

Aus dem Center for Cardiovascular Research (CCR)
Forschergruppe für Experimentelle und Klinische Arteriogenese
Centrum für Innere Medizin CC 11
Abteilung für Kardiologie Campus Virchow Klinikum
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Molekulare Untersuchung der Akuteffekte von aktivem und
passivem Gefäßsport auf die Expression von Arteriogenese-
Biomarkern in zirkulierenden mononukleären Zellen des peri-
pheren Blutes

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Constantin Clemens Benedict Jungk

aus Berlin

Datum der Promotion: 22. September 2017

Für Heinz und Annerose

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract	7
1.1	Abstract (deutsch)	7
1.2	Abstract (englisch)	9
2	Einleitung	11
2.1	Statistische Grundlagen zu kardiovaskulären Erkrankungen	11
2.2	Einführung in die Arteriosklerose	12
2.3	Mechanismen endogenen Gefäßwachstums	13
2.3.1	Vaskulogenese und Angiogenese.....	13
2.3.2	Einführung in die Arteriogenese	13
2.3.3	Mechanismen der Arteriogenese	14
2.4	Arteriogenese als Therapieoption	15
2.4.1	Invasive Therapieansätze	15
2.4.2	Noninvasive Therapieansätze	16
2.4.3	Schubspannung	16
2.5	Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes	17
2.5.1	Klassifizierung in Zelltypen und Subtypen.....	17
2.5.2	Rolle von mononukleären Zellen in der Arteriogenese	18
2.6	Das Kallikrein-Kinin-System	18
2.7	MCP-1 / CCR2	20
2.8	Zielsetzung der Arbeit	22
2.8.1	Untersuchung der Expressionsmuster in PBMCs als diagnostischer Effektivitätsparameter des Gefäßsports.....	22
2.8.2	Direktvergleich des Akuteffektes von aktivem und passivem Gefäßsport	22
3	Darlegung der Methoden	25

3.1	Materialien	25
3.2	Etablierung eines <i>in vitro</i> Zell-Stimulationsmodells.....	27
3.2.1	Herstellung der Medien	27
3.2.2	Vorbereitende Zellkulturarbeiten	28
3.2.3	THP-1 Zell-Stimulation	28
3.3	Verarbeitung von Primärproben	29
3.3.1	Isolation von PBMCs aus Vollblut	29
3.3.2	Primerdesign	30
3.3.3	RNA-Isolation	32
3.3.4	cDNA-Herstellung.....	33
3.3.5	Semi-quantitative Real-Time-Polymerase Kettenreaktion.....	34
3.4	Studie zum Vergleich von aktivem und passivem Gefäßsport.....	35
3.4.1	Voraussetzungen	35
3.4.2	Probandenauswahl.....	35
3.4.3	Versuchsordnung	35
3.4.4	Blutentnahme	37
3.4.5	Versuchsablauf.....	37
3.5	Statistik	37
4	Ergebnisse	39
4.1	Übersicht.....	39
4.2	Expressionsänderungen durch THP-1-Zell-Stimulation.....	41
4.2.1	Kallikrein.....	41
4.2.2	B1R	42
4.2.3	B2R	43
4.2.4	MCP-1	44
4.2.5	CCR2.....	45

4.3 Expressionsänderungen im Kallikrein-Kinin-System nach Gefäßsport..	46
4.3.1 Kallikrein.....	46
4.3.2 Kininogen	47
4.3.3 B1R	48
4.3.4 B2R	49
4.4 Expressionsänderungen im MCP-1/CCR2-System	50
4.4.1 MCP-1	50
4.4.2 CCR2.....	51
5 Diskussion	52
5.1 Überblick über die Ergebnisse	52
5.2 Ergebnisse der THP-1 Zell-Stimulation.....	52
5.2.1 THP-1 Stimulation als Zellkulturmodell für Expressionsuntersuchungen von Arteriogenese-Markern	53
5.2.2 Limitierungen des THP-1 Zell-Stimulationsmodells.....	54
5.3 Ergebnisse der Expressionsanalyse von Arteriogenese-Markern in PBMCs nach Gefäßsport.....	55
5.3.1 Hemmung der Expression von Arteriogenese-Biomarkern durch Laufband-Training und ECP	56
5.3.2 Beeinflussung der Expression von B1R und B2R durch Gefäßsport	56
5.3.3 Anti-inflammatorischer Effekt von Sport.....	57
5.3.4 Schubspannungserhöhung als regulierender Faktor eines pro- arteriogenen oder anti-arteriosklerotischen Effekts von Gefäßsport.....	58
5.3.5 Limitierungen der Gefäßsport-Studie und PBMC- Expressionsanalysen	59
5.3.6 Probanden und Compliance als limitierende Faktoren der Gefäßsport- Studie	61
5.4 Vergleich von passivem und aktivem Gefäßsport.....	62

Inhaltsverzeichnis

5.4.1	Zusammenfassung aktiver Gefäßsport	62
5.4.2	Zusammenfassung passiver Gefäßsport	63
5.4.3	Wertung der Ergebnisse nach passivem und aktivem Gefäßsport ...	64
5.5	Ausblick	64
6	Zusammenfassung.....	66
7	Verzeichnisse	69
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	69
7.2	Literaturverzeichnis	70
7.3	Abbildungsverzeichnis.....	83
7.4	Tabellenverzeichnis	84
8	Eidesstattliche Versicherung.....	85
9	Lebenslauf	88
10	Teilpublikationen.....	90
11	Danksagung.....	91

1 Abstract

1.1 Abstract (deutsch)

Aufgrund körperlicher Einschränkungen bei kardiovaskulär erkrankten Patienten ist aktiver Gefäßsport als Therapie nur einem Teil der Betroffenen möglich. Diese Patienten könnten von einem passiven Gefäßsport nach dem External Counterpulsation (ECP)-Prinzip profitieren. Erstens kann durch einen anti-arteriosklerotischen Effekt das Auftreten und / oder die Progression kardiovaskulärer Erkrankungen verhindert werden; zweitens können, durch Stimulation von Arteriogenese, die Beschwerden derartig erkrankter Patienten nachweislich gemindert werden. Hierbei spielen insbesondere das in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) aktivierte Kallikrein-Kinin-System (KKS) sowie die dem Monocyte chemoattractant Protein-1 / C-C-Chemokin-Rezeptor 2 (MCP-1 / CCR2) nachgeschaltete Signalkaskade eine entscheidende Rolle.

In dieser Studie wurden die Arteriogenese-Effektormoleküle des KKS (Kallikrein, Kininogen, Bradykinin Rezeptor B1 (B1R), Bradykinin Rezeptor B2 (B2R)), sowie von MCP-1 und CCR2 auf ihre Eignung als molekulare, diagnostische Marker zur Beurteilung eines Trainingseffektes bei Laufbandtraining oder ECP-Therapie untersucht. Hierzu wurde zunächst an einer monozytären THP-1 Zelllinie ein Stimulationsmodell entwickelt, dessen Ergebnisse die Basis für die Analyse der Expressionsregulation in einer anschließend durchgeführten Gefäßsport-Studie bildeten. Der Effekt von aktivem (Laufbandtraining, 30 Minuten) und passivem (ECP-Training, 45 Minuten) Gefäßsport auf die Expression der ausgewählten Arteriogenese-Biomarker wurde an n = 26 jungen (mittleres Alter 23,37 Jahre) gesunden Probanden durchgeführt und das Expressionsprofil dieser Marker in isolierten zirkulierenden PBMCs untersucht.

Die Auswertung der Expressionsanalyse nach THP-1 Zell-Stimulation zeigte, dass die Expression der untersuchten Moleküle mittels unterschiedlicher stimulatorischer Reize (Stimulation mittels Granulocyte-colony stimulating factor [G-CSF], Interleukin-1 β [IL-1 β], Lys-[Des-Arg]-Bradykinin und bakterielles Lipopolysaccharid [LPS]) beeinflusst werden kann. Die Ergebnisse entsprachen am ehesten einer angestoßenen Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen.

Abstract

Der Vergleich des Expressionsmusters der im Rahmen der Gefäßsport-Studie aus Vollblut isolierten PBMCs ergab eine generelle Tendenz zur Herunterregulation der untersuchten Parameter. Hierbei zeigten sich insbesondere MCP-1 und CCR2 zwar nicht signifikant, jedoch relevant in ihrer Expression herunterreguliert. Für die Bradykinin-Rezeptoren B1R und B2R konnte ein gegenläufiges Expressionsmuster nachgewiesen werden. Während B1R bei passivem Gefäßsport signifikant hochreguliert wurde, zeigte sich nach aktivem Gefäßsport eher eine Tendenz zur Hochregulation. Die Expression von B2R verhielt sich hierzu exakt gegensätzlich, wobei auch hier nur die Expressionsänderung nach passivem Gefäßsport Signifikanz erreichte.

Diese Ergebnisse weisen auf eine anti-arteriosklerotische Wirkung von Gefäßsport bei jungen gesunden Probanden hin. Die hier nach passivem und aktivem Gefäßsport gleichermaßen feststellbare Regulation der untersuchten Parameter erlaubt erstmals den direkten Vergleich beider Therapieformen und legt eine, in ihrer Ausprägung vergleichbare, kardio- / vaskuloprotektive Wirkung nahe.

1.2 Abstract (englisch)

Active training as a highly effective therapy for patients suffering from cardiovascular diseases is only available for patients in moderate cases. However, patients in higher disease stages could benefit from external counterpulsation (passive training) promoting an anti-arteriosclerotic effect to prevent the formation and / or progression of cardiovascular diseases due to arteriosclerotic lesions. Notably, arteriogenesis, characterised by the shear stress-induced outgrowth of pre-existing collateral vessels to functional conductance arteries, is furthermore stimulated. Since the activation of peripheral blood mononuclear cells via the KKS as well as the MCP-1- / CCR2-pathway plays a major role in arteriogenesis, we examined the ability of different biomarkers out of these pathways (Kallikrein, Kininogen, B1R, B2R, MCP-1, CCR2) upon training.

We first developed an *in vitro* cell stimulation model using THP-1 cells. Taking into account the results of the *in vitro* experiments, we designed and performed a clinical trial with young (mean age 23,37 years) healthy volunteers to examine the effects of active (treadmill, 30 minutes) and passive (ECP, 45 minutes) training on the expression of the aforementioned biomarkers.

The *in vitro* stimulation of THP-1 cells showed that the expression of different molecules of the KKS and the MCP-1- / CCR2-pathways could be affected by different stimuli (G-CSF, IL-1 β , Lys-[Des-Arg]-Bradykinin and LPS) resulting in the induction of cell differentiation from monocytes to macrophages.

Comparing the expression profiles of PBMCs isolated from whole blood of healthy volunteers before and after active or passive training, we noticed a general tendency of expressional down regulation of the examined parameters. Interestingly, the expression of B1R and B2R seem to reveal an adverse regulation one to the other. While the expression of B1R was significantly up regulated after passive training, active training led to a leaning down regulation. The changes in B2R expression have been shown in the opposite direction.

These results point out an anti-arteriosclerotic effect of training on young healthy volunteers. In this study, we compared for the first time the impact of active and, respectively,

Abstract

passive training on the expressional regulation of arteriogenesis relevant biomarkers and found a downregulation of both the KKS and the MCP-1- / CCR2-pathway upon both training types.

2 Einleitung

2.1 Statistische Grundlagen zu kardiovaskulären Erkrankungen

38,9 % der Todesfälle in Deutschland werden nach Angaben des statistischen Bundesamtes durch Erkrankungen des Kreislaufsystems verursacht (**Abbildung 1**)¹. Weltweit sind kardiovaskuläre Erkrankungen die führende Ursache für Morbidität und Mortalität²; aktuelle Zahlen zeigen zudem eine weiterhin steigende Tendenz.³ Dementsprechend ist die Weiterentwicklung der Akut- und Langzeittherapie kardiovaskulärer Erkrankungen von besonderem klinischem Interesse.

Die Mehrzahl der kardiovaskulären Erkrankungen entsteht auf der Grundlage der Arteriosklerose. Der Myokardinfarkt ist hierfür ein prominentes Beispiel. Durch einen plötzli-

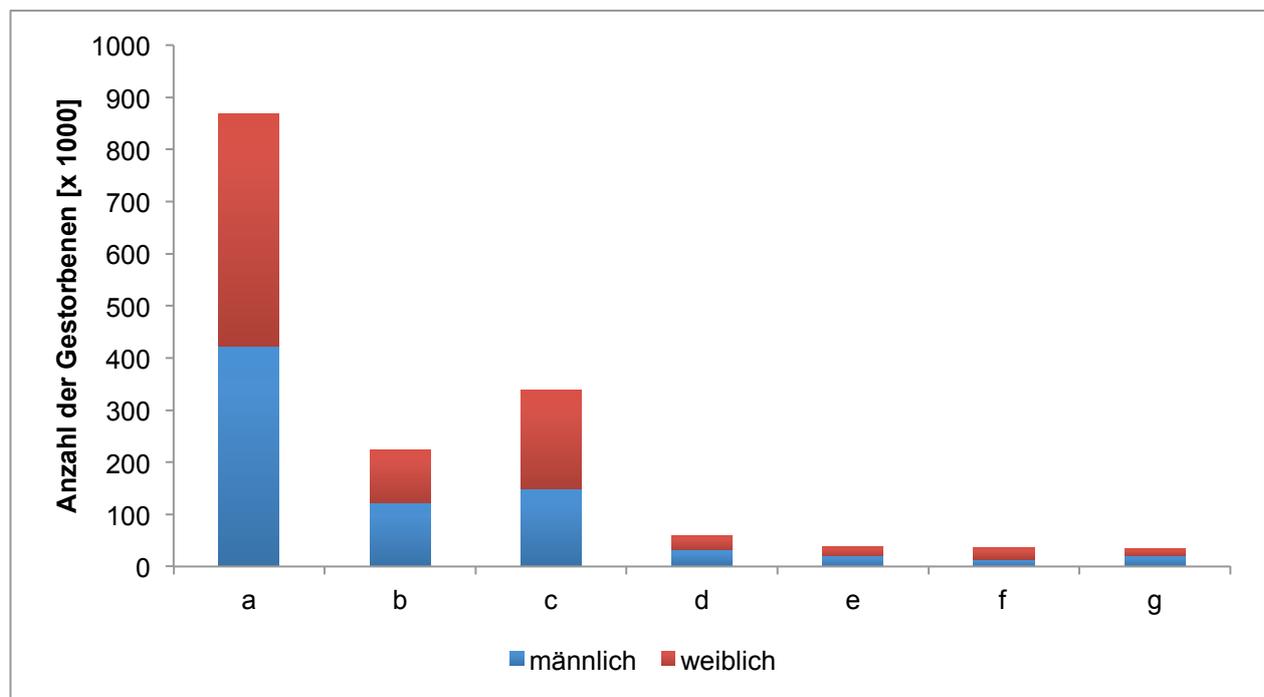


Abbildung 1: Anzahl der in Deutschland im Jahr 2014 Gestorbenen nach ausgewählten Todesursachen. a) Insgesamt b) Bösartige Neubildungen c) Krankheiten des Kreislaufsystems d) Krankheiten des Atmungssystems e) Krankheiten des Verdauungssystems f) psychische und Verhaltensstörungen g) Verletzungen, Vergiftungen und bestimmte andere Folgen äußerer Ursachen.¹

chen koronararteriellen Verschluss kommt es zu einem Ischämie-bedingten Absterben von Kardiomyozyten⁴. Hieraus resultiert eine verminderte Kontraktilität des Herzmuskels und häufig auch eine gegebenenfalls lebensbedrohliche Herzinsuffizienz. Die Ent-

stehung eines koronararteriellen Verschlusses wird durch eine chronische Abnahme von Gefäßelastizität und –durchmesser im Sinne einer Arteriosklerose stark begünstigt.

2.2 Einführung in die Arteriosklerose

Arteriosklerose gilt als bedeutendster Risikofaktor für die Entstehung eines Myokardinfarktes⁵ und stellt somit die Hauptursache für Morbidität und Mortalität in der industrialisierten Welt dar⁶. Die hierbei betroffenen arteriellen Gefäße bestehen von außen nach innen aus der Tunica adventitia (Bindegewebe), der Tunica media (glatte Muskulatur) sowie der Tunica intima (Endothel).⁷ Der Begriff Arteriosklerose umschreibt eine variable Kombination folgender Veränderungen der Tunica intima in arteriellen Gefäßen: herdförmige Ansammlungen von Fetten, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, sowie Veränderungen der Tunica media. Dieser Prozess ist bereits seit der Mitte des 19. Jahrhunderts als Auslöser verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen bekannt^{7,8}. Der weitaus häufigste Entstehungsmechanismus von arteriosklerotischen Plaques ist hierbei die Bildung von lipidhaltigen Einlagerungen in der Intima^{8,9}, den sogenannten Atheromen⁷.

Die Entstehung arteriosklerotischer Plaques wird mit zahlreichen Risikofaktoren in Verbindung gebracht. Unter anderem bewirken verschiedene Noxen Genexpressions- und Endothelveränderungen an den Prädilektionsorten, wodurch die Gefäßintima initial geschädigt wird. Solche Prädilektionsorte finden sich beispielsweise an den Ostien der Seitenäste sowie an inneren Kurvaturen der Aorta^{10,11}. Durch hohe low-density Lipoprotein (LDL)-Blutkonzentrationen begünstigen, oxidieren und aggregieren die Blutfette im geschädigten Gefäßabschnitt¹². Die so veränderten Lipide lösen in Endothel- und glatten Muskelzellen die Ausbildung von Adhäsionsmolekülen und chemotaktischen Substanzen aus, wodurch wiederum die Transmigration von Monozyten ins betroffene Gewebe stimuliert wird. Die transmigrierten Monozyten differenzieren zu Makrophagen und dendritischen Zellen¹³. Diese werden, nach Phagozytose von Lipoproteinen, Schaumzellen genannt¹⁴. Mehrere Schichten aus Schaumzellen bilden gelbliche Fettstreifen („Fatty steaks“), die als noch reversible Läsionen durch die weitere Akkumulation azellulären, lipidreichen Materials in der Intima und weiterer Makrophagen-Invasion vergrößert werden. Dies führt zur irreversiblen Zerstörung der normalen Intimastruktur¹². Apoptose und sekundäre Nekrose von Schaum- und glatten Muskelzellen resultieren in der Ausbildung eines nekrotischen Kerns, in dem Kalzium ausfallen

Einleitung

kann (Kalzifikation). Die gebildete Plaque kann durch verschiedene Mechanismen wie beispielsweise hohe intravasale Drücke oder andere mechanische Reizungen rupturieren, wodurch der hoch thrombogene Kern in direkten Kontakt mit zirkulierenden Thrombozyten kommt, was wiederum zur Aggregation führt. Die aggregierten Thrombozyten können dann entweder lokal als Thrombus oder durch Ausschwemmung in andere Regionen als Embolus das Gefäßlumen verengen oder komplett verschließen^{12,14,15}. Dieser Mechanismus steht zu Beginn der Mehrzahl kardiovaskulärer Erkrankungen.

Der demographische Wandel und die zunehmende Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen führen zu einer stetig steigenden Patientenzahl und fordern somit ein Umdenken in der Entwicklung erfolgreicher Therapien; insbesondere da die Zahl derer wächst, bei denen die konservativ-medikamentöse Therapie oder die interventionelle und operative Revaskularisierung ohne Erfolg bleiben. Diese Patienten würden von regenerativen Therapien, beispielsweise der Induktion von Gefäßwachstum, profitieren. Hierbei spielt die Arteriogenese, auch biologischer Bypass genannt, eine große Rolle¹⁶.

2.3 Mechanismen endogenen Gefäßwachstums

2.3.1 Vaskulogenese und Angiogenese

Die Vaskulogenese beschreibt die *de novo* Formation von arteriellen Netzwerken während der embryonalen Entwicklung. Neben der Bedeutung für die pränatale Entwicklung wird sie auch im Rahmen von Neoplasien diskutiert, verliert aber im adulten Organismus an Bedeutung. Die Vaskulogenese schließt die Bildung des Mesoderms, die Bildung einer endothelialen Zellschicht (Hämangioblasten), deren Organisation und die Ausbildung vaskulärer Netzwerke ein¹⁷.

Anders als die Vaskulogenese stellt die Angiogenese die Aussprossung oder Abspaltung aus prä-existenden Kapillaren dar. Im adulten Menschen ist sie nachweislich durch Hypoxie induzierbar und spielt insbesondere bei regenerativen Prozessen eine Rolle¹⁸.

