Franzreb für die herzliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe und für die Unterstützung bei sämtlichen Problemen besonders nach dem Umzug eines Teils unserer Gruppe nach Hannover. Meinen TAC Mitgliedern Prof. Dr. Hans-Eric Gottwald und Dr. Guillaume Delaittre gilt ein großes Dankeschön für die konstruktiven Vorschläge und die stete Hilfsbereitschaft. Vielen Dank auch an Prof. Dr. Martin Bastmeyer, der sich dazu bereit erklärt hat, für meine Dissertation als 2. Referent zu fungieren.

Prof. Carsten Werner und Dr. Uwe Freudenberg gilt ein besonderer Dank für die Möglichkeit, das von ihnen entwickelte Heparin/sPEG Hydrogelsystem im Rahmen einer Kooperation verwenden und weiterentwickeln zu dürfen. Vielen Dank auch an Dr. Alexander Welle für die durchgeführten ToF-SIMS Messungen sowie für die Vermittlung des Kontaktes zu Dr. Hatice Mutlu. Ihr gebührt ein besonderer Dank für die Anregung zum Einsatz von Multikomponenten Reaktionen für die Funktionalisierung von Polysacchariden.

Zusätzlich möchte ich meinen Kollegen aus der AG Franzreb für die vielen netten Gespräche beim Mittagessen oder in Kuchenpausen danken. Auch allen Kollegen aus der AG Lee-Thedieck möchte ich für die gute Arbeitsatmosphäre, das kollegiale Miteinander und die schöne Zeit herzlich Danke sagen. Besonders hervorheben möchte ich dabei Saskia Kraus, die unermüdlich Stammzellen aus Nabelschnurblut isoliert hat und mich gerade gegen Ende meiner Laborzeit sehr unterstützt hat. Weiterhin hat Katharina Brändle mir mit der Beladung vieler

SDS-Gele unter die Arme gegriffen und war mir eine große Hilfe. Dr. Annamarija Raic möchte ich für die vielen schönen Momente im Labor und außerhalb danken. Es war eine wirklich tolle Zeit im Labor mit dir, die nie langweilig wurde. Auch für die aufmunternden Worte und Gesten ein großes Dankeschön. Weiterhin möchte ich meinen Bürokollegen Domenic Kratzer, Sabrina Zippel und Anita Ludwig-Husemann für die fachliche Unterstützung und die kurzweiligen Gespräche danken.

Ein herzliches Dankeschön auch an meine Familie, besonders an meine Eltern Christa und Roland für ihre bedingungslose Unterstützung. Danke für die vielen „Versorgungspakete“, das Korrekturlesen meiner Arbeit sowie die moralische Unterstützung per Telefon. Genauso möchte ich meinen langjährigen Freundinnen Betty, Meike, Kerstin und Caro dafür danken, dass sie immer da sind. Ihr seid wichtige Konstanten in meinem Leben, die ich nicht missen möchte. Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Freund Matthias für die kontinuierliche Unterstützung bedanken. Dank seiner unaufgeregten Weltsicht und seiner Gelassenheit konnte er mich bei jedem Anflug von Panik erden und die Dinge in die richtige Perspektive setzen.

Publikationsliste

Hümmer, J., Kraus, S., Welle, A., Lee-Thedieck, C., *Nitric oxide has concentration-dependent effects on cord blood-derived CD34+ cell proliferation and mediates myeloid differentiation*, in preparation

Hümmer, J., Koc, J., Rosenhahn, A., Lee-Thedieck, C. (2019), *Microfluidic shear force assay to determine cell adhesion forces*. Methods Mol Biol, Volume: Stem Cell Mobilization. In press.

Bertlein, S., Hikimoto, D., Hochleitner, G., Hümmer, J., Jungst, T., Matsusaki, M., Akashi, M., Groll, J. (2018), *Development of Endothelial Cell Networks in 3D Tissues by Combination of Melt Electrospinning Writing with Cell-Accumulation Technology*. Small, **14**, 1701521

Schmitt, S., Hümmer, J., Kraus, S., Welle, A., Grosjean, S., Hanke-Roos, M., Rosenhahn, A., Bräse, S., Wöll, C., Lee-Thedieck, C. and Tsotsalas, M. (2016), *Tuning the Cell Adhesion on Biofunctionalized Nanoporous Organic Frameworks*. Adv Funct Mater, **26**: 8455-8462.

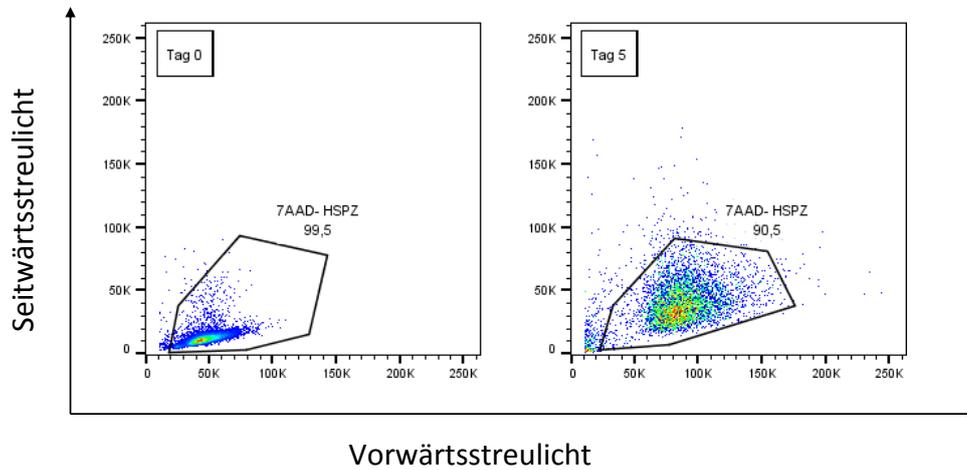
Nunes, S. C., Hümmer, J., Freitas, V., Ferreira, R., Carlos, L., P. Almeida, de Zea Bermudez, V. (2015), *Di-amidosils with Tunable Structure, Morphology and Emission Quantum Yield: The Role of Hydrogen Bonding*. J Mater Chem C, **3**: 6844-6861

Hochleitner, G., Hümmer, J. F., Luxenhofer, R., Groll, J. (2014), *High definition fibrous poly(2-ethyl-2-oxazoline) scaffolds through melt electrospinning writing*. Polymer, **55**: 5017-5023