2.3.2 Einführung in die Arteriogenese

Arteriogenese bezeichnet die Remodellierung prä-existenter Kollateralgefäße zu funktionellen Konduktanzarterien als Umgehungskreisläufe eines stenosierten arteriellen Gefäßes¹⁹. Eine Ischämie wird in ihrer Schwere von der individuellen Zahl der verfügbaren Kollateralgefäße beeinflusst. Hierbei findet Arteriogenese im nicht-ischämischen,

zuführenden Bereich statt, während Angiogenese ausschließlich im ischämischen Areal vorkommt. Damit stellt die Arteriogenese einen der wichtigsten endogenen Protektionsmechanismen bei Gefäß-okkludierenden Erkrankungen dar und ist von besonderem klinischem Interesse¹⁷.

Durch Arteriogenese können stromabwärts liegende ischämische Areale verkleinert und / oder das Auftreten von vaskulärer Ischämie präventiv verhindert werden^{20,21}.

Arteriogenese ist bislang die einzige Form des Blutgefäßwachstums, für die gezeigt werden konnte, dass Blutzirkulationsdefizite nach arteriellen Verschlüssen effektiv kompensiert werden können¹⁷.

2.3.3 Mechanismen der Arteriogenese

Arteriogenese wird initiiert, wenn durch die Verengung bzw. den Verschluss eines Konduktanzgefäßes ein prä-existentes Kollateralgefäß vermehrt mit Blut durchströmt wird und dessen Endothel dabei einer erhöhten laminaren Schubspannung ausgesetzt ist (**Abbildung 2**)²².

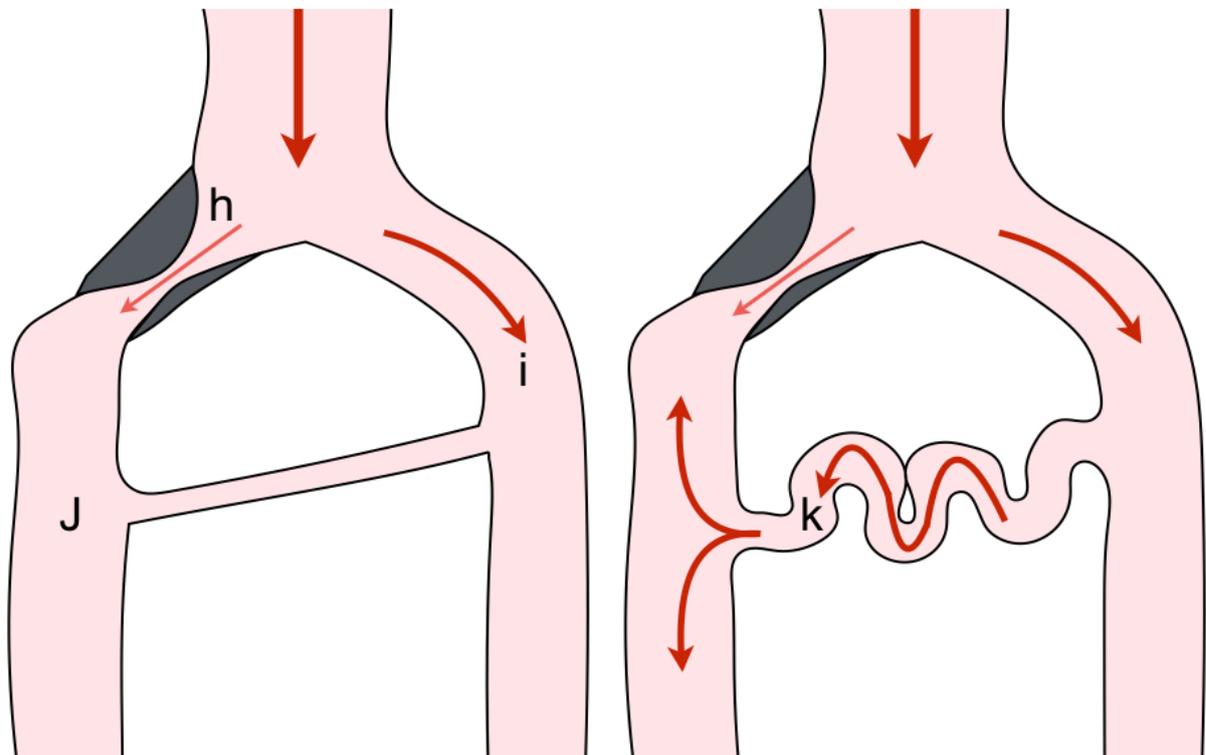


Abbildung 2: Darstellung der prinzipiellen Mechanismen der Arteriogenese. Durch Stenose oder Verschluss (h) eines Hauptgefäßes entsteht ein Druckgradient zwischen den kollateralen Anastomosen, die das verengte Gefäß proximal (i) und distal des poststenotischen Gefäßverlaufs verbinden (J). Dies führt zu einem funktionellen Umgehungskreislauf nach dem Prinzip eines biologischen Bypasses und zur Remodellierung des Kollateralgefäßes (k). Adaptiert nach Persson *et al.*, 2011

Einleitung

Die so aktivierten Endothelzellen eines rekrutierten Kollateralgefäßes setzen zum einen chemoattraktive Substanzen wie MCP-1 frei und induzieren zum anderen die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen. Durch beide Prozesse wird die Rekrutierung von PBMCs, insbesondere Monozyten, gesteigert²³⁻²⁵.

Die rekrutierten Monozyten transmigrieren durch die Gefäßwand kollateraler Gefäße in den perivaskulären Bereich und differenzieren zu unterschiedlichen Makrophagen-Subtypen (siehe **2.5.1f**). Makrophagen wirken hier in parakriner Funktion und sezernieren Wachstumsfaktoren und Botenstoffe. Die daraus resultierende Umstrukturierung des perivaskulären Raumes sowie anschließend des Gefäßes durch unter anderem Matrixmetalloproteasen (MMP) ermöglicht die Proliferation von Endothelzellen, glatten Muskelzellen sowie Fibroblasten. Diese Faktoren charakterisieren die Reifung einer prä-existenten Kollateralarterie in eine größere funktionelle Konduktanzarterie^{17,26}.

2.4 Arteriogenese als Therapieoption

2.4.1 Invasive Therapieansätze

Während bei akuten Gefäßokklusionen (Myokardinfarkt, ischämischer apoplektischer Insult) eine sofortige medikamentöse Therapie oder interventionelle Revaskularisierung dringend erforderlich ist, erscheint der Nutzen solcher Therapien bei chronischen Ischämien fraglich⁶. Aus diesem Grund wurde in der jüngeren Vergangenheit mehrfach versucht, Arteriogenese durch eine medikamentöse Therapie zu steigern. Hierbei wurden unterschiedliche Zytokine mit verschiedenen Wirkmechanismen und -orten verwendet. Die in Nagetieren (Maus, Ratte) teilweise vielversprechenden präklinischen Studien konnten allerdings aufgrund von massiven unerwünschten Wirkungen der Agenzien nie vollständig im Menschen angewandt werden^{25,27}. Des Weiteren war auch die Applikation einzelner Wachstumsfaktoren im Vergleich zum Effekt einer gesteigerten Schubspannung im Gefäß therapeutisch weniger erfolgreich. Die Steigerung der Schubspannung wurde im Tiermodell bei Ratten und Kaninchen mit Hilfe einer Ligatur der Arteria (A.) femoralis mit anschließender Anlage eines arteriovenösen Shunts distal der Ligaturstelle erreicht. Der auf diese Weise induzierte Druckgradient führte zu einer Erhöhung der Perfusion sowie der Schubspannung in den prä-existenten kollateralen Anastomosen, die wiederum zum Wachstum eben dieser führte²⁸.

2.4.2 Noninvasive Therapieansätze

Physisches Training, insbesondere Gefäßsport, hat einen vasoprotektiven Effekt und erhöht auf natürliche Weise die laminare Schubspannung im Gefäßbett und in den Kollateralgefäßen. Da dies zur Induktion therapeutischer Arteriogenese führt, ist Gefäßsport insbesondere bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) integraler Bestandteil der kardiovaskulären Rehabilitation geworden¹⁶.

Regelmäßiges Ausdauertraining (aktiver Gefäßsport) steigert zwar die Schubspannung und konsekutiv die Arteriogenese in den unteren Extremitäten nachweislich, jedoch kommt aktiver Gefäßsport nicht für alle Patienten in Frage. Zum einen ist die Regelmäßigkeit des Trainings (Patienten-Compliance) von essentieller Bedeutung; zum anderen können viele Patienten aufgrund ihrer Erkrankungen an keinem effektiven Trainingsprogramm teilnehmen^{16,29}.

Für solche Patienten bietet der passive Gefäßsport mit dem Ziel der Arteriogenese-Induktion eine wichtige Alternative. Hierbei werden dem auf einer Liege ruhenden Patienten pneumatische Manschetten um die unteren Extremitäten herum angelegt. Diese werden dann, EKG-getriggert, nach dem ECP-Prinzip in der Diastole mit Luft befüllt und in der Systole entlüftet, wodurch eine herzwärts gerichtete Pulsdruckwelle entsteht. Auf diese Weise wird, ähnlich dem aktiven Gefäßsport, die Schubspannung am Gefäßendothel erhöht. Durch diese Therapie konnten beispielsweise die anginösen Beschwerden von ECP-behandelten Patienten nachhaltig gebessert werden^{16,19}.

2.4.3 Schubspannung

Schubspannung wird als tangentielle Kraft des Blutes entlang der Gefäßwand definiert und durch den Schub des viskosen Blutes ausgelöst. Veränderungen der Viskosität (η), des Blutflusses (Q) oder des Gefäßradius (r) beeinflussen die Schubspannung (τ) entsprechend folgender Formel:

$$\tau = \frac{4 \eta Q}{\pi r^3}$$

Unter Anwendung der Dynamik Newton'scher Flüssigkeiten ist anzunehmen, dass ein vermehrter Blutfluss bzw. eine erhöhte Blutflussgeschwindigkeit, beispielsweise in Fol-

Einleitung

ge eines veränderten Druckgradienten nach Okklusion eines Konduktanzgefäßes, die Schubspannung im Kollateralgefäß erhöht²².

Obwohl der exakte Mechanismus der Schubspannungs-induzierten Endothelzell-Aktivierung noch nicht vollständig verstanden ist, existiert ein allgemein anerkanntes Konzept, wonach verschiedene Kompartimente der Zelle, durch enge Kopplung der Zellmembran an das Zytoskelett, als Schubspannungsrezeptor wirken (Mechanosensing). Insbesondere verschiedene Integrine, bestimmte Ionenkanäle, Tyrosin-Kinase-Rezeptoren sowie Aktinfilamente scheinen hier eine bedeutende Rolle zu spielen^{30-32, 22}. Die aktivierten Endothelzellen remodellieren ihr Aktinzytoskelett, induzieren eine veränderte Expression von Oberflächenrezeptoren und synthetisieren chemotaktische Substanzen zur Rekrutierung mononukleärer Zellen^{30-32, 22}.

2.5 Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes

2.5.1 Klassifizierung in Zelltypen und Subtypen

Die Klassifikation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes ist im Wesentlichen eine historische, morphologische Einteilung ohne Charakterisierung der Zellen nach Ursprung, Funktion oder Expressionsmuster. Sie schließt alle einkernigen Leukozyten, wie Lymphozyten und Monozyten, ein, wobei Monozyten nur etwa 10% der gesamten Zellzahl ausmachen³³. Granulozyten gelten als mehrkernig, werden an dieser Stelle aufgrund ihrer engen Beziehung zu den mononukleären Zellen sowie ihrer großen Zellzahl im Vollblut (60%) dennoch erwähnt³³. Obwohl auch Granulozyten und Lymphozyten weiter subklassifiziert werden können, wird im Folgenden aufgrund der starken Relevanz für diese Arbeit der Fokus auf die Subklassifikation der Monozyten gelegt.

Die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen hat einen wesentlichen Anteil an der Arteriogenese. Es kann zwischen den M1-Makrophagen und den M2-Makrophagen unterschieden werden. Während M1-Makrophagen durch ihre Zytokin-Produktion (insbesondere Interleukine wie IL-1 β) die Immunantwort im Zielgewebe erhöhen, gelten M2-Makrophagen nicht als klassisch-inflammatorisch, sondern scheinen eher anti-inflammatorisch zu wirken. Eine weitere Unterscheidung in M2a-, M2b- und M2c-Makrophagen zeigt, dass M2c-Makrophagen im Wesentlichen für die Remodellierung der extrazellulären Matrix sowie die Gewebereparatur zuständig sind^{24,34}. Aufgrund dieser Eigenschaften erscheinen sie im Kontext der Arteriogenese von besonderem Inte-

Einleitung

resse, während die Subtypen M2a und M2b durch ihre speziellen Eigenschaften (M2a: Mediation von Typ-2-Reaktionen, Regulation der T-Helferzell-2-Antwort [TH2-Antwort], Bekämpfung von Parasiten; M2b: Aktivierung von TH2-Zellen und Immunoregulation)³⁴ hier nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen.

2.5.2 Rolle von mononukleären Zellen in der Arteriogenese

Die Rolle der Leukozyten in der Arteriogenese ist besonders wichtig, da klinische Untersuchungen eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl zirkulierender Leukozyten und dem Grad der Kollateralisierung zeigten³⁵. Demnach ist der therapeutische Nutzen von Leukozyten für die Gefäßbiologie bedeutend und wurde jüngst als regeneratives Konzept für die kardiovaskuläre Forschung formuliert¹⁵.

Sowohl M1- als auch M2-Makrophagen konnten im Prozess der Gefäßmodellierung nachgewiesen werden. Es wird angenommen, dass M1-Makrophagen durch Sekretion chemotaktischer Substanzen, wie MCP-1, weitere zirkulierende Monozyten rekrutieren. Auf diese Weise rekrutierte Monozyten transmigrieren in den perivaskulären Raum und differenzieren zu M2-Makrophagen, wo sie durch veränderte Zytokin- und Enzym-Expression den Gewebsumbau einleiten^{17,24}. Dementsprechend ist neben dem zellulären auch der humorale Aspekt in gefäßmodellierenden Prozessen von Bedeutung.

2.6 Das Kallikrein-Kinin-System

Das Kallikrein-Kinin-System spielt sowohl in der Nierenphysiologie, der Regulation kardiovaskulärer Parameter (z.B. Blutfluss und -druck), als auch in der Mediation inflammatorischer Prozesse (z.B. Arteriogenese) eine zentrale Rolle.

Kallikreine sind eine heterogene Gruppe von Serin-Proteasen unterschiedlichen Ursprungs (Niere, Speicheldrüsen, Pankreas, Gastrointestinaltrakt)³⁶. Sie spalten das Propeptid Kininogen durch die Prozessierung von verschiedenen Kininen, deren wohl bekanntester Vertreter das Bradykinin ist³⁷.

Kininogen ist ein Cystein-Proteinase-Inhibitor, der unter anderem die Wirkung von Matrix-Metalloproteasen (MMP) im perivaskulären Raum hemmt²⁶. In Kininogen-knock-out-Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass Kininogen-Mangel zu einer Überaktivierung von MMP2 und MMP3 und konsekutiv zu einer erhöhten Inzidenz von Aortenaneurysmen führt. Interessanterweise traten trotz atherogener Diät keine arteriosklero-

Einleitung

tischen Plaques auf³⁸. Plasma-Kallikreine spalten aus einer HMW-Kininogen-Form (engl. high molecular weight) mit hohem Molekulargewicht und sehr kurzer Halbwertszeit das Polypeptid Des-Arg9-Bradykinin ab. Des-Arg9-Bradykinin besteht aus 8 Aminosäuren, wirkt am B2R und ist das wichtigste vasoaktive Peptid des KKS im Kontext der Regulation von Blutdruck und Blutfluss^{39,40}.

Der B2R ist ein konstitutiv exprimierter Oberflächenrezeptor des kardiovaskulären Systems⁴¹. Bradykinin bindet am B2R und vermittelt eine Signalwirkung über die Sezernierung von Prostaglandinen sowie der Kalzium-abhängigen Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS). Die hieraus resultierende transiente Freisetzung von Stickstoff-Monoxid („Nitric Oxide“, NO) führt dann zur Relaxation der glatten Muskelzellen in der Tunica media und zur Regulation des Gefäßtonus. Die Aktivierung des B2R kann sowohl autokrin als auch parakrin erfolgen^{42,39} und zieht eine schnelle Desensitivierung nach sich⁴³.

An der Niere induziert Bradykinin die Natrium-Diurese. Diese wird durch einen reduzierten Gefäßwiderstand und dem daraus resultierenden signifikant gesteigerten renalen Blutfluss verursacht. Die glomeruläre Filtrationsrate ändert sich jedoch nicht⁴⁴.

Das KKS und das Renin-Angiotensin-System (RAS) sind über das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) verbunden. Das ACE setzt Angiotensin I zu Angiotensin II um. Gleichzeitig kann es Bradykinin degradieren⁴⁵. Die Hemmung des ACE's bewirkt eine Stabilisierung von Bradykinin, was die kardioprotektive Wirkung der ACE-Inhibitoren mit begründet^{46,47}.

Gewebe-Kallikreine setzen eine Kininogen-Form mit niedrigem Molekulargewicht (engl. low molecular weight, LMW) zu Lysyl-Bradykinin um. Dieses Peptid bindet am B1R. Der B1R ist ein durch Inflammation in verschiedensten Geweben induzierter, G-Proteingekoppelter Oberflächenrezeptor^{37,48}. Er bleibt durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor κ B (NF- κ B) über längere Zeit aktiv. Hierdurch wird der initiale inflammatorische Reiz verstärkt⁴³. Der aktivierte B1R induziert die Expression von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), dessen Rezeptor VEGFR und eNOS in Endothelzellen³⁷.

Einige ausgewählte Mechanismen des Kallikrein-Kininsystems sind in **Abbildung 3** übersichtlich dargestellt. Aufgrund der Komplexität des KKS wurde hier zugunsten der Übersichtlichkeit auf eine allumfassende Darstellung der Interaktionen und Mechanismen verzichtet.

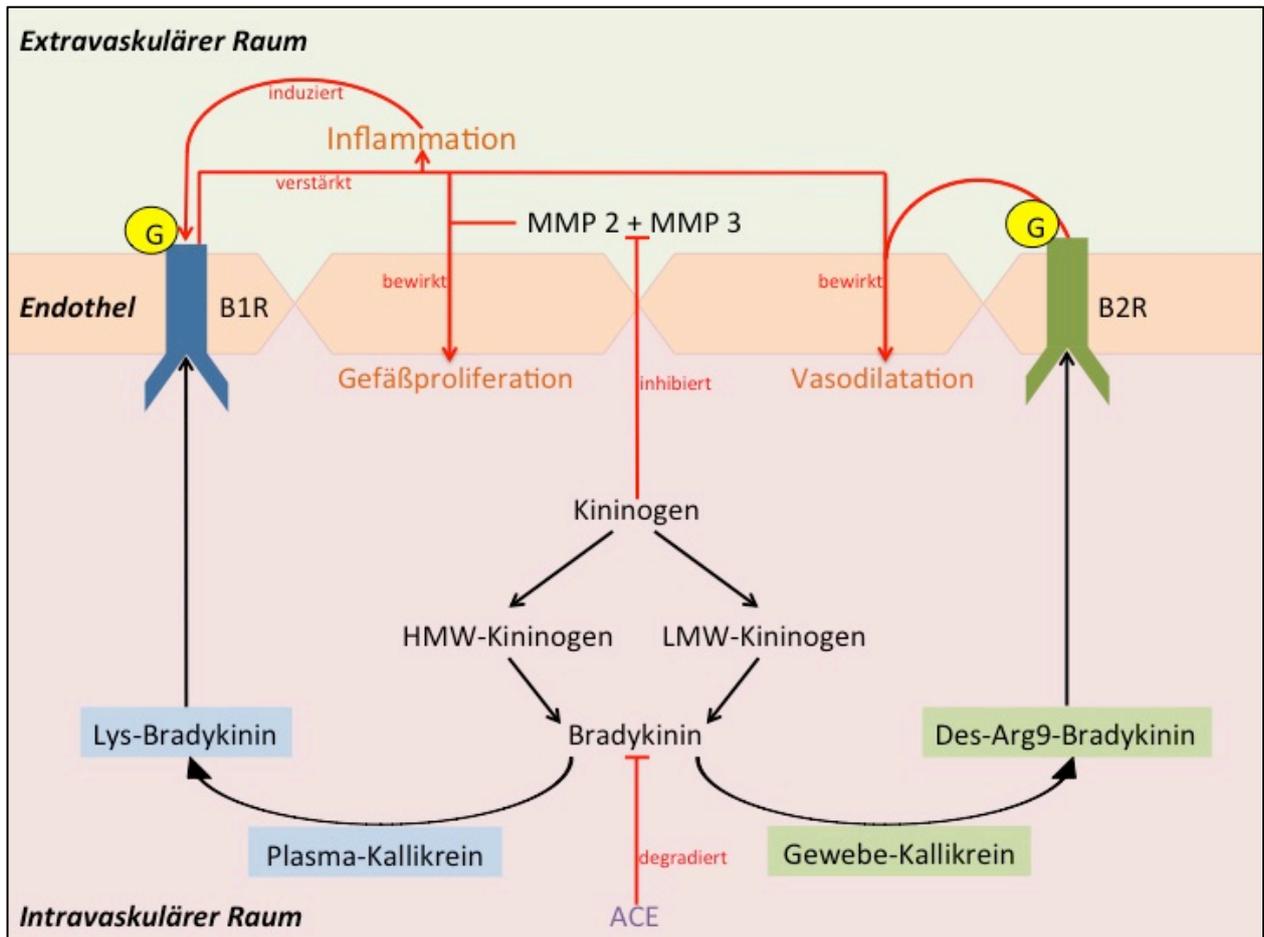


Abbildung 3: Darstellung ausgewählter Mechanismen des Kallikrein-Kinin-Systems. Kininogen inhibiert die Matrixmetalloproteasen MMP2 und MMP3. Die Umwandlung von HMW-Kininogen (durch Plasma-Kallikrein) und LMW-Kininogen (durch Gewebe-Kallikrein) zu Bradykinin induziert auf diese Weise den Gewebeumbau. Lys-Bradykinin bindet am durch Inflammation induzierten B1R und verstärkt so den inflammatorischen Reiz. Weiterhin bewirkt es Gefäßproliferation und Vasodilatation. Die Bindung von Des-Arg9-Bradykinin am konstitutiv exprimierten B2R bewirkt im Wesentlichen Vasodilatation. Bradykinin wird durch ACE degradiert.