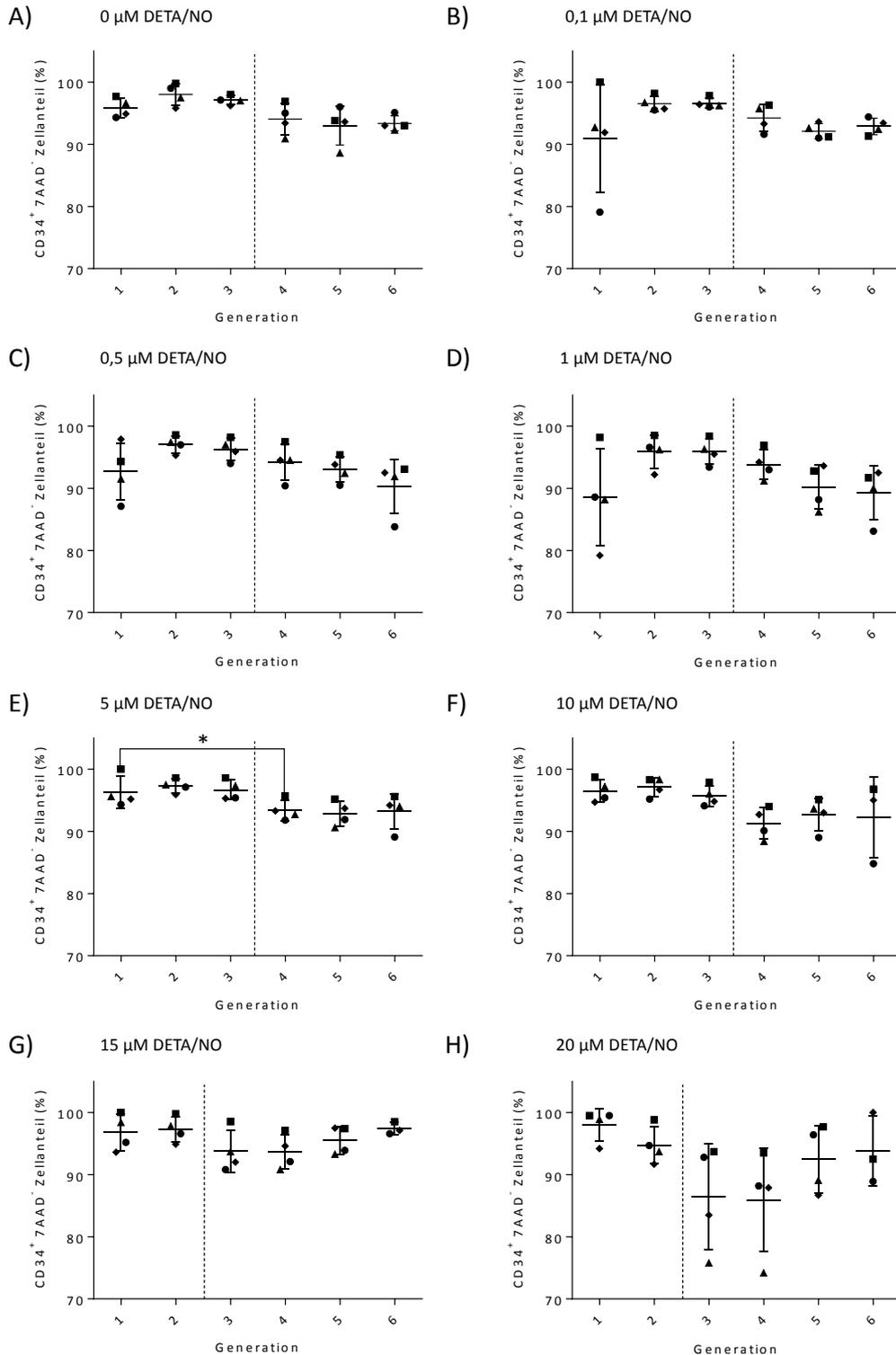
Nunes, S. C., Ferreira, C. B., Hümmer, J., Ferreira R. A. S., Carlos, L. D., Almeida, P., de Zea Bermudez, V. (2013), *Lamellar mono-amidosil hybrids incorporating monomethinecyanine dyes*. J Mater Chem C, **1**: 2290-2301

Nunes, S. C., Silva, N. J. O., Hümmer, J., Ferreira R. A. S., Almeida, P., Carlos, L. D., de Zea Bermudez, V. (2012), *Water-mediated structural tunability of an alkyl/siloxane hybrid: from amorphous material to lamellar structure or bilamellar superstructure*, RSC Advan, **2**: 2087-2099

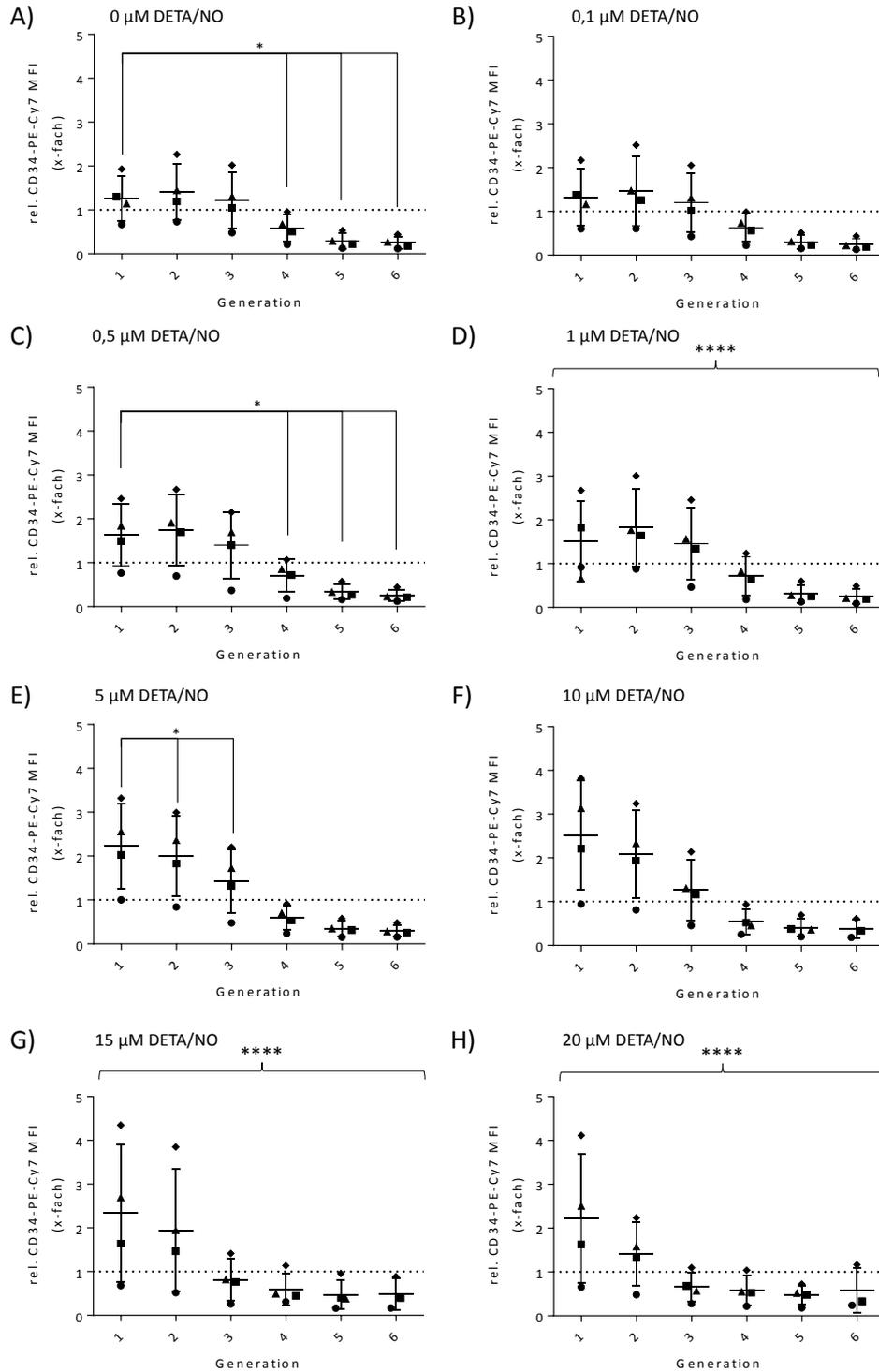
Anhang



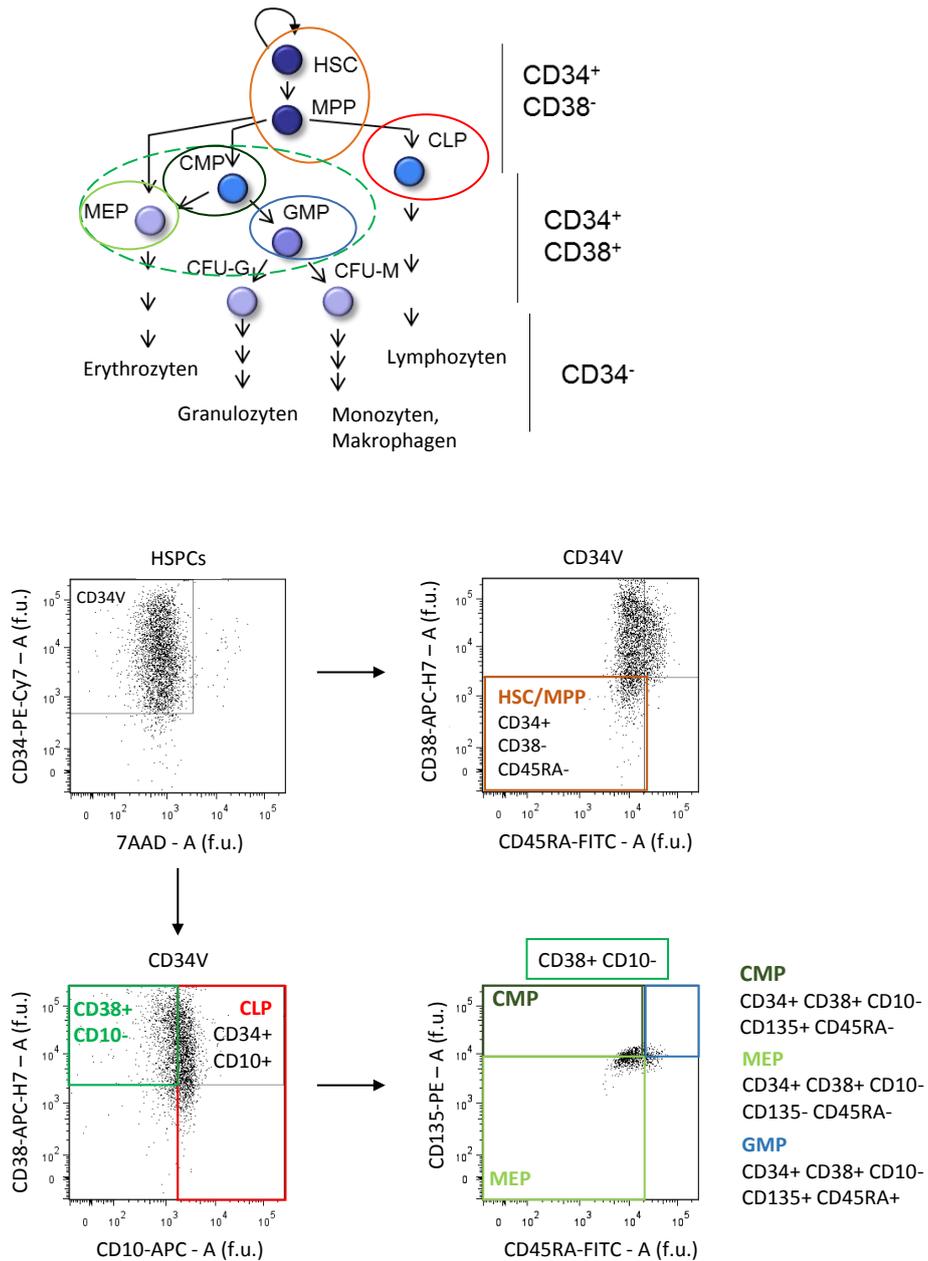
Anhang 1 Repräsentative Gegenüberstellung von CD34⁺ HSPZ aus Nabelschnurblut nach Analyse mittels Durchflusszytometrie. Links: HSPZ nach Isolation aus Nabelschnurblut, rechts: HSPZ nach fünftägiger Kultur in zellspezifischem Kulturmedium. Dotplotdarstellung von Einzelzellereignissen des Seitwärtsstreulichtes (Granularität der Zellen) in Abhängigkeit des Vorwärtsstreulichtes, welches ein Maß für die Zellgröße darstellt.