2.7 MCP-1 / CCR2

Neben dem KKS spielen noch weitere humorale Faktoren wie MCP-1 / CCR2 eine wichtige Rolle bei der Regulation arteriogener und inflammatorischer Prozesse. Der G-Protein-gekoppelte CCR2 stellt eines von aktuell 10 bekannten Mitgliedern der C-C-Rezeptorfamilie dar, deren Namensgebung an die N-terminale Aminosäurestruktur und die dortige Reihenfolge der Cysteinreste angelehnt ist. Auf Monozyten konnten bisher im Wesentlichen die Rezeptoren CCR1, CCR2 und CCR5 nachgewiesen werden⁴⁹.

Einleitung

Der Hauptligand von CCR2 ist MCP-1, dessen Relevanz für die Monozyten- / Makrophagen-Rekrutierung in verschiedenen Tiermodellen bewiesen werden konnte⁵⁰. MCP-1 wird von Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Fibroblasten und Monozyten exprimiert²³.

Durch die Bindung von MCP-1 an CCR2 wird durch Remodelling des Zytoskeletts die Zelldifferenzierung eingeleitet und folglich die Zellmigration in den perivaskulären Bereich erleichtert. Die dort stattfindende weitere Zelldifferenzierung führt zur Erhöhung der Expression von MCP-1, die wiederum die Herunterregulation von CCR2 und eine vermehrte Proliferation von Endothelzellen sowie der extrazellulären Matrix nach sich zieht⁵¹.

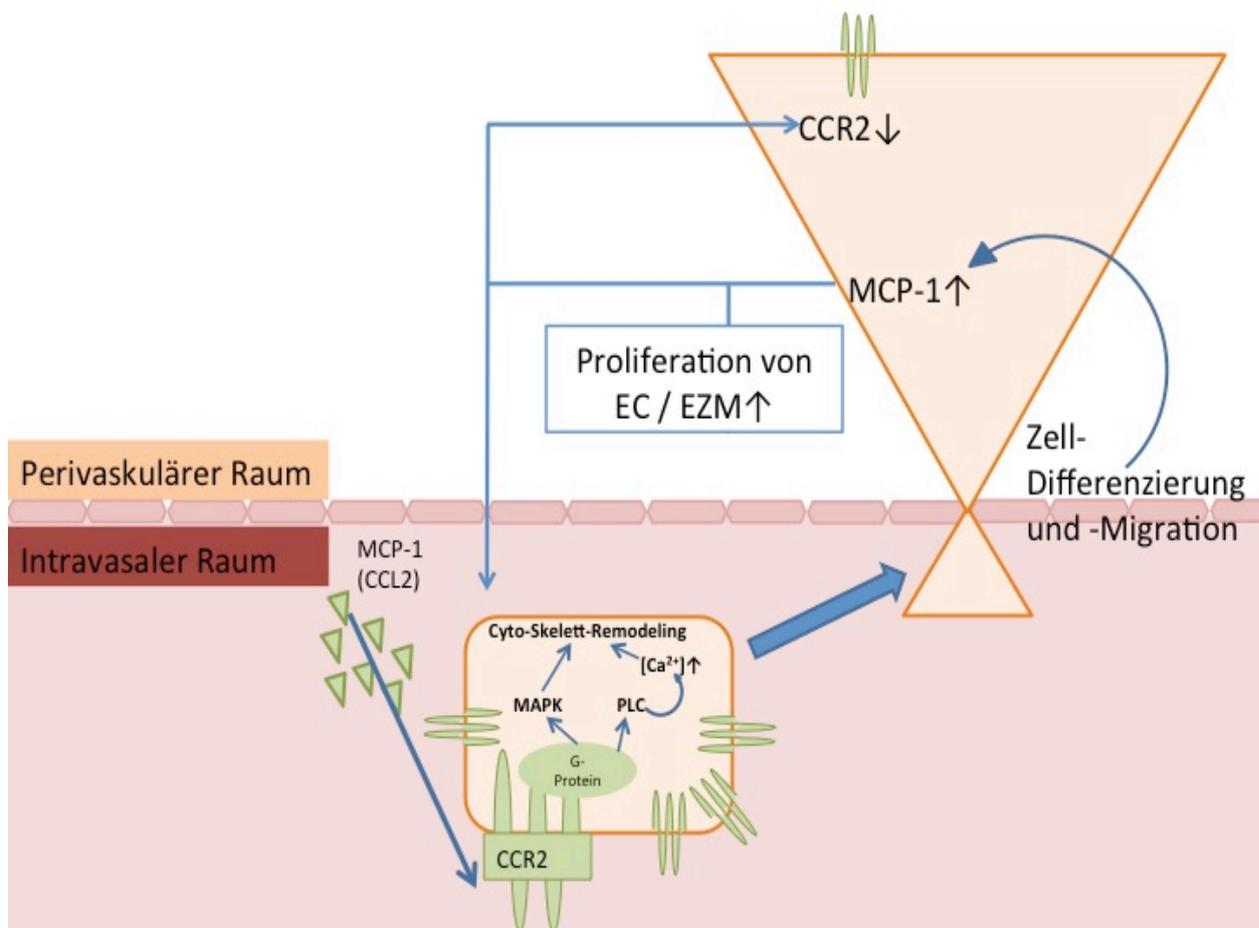


Abbildung 4: Darstellung ausgewählter Mechanismen der MCP-1-Wirkung auf im Blut zirkulierende Monozyten. Die Bindung von MCP-1 am CCR2 zirkulierender Monozyten führt über Aktivierung der Map-Kinase (MAPK) sowie der Phospholipase C (PLC) zur Remodellierung des Zytoskeletts. Hierdurch wird die Zellmigration in den perivaskulären Raum erleichtert. Dort führt die weitere Zelldifferenzierung zur erhöhten Expression von MCP-1, die eine Herunterregulation von CCR2 sowie eine vermehrte Proliferation von Endothelzellen (EC) und extrazellulärer Matrix (EZM) bewirkt. Adaptiert nach Fantuzzi *et al.*, 1999

Fantuzzi *et al.* konnten außerdem zeigen, dass sowohl die Expression von CCR2, als auch die direkt korrelierende Responsivität auf MCP-1 mit zunehmendem Differenzierungsgrad vom Monozyten zum Makrophagen abnimmt. Die MCP-1-Expression und -Sekretion wiederum nehmen zu (umgekehrt proportionales Verhältnis). MCP-1 scheint also die CCR2-Expression in Monozyten in frühen Differenzierungsstadien herunterzu regulieren (**Abbildung 4**)⁵¹.

2.8 Zielsetzung der Arbeit

2.8.1 Untersuchung der Expressionsmuster in PBMCs als diagnostischer Effektivitätsparameter des Gefäßsports

Training und die damit einhergehende Schubspannungserhöhung konnte als effektiver Induktor der Arteriogenese in verschiedenen Tiermodellen nachgewiesen werden⁵². Da bisherige Methoden zum Nachweis der Arteriogenese nur teilweise auf den Menschen übertragbar sind und / oder erhöhte Risiken bergen (Angiographien, endovaskuläre Interventionen etc.), ist eine objektivierte, gering invasive Messung der Trainingseffektivität noch ausstehend. Durch objektivierte, Untersucher-unabhängige Parameter könnte eine schnelle und einfache Überwachung der Trainingserfolge erzielt und eine gegebenenfalls notwendige, intermediäre Adaptation des Trainings realisiert werden. Ziel dieser Arbeit ist es, Expressionsmuster ausgewählter Gene zu identifizieren und auf ihre Eignung als diagnostischer Marker zur Bewertung von Trainingseffekten hinsichtlich der positiven Wirkung auf das regenerative vaskuläre Remodelling zu untersuchen.

2.8.2 Direktvergleich des Akuteffektes von aktivem und passivem Gefäßsport

Die steigende kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität impliziert eine stetig zunehmende Relevanz effektiver Trainingsmethoden als Präventions- und Therapiestrategie. Da sowohl aktive als auch passive Trainingsmethoden vasoprotektive Effekte zeigen, sind messbare Parameter notwendig, um die Effektivität beider Trainingsmethoden objektiv miteinander vergleichen zu können.

Die Mehrzahl der vorliegenden Studien konzentriert sich zudem auf den Langzeiteffekt von Training. Der Akuteffekt von passivem und aktivem Gefäßsport auf die Expression ausgewählter Arteriogenese- und Arteriosklerose-relevanter Moleküle in mononukleären

Einleitung

Zellen des peripheren Blutes wurde bisher jedoch noch nicht beschrieben und liegt dementsprechend im Fokus dieser Arbeit. In vorherigen Studien zeigten zudem gezielte Untersuchungen der frühen Phase der Arteriogenese interessante Expressionsmuster des KKS, welche für die Initiierung des vaskulären Remodellings bedeutsam erscheinen. Es soll daher die akute Wirkung beider Gefäßsporttypen in Bezug auf das Expressionsmuster mononukleärer Zellen miteinander verglichen werden. Wegen der Bedeutung des KKS sowie der durch MCP-1 und CCR2 induzierten Signalkaskaden für die flussinduzierte Arteriogenese sollen die Expressionsmuster dieser Moleküle als mögliche Effektivitätsparameter des Gefäßsports charakterisiert werden. Die Hypothese lautet, dass ein erfolgreiches Training die Arteriogenese induziert und sich dies über die Expressionsmuster der relevanten Schlüssel-moleküle in den zirkulierenden Effektorzellen abbilden lässt.

2.8.2.1 Ausgewählte Moleküle des Kallikrein-Kinin-Systems

Sowohl die Aktivierung von B2R-, als auch von B1R-Rezeptoren bewirkt die Proliferation von Endothelzellen und eine starke Induktion der Angiogenese^{53,54}. Darüber hinaus konnten Hillmeister *et al.* nachweisen, dass auch die Arteriogenese durch eine Aktivierung von B2R und B1R reguliert wird. Es zeigte sich, dass man die Arteriogenese insbesondere durch eine Stimulation des B1R therapeutisch signifikant induzieren kann. Bei Untersuchungen an der Maus wurde deutlich, dass es B1R exprimierende zirkulierende Leukozyten sind, die einen essentiellen Anteil bei der Steuerung der Arteriogenese einnehmen⁵⁵. Dieser Befund macht erneut deutlich, wie wichtig die Expression relevanter molekularer Parameter auf zirkulierenden Leukozyten für den Ablauf vaskulärer Umbauprozesse ist. Auch für die dem Bradykinin vorgeschalteten Moleküle konnte eine Relevanz für das Gefäßwachstum nachgewiesen werden. Die Infusion von Gewebekallikrein, Bradykinin oder Des-Arg-Bradykinin in Ratten führte nach Ischämie beispielsweise zu einer deutlich gesteigerten Revaskularisierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe⁵⁶. Bei Kallikrein-1-knock-out-Mäusen konnte außerdem eine stark verzögerte hämodynamische Regeneration nach Extremitäten-Ischämie nachgewiesen werden⁵⁷. Weiterhin scheint die Expression von Kininogen direkt mit Veränderungen des Blutflusses²⁶ sowie mit Gefäß-modellierenden Prozessen zu korrelieren³⁸ und wurden demzufolge als Marker für Umpauprozesse identifiziert.

Einleitung

Diese vielfältigen Einflüsse des KKS auf die Arteriogenese implizieren die Untersuchung seiner Kernmoleküle (B1R- / B2R-Rezeptor, Kininogen 1, Kallikrein 1) auf ihre Eignung als Effektivitätsindikatoren für den Gefäßsport.

2.8.2.2 Ausgewählte Moleküle der MCP-1 / CCR-2-Signalkaskade

Transmigration von Monozyten spielt eine entscheidende Rolle für Gefäß-modellierende Prozessen. Im Kontext der Arteriosklerose^{59,60} und Arteriogenese^{45,56} belegen verschiedene Tiermodelle die Relevanz von MCP-1 und CCR2 für Prozesse der Monozytenbiologie.

MCP-1 wird Schubspannungs-abhängig von Endothelzellen exprimiert und sezerniert und scheint bei beiden Prozessen eine begünstigende Rolle zu spielen²³. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die Infusion von MCP-1, aufgrund der dadurch stimulierten Rekrutierung von Monozyten aus dem peripheren Blut, einen starken pro-angiogenen Effekt erzielte. Dementsprechend weisen MCP-1-knock-out Mäuse eine verminderte Kollateralisierung auf^{61,62}. In Wildtyp-Mäusen konnte außerdem eine direkte Abhängigkeit der Monozyten-Migration in ein ischämisches Areal von der MCP-1-Konzentration belegt werden, während in CCR2-knock-out-Mäusen die Migrationsrate annähernd konstant blieb⁵⁰.

Aufgrund der oben beschriebenen Relevanz der MCP-1/CCR2-Signaltransduktion für die Arteriogenese und Arteriosklerose wurden in dieser Arbeit die Expression beider Moleküle in PBMCs hinsichtlich ihrer Eignung als Effektivitätsparameter des Gefäßsports untersucht.

3 Darlegung der Methoden

3.1 Materialien

Tabelle 1: Tabellarische Auflistung der verwendeten Materialien.

Material	Hersteller	Land	Artikelnummer
Medien und Agenzien			
Roswell Park Memorial Institute Medium	Miltenyi Biotec	Deutschland	130-091-439
Glutamin	Life technologies	USA	25030-024
Penicillin / Streptomycin	Life technologies	USA	15140-122
Fetales Kalbsserum	Sigma-Aldrich	USA	F0804
Phosphate Buffered Saline, Mg ²⁺ - / Ca ²⁺ -frei	Gibco	USA	14190-169
G-CSF	Sygnis Bioscience	Deutschland / Spanien	
IL-1 β	Miltenyi Biotec	Deutschland	130-093-895
Lys-(Des-Arg)-Bradykinin R715	Sigma-Aldrich	USA	R9032
LPS	Sigma-Aldrich	USA	L2654-1MG
99,8 % Ethanol, (vergällt), ca. 1 % Methylethylenketon	Roth	Deutschland	K928.4
SYBR-Green PCR Mastermix	Applied Biosystems	USA	4309155
Kits			
Quick-RNA MicroPrep Kit	Zymo Research	USA	R1050 & R1051
Quick-RNA MiniPrep Kit	Zymo Research	USA	R1055
High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kit	Applied Biosystems	USA	4368814
Verbrauchsmaterial			
6-Well-Platten	greiner bio-one	Österreich	657185
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems	USA	4306737
Zellkultur-Flaschen	Thermo Scientific (Nunc)	USA	156499

Darlegung der Methoden

PCR-Single-Cap 8er Soft-Strips	Biozym	Deutschland	710970
optisch klare Klebefolie	Applied Biosystems	USA	4311971
Serological pipets (5ml, steril)	Corning	USA	357543
Serological pipets (25ml, steril)	Corning	USA	357525
Serological pipets (10ml, steril)	Fisher Scientific	USA	13-676-10J
Serological pipets (25ml, steril)	Fisher Scientific	USA	13-676-10K
15 ml Falcon Tubes	Corning	USA	302096
50 ml Falcon Tubes	Corning	USA	352070
1,5 ml Safe-Lock-Tubes, clear, PCR clean	Eppendorf	Deutschland	0030123328
1,5 ml Safe-Lock-Tubes, Eppendorf Quality, grün	Eppendorf	Deutschland	0030120183
2 ml Safe-Lock-Tubes, clear, PCR clean	Eppendorf	Deutschland	0030123344
TipOne 10/20 µl XI, graduated Filter Tip (steril)	StarLab	Deutschland	S1120-3810
TipOne 100 µl Ultra Point, graduated Filter Tip (steril)	StarLab	Deutschland	S1123-1840
TipOne 1000 µl Filter Tip (steril)	StarLab	Deutschland	S1126-7810
TipOne 200 µl graduated Filter Tip (steril)	StarLab	Deutschland	S1120-8810
7 ml Pasteur Pipetten (Gradierung bis 3 ml), einzeln steril verpackt	VWR International	USA	612-1747
Geräte und Software			
5417R (Zentrifuge)	Eppendorf	Deutschland	
5810R (Zentrifuge)	Eppendorf	Deutschland	
Universal 32R (Zentrifuge)	Hettrich	Deutschland	
Universal 320R (Zentrifuge)	Hettrich	Deutschland	
Mini-Zentrifuge „Sprout“	Biozym	Deutschland	552023
qRT-PCR-Thermocycler Mx3000P	Stratagene	USA	
PTC-200 Thermal Cycler	MJ Research	USA	
Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer	peqlab	Deutschland	

Darlegung der Methoden

Cardi Assist External Counterpulsation System	Cardiomedics	USA	4500GS
External Counterpulsation System with SpO ₂ detecting,)	PSK Health Sci-Tech Development	China	PSK-11010
Pipetus-akku	Hirschmann Laborge-räte	Deutschland	
ND-1000 V3.5.2 Software	peqlab	Deutschland	
MxPro qPCR Software	Agilent Technologies	USA	
IBM SPSS Statistics v. 18 / 22	IBM	USA	

Alle verwendeten Materialien sind, sofern möglich, mit Hersteller, Land des Hauptsitzes des Herstellers und Artikelnummer angegeben.

3.2 Etablierung eines *in vitro* Zell-Stimulationsmodells

Es wurde ein *in vitro* Zell-Stimulationsmodell entwickelt, um die in der Literatur beschriebenen Parameter zu validieren und weitere kontextabhängige Parameter zu bestätigen. Dabei wurden ausschließlich Zellen der humanen Monozyten-Leukämie-Zelllinie THP-1 (erhalten aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) verwendet. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Arbeitsbedingungen durchgeführt.

3.2.1 Herstellung der Medien

Zur Herstellung des Cell Recovery Mediums, bestehend aus 0,8 Volumeneinheiten Roswell Park Memorial Institute Medium mit stabilem Glutamin (RPMI), 0,01 Volumeneinheiten Glutamin, 0,01 Volumeneinheiten Penicillin / Streptomycin und 0,2 Volumeneinheiten Fetales Kalbsserum (FBS), wurden alle Bestandteile zunächst, falls nötig, aufgetaut und anschließend unter sterilen Arbeitsbedingungen sorgfältig vermengt. Zur Herstellung des Kultur-Mediums wurden 450 ml RPMI Medium mit 4,5 ml Glutamin, 4,5 ml Penicillin / Streptomycin und 50 ml FBS unter sterilen Bedingungen zusammengegeben. Alle Medien wurden bei 4 °C gelagert und vor der Benutzung auf 37 °C vorgewärmt.

3.2.2 Vorbereitende Zellkulturarbeiten

Die bei -80 °C gelagerten THP-1 Zellen wurden innerhalb von etwa 2 min bei 37 °C aufgetaut. Kurz vor der vollständigen Lösung des Eises wurde das Zellgefäß äußerlich mit 70 % Ethanol gereinigt. Anschließend wurden die Zellen in ein steriles 15 ml Falcon Tube überführt. Dann wurden langsam 4 ml des Recovery Mediums hinzugefügt. Nach der Zellzählung wurde die Lösung bei 100facher Erdanziehungskraft (g) für 4 min bei 37 °C zentrifugiert (Universal 32R, Hettrich, Deutschland), der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 10 ml Recovery Medium resuspendiert. Die Zellsuspension mit einer ungefähren Zellzahl von 5×10^5 Zellen /ml wurde in eine Zellkultur-Flasche überführt und in horizontaler Position bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden täglich hinsichtlich ihrer Konzentration und Morphologie kontrolliert. Das Kultur-Medium wurde alle 48 Stunden gewechselt. Hierzu wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Das für eine Zielkonzentration von ca. 5×10^5 Zellen /ml benötigte Volumen wurde in ein 15 ml Falcon Tube überführt und bei 100 g für 5 Minuten (min) bei 37 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in 10 ml Kultur-Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine Zellkultur-Flasche überführt und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.2.3 THP-1 Zell-Stimulation

Für die Stimulationsversuche wurden THP-1 Zellen der 7., 10., 14. und 24. Passage verwendet. Da verschiedene Transduktionswege induziert werden sollen, wurden folgende Agenzien als Stimulanz verwendet: Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) 50 ng/ml und 100 ng/ml, Interleukin-1 β (IL-1 β) 10 ng/ml, Lys-(Des-Arg)-Bradykinin 10 ng/ml und bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) 100 ng/ml. Zur Stimulation der THP-1 Zellen wurden nach Medienwechsel (siehe **3.2.2**) je 2 ml der Zellsuspension in einer Konzentration von 500.000 Zellen /ml in je ein Well einer 6-Well-Platte gegeben. Anschließend wurde die Platte wie in **Abbildung 5** gezeigt beimpft.

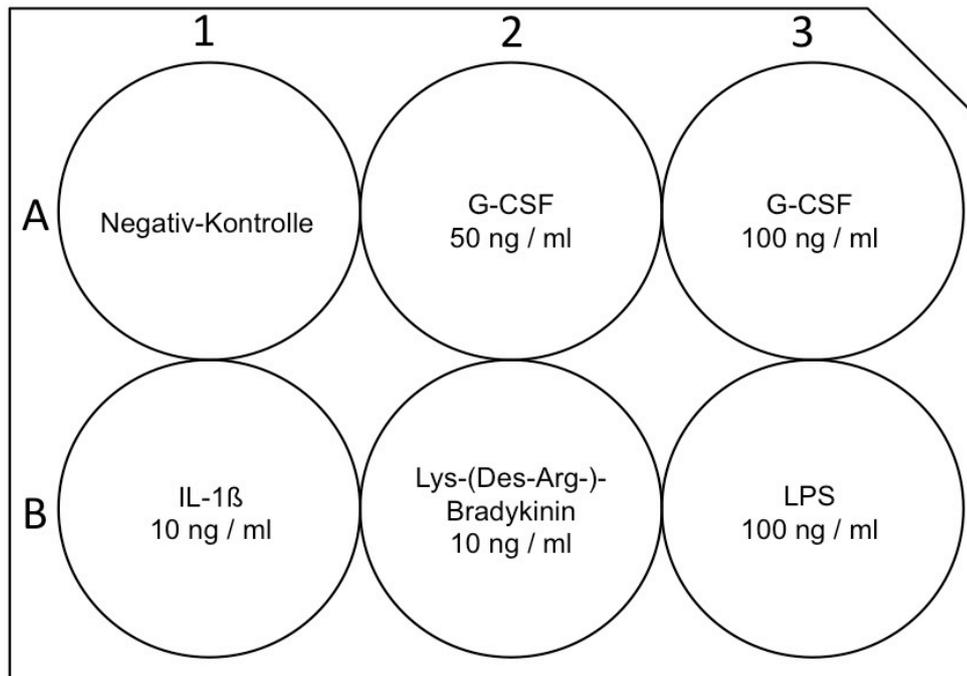


Abbildung 5: Darstellung der Beimpfung einer 6-Well-Platte gemäß des THP-1-Zell-Stimulationsansatzes.

Die Zellen wurden direkt nach der Zugabe der Agenzien 60 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden sie 5 min bei 100 g zentrifugiert (Universal 32R, Hettich, Deutschland), der Überstand dekantiert und das Zellpellet zur RNA-Isolation weiterverwendet (siehe 3.3.3.1).

3.3 Verarbeitung von Primärproben

Alle Methoden wurden zunächst an der Zelllinie THP-1 etabliert und anschließend auf PBMCs übertragen.

3.3.1 Isolation von PBMCs aus Vollblut

Die Isolation der PBMCs aus Vollblut wurde mittels Ficoll-Paque-PLUS-Dichtegradienten-Zentrifugation umgesetzt. Das frisch entnommene, mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (siehe 3.4.4) antikoagulierte Vollblut wurde in einem 50 ml Falcon Tube im Verhältnis 1:3 mit Magnesium und Kalzium-freiem Phosphate Buffered Saline (PBS) verdünnt. Anschließend wurde das verdünnte Vollblut im Verhältnis 4:3 langsam seitlich auf das etwa 20 °C warme Ficoll-Paque PLUS aufgetragen. Eine Vermischung der beiden Phasen war unbedingt zu vermeiden. Die Probe wurde dann über 35 min bei 400 g (Universal 320R, Hettich, Deutschland) ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert, wodurch sich die in **Abbildung 6** gezeigte Schichtung ergab. Die PBMC-Fraktion wurde mit einer sterilen Pasteur-Pipette vollständig abgenommen

Darlegung der Methoden

und mit 40 ml PBS bei 200 g und 4 °C für 10 min gewaschen (Universal 32R, Hettrich, Deutschland). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 6 ml PBS gelöst. Zur Zählung der Zellen wurden 20 µl der Lösung mit 20 µl Trypanblau vermischt und anschließend auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Das Trypanblau erlaubt die Identifizierung avitaler Zellen, die die Zellzählung verfälschen würden. Nach dem Zählen der Zellen wurde die Zelllösung aliquotiert und bei 200 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert (Universal 32R, Hettrich, Deutschland). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet auf Trockeneis schockgefroren. Die so konservierten Zellen wurden anonymisiert beschriftet und bei -80 °C gelagert. Die dann auf Trockeneis ins Center for Cardiovascular Research verbrachten Proben wurden anschließend wie in **3.3.3.2ff** beschrieben weiterverarbeitet.

3.3.2 Primerdesign

Die Auswahl der in dieser Arbeit verwendeten Arteriogenese-Biomarker erfolgte auf der Grundlage von Recherchen in entsprechenden Fachartikeln. Für die Expressionsanalysen wurden Primer für folgende Gene entworfen:

Bradykinin-Rezeptor 1 (B1R)

Forward 5'-ATTCTCCCACCTCAGCCTCT-3'

Reverse 5'-CTCTGGTTGGAGGATTGGAG-3'

Bradykinin-Rezeptor 2 (B2R)

Forward 5'-CTTCATGGCCTACAGCAACA-3'

Reverse 5'-GCACACTCCCTGGTACACCT-3'

Kallikrein 1

Forward 5'-GCCAAGCAGACGAGGACTAC-3'

Reverse 5'-AACTCCACGACCTTCACAGC-3'

Kininogen 1

Forward 5'-GTGGTGGCTGGATTGAACTT-3'

Reverse 5'-CACCATTCCAAAGGGACTTG-3'

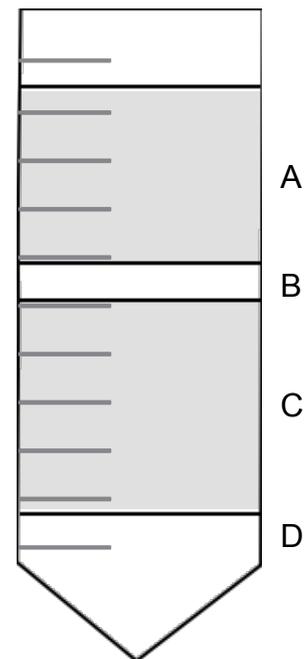


Abbildung 6: Schichtung nach Zentrifugation von verdünntem Vollblut mit Ficoll-Paque PLUS. A) Blutplasma- und PBS-Fraktion B) PBMC-Fraktion C) Ficoll-Paque PLUS-Fraktion D) Erythrozyten-, Granulozyten- und Thrombozyten-Fraktion

Darlegung der Methoden

Monozyten-chemotaktische Protein 1 (MCP-1)

Forward 5'-AGCAAGTGTCCTCCAAAGAAGC-3'

Reverse 5'-TGGAATCCTGAACCCACTTC-3'

C-C-Chemokine-Rezeptor Typ 2 (CCR2)

Forward 5'-GACAAGCCACAAGCTGAACA-3'

Reverse 5'-AAACCGAGAACGAGATGTGG-3'

18S-RNA

Forward 5'-CCGCAGCTAGGAATAATGGAATA-3'

Reverse 5'-TCTAGCGGCGCAATACGAAT-3'

RPLP0

Forward 5'-ACGGGTACAAACGAGTCCTG-3'

Reverse 5'-AGCCACAAAGGCAGATGGAT-3'

Zur Quantifizierung der zellulären RNA-Expression wurden des Weiteren Primer gegen die konstitutiv exprimierten Housekeeping-Gene 18S-RNA und Acidic ribosomal phosphoprotein P0 (RPLP0) entworfen.

Zum Design der oben aufgelisteten Primer wurden die oben genannten Zielgene über die Online-Genom-Datenbank Ensembl.org^{63,64} identifiziert. Diese Datenbank erlaubt einen gezielten Zugriff auf die relevanten Gene des entschlüsselten humanen Genoms und liefert so die komplementäre DNA (cDNA)-Sequenz der Gene für das anschließende Primerdesign. Nach der Auswahl eines Gens und des gewünschten cDNA-Transkripts wurden der transkribierende und nicht-transkribierende Bereich sowie die alternierenden Exons des gesuchten Gens angezeigt. Der gezeigte Abschnitt der cDNA konnte nun im Online-basierten Programm Primer3^{65,66} des Howard Hughes Medical Institute / Whitehead Institute eingefügt werden. Nach Einstellung einer gewünschten Primerlänge von 20 Basenpaaren und einer gewünschten Produktlänge von 90-110 Basenpaaren generierte das Programm passende Primer für die ausgewählte DNA-Sequenz. Diese Primer wurden nun auf unterschiedliche Kriterien hin überprüft. Es war darauf zu achten, dass das Produkt exonüberspannend positioniert ist, damit in späteren Analysen keine genomische, sondern ausschließlich die durch reverse Transkription gewonnene cDNA amplifiziert würde. Um Zusammenlagerungen und damit Funktions-

Darlegung der Methoden

einbußen der Primer zu verhindern, sollte der Guanin/Cytosin-Gehalt außerdem 62 % nicht übersteigen.

Die ausgewählten Primersequenzen wurden als individualisierte Primer von Life Technologies angefertigt. Die gelieferten Primer wurden in RNase/DNase-freiem Wasser gelöst. Die so hergestellten Lösungen hatten eine Konzentration von 100 µM (Vorratslösung) beziehungsweise 10 µM (Arbeitslösung).

Die Primereffektivität wurde mittels einer cDNA-Verdünnungsreihe in der quantitativen RealTime-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) getestet. Hierbei wurden cDNA-Verdünnungen von 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 sowie 1:640 mit DNase/RNase-freiem Wasser verwendet. Die Primerqualität wurde anhand des Vergleichs der Amplifikation der verschiedenen Verdünnungen beurteilt. Hierbei sollten die Verdünnungen eines idealen Primers in der Analyse jeweils exakt einen Ct-Wert auseinander liegen.

3.3.3 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde abhängig vom Zelltyp mit Hilfe zweier verschiedener Kits realisiert.

3.3.3.1 RNA-Isolation aus THP-1-Zellen

Zur RNA-Isolation aus THP-1 Zellen wurde das Quick-RNA MicroPrep Kit (Zymo Research, USA) nach Angaben des Herstellers wie folgt verwendet. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis oder in einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge (5417R Eppendorf Zentrifuge, Eppendorf, Deutschland) durchgeführt. Die durch Zentrifugation pelletierten Zellen wurden vollständig vom Überstand befreit und in 300 µl RNA Lysis-Puffer resuspendiert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation bei 12.000 g und anschließende Überführung in ein RNase-freies 2ml-Eppendorf-Gefäß von Zellfragmenten gereinigt. Dem Lysat wurden dann 300 µl 99,8 % Ethanol hinzugefügt. Das Gemisch wurde in eine ZymoSpin IC Säule überführt, die wiederum in einem Sammelröhrchen platziert wurde. Die Säule wurde bei 12.000 g für 30 sek zentrifugiert, wodurch die RNA in dem in der Säule befindlichen Filter zurückgehalten wurde. Es folgten ein Aufreinigungsschritt sowie zwei Waschschriffe, jeweils getrennt durch Zentrifugation bei 12.000 g über eine Dauer von 30 sek bis 2 min. Hiernach wurde die Säule in einem neuen RNase-freien

Darlegung der Methoden

Eppendorf-Gefäß platziert, 10 µl DNase-/RNase-freies Wasser direkt auf den Filter gegeben und die Säule in dem Gefäß bei 18.000 g für 30 sek zentrifugiert. Die im Wasser gelöste RNA befand sich nach der Zentrifugation im Eppendorf-Gefäß und konnte nun nach einer Konzentrationsbestimmung eingefroren oder direkt zur Präparation der cDNA verwendet werden.

3.3.3.2 RNA-Isolation aus isolierten PBMCs

Die Isolation von RNA aus PBMCs (Isolation aus Vollblut siehe **3.3.1**) wurde mittels des Quick-RNA MiniPrep Kits (Zymo Research, USA, Art.Nr. R1055) realisiert. Alle Schritte wurden auf Eis oder in einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge durchgeführt. Wie vom Hersteller empfohlen wurden die pelletierten Zellen je nach Zellzahl in 300 µl oder 600 µl RNA Lysis Puffer gelöst, wobei das größere Volumen einer Zellzahl von über 5×10^6 Zellen vorbehalten ist. Das Lysat wurde nach gründlichem Durchmischen bei 12.000 g zentrifugiert und der Überstand auf einen Spin-Away Filter überführt, der sich in einem Sammel-Tube befand. Eine anschließende Zentrifugation für 30 sek bei 12.000 g befreite das Lysat von der Mehrheit der genomischen DNA. Die aufgereinigte Probe wurde mit 300 µl oder 600 µl 99,8 % Ethanol (im Verhältnis 1:1 mit dem Lysispuffer) versetzt, gut durchmischt und in eine Zymo-Spin IIICG Säule in einem Sammel-Tube überführt; anschließend wurde die Probe für weitere 30 sek bei 12.000 g zentrifugiert. Die nun im Filter befindliche RNA wurde durch mehrere Waschschriffe aufgereinigt und mit 30 µl DNase/RNase-freiem Wasser bei 16.000 g für 1 min in ein RNase-freies Tube eluiert. Folglich wurde die Konzentration der auf diese Weise isolierten RNA mit Hilfe eines Spektralphotometers (Nanodrop ND-1000, peqlab, Deutschland) bestimmt. Anschließend wurde die RNA in cDNA umgeschrieben.

3.3.4 cDNA-Herstellung

Die cDNA-Synthese erfolgte mithilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kits (Applied Biosystems, USA). Hierzu wurden 500 µg RNA mit UltraPure DNase-/RNase-Free distilled water auf 13,95 µl verdünnt. Diese Verdünnung wurde um 2 µl 10x RT Buffer, 2 µl RT Random Primers, 0,8 µl dNTP Mix 100mM, 1 µl MultiScribe RTase (50 U/µl) und 0,25 µl RNase Inhibitor (RNasin, 40 U/µl) auf 20 µl Gesamtvolumen ergänzt. Die fertige Lösung wurde gut vermengt und anschließend kurz zentrifugiert (Sprout Minizentrifuge, Biozym, USA), um den Inhalt am Boden des PCR-Single-Cap-Tubes zu sammeln. Im PTC-200 Thermal Cycler wurde das Tube zunächst 10 min

Darlegung der Methoden

bei 25 °C, anschließend 120 min bei 37 °C und anschließend 15 min bei 70 °C inkubiert. Die fertige cDNA wurde entnommen und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.3.5 Semi-quantitative Real-Time-Polymerase Kettenreaktion

Die semi-quantitative Real-Time-Polymerase Kettenreaktion ist eine Methode zur Echtzeit-Quantifizierung von Konzentrationsänderungen von Nukleinsäuren. Mit von Hilfe verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen erlaubt sie die Echtzeit-Messung der Produktmenge, da diese sich proportional zur Zunahme der Fluoreszenz verhält. Der Cycle Threshold-Wert bestimmt den Zeitpunkt, an dem die Fluoreszenz vom Hintergrundrauschen abgrenzbar wird.

Hierzu wurden in jedes Well einer MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate je 5 µl verdünnte cDNA (RNase/DNase freies Wasser, 1:100) sowie 15 µl SYBR-Green PCR Mastermix, 3,4 µl RNase/DNase freies Wasser und je 3,3 µl 10 µM Primer gegeben. In dieser Arbeit wurden die Primer für die in **3.3.2** beschriebenen Gene verwendet. Die fertige Platte wurde mittels einer optisch klaren Klebefolie versiegelt und bei späterer Verwendung bei -20 °C gelagert. Zur Analyse wurde die 96-Well-Platte nach einem Zentrifugationsschritt (5810R Eppendorf Zentrifuge, Eppendorf, Deutschland) 1 min bei 2000 Runden / min und 4 °C) in einen qRT-PCR-Thermocycler (PTC-200 Thermal Cycler, MJ Research, USA) überführt. Im angeschlossenen Computerprogramm MxPro wurde das Gerät ausgewählt, anschließend die Plattenbelegung eingegeben und das Thermalprofil festgelegt. Zu Beginn wurde die 96-Well-Platte über 10 Minuten und 15 sek bei 95 °C inkubiert. Hierbei denaturierte die cDNA, die komplementären Stränge trennten sich. Anschließend lagerten sich bei 60 °C die Primer über 15 sek an die getrennten cDNA-Stränge an. Der nun folgende Elongationsschritt erfolgte über 30 sek bei 72 °C. Die Schritte Denaturierung (15 sek bei 95 °C) Primeranlagerung (15 sek bei 60 °C) und Elongation (30 sek bei 72 °C) wurden in insgesamt 40 Zyklen wiederholt, um durch die stetige Fluoreszenzzunahme die DNA-Quantifizierung vornehmen zu können. Abschließend wurden die Proben über 1 Minute bei 50 °C, dann 15 sek bei 95 °C, 20 sek bei 60 °C und final 30 sek bei 95 °C inkubiert.

Der im SYBR-Green enthaltene Cyanin-Farbstoff interkaliert in doppelsträngiger DNA. Der entstandene Fluoreszenzfarbstoff emittiert grünes Licht bei einer maximalen Wellenlänge (λ_{\max}) von $\lambda_{\max} = 521 \text{ nm}$ und erlaubt so nach jedem Zyklus eine Analyse der bereits amplifizierten DNA. Mit Hilfe einer Dissoziationskurve war es möglich, die Quali-

Darlegung der Methoden

tät der amplifizierten DNA zu beurteilen. Insbesondere konnte so die Entstehung mehrerer Indukte und / oder von Primerdimeren ausgeschlossen werden.

Die bei der semi-quantitativen Real-Time-Polymerase Kettenreaktion erhaltenen Ct-Werte wurden anschließend ausgewertet. Von der Norm abweichende Wells (Ct-Unterschied bei technischen Replikaten ≥ 2) wurden von der Berechnung ausgeschlossen. Die Berechnung erfolgte nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode. Hierbei wurde zunächst die Differenz aus Ziel-Gen und dem Housekeeping-Gen RPLPO gebildet. Anschließend wurden ΔCt (vor Training) von ΔCt (nach Training) subtrahiert. Der durch $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ erhaltene Relativwert stellt die n-fache Expression im Vergleich zum Ausgangswert und somit die Basis der statistischen Auswertung (siehe 3.5) dar.

3.4 Studie zum Vergleich von aktivem und passivem Gefäßsport

3.4.1 Voraussetzungen

Nach Zielsetzung und entsprechendem Studiendesign wurde der Ethikkommission der Charité ein Antrag auf Zulassung der Studie vorgelegt. Das positive Votum wurde am 15.08.2013 erteilt (Referenznummer: EA2/108/13). Die International Standard Randomised Controlled Trial Number (ISRCTN)-Registrierung erfolgte am 09.05.2014 (Referenznummer: ISRCTN88693704).