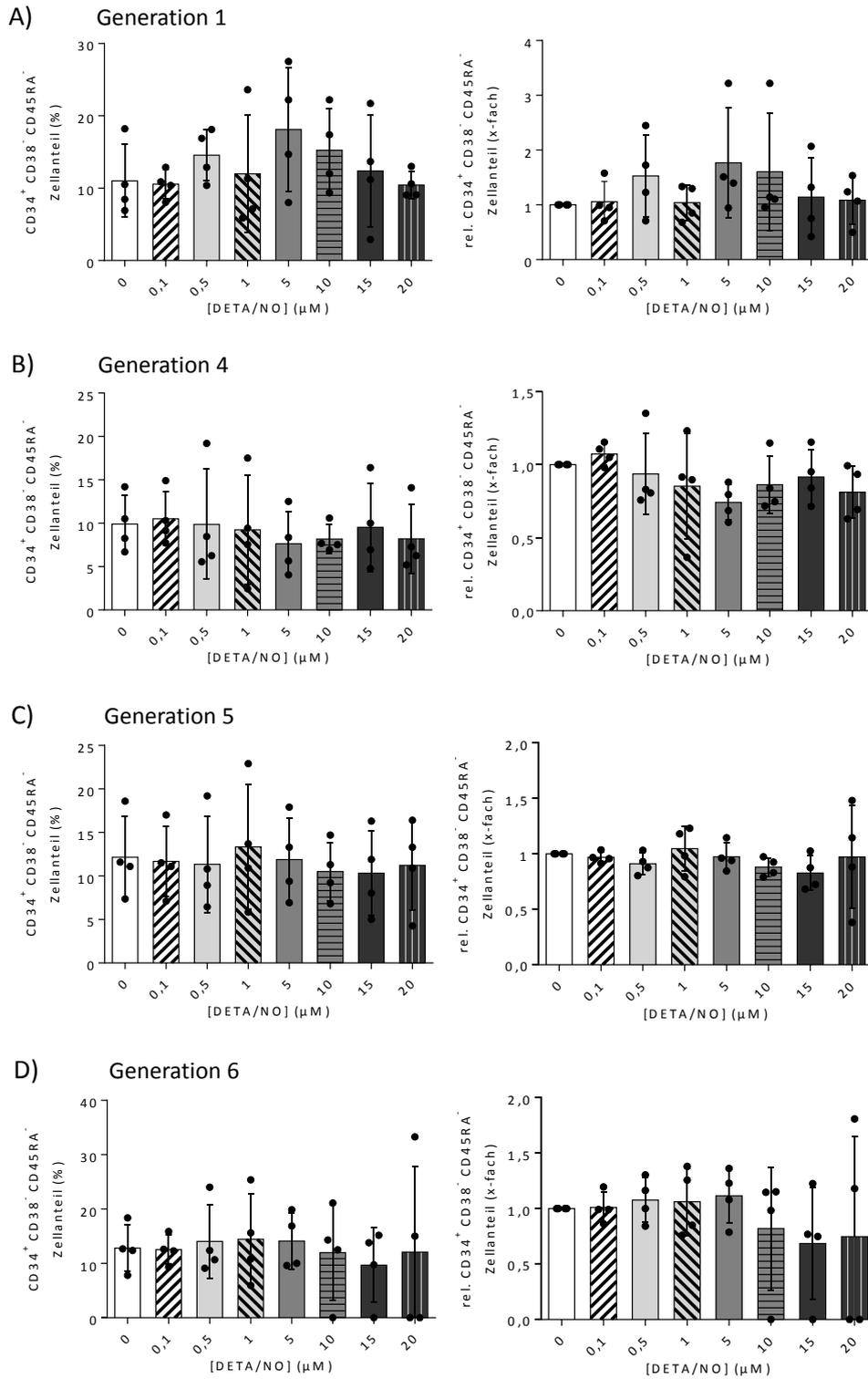
Anhang 2 Anteil vitaler (7-AAD⁻) CD34⁺ HSPZ nach fünfzügiger Kultur mit verschiedenen Konzentrationen von DETA/NO in Abhängigkeit der Zellgeneration bzw. der Anzahl durchlaufener Zellteilungen. CTV-gefärbte HSPZ wurden in Gegenwart von A) 0 μM, B) 0,1 μM, C) 0,5 μM, D) 1 μM, E) 5 μM, F) 10 μM, G) 15 μM oder H) 20 μM DETA/NO kultiviert und anschließend mittels fluoreszenzgekoppelter Antikörper auf die Expression von CD34 überprüft. Tote Zellen wurden durch 7-AAD markiert und von der Analyse ausgeschlossen. Punktdiagrammdarstellung vitaler, CD34⁺ HSPZ aus n = 4 unabhängigen Experimenten mit dem Mittelwert und der Standardabweichung des Mittelwertes als Linie und Fehlerbalken. Signifikante Unterschiede der Mittelwerte im Vergleich mit dem Mittelwert in Generation 1 nach gepaarter ANOVA sind wie folgt markiert: * = p < 0,05.



Anhang 3 Einfluss verschiedener DETA/NO Konzentrationen auf die rel. Expressionsstärke von CD34 von HSPZ bezogen auf die Expressionsstärke der Ursprungspopulation in Abhängigkeit der Generation. Nach fünftägiger Kultur von CTV-gefärbten HSPZ mit A) 0 μM , B) 0,1 μM , C) 0,5 μM , D) 1 μM , E) 5 μM , F) 10 μM , G) 15 μM oder H) 20 μM DETA/NO wurde die Expressionsstärke von CD34 durch die Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörperkonjugaten anhand der MFI im PE-Cy-7 Kanal ermittelt. Punktdiagrammdarstellung aus $n = 4$ unabhängigen Experimenten mit dem Mittelwert und der Standardabweichung des Mittelwertes als Linie und Fehlerbalken. Signifikante Unterschiede der Mittelwerte der Zellen in den einzelnen Generationen im Vergleich zum Mittelwert der Zellen in Generation 1, welche durch gepaarte ANOVA ermittelt wurden, sind durch Linien verbunden. Lineare Trends mit zunehmender Zellgeneration sind durch geschweifte Klammern verdeutlicht. * = $p < 0,05$; **** = $p < 0,0001$.

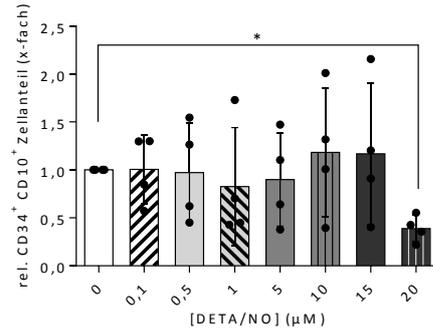
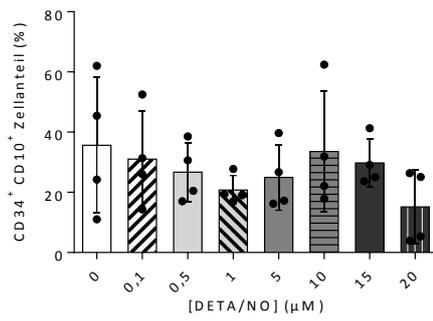


Anhang 4 Schematische Darstellung der durch HSZ gebildeten Progenitorzelltypen und reifen, hämatopoetischen Zelltypen (oberer Bildabschnitt) sowie hierarchische Gatingstrategie zur Identifikation einzelner Progenitorzellanteile nach Färbung von HSPZ mit einem Antikörperpanel (unterer Bildabschnitt). Gates wurden anhand mitgeführter FMO Kontrollen so gewählt, dass 1% der Zellereignisse in den FMO Kontrollen innerhalb des Gates lagen.