3.4.2 Probandenauswahl

Es wurde eine Studie mit $n = 26$ Probanden geplant, wobei die Probanden zwischen 18 und 35 Jahren (mittleres Alter $23,37 \pm 1,85$ Jahre) alte, gesunde Nichtraucher (mittlerer Body Mass Index $22,22 \pm 2,25$ kg/m²) ohne regelmäßige Einnahme von Medikamenten sein mussten. Für diese Studie wurden Männer und Frauen in gleicher Anzahl rekrutiert. Aufgrund der Schwierigkeit Frauen dieses Alters ohne orale Kontrazeption zu finden, wurde die Einnahme entsprechender Medikamente als Ausnahme zugelassen.

3.4.3 Versuchsanordnung

Die Probanden wurden für die Untersuchung und Therapie zu zwei Visiten in die Charité – Campus Virchow Klinikum einberufen. Zwischen den beiden Untersuchungstagen wurde ein Mindestabstand von sieben Tagen eingehalten, um eine Beeinflussung der Ergebnisse des zweiten Termins durch die Therapie am ersten Termin auszuschließen. Die Probanden wurden in zwei Gruppen à 13 Probanden aufgeteilt. Die erste Gruppe

Darlegung der Methoden

erhielt am ersten Termin ein passives Trainingsprogramm (ECP), am zweiten Termin ein aktives Trainingsprogramm.

Bei der zweiten Gruppe wurden die Trainingsprogramme in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt, um einen möglichen Bias zu minimieren (**Abbildung 7**).

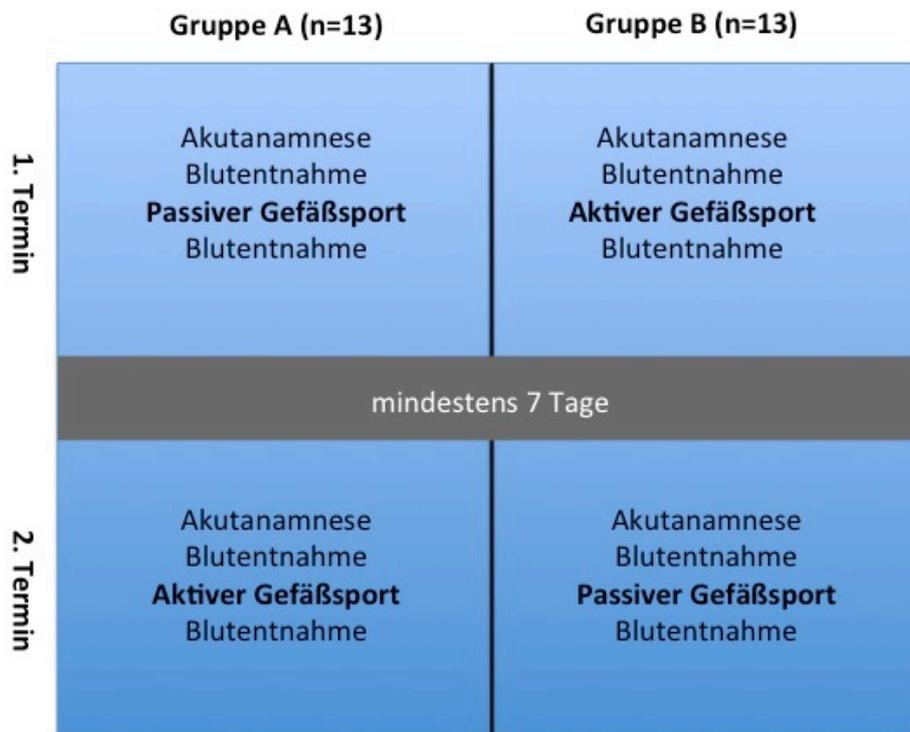


Abbildung 7: Darstellung der Versuchsanordnung nach dem Cross-Over-Prinzip.

Als aktiver Gefäßsport wurde ein 30minütiges Laufbandtraining mit einer Ziel-Herzfrequenz von 130 Schlägen / min angewandt (Geschwindigkeit und Steigung frequenzadaptiert). Als passiver Gefäßsport wurde ein ECP-Training mit 200 mmHg Manschettendruck über 40 min angewandt. Der Manschettendruck wurde kontinuierlich in 40 mmHg-Schritten über jeweils ca. 2 min auf den Zieldruck erhöht. Die Gesamtdauer der Therapie betrug 50 min. Zu Beginn beider Trainings wurde eine körperliche Untersuchung und eine Akutanamnese durchgeführt. Jeweils vor und nach dem Training wurde ca. 30 ml Blut für die experimentellen Analysen entnommen. Aus dem entnommenen Blut wurden unmittelbar nach der Entnahme mittels Ficoll-Paque Dichtegradienten-Zentrifugation die PBMCs isoliert, aliquotiert und auf Trockeneis schockgefroren. Die Lagerung bis zur Expressionsanalyse erfolgte bei -80 °C (siehe **3.3.1**).

3.4.4 Blutentnahme

Die Blutentnahme aus einer peripheren Vene wurde durch erfahrene medizinische Mitarbeiter der beteiligten Institute durchgeführt. Es wurden alle hygienischen, arbeitsschutzrechtlichen sowie patientenschutzrechtlichen Grundlagen beachtet. Das Vollblut wurde in drei 10 ml -Vacutainern entnommen, durch die darin enthaltenen 18 mg EDTA antikoaguliert und sofort verwandt. Die erste Blutentnahme geschah initial nach der körperlichen Untersuchung, jedoch vor dem Gefäßsport. Die zweite Blutentnahme geschah 10 min nach Beendigung des Gefäßtrainings.

3.4.5 Versuchsablauf

Es wurden pro Tag maximal drei Probanden in die oben genannten Räumlichkeiten einbestellt. Nach initialer körperlicher Untersuchung und Blutentnahme begannen die Probanden ihr Gefäßtraining. Parallel wurden die bereits gewonnenen Proben sofort verarbeitet (siehe 3.3.1). Nach Beendigung des Gefäßsports wurden erneut die Vitalparameter erhoben und die zweite Blutentnahme durchgeführt (näheres siehe 3.4.4). Die in den Abschnitten 3.3.1 , 3.4.3 und 3.4.4 beschriebenen Arbeitsschritte wurden teilweise in Kooperation mit den Mitorganisatoren der hier beschriebenen Studie gemeinsam durchgeführt.

3.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms IBM SPSS Statistics (Versionen 18 und 22) von IBM sowie mit der statistischen Programmiersprache R⁶⁷ in Kooperation mit der HealthTwist GmbH. Um zufällige Fehler und Messungenauigkeiten während der qRT-PCR zu minimieren wurden jeweils drei technische Replikate angefertigt. Für alle oben genannten Gene wurde zunächst die Expression relativ zum Housekeeping-Gen (**siehe 3.3.5**) berechnet. Die erhaltenen relativen Expressionsdaten wurden mittels Kolmogorov-Smirnof-Test auf Normalverteilung getestet. Da eine rechtsschiefe Verteilung vorliegt, wurden sie vor dem Mittelwertsvergleich logarrhythmisch transformiert, um sie zu normalisieren. Für die statistische Auswertung bei der Expressionsanalyse der Probandenproben wurden Median und Quartile der untransformierten Werte angegeben. Bei den THP-1 Zell-Stimulationsversuchen mit wenigen Datenpunkten wurden Median und Extremwerte dargestellt. Die Analyse der Expression basiert auf den gegenüber dem unstimulierten Zustand standardisierten Werten (Fold-Change).

Darlegung der Methoden

Sie wurden pro Stimulation mittels Einstichproben-t-Tests gegen den unter der Nullhypothese zu erwarteten Wert 0 ($\log_{10}(1)$) getestet. Bei weniger als 3 verfügbaren Messwerten wurde kein Test durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde bei einem Wert $p \leq 0,05$ durch ein Sternchen (*) gekennzeichnet, p-Werte $\leq 0,1$ aber $\geq 0,05$ wurden durch eine Raute (#) gekennzeichnet. Die Richtlinien der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur guten wissenschaftlichen Arbeit wurden jederzeit eingehalten.

4 Ergebnisse

4.1 Übersicht

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war es, Arteriogenese-relevante molekulare Marker als Parameter zum Nachweis der pro-arteriogenen Wirkung von Gefäßsport zu evaluieren. Die Expressionsanalyse prä-selektierter Gene erfolgte durch semiquantitative qRT-PCR und wurde zunächst nach *in vitro* Stimulation von THP-1 Zellen mittels verschiedener Agentien durchgeführt.

Hieran schloss sich die systematische Untersuchung von Probandenproben an, wobei die Expression der Gene vor und nach passivem bzw. aktivem Gefäßsport analysiert wurde. Auf diese Weise wurde der Direktvergleich des Akuteffektes beider Trainingsmethoden ermöglicht.

Die nachfolgenden Tabellen stellen übersichtlich die Ergebnisse des THP-1 Zell-Stimulationsversuches (**Tabelle 2**), sowie der Gefäßsportstudie vor und nach aktivem und passivem Gefäßsport (**Tabelle 3**) dar. Nachfolgend sind die detaillierten Ergebnisse graphisch aufgetragen und näher beschrieben (**siehe 4.2 bis 4.4.2**).

Ergebnisse

Tabelle 2: Expressionsänderungen von THP-1 Zellen nach Stimulation.

Darstellung: (Median (Minimum/Maximum)). Die Signifikanzberechnung erfolgte gegen die unstimulierte Kontrolle

Messwert	G-CSF 50nM	p-Wert ≤	G-CSF 100nM	p-Wert ≤	IL-1β	p-Wert ≤	Lys-Bradykinin	p-Wert ≤	LPS	p-Wert ≤
Kallikrein	1.737 (1.576/2.526) *	0.046	1.730 (1.523/2.530) #	0.054	1.880 (1.119/2.020) n.s.	0.122	1.570 (0.900/1.700) n.s.	0.281	1.266 (0.870/1.700) n.s.	0.394
B1R	0.410 (0.410/0.410)		0.263 (0.027/0.500)		0.330 (0.330/0.330)		0.1747 (0.0394/0.3100)		0.1359 (0.0418/0.2300)	
B2R	1.63 (0.02/3.17) n.s.	0.717	1.334 (0.014/2.400) n.s.	0.570	1.394 (0.038/2.580) n.s.	0.670	0.780 (0.030/1.990) n.s.	0.430	1.235 (0.064/3.014) n.s.	0.737
MCP1	2.78 (0.26/6.25) n.s.	0.432	4.42 (0.39/3.1.34) n.s.	0.230	3.02 (0.61/5.57) n.s.	0.172	1.650 (0.262/2.120) n.s.	0.844	5.19 (2.50/7.91) **	0.007
CCR2	0.690 (0.290/1.740) n.s.	0.396	1.31 (0.25/3.34) n.s.	0.878	0.900 (0.360/1.110) n.s.	0.345	0.520 (0.410/0.840) *	0.030	0.815 (0.710/1.120) n.s.	0.223

Tabelle 3: Expressionsänderungen von zirkulierenden PBMCs nach passivem und aktivem Gefäßsport.

Darstellung: (Median (25%/75%)). Die Signifikanzberechnung erfolgte gegen die Kontrolle (vor Gefäßsport). VP: vor passivem Gefäßsport, NP: nach passivem Gefäßsport, VA: vor aktivem Gefäßsport, NA: nach aktivem Gefäßsport.

Messwert	NP	p-Wert ≤	NA	p-Wert ≤	n VP	n NP	n VA	n NA
Kallikrein	0.975 (0.139/1.647) n.s.	0.242	0.970 (0.357/2.967) n.s.	0.794	26	26	26	25
Kininogen	0.865 (0.125/1.803) n.s.	0.173	0.965 (0.149/2.622) n.s.	0.585	26	24	26	24
B1R	1.83 (0.92/3.38) *	0.035	0.750 (0.582/2.618) n.s.	0.601	26	15	26	14
B2R	0.680 (0.113/1.563) *	0.021	1.020 (0.223/3.137) n.s.	0.581	26	23	26	22
MCP1	0.740 (0.077/1.753) #	0.094	1.21 (0.35/4.38) n.s.	0.691	26	25	26	23
CCR2	0.910 (0.592/1.158) #	0.091	1.030 (0.848/1.372) n.s.	0.890	26	19	26	20

4.2 Expressionsänderungen durch THP-1-Zell-Stimulation

4.2.1 Kallikrein

Die Kallikrein-Expression in THP-1 Zellen wurde nach Stimulation mit G-CSF, IL-1 β , Lys-Bradykinin und LPS analysiert. Die Stimulation mit G-CSF erfolgte mit Konzentrationen von 50 ng/ml und 100 ng/ml, da in der Literatur unterschiedliche Angaben bezüglich der stimulatorischen Wirkung von G-CSF zu finden waren. Hierbei wurden alle Ct-Werte für Kallikrein gegen die des Housekeeping-Gens RPLPO relativiert. Unstimulierte THP-1 Zellen wurden als Kontrolle betrachtet, alle oben genannten Stimulationsansätze wurden relativ zur Kontrolle berechnet. Es zeigte sich bei 60 minütiger Stimulation von THP-1 Zellen mit 50 ng/ml G-CSF eine signifikante (Median 1,74, $p = 0,046$), mit 100 ng/ml G-CSF (Median 1,73, $p = 0,054$) eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Hochregulation der Kallikrein-Expression. Die Stimulation mit IL-1 β , Lys-Bradykinin und LPS hatte keinen messbaren Effekt auf die Kallikrein-Expression.

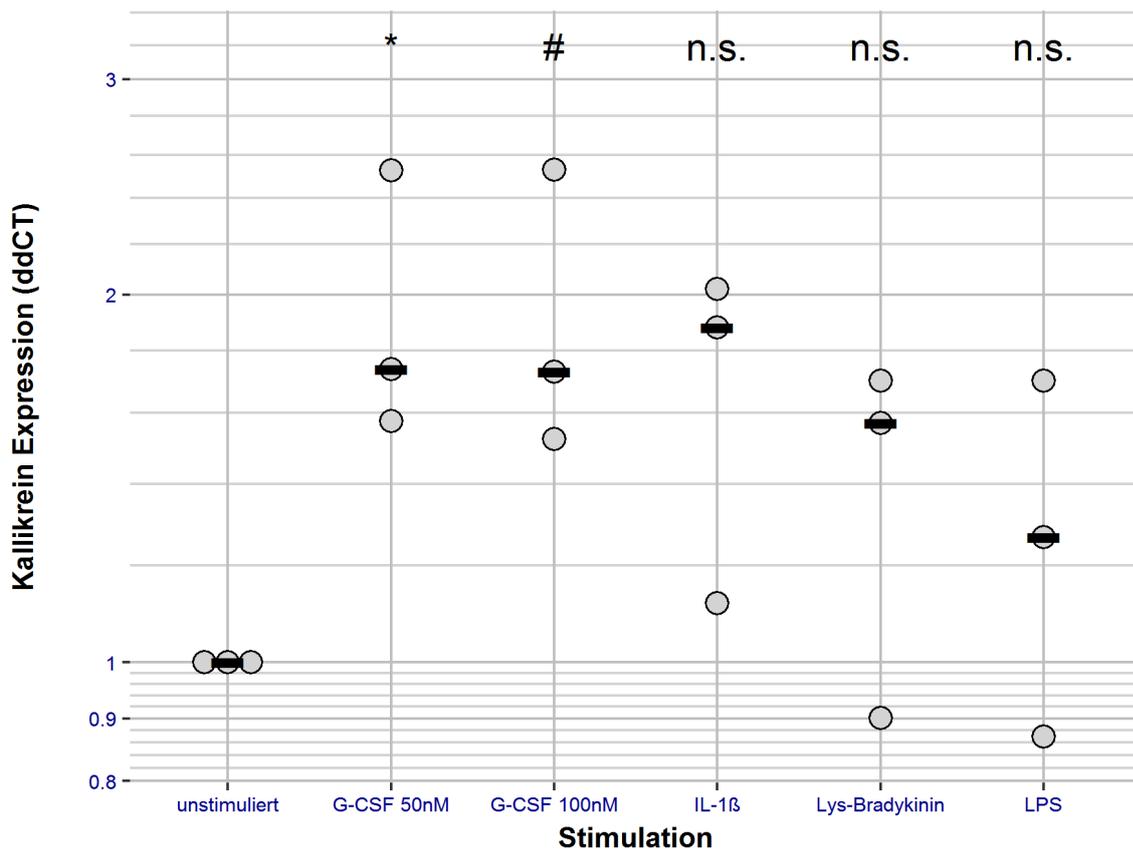


Abbildung 8: Darstellung der Kallikrein-Expressionsänderung von THP-1 Zellen nach Stimulation mittels verschiedener Agentien. Alle Werte sind als relative Expressionsänderung zum Housekeeping-Gen RPLPO dargestellt. Die Stimulation mit G-CSF bewirkte eine signifikante (50 ng/ml, $p = 0,046$) bzw. tendenzielle (100 ng/ml, $p = 0,054$) Hochregulation der Kallikrein-Expression. $n = 3$ biologische Replikate.

Ergebnisse

4.2.2 B1R

Viele Ansätze zur Detektion der B1R-Expression nach Stimulation von THP-1 Zellen fielen unterhalb der Nachweisgrenze. Es konnte dementsprechend keine valide Aussage über die stimulationsbedingte Expressionsänderung von B1R getätigt werden. Auffällig ist jedoch, dass sich bei detektierbaren biologischen Replikaten ($n = 2$ bei G-CSF 100 ng/ml, Lys-Bradykinin- und LPS-Stimulation, $n = 1$ bei G-CSF 50 ng/ml- und IL-1 β -Stimulation) eine Herunterregulation der B1R-Expression infolge aller Stimulationsbedingungen abzeichnet. Dies ist jedoch nur eine Tendenz und bedarf weiterer Untersuchungen.

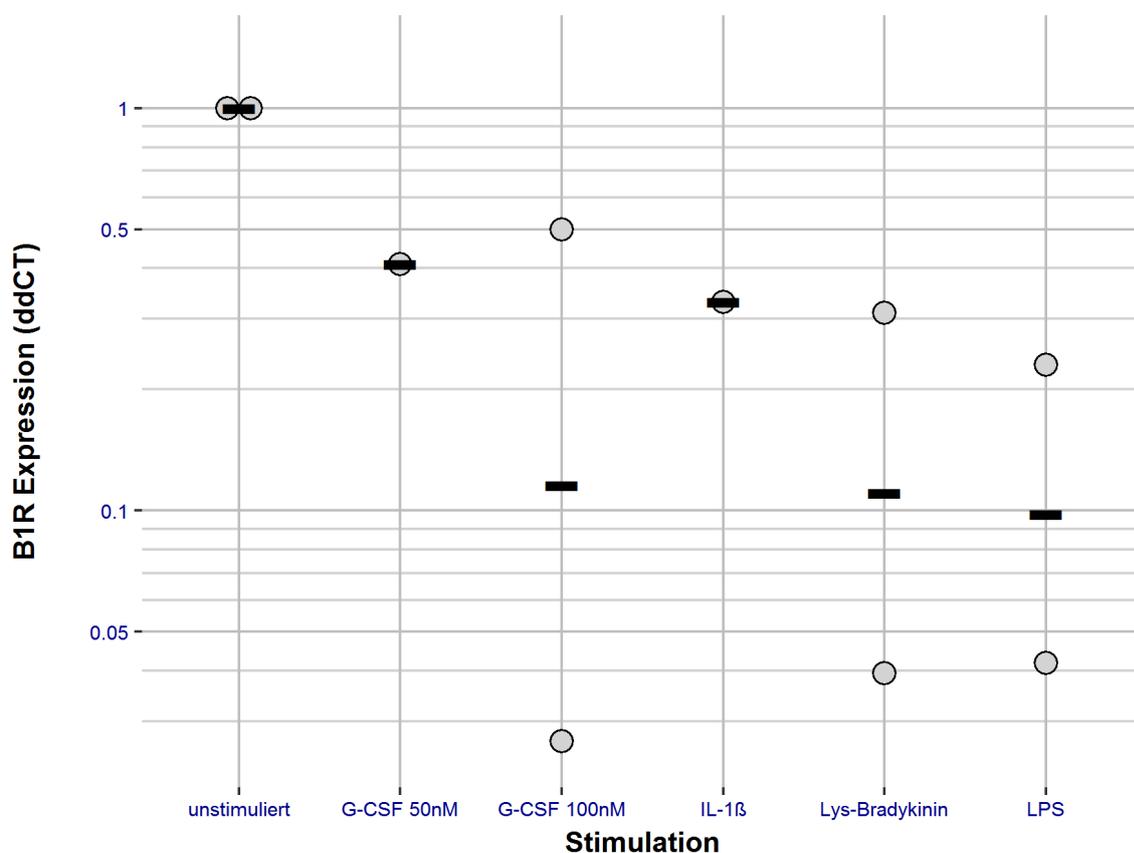


Abbildung 9: Darstellung der B1R-Expressionsänderung von THP-1 Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Agentien. Alle Werte sind als relative Expressionsänderung zum Housekeeping-Gen RPLPO dargestellt. $n = 2$ biologische Replikate (unstimuliert, G-CSF 100nM, Lys-Bradykinin, LPS) bzw. $n = 1$ (G-CSF 50nM, IL-1 β).