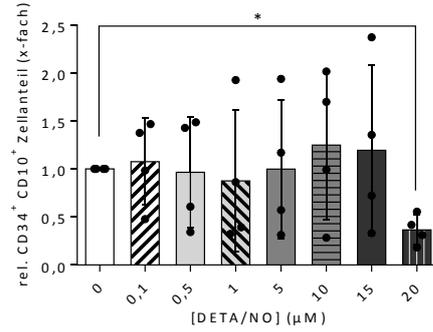
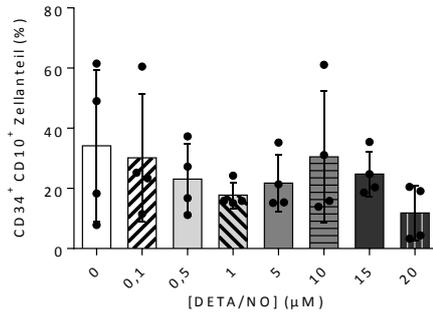


Anhang 5 Anteil an CD34⁺ CD38⁻ CD45RA⁻ HSZ und MPP nach fünftägiger Kultur in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration an DETA/NO. Balkendiagramme stellen die Zellanteile (links) sowie die rel. zur jeweiligen Lösemittelkontrolle gefundenen Zellanteile (rechts) an HSZ und MPP in A) Generation 1, B) Generation 4, C) Generation 5 und D) Generation 6 dar. Balken zeigen die Mittelwerte aus n = 4 unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. Nach gepaarter ANOVA wurden keine signifikanten Unterschiede bei Vergleich der mittleren Zellanteile einer Bedingung mit den Zellanteilen der Lösemittelkontrolle ermittelt.

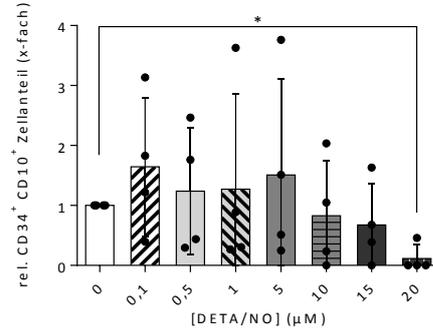
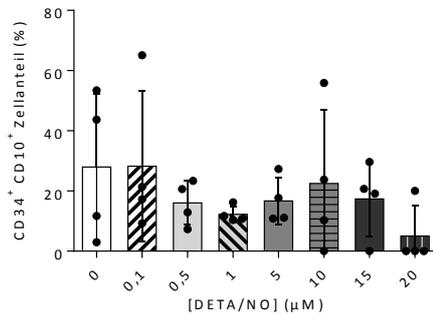
A) Generation 4



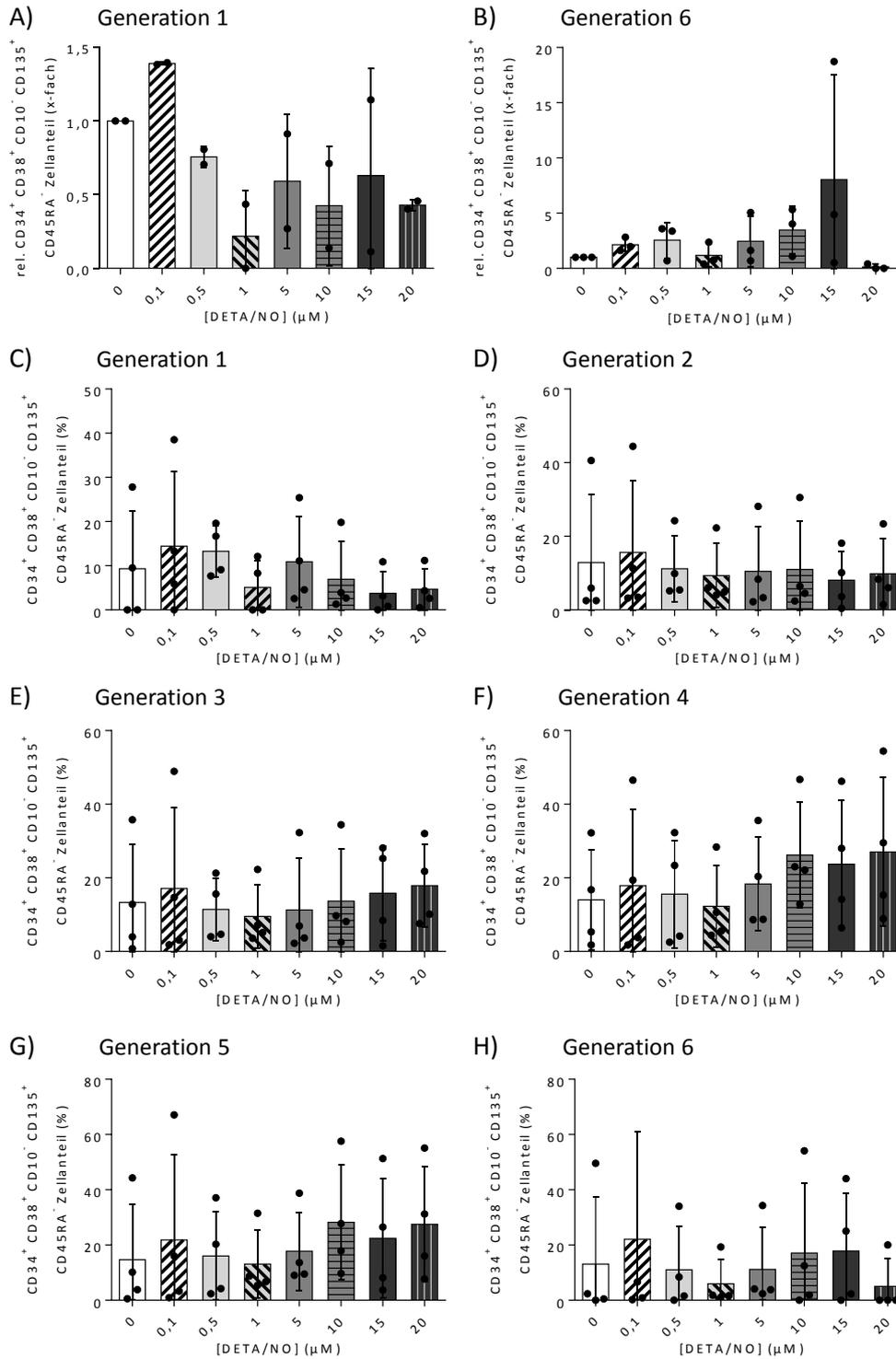
B) Generation 5



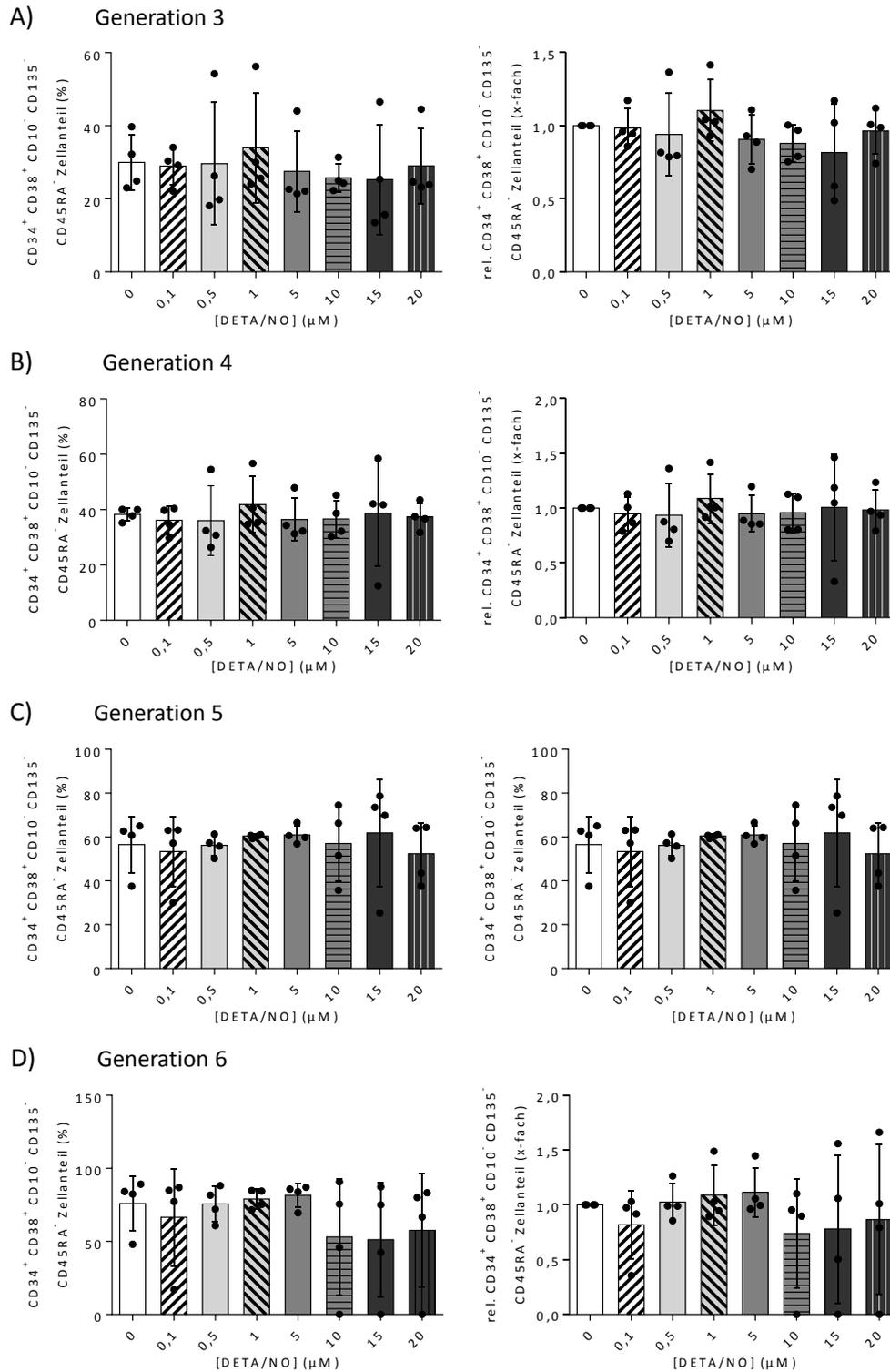
C) Generation 6



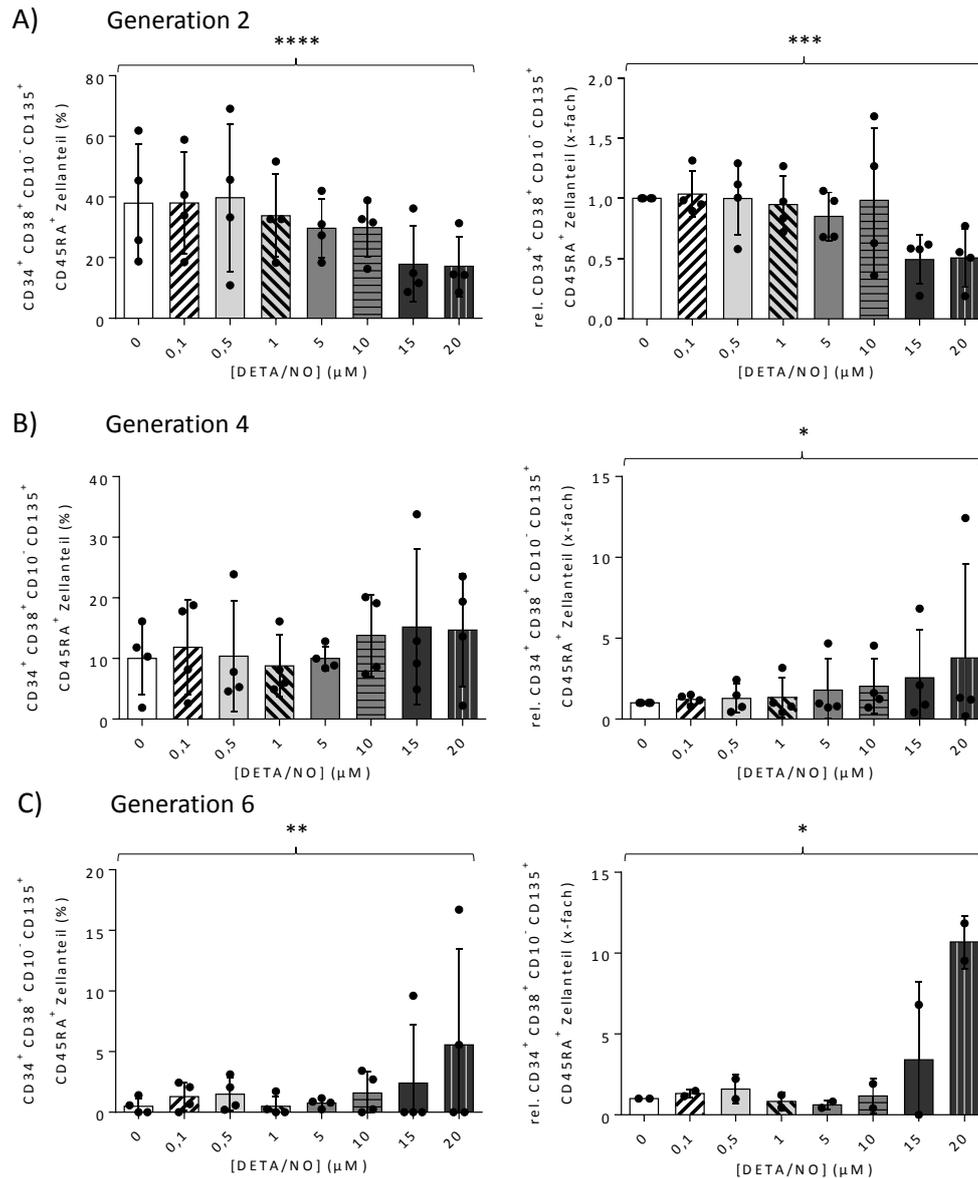
Anhang 6 Einfluss der Stimulation von HSPZ mit DETA/NO auf den Anteil an CD34⁺ CD10⁺ CLPs nach fünftägiger Kultur. Balkendiagramme zeigen CLP Anteile in A) Generation 4, B) Generation 5 und C) Generation 6 in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration an DETA/NO. Links sind die ermittelten Zellanteile dargestellt, während in rechten Diagrammen CLP Anteile auf die jeweiligen Lösemittelkontrolle bezogen sind und Effekte von DETA/NO ohne spenderabhängige Variationen zeigen. Balkendiagramme stellen die Mittelwerte aus n = 4 unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken dar. Signifikante Unterschiede der mittleren CLP Anteile verglichen mit der jeweiligen Lösemittelkontrolle nach gepaarter ANOVA sind durch verbindende Linien dargestellt. * = p < 0,05.



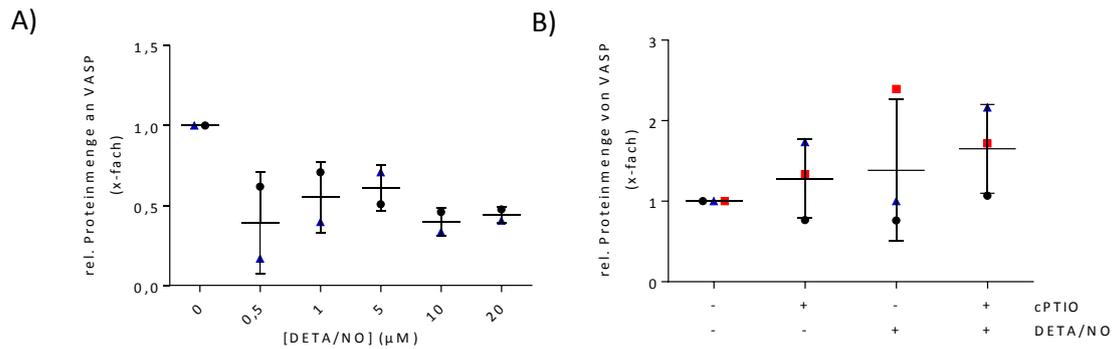
Anhang 7 Einfluss der Stimulation von HSPZ mit DETA/NO auf den Anteil an CD34⁺ CD38⁺ CD10⁻ CD135⁺ CD45RA⁻ CMPs nach fünftägiger Kultur. Balkendiagramme zeigen rel. CMP Anteile in A) Generation 1 und B) Generation 6 bezogen auf die jeweilige Lösemittelkontrolle