Ergebnisse

4.2.3 B2R

Die Expression des B2R in THP-1 Zellen nach der Stimulation durch G-CSF, IL-1 β , Lys-Bradykinin oder LPS unterlag generell einer großen Varianz. Es konnte keine signifikante Änderung des Expressionslevels von B2R relativ zur unstimulierten Kontrolle detektiert werden.

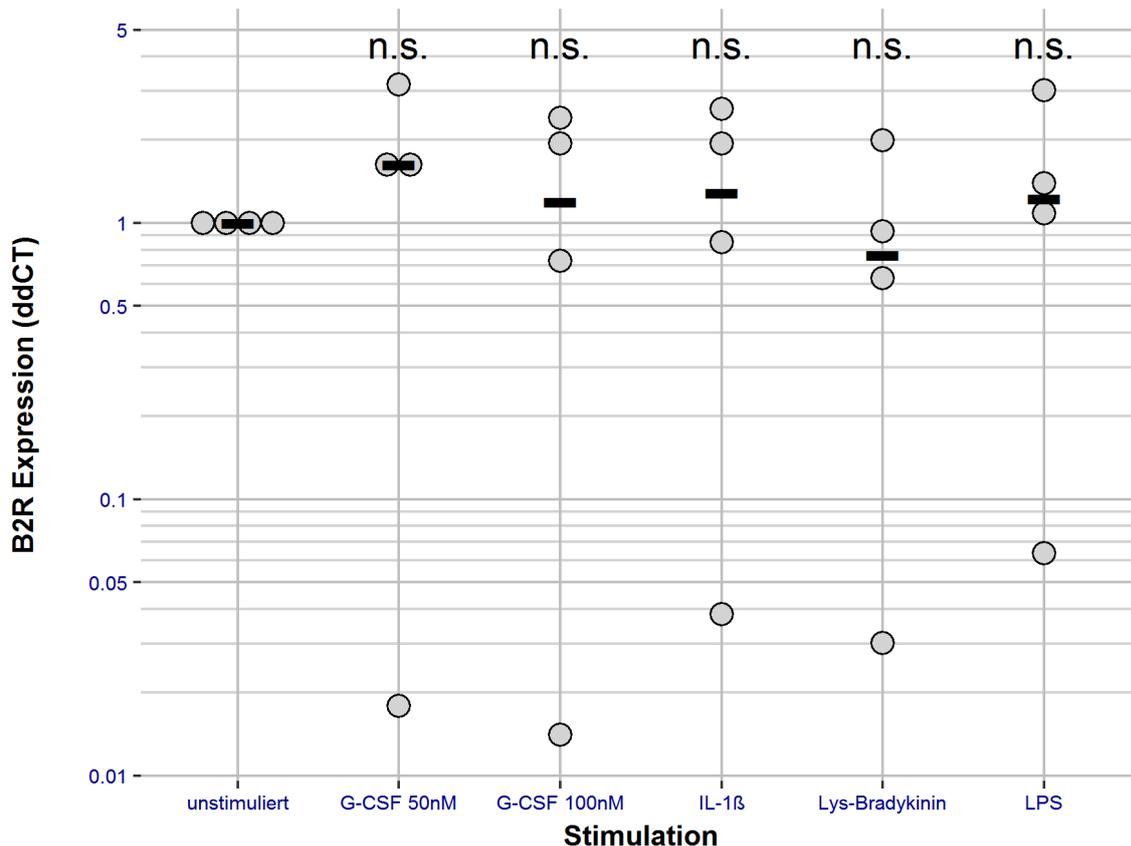


Abbildung 10: Darstellung der B2R-Expressionsänderung von THP-1 Zellen nach Stimulation mittels verschiedener Agentien. Alle Werte sind als relative Expressionsänderung zum Housekeeping-Gen RPLPO dargestellt. n = 4 biologische Replikate.

Ergebnisse

4.2.4 MCP-1

Bei der Analyse der MCP-1-Expression gegenüber der unstimulierten Kontrolle stellte sich eine hochsignifikant erhöhte Expression nach Stimulation mit LPS dar (Median 5,19, $p = 0,007$). Die Stimulation der Zellen mit G-CSF, IL-1 β oder Lys-Bradykinin führte zu keiner signifikanten Änderung der Expression.

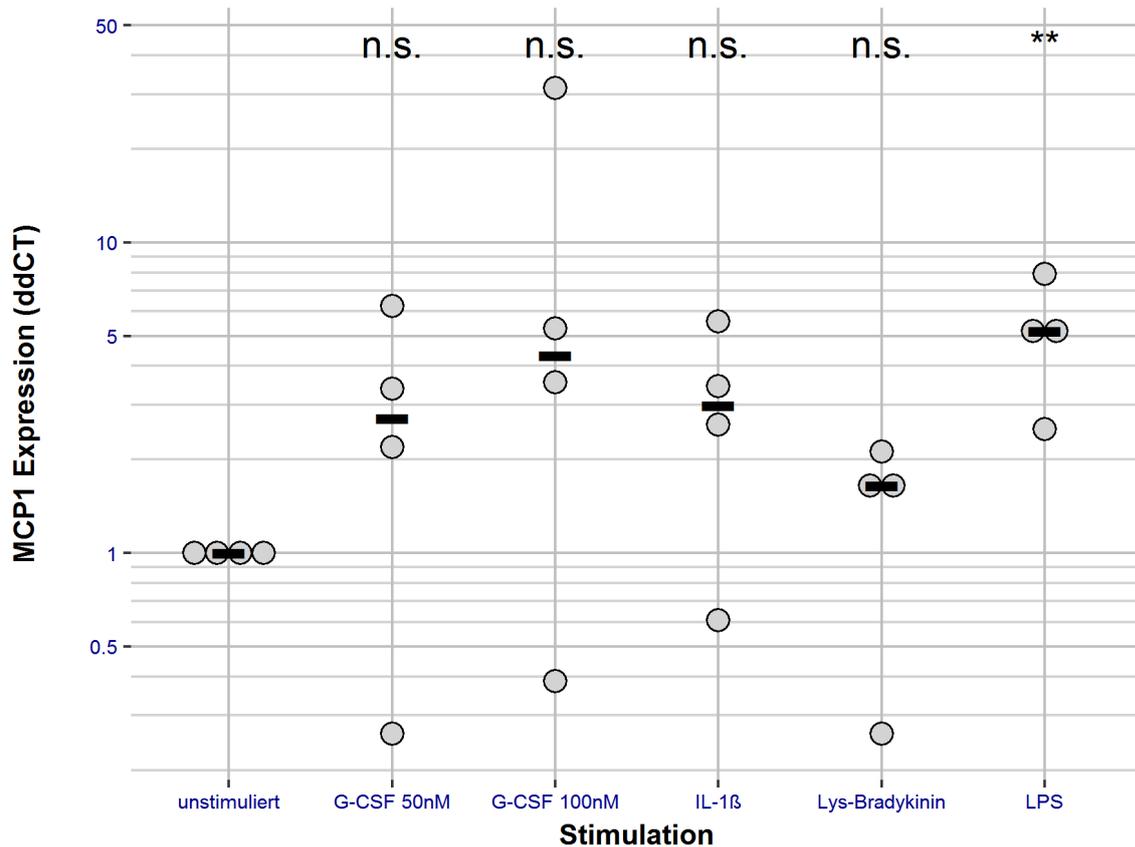


Abbildung 11: Darstellung der MCP-1-Expressionsänderung von THP-1 Zellen nach Stimulation mittels verschiedener Agentien. Alle Werte sind als relative Expressionsänderung zum Housekeeping-Gen RPLPO dargestellt. Nach Stimulation mit LPS zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von MCP-1 (Median 5,19, $p = 0,007$) gegenüber der unstimulierten Kontrolle. $n = 4$ biologische Replikate.

Ergebnisse

4.2.5 CCR2

Nach der Stimulation von THP-1 Zellen mittels 10 ng/ml Lys-Bradykinin konnte eine signifikante Herunterregulation der CCR-2-Expression (Median 0,52, $p = 0,03$) festgestellt werden. Die Stimulation mit G-CSF, IL-1 β und LPS zog keine signifikanten Effekte nach sich.

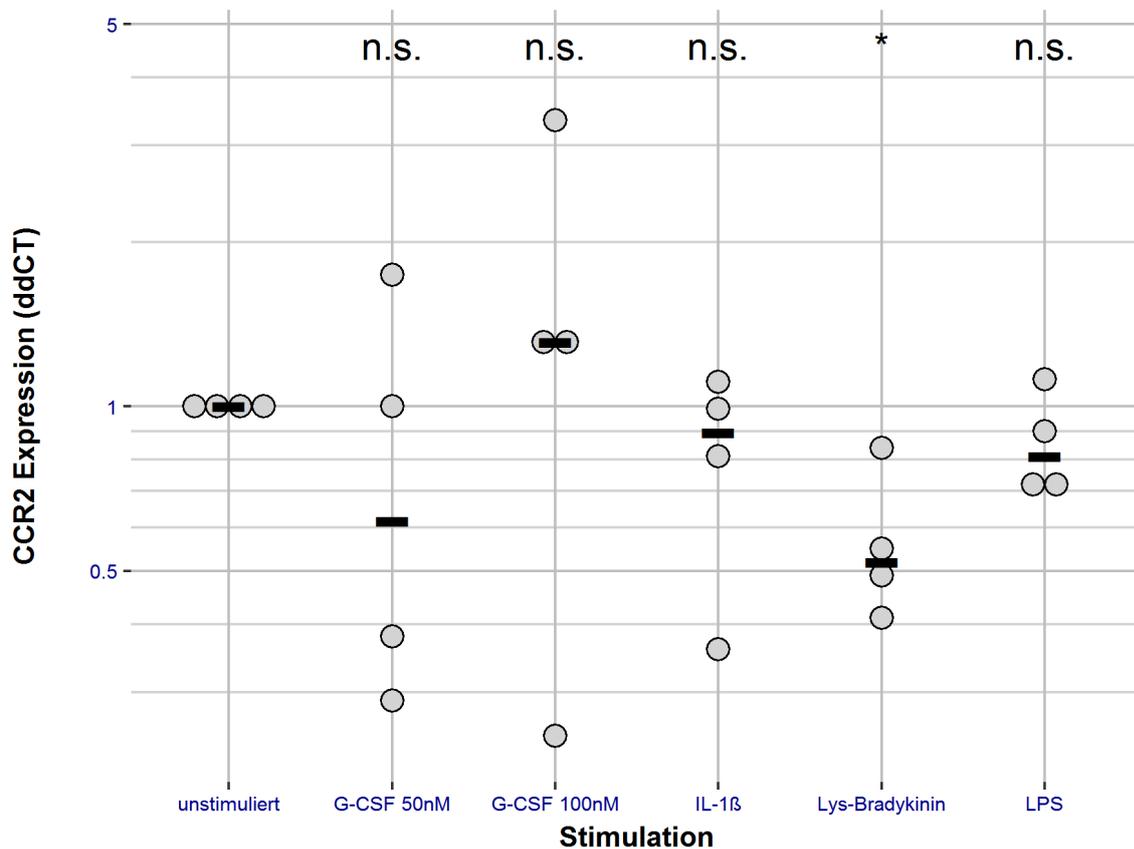


Abbildung 12: Darstellung der CCR2-Expressionsänderung von THP-1 Zellen nach Stimulation mittels verschiedener Agentien. Alle Werte sind als relative Expressionsänderung zum Housekeeping-Gen RPLPO dargestellt. Nach der Stimulation mit 10 ng/ml Lys-Bradykinin zeigte sich eine signifikante Herunterregulation der CCR2-Expression (Median 0,52) gegenüber der unstimulierten Kontrolle ($p = 0,03$). $n = 4$ biologische Replikate.

4.3 Expressionsänderungen im Kallikrein-Kinin-System nach Gefäßsport

4.3.1 Kallikrein

Die Expression von Kallikrein relativ zu RPLPO konnte weder durch passiven noch durch aktiven Gefäßsport messbar beeinflusst werden. Feststellbar ist eine minimale Tendenz zur Herunterregulation, wobei die Mediane sowohl nach aktivem als auch nach passivem Gefäßsport auf Kontrollniveau liegen.

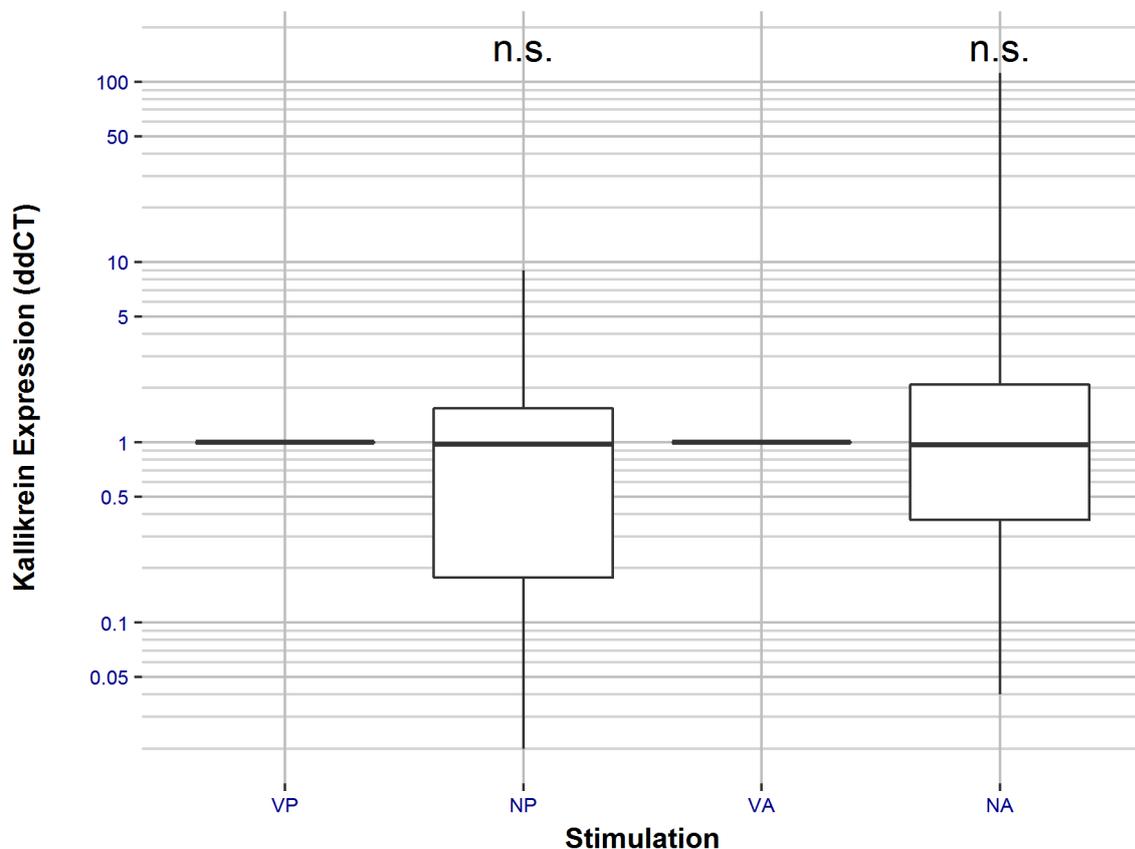


Abbildung 13: Darstellung der Kallikrein-Expressionsänderung von PBMCs nach passivem und aktivem Gefäßsport. Alle Werte sind als relative Expressionsänderung zum Housekeeping-Gen RPLPO dargestellt. Es konnte keine signifikante Veränderung der Kallikrein-Expression, weder nach aktivem noch nach passivem Gefäßsport, festgestellt werden. VP: n = 26 biologische Replikate. NP: n = 26 biologische Replikate. VA: n = 26 biologische Replikate. NA: n = 25 biologische Replikate. VP: vor passivem Gefäßsport, NP: nach passivem Gefäßsport, VA: vor aktivem Gefäßsport, NA: nach aktivem Gefäßsport.

Ergebnisse

4.3.2 Kininogen

Bei der Kininogen-Expression nach passivem Gefäßsport wurde ebenfalls keine statistisch signifikante Regulation nach aktivem oder passivem Gefäßsport detektiert, jedoch zeigte sich auch hier die gleiche Tendenz zur Herunterregulation.

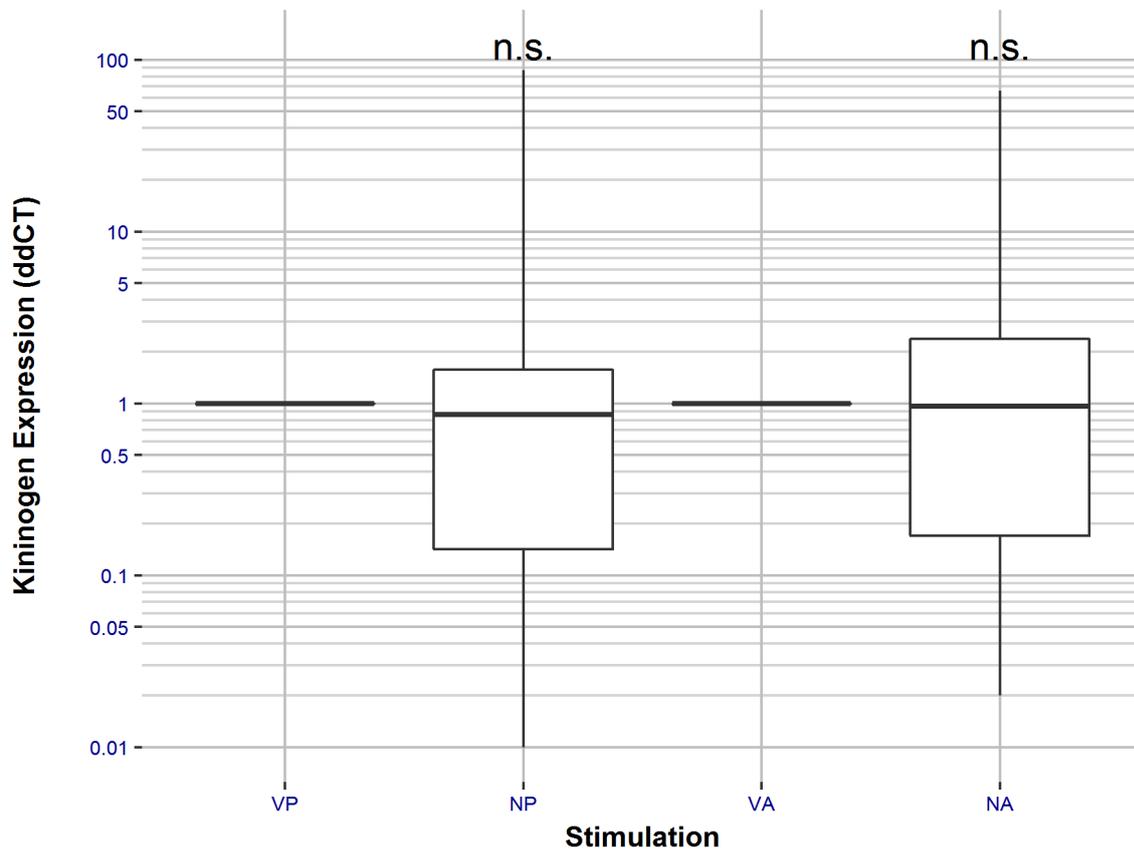


Abbildung 14: Darstellung der Kininogen-Expressionsänderung von PBMCs nach passivem und aktivem Gefäßsport. Alle Werte sind als relative Expressionsänderung zum Housekeeping-Gen RPL-PO dargestellt. Weder nach aktivem noch nach passivem Gefäßsport zeigte sich eine signifikante Regulation der Kininogen-Expression. VP: n = 26 biologische Replikate. NP: n = 24 biologische Replikate. VA: n = 26 biologische Replikate. NA: n = 24 biologische Replikate. VP: vor passivem Gefäßsport, NP: nach passivem Gefäßsport, VA: vor aktivem Gefäßsport, NA: nach aktivem Gefäßsport.

4.3.3 B1R

Die Analyse der Expression der B1R-Expression gestaltete sich aufgrund der sehr unterschiedlichen Expressionsniveaus schon vor passivem oder aktivem Gefäßsport als schwierig. Tatsächlich war eine größere Anzahl der Proben (15 / 26 Proben nach passivem Gefäßsport und 14 / 26 Proben nach aktivem Gefäßsport) auswertbar, sodass die Aussagekraft der Analyse erheblich beeinträchtigt ist. Von den ausgewerteten Proben zeigte sich nach aktivem Gefäßsport keine signifikante Regulation der Expression von B1R. Nach passivem Gefäßsport konnte eine signifikante positive Regulation festgestellt werden (Median 1,83, $p = 0,035$).