in Abhängigkeit der zugesetzten Konzentration von DETA/NO. CMP Anteile in myeloiden CD34⁺ CD10⁻ CD38⁺ Zellen in C) Generation 1, D) Generation 2, E) Generation 3, F) Generation 4, G) Generation 5 und H) Generation 6 sind in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration an DETA/NO gezeigt. Balkendiagramme stellen die Mittelwerte aus n = 4 unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken dar. Nach gepaarter ANOVA wurden keine signifikanten Unterschiede der mittleren CMP Anteile im Vergleich mit der jeweiligen Lösemittelkontrolle gefunden.



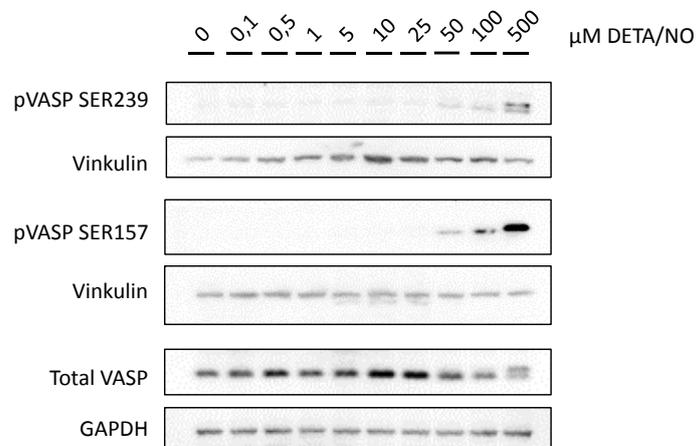
Anhang 8 Einfluss der Stimulation von HSPZ mit DETA/NO auf den Anteil an CD34⁺ CD38⁺ CD10⁻ CD135⁻ CD45RA⁻ MEPs nach fünftägiger Kultur. Balkendiagramme zeigen MEP Anteile (links) bzw. rel. MEP Anteile bezogen auf die jeweilige Lösemittelkontrolle (rechts) in A) Generation 3, B) Generation 4, C) Generation 5 und D) Generation 6 in Abhängigkeit der zugesetzten Konzentration von DETA/NO. Balken stellen die Mittelwerte aus n = 4 unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken dar. Nach gepaarter ANOVA wurden keine signifikanten Unterschiede der mittleren MEP Anteile im Vergleich mit der jeweiligen Lösemittelkontrolle gefunden.



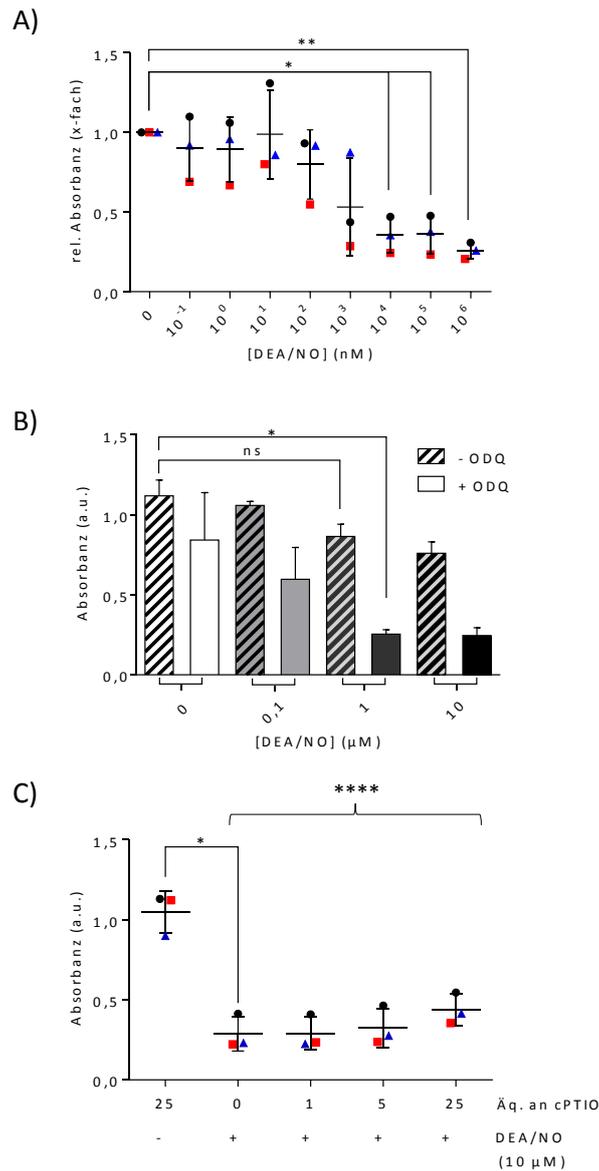
Anhang 9 Einfluss der Stimulation von HSPZ mit DETA/NO auf den Anteil an CD34⁺ CD38⁺ CD10⁺ CD135⁺ CD45RA⁺ GMPs nach fünftägiger Kultur. Balkendiagramme zeigen GMP Anteile in frühen, myeloiden Vorläuferzellen (links) bzw. rel. GMP Anteile bezogen auf die jeweilige Lösemittelkontrolle (rechts) in A) Generation 2, B) Generation 4 und C) Generation 6 in Abhängigkeit der zugesetzten Konzentration von DETA/NO. Balken stellen die Mittelwerte aus n = 4 unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung als Fehlerbalken dar. Lineare Trends mit zunehmender DETA/NO Konzentration nach gepaarter ANOVA sind durch geschweifte Klammern verdeutlicht. * = p < 0,05; ** = p < 0,001; *** = 0,0001 < p < 0,001, **** = p < 0,0001.



Anhang 10 Quantifizierung der rel. Proteinmenge an VASP nach Protein-Immunblot. A) Rel. Signalintensität von VASP nach Behandlung von HSPZ mit DETA/NO bezogen auf die Lösemittelkontrolle in Abhängigkeit der zur Stimulation eingesetzten DETA/NO Konzentration. B) Rel. Signalintensität von VASP nach Behandlung von HSPZ mit 10 μM DETA/NO und/oder 1,25 mM cPTIO. Punktdiagrammdarstellung aus n = 3 Versuchen mit Mittelwerten und Standardabweichung als Linie mit Fehlerbalken. Aufgrund der geringen Proteinmenge, konnte die Quantifizierung des VASP Signals in Abhängigkeit der DETA/NO Konzentration nur in zwei von drei Versuchen durchgeführt werden. Nach gepaarter ANOVA wurden keine signifikanten Unterschiede der einzelnen Proteinsignale verglichen mit der Lösemittelkontrolle gefunden.



Anhang 11 Repräsentativer Protein-Immunblot der DETA/NO-vermittelten Phosphorylierung von VASP an Ser239 und Ser157 in KG1a Zellen nach Stimulation mit bis zu 500 μM DETA/NO. Zusätzlich wurde die VASP mit enzymgekoppelten Antikörpern nachgewiesen und ebenso als Ladekontrollen jeweils GAPDH oder Vinkulin gefärbt.



Anhang 12 Auswirkung der Stimulation von KG1a Zellen mit DEA/NO auf die intrazelluläre cGMP Konzentration ermittelt durch einen kompetitiven cGMP Immunassay. Hierbei korreliert ein erhöhter cGMP Anteil in den Lysaten mit einem verringerten Substratumsatz durch das im Volumenverhältnis 1:1 eingesetzte enzymgekoppelte Konkurrenz molekül und somit mit einer reduzierten gemessenen Absorbanz. A) Darstellung der rel. Absorbanz des Substrates bezogen auf die der Lösemittelkontrolle nach Analyse von Lysaten von KG1a Zellen abhängig von der zur Stimulation eingesetzten Konzentration an DEA/NO. B) Absorbanz des Substrates nach Auftrag von Lysaten von KG1a Zellen in Abhängigkeit der eingesetzten DEA/NO Konzentration. Zellen wurden vor der Stimulation mit DEA/NO mit dem sGC Inhibitor ODQ (gestreifte Balken) oder DMSO (ohne Muster) inkubiert. C) Absorbanz des enzymatisch umgesetzten Substrates nach Auftrag von Lysaten von KG1a Zellen, welche zusätzlich zur Stimulation mit DEA/NO mit 0, 1, 5 und 25 Stoffmengenäquivalenten cPTIO (bezogen auf die maximal freisetzbare Menge an NO) inkubiert wurden. Punktdiagramme und Balkendiagramme stellen die Mittelwerte aus $n = 3$ unabhängigen Versuchen mit der Standardabweichung als Fehlerbalken dar. Signifikante Unterschiede nach gepaarter ANOVA sind durch Linien verbunden, lineare Trends mit steigender Konzentration sind durch geschweifte Klammer markiert. ns = nicht signifikant, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.