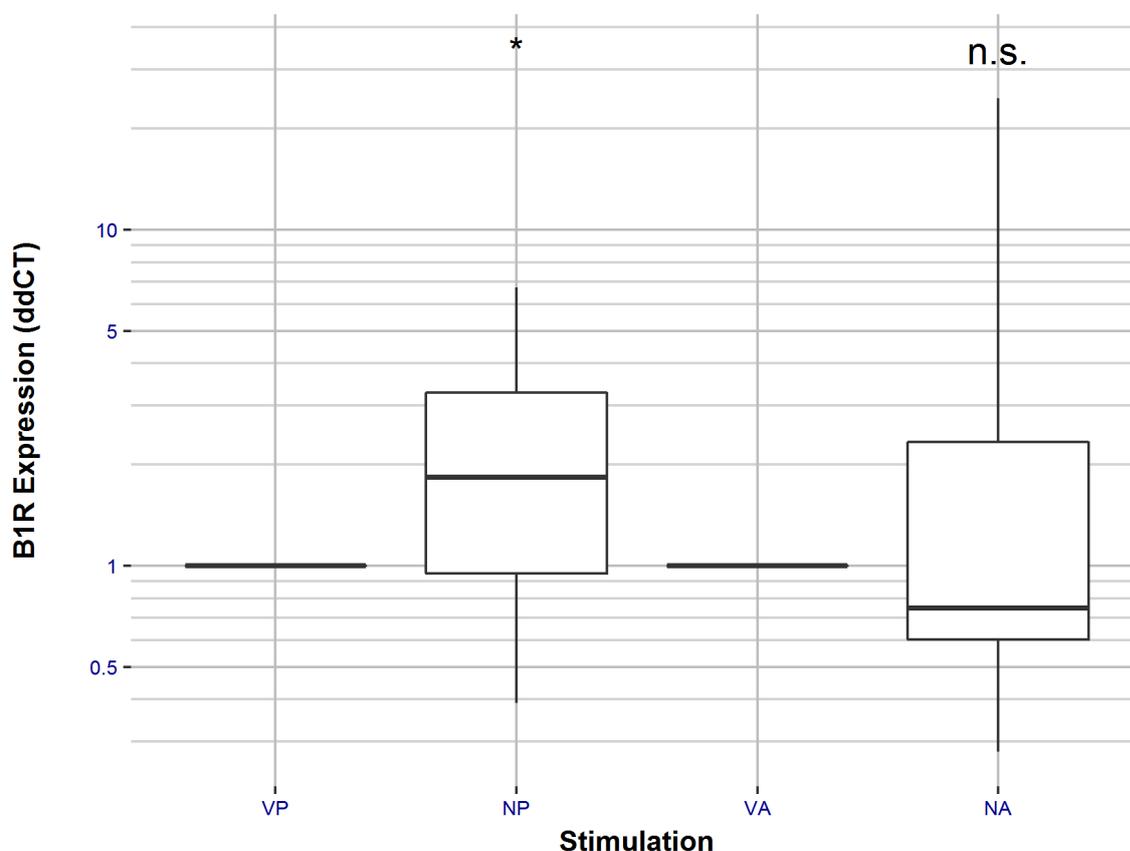


Abbildung 15: Darstellung der B1R-Expressionsänderung von PBMCs nach passivem und aktivem Gefäßsport. Alle Werte sind als relative Expressionsänderung zu RPLPO dargestellt. Nach passivem Gefäßsport zeigte sich eine signifikante Hochregulation der B1R-Expression (Median 1,83) gegenüber der unstimulierten Kontrolle (NP: $p = 0,035$). VP: $n = 26$ biologische Replikate. NP: $n = 15$ biologische Replikate. VA: $n = 26$ biologische Replikate. NA: $n = 14$ biologische Replikate. VP: vor passivem Gefäßsport, NP: nach passivem Gefäßsport, VA: vor aktivem Gefäßsport, NA: nach aktivem Gefäßsport.

Ergebnisse

4.3.4 B2R

Die Expression von B2R konnte durch passiven Gefäßsport signifikant beeinflusst werden (Median 0,68, $p = 0,021$) - Es zeigte sich eine Herunterregulation der B2R-Expression. Im Gegensatz hierzu zeigte sich im Vergleich vor und nach aktivem Gefäßsport keine signifikante Expressionsänderung.

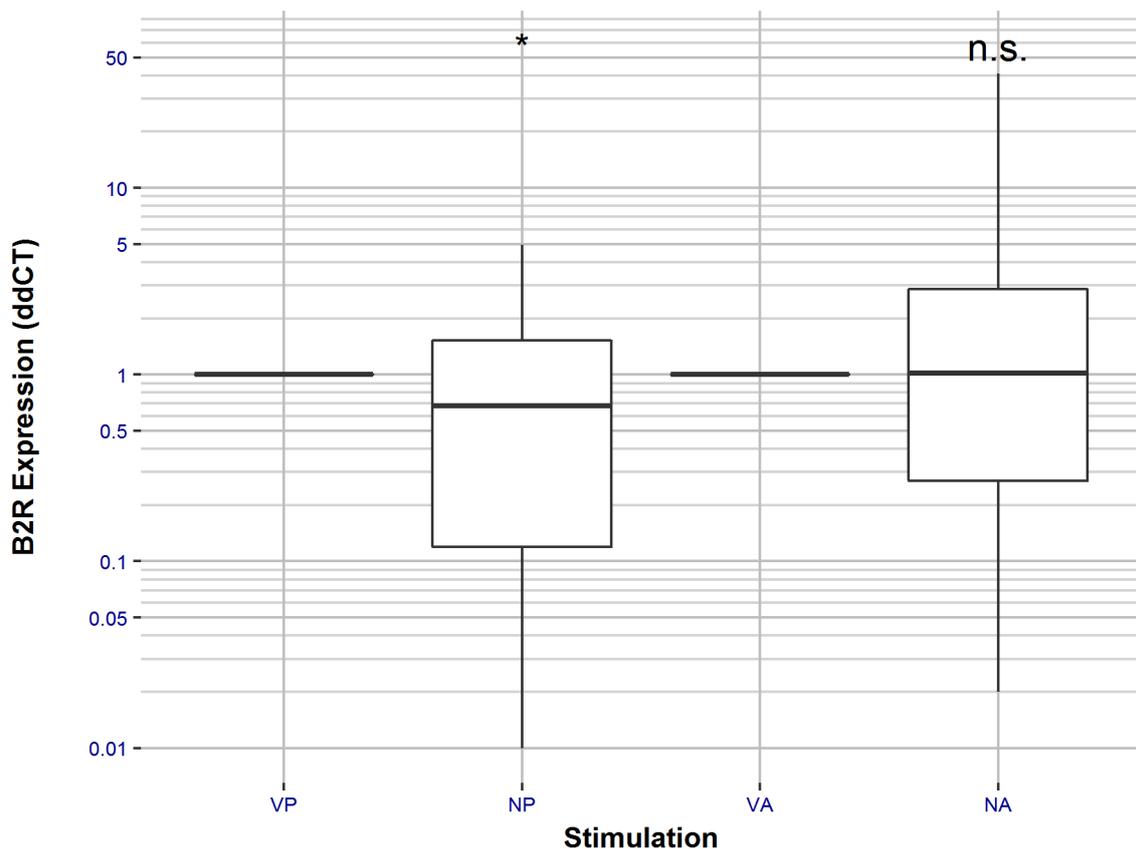


Abbildung 16: Darstellung der B2R-Expressionsänderung von PBMCs nach passivem und aktivem Gefäßsport. Alle Werte sind als relative Expressionsänderung zum Housekeeping-Gen RPLPO dargestellt. Nach passivem Gefäßsport zeigte sich eine signifikante Herunterregulation der B2R-Expression (Median 0,68) gegenüber der unstimulierten Kontrolle. (NP: $p = 0,021$). VP: $n = 26$ biologische Replikate. NP: $n = 23$ biologische Replikate. VA: $n = 26$ biologische Replikate. NA: $n = 22$ biologische Replikate. VP: vor passivem Gefäßsport, NP: nach passivem Gefäßsport, VA: vor aktivem Gefäßsport, NA: nach aktivem Gefäßsport.

4.4 Expressionsänderungen im MCP-1/CCR2-System

4.4.1 MCP-1

Die Expression von MCP-1 scheint nach passivem Gefäßsport einer Regulation zu unterliegen. Nach passivem Gefäßsport konnte im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Herunterregulation des MCP-1-Expressionslevels detektiert werden (Median 0,74, $p = 0,094$). Nach aktivem Gefäßsport stellte sich keine Expressionsänderung feststellen.

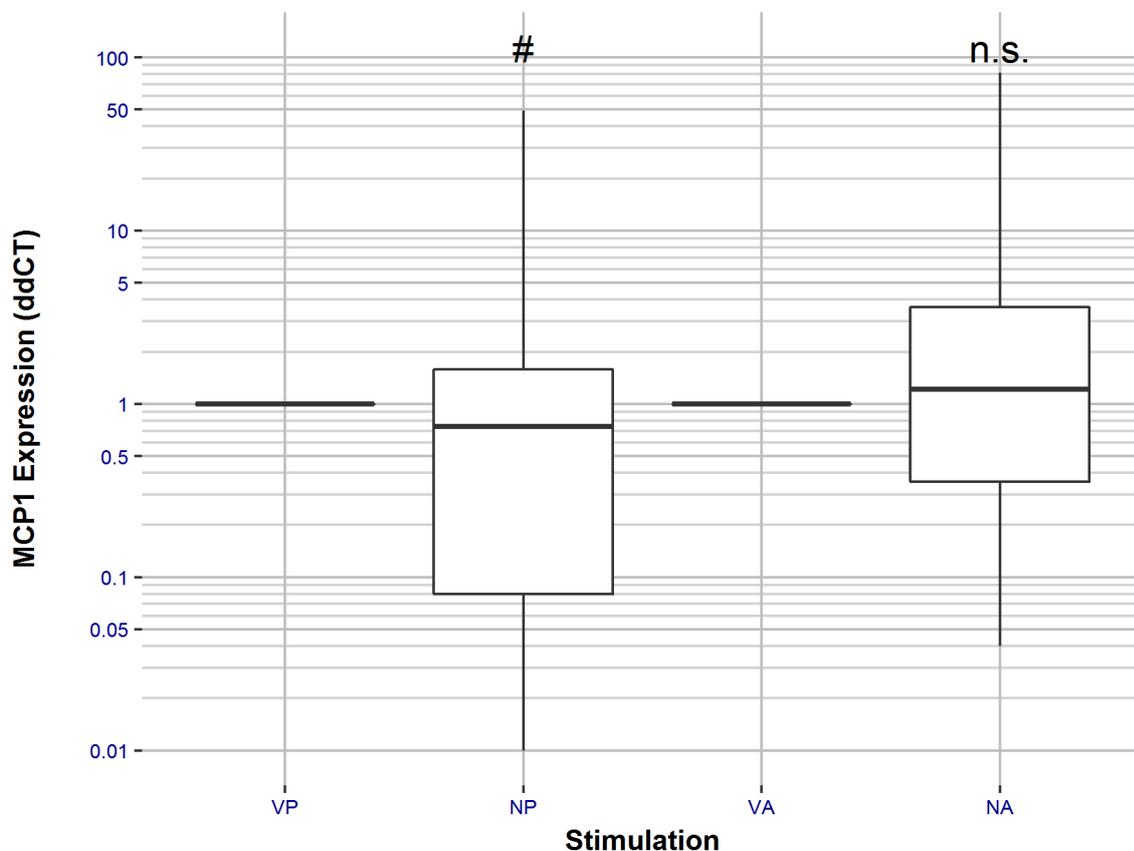


Abbildung 17: Darstellung der MCP-1-Expressionsänderung von PBMCs nach passivem und aktivem Gefäßsport. Alle Werte sind als relative Expressionsänderung zum Housekeeping-Gen RPL-PO dargestellt. Nach passivem Gefäßsport zeigte sich eine tendenzielle Herunterregulation der MCP-1-Expression (Median 0,74) gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Nach aktivem Gefäßsport konnte keine ähnliche Tendenz festgestellt werden (NP: $p = 0,094$). VP: $n = 26$ biologische Replikate. NP: $n = 25$ biologische Replikate. VA: $n = 26$ biologische Replikate. NA: $n = 23$ biologische Replikate. VP: vor passivem Gefäßsport, NP: nach passivem Gefäßsport, VA: vor aktivem Gefäßsport, NA: nach aktivem Gefäßsport.

Ergebnisse

4.4.2 CCR2

Die Analyse der CCR2-Expression ergab eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Herunterregulation nach Stimulation durch passiven Gefäßsport (Median 0,91, $p = 0,091$). Die Stimulation durch aktiven Gefäßsport führte zu keinen signifikanten Expressionsänderungen.

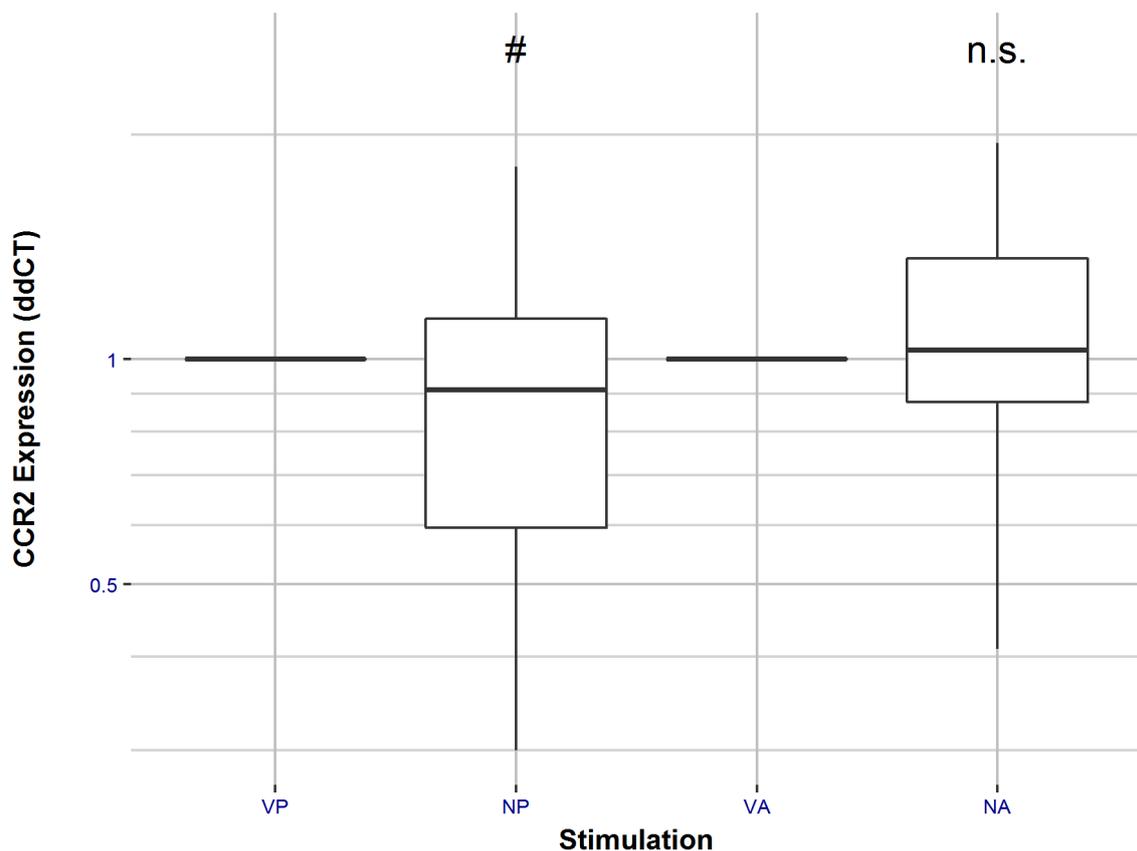


Abbildung 18: Darstellung der CCR2-Expressionsänderung von PBMCs nach passivem und aktivem Gefäßsport. Alle Werte sind als relative Expressionsänderung zum Housekeeping-Gen RPLPO dargestellt. Nach passivem Gefäßsport zeigte sich eine Tendenz zur Herunterregulation ohne statistische Signifikanz (Median 0,91, $p = 0,091$). VP: $n = 25$ biologische Replikate. NP: $n = 21$ biologische Replikate. VA: $n = 23$ biologische Replikate. NA: $n = 22$ biologische Replikate. VP: vor passivem Gefäßsport, NP: nach passivem Gefäßsport, VA: vor aktivem Gefäßsport, NA: nach aktivem Gefäßsport.

5 Diskussion

5.1 Überblick über die Ergebnisse

Nach aktuellem Kenntnisstand wurden in dieser Arbeit erstmalig die Expressionsänderungen von Arteriogenese-Markern in Folge des Akuteffektes von Gefäßsport diagnostisch untersucht und in einem Expressionsprofil abgebildet. Vergleichend dazu wurden Stimulationsversuche an einer monozytären THP-1 Zelllinie mit unterschiedlichen Zytokinen durchgeführt, um hier die pro-inflammatorische Initiation der Arteriogenese und Monozytenaktivierung zu stimulieren. Überblickend zeigten die Ergebnisse der *in vitro* Zell-Stimulationsversuche an THP-1 Monozyten ein klares Expressionsprofil, jedoch tendenziell geringe Unterschiede. Die Ergebnisse der molekularen Untersuchung der Primärzellen aus der klinischen Gefäßsport-Studie an 26 Probanden konnten ebenso zeigen, dass bereits nach einmaligem Training im Akutversuch Expressionsänderungen im KKS sowie in der MCP-1- / CCR2-Signalkaskade nachweisbar sind. Vergleiche zwischen *in vitro* Expressionsuntersuchungen an THP-1 Zellen und primären PBMCs von Probanden zeigten jedoch teils sehr heterogene Ergebnisse.

5.2 Ergebnisse der THP-1 Zell-Stimulation

Durch *in vitro* Stimulation von THP-1-Zellen mittels verschiedener Zytokine konnten bereits nach einer Stimulationszeit von 60 Minuten klare Expressionsänderungen detektiert werden. Insbesondere in der MCP-1- / CCR2-Signalkaskade zeigte sich eine signifikante Deregulation. Entsprechend Fantuzzi *et al.* konnte hier gezeigt werden, dass sich durch Stimulation von THP-1 Zellen die Expression von MCP-1 (bei Stimulation durch LPS) signifikant erhöht, während die Expression von CCR2 (bei Stimulation durch Lys-Bradykinin) signifikant sinkt⁵¹. Dieses Ergebnis entspricht dem Expressionsprofil, welches für die beginnende Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen bekannt ist und auch durch stimulatorische Reize angestoßen wird^{49,68}. Der Nachweis pro-inflammatorischer M1- und anti-inflammatorischer M2-Makrophagen in diesem Prozess steht aktuell noch aus.

Während in der MCP-1- / CCR2-Signalkaskade signifikante Änderungen der THP-1 Expression schon nach kurzer Stimulationszeit nachweisbar waren, konnten im KKS mit Ausnahme von Kallikrein nur tendenzielle Änderungen ohne Signifikanzen festgestellt

werden. So zeigte sich bei Stimulation von THP-1 Monozyten durch G-CSF eine signifikante (50 ng/ml) bzw. tendenzielle (100 ng/ml) Hochregulation der Expression von Kallikrein. Diese Tendenz lässt sich im Rahmen der experimentell induzierten Inflammation als beginnende Aktivierung des KKS mit daraus theoretisch resultierender Verstärkung der Inflammation, Vasodilatation und Proliferation deuten⁶⁹. Im Gegensatz zur Expression von Kallikrein unterlag die Expression von B2R deutlichen Schwankungen, sodass hohe Standardabweichungen ein aussagekräftiges Ergebnis verhinderten. Dies kann durch die mögliche rasche Internalisation von B2R, insbesondere bei durch Inflammation hochregulierter B1R-Expression, erklärt werden⁷⁰. Die Expression des konstitutiv exprimierten B2R unterliegt weiterhin, je nach Zellursprung (Spezies, Gewebe), Zelltyp (Monozyten, Makrophagen, Mikroglia) und Zelldifferenzierungsgrad, Schwankungen. Auch eine Beeinflussung durch äußere Umstände wie Erkrankungen konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden^{71,72,73}. Die Analyse der Expression von B1R in THP-1 Zellen zeigte, dass sich insbesondere vor der Stimulation, ähnlich wie in PBMCs, kaum mRNA detektieren ließ. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Rodrigues *et al.*, die nachweisen konnten, dass in gesunden Probanden die Expression von B1R ohne Stimulation stark herunterreguliert bzw. nicht exprimiert ist. Bei Inflammation wird B1R wiederum sehr stark exprimiert⁴¹, wie es auch von Leeb-Lundberg *et al.* genauer beschrieben wurde⁷⁴. Weiterführende Untersuchungen, beispielsweise eine längere Stimulationszeit oder andere immunologische (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)) oder biochemische Nachweismethoden (Western-Blot, Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)), könnten diesen Effekt validieren und so das hier eingeführte Zell-Stimulationsmodell weiterentwickeln.

5.2.1 THP-1 Stimulation als Zellkulturmodell für Expressionsuntersuchungen von Arteriogenese-Markern

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass THP-1 Zellen als Modellorganismus für inflammatorische Stimulationsversuche geeignet sind^{75,76}. Tangirala *et al.* zeigten beispielsweise eine identische Rezeptordichte für CCR2 auf THP-1 Zellen und humanen Monozyten⁶⁸. Ein Vorteil der Zelllinie THP-1 gegenüber frisch isolierten PBMCs ist die deutlich höhere Teilungsrate und der einfachere Umgang aufgrund nachgewiesener Virus- und Toxinfreiheit. Auch die Immortalisierung, die eine vielfache Passage der Zellen mit geringen Veränderungen der Zelleigenschaften erlaubt, sowie der homogene genetische Ursprung der THP-1 Zellen ermöglichen eine einfachere Re-

produzierbarkeit von Ergebnissen. Dennoch muss bei der Verwendung dieser Zelllinie bedacht werden, dass der Ursprung aus malignen Zellen möglicherweise die Vergleichbarkeit zu gesunden Zellen mindert. Auch die wechselseitige Beeinflussung von THP-1 Zellen mit anderen, *in vivo* interagierenden Zellen ist *in vitro* nur bedingt simulierbar, was insbesondere im Rahmen der komplexen leukozytären Expressionsmuster bei der Arteriogenese von Relevanz ist. THP-1 ist eine monozytäre Zelllinie, wohingegen PBMCs eine heterogene Zellpopulation aus u.a. Monozyten und Lymphozyten repräsentiert. Dennoch war das Expressionsprofil von THP-1-Zellen und PBMCs in dieser Untersuchung bis auf wenige Ausnahmen gut vergleichbar. Bis jetzt gibt es keine Untersuchungen, die Unterschiede in der Expression von Arteriogenese-Biomarkern in verschiedenen leukozytären Subpopulationen im Detail untersuchen⁷⁷. Es wurde jedoch gezeigt, dass Monozyten und differenzierte anti-inflammatorische M2-Makrophagen die wichtigsten Effektorzellen der Arteriogenese darstellen⁷⁸.

5.2.2 Limitierungen des THP-1 Zell-Stimulationsmodells

Das THP-1 Zell-Stimulationsmodell wurde entwickelt, um unterschiedliche Signalwege in Monozyten einer humanen monozytären Zelllinie *ex vivo* zu stimulieren. Auf diese Weise sollte eine Reaktion der Zellen auf verschiedene Stimuli auf Transkriptionsebene nachweisbar werden. So konnten ausgewählte Gensequenzen auf ihre Relevanz in Inflammation und schließlich Arteriogenese hin untersucht werden. Zur Weiterentwicklung des hier erstmalig vorgestellten Modells wäre eine größere Anzahl an Wiederholungen der Experimente nötig, um die Signifikanz der Ergebnisse weiter zu unterstreichen. Weiterhin sollte sich um eine Integration von Schubspannung in die experimentelle Durchführung bemüht werden, da Schubspannung als initialer Stimulus der Arteriogenese identifiziert werden konnte²⁴. In Endothelzellen wurde in diesem Zusammenhang bereits erfolgreich eine Schubspannungs-induzierte Expressionsänderung von Arteriogenese-Biomarkern (z. B. MCP-1²³, Gewebe-Kallikrein⁷⁹, B1R³⁹) gezeigt. Ein mögliches Modell um die Expression von Arteriogenese-Markern in Monozyten zu untersuchen und gleichzeitig die schubspannungsinduzierte Aktivierung von Endothelzellen zu berücksichtigen wäre die künstliche Arterie⁸⁰. Die künstliche Arterie erlaubt unter anderem, nicht-adhärenente Zellen Schubspannung auszusetzen. In diesem Rahmen wäre auch eine Co-Kultur von Monozyten mit Endothelzellen denkbar, um Zell-Zell-Interaktionen *in vitro* besser simulieren zu können^{77,80}.

5.3 Ergebnisse der Expressionsanalyse von Arteriogenese-Markern in PBMCs nach Gefäßsport

Die hier durchgeführte Expressionsanalyse von PBMCs zeigt, unseres Wissens nach erstmalig, dass bereits nach kurzer Applikationszeit sowohl von passivem als auch von aktivem Gefäßsport eine Deregulation der Expression in PBMCs stattfindet. Gleichzeitig wird hier erstmalig die Wirkung von passivem und aktivem Gefäßsport auf molekularer Ebene direkt verglichen (siehe **5.4**). Ein solcher Vergleich stand bisher noch aus und wurde von verschiedenen Fachgesellschaften dringend gefordert⁸¹. In der Literatur wurde bisher nur der Langzeiteffekt von entweder passivem^{19,82,83} oder aktivem⁸⁴⁻⁸⁶ Gefäßsport eruiert, beziehungsweise allgemeine Plasmakonzentrationsbestimmungen ohne Bezug auf bestimmte Zelltypen vorgenommen⁸⁷. Gefäßsport ist eine effektive Methode, um physiologisch das vaskuläre Remodelling zu induzieren. Hinsichtlich des vaskulären Remodelling ist die Untersuchung der Akuteffekte, insbesondere für die Arteriogenese-Forschung, von großem Interesse. Hier können Informationen über die frühe und damit initiale Phase von Gefäßumbauprozessen gewonnen werden²⁶. Ergebnisse aus Langzeitversuchen werden immer auch durch Adaptationsprozesse mitbeeinflusst, was sich in der Aktivierung anderer Gene in frühen als in späteren Phasen der Arteriogenese widerspiegelt. Untersuchungen zu Expressionsprofilen von Arteriogenese-Markern zeigten, dass sich eine frühe, mittlere und späte Phase der Arteriogenese charakterisieren lassen. So beschrieben Lee *et al.* in einem Arteriogenesemodell in der Maus, dass sich durch die Ligatur der linken A. femoralis das kollaterale Gefäßwachstum induzieren und innerhalb von 7 Tagen sichtbar nachweisen lässt. Genexpressionsuntersuchungen an isolierten Gefäßen zeigten hier, dass sich innerhalb der ersten 24 Stunden große Expressionsunterschiede nachweisen lassen. Betroffen waren insbesondere Inflammation-, Angiogenese und Stress-assoziierte Gene sowie die Expression von Transkriptionsfaktoren. Auf eine von pro-inflammatorischen Genen dominierte frühe Phase folgte eine mittlere Phase (ab dem dritten Tag), welche durch eine Hochregulation von Zellzyklus-, Zytoskelett- und ebenso Inflammationsgenen charakterisiert war. Zuletzt zeigte sich in der Spätphase (7. – 14. Tag) die Expression von angiostatisch und anti-inflammatorisch wirkenden, sowie Extrazellulärmatrix-assoziierten Genen⁸⁸. Hieraus lässt sich klar ablesen, dass in den verschiedenen Phasen der Arteriogenese unterschiedliche Prozesse relevant sind.

5.3.1 Hemmung der Expression von Arteriogenese-Biomarkern durch Laufband-Training und ECP

Die Expressionsanalyse von B1R und B2R ergab nach passivem Gefäßsport eine signifikante Regulation, wobei B1R hoch- und B2R herunterreguliert wurde. Die Expression von MCP-1 und CCR2 zeigte den gleichen Trend zur Herunterregulation nach passivem Gefäßsport. Keines der hier untersuchten Markermoleküle zeigte eine signifikante Expressionsänderung nach aktivem Gefäßsport. Tendenziell zeigen die hier erhobenen Daten eine Herunterregulation nach passivem Gefäßsport, aus der lediglich B1R signifikant heraussticht. Während nach passivem Gefäßsport signifikante Ergebnisse erreicht werden konnten, zeigte sich nach aktivem Gefäßsport allenfalls ein Trend zur Hochregulation, der jedoch nicht durch alle hier untersuchten Arteriogenese-Biomarker getragen wird.

5.3.2 Beeinflussung der Expression von B1R und B2R durch Gefäßsport

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass aktiver und passiver Gefäßsport die Expression der hier untersuchten Arteriogenese-Biomarker gegenläufig zu beeinflussen scheinen. Obwohl die Ergebnisse nur teilweise signifikant sind, zeigte die Expression von B2R nach passivem Gefäßsport eine (signifikante) Herunterregulation, während die Expression von B1R offenbar gegensätzlich beeinflusst wurde. Umgekehrt zeigte aktiver Gefäßsport eine nur angedeutete Herunterregulation von B1R, während die Expression von B2R eine Tendenz zur Hochregulation zeigte.

Unter der Prämisse der besonderen Bedeutung, die den Bradykinin-Rezeptoren in der Arteriogenese zugeschrieben wird⁵⁵, scheinen dieser beobachtete Umstand und die hier beschriebenen Unterschiede in der B1R- und B2R-Expression bedeutsam. Auch wenn die beobachteten Unterschiede im Ergebnis gering sind, so können sie doch auf unterschiedliche Formen der Regulation der Bradykinin-Rezeptoren hindeuten. Für die Bradykinin-Rezeptoren wurde beschrieben, dass zirkulierende mononukleäre Zellen mit B1R und B2R die Arteriogenese aktivieren^{69,89}. Weiterhin ist bekannt, dass anti-inflammatorische M2-Monozyten bei der Arteriogenese eine wichtige regulatorische Rolle spielen; gleichzeitig werden andere monozytäre Subpopulationen mit der Entstehung und dem Wachstum von pathologischen, arteriosklerösen Plaques in Verbindung gebracht^{90,91}. Eine weitere Analyse von Bradykinin-Rezeptor-exprimierenden leukozytären Subpopulationen erscheint hier daher sinnvoll.

5.3.3 Anti-inflammatorischer Effekt von Sport

Die Herunterregulation der Expression der hier untersuchten Komponenten des KKS sowie der MCP-1- / CCR2-Signalkaskade kann im Rahmen einer generellen anti-inflammatorischen Regulation gedeutet werden. Ein solcher Effekt ist bisher bereits im Rahmen von aktivem Training (Laufbandtraining, Schwimmen) sowohl bei Ratten als auch beim Menschen nachgewiesen worden. Beispielsweise zeigten mit Isoprenalin vorbehandelte Ratten, nach einem 13-wöchigen Laufbandtraining, im Vergleich zu ausschließlich mit Isoprenalin behandelten Kontrollratten, einen deutlich geringeren Expressionsanstieg von Tumor Nekrosefaktor α (TNF- α), Interleukin 6 (IL-6) und anderen pro-inflammatorischen Zytokinen.

In dieser Promotionsarbeit konnten keine signifikanten Veränderungen der Expression der hier untersuchten Biomarker nach Laufbandtraining festgestellt werden. Im Gegensatz hierzu war in vorangegangenen Studien ein signifikanter Anstieg des anti-inflammatorisch wirkenden Interleukins 10 (IL-10) sowie von B2R und Gewebe-Kallikrein feststellbar^{92,93}. Die Vergleichbarkeit dieser Studien ist jedoch eingeschränkt, da die untersuchte mRNA aus myokardialen Zellen stammte. Touati *et al.* zeigten jedoch auch jüngst, dass durch ein 12-wöchiges Laufbandtraining die Plasmakonzentrationen von TNF- α und IL-6 in übergewichtigen Ratten gesenkt werden, was im Rahmen der ebenfalls nachgewiesenen allgemeinen Senkung von Risikofaktoren als anti-arteriosklerotischer Effekt gewertet wurde⁹⁴.

Ein derartiger anti-arteriosklerotischer Effekt wurde auch nach passivem Gefäßsport beschrieben. So wiesen Braith *et al.* nach 35 ECP-Behandlungen (35 x 1 Stunde über einen Zeitraum von 7 Wochen) eine signifikante Herunterregulation der Plasmakonzentration von MCP-1 und anderer pro-inflammatorischer Zytokine bei Patienten mit stabiler Angina pectoris nach⁸². Die Autoren erklären diese Expressions-Änderung mit einer durch ECP-Behandlung hervorgerufene vermehrte Freisetzung von Stickstoff-Monoxid (NO). Dem vasodilatatorischen Effekt von NO wurde hier die hemmende Wirkung auf die Expression von MCP-1 zugeschrieben. Gegensätzliche Ergebnisse zu denen von Braith *et al.* sowie zu den in dieser Arbeit erhobenen Messungen führen Roseguini *et al.* an. Sie konnten nachweisen, dass passiver Gefäßsport bei Ischämie inflammatorische Prozesse, beispielsweise die Expression von MCP-1, in Ratten stimuliert⁹⁵. Entschei-

dender Faktor für die entweder pro-inflammatorische oder anti-inflammatorische Wirkung von passivem Gefäßsport scheint ergo das Vorliegen von Ischämie zu sein.

Eine derartige, durch passiven Gefäßsport (30 Stunden, Patienten mit pAVK) ausgelöste, signifikante Plasmakonzentrations-Erhöhung von NO konnte kürzlich auch durch Brix *et al.* an Patienten mit pAVK nachgewiesen werden. Währenddessen zeigte 45-minütiger aktiver oder passiver Gefäßsport keinen messbaren Kurzzeiteffekt hinsichtlich der Änderung der NO-Konzentration⁹⁶.

5.3.4 Schubspannungserhöhung als regulierender Faktor eines pro-arteriogenen oder anti-arteriosklerotischen Effekts von Gefäßsport

Arteriogenese findet statt, wenn aufgrund einer hämodynamisch relevanten Stenose erhöhte Schubspannung entlang des Gefäßes und Ischämie entsteht⁹⁷. Da in dieser Arbeit ausschließlich gesunde Probanden untersucht wurden, ist das Vorliegen einer Ischämie mit relevantem Druckgradienten zwischen einer Kollateralarterie und einem poststenotischen Gefäß unwahrscheinlich. Die für die Arteriogenese essenzielle Aktivierung von Entzündungszellen wie PBMCs führt im Falle eines vorliegenden Druckgradienten mit konsekutiv erhöhter Schubspannung zur Umformung prä-existenter Kollateralarterien in Konduktanzarterien⁹⁸. Solche pro-arteriogenen bzw. anti-arteriosklerotischen Effekte konnten in dieser Arbeit sowohl durch passiven als auch durch aktiven Gefäßsport hervorgerufen werden, wobei lediglich nach passivem Gefäßsport signifikante Expressionsänderungen feststellbar waren.

Dieses Ergebnis gliedert sich in eine Reihe anderer Studienergebnisse ein, die die Senkung einer Vielzahl von Risikofaktoren für Arteriosklerose nach Sport darlegen^{94,99,100}. Dementsprechend konnte kürzlich durch Zietzer *et al.* nachgewiesen werden, dass passiver Gefäßsport die Telomerase-Aktivität in PBMCs erhöht und so vermutlich durch Beeinflussung relevanter Moleküle vaskulären Alterungsprozessen vorbeugt. Diese Ergebnisse konnten als Kurz- sowie als Langzeiteffekt beobachtet werden¹⁰¹. Da endotheliale Gefäßalterung arteriosklerotische Umbauprozesse begünstigt, ist auch dieser Prozess als anti-arteriosklerotischer Effekt von Gefäßsport zu verstehen.

Direkt nach 60minütigem Wassersport oder normalem Lauftraining zeigten Pontes *et al.* in Erwachsenen mit bekannter arterieller Hypertonie eine erhöhte Kallikrein- und Bradykininkonzentration im Blutplasma. Erst 60 Minuten nach dem Training erreichten diese Konzentrationen wieder das Vor-Trainings-Niveau⁸⁷. Da diese Ergebnisse auf den

ersten Blick gegensätzlich zu den in dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen erscheinen, bedarf es eines differenzierteren Vergleichs. Zunächst existieren einige wesentliche Unterschiede zwischen der hier dargelegten Arbeit und der Studie von Pontes *et al.* Während in der hier dargelegten Arbeit der Effekt von Laufbandtraining bzw. passivem Gefäßsport auf das Expressionsmuster von PBMCs junger gesunder Erwachsener (Alter zwischen 18 und 35 Jahren) hin untersucht wurde, untersuchten Pontes *et al.* die Veränderungen der Plasmakonzentrationen von Kallikrein und Bradykinin in Patienten mit arterieller Hypertonie im mittleren Alter von $39,8 \pm 0,8$ Jahren nach Wassersport bzw. Lauftraining. In der Studie von Pontes *et al.* handelt es sich also tendenziell um kranke Patienten, die länger trainierten. Weiterhin fällt auf, dass die Plasma-Bradykinin- und Plasma-Kallikrein-Konzentrationen ihr Maximum direkt nach dem Sport erreichen, um anschließend abzufallen. Es ist demzufolge davon auszugehen, dass die Expression von Kallikrein und Bradykinin, die dem tatsächlichen Abfall im Plasma vorausgeht, nach Sport herunterreguliert wird. In der hier dargelegten Arbeit könnten also die Probenentnahmen 10 Minuten nach Gefäßsport bereits in die Phase der negativen Regulation fallen. Gjevstad *et al.* postulierten in einem neuen und sehr umfangreichen Review zu Genexpressionsanalysen in PBMCs, dass generell direkt nach Training eine proinflammatorische Antwort und im weiteren Verlauf eine anti-inflammatorische Antwort beobachtet werden kann¹⁰². Dies könnte die hier beobachteten Unterschiede erklären. Bei all diesen Betrachtungen muss hier auch posttranslationale Modifikation und Regulation als möglicher Erklärungsansatz erwogen werden.

5.3.5 Limitierungen der Gefäßsport-Studie und PBMC-Expressionsanalysen

Die hier dargelegten Effekte von passivem und aktivem Gefäßsport auf das Expressionsprofil von PBMCs sind nur teilweise statistisch signifikant. Ihre biologische Relevanz muss jedoch in weiteren Untersuchungen näher überprüft werden. Hierzu wären insbesondere eine größere Probandenzahl sowie die Integration von Proteinanalysen in das Studiendesign geeignet. Auch der Effekt von siRNA (small interfering RNA) könnte in zukünftige monozytäre Zellanalysen mit untersucht werden. Durch den knock-down von Zielgenen könnte so der Einfluss auf relevante Signalwege genauer charakterisiert werden.

Die zum Teil große Standardabweichung kann bei einigen der hier untersuchten Arteriogenese-Biomarker auf die bereits initial niedrige Expression zurückgeführt werden. Insbesondere die Auswertung von B1R würde aufgrund des geringen basalen Expres-

Diskussion

sionsniveaus von einer diesbezüglichen Überprüfung und gegebenenfalls Anpassung profitieren. Die hier vorgestellten objektiven Parameter sind theoretisch in der Lage, Trainingseffektivität anzuzeigen. Jedoch ist zum einen der klinische Nutzen zum jetzigen Zeitpunkt aufgrund der Komplexität der Probenaufbereitung begrenzt; zum anderen fehlen aktuell weitere Daten, beispielsweise die Abhängigkeit der Expressionsänderung von der Trainingsintensität, dem Trainingszustand der Probanden, die Auswirkungen von Medikation oder verschiedenen Erkrankungen auf die Expression der hier besprochenen Parameter.

So konnte bei adipösen Männern mittleren¹⁰³ und gesunden Probanden höheren Alters¹⁰⁴ eine Reduktion inflammatorischer Prozesse durch (Gefäß-)Sport nachgewiesen werden, während bei exzessiver sportlicher Betätigung Inflammation häufiger aufzutreten schien¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Andere Studien zeigen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Beeinflussung kardiovaskulärer Risikofaktoren durch mäßiges oder intensives Lauftraining¹⁰⁸. Insgesamt ist die Vergleichbarkeit der verschiedenen vorliegenden Studien aufgrund der enormen Diversität an Trainingsmethoden und –intervallen sowie der Auswahl verschiedener Probanden und Endpunkte eingeschränkt. Über die molekulare Wirkung von Sport herrscht aktuell eine rege Diskussion. Hier zeigten Expressionsanalysen zur Untersuchung der Länge von Telomerasen in Leukozyten (siehe hierzu auch **5.3.4**), dass ein Kumulativeffekt von regelmäßiger sportlicher Betätigung über die Lebenszeit existiert^{109,110}. Dies ist ein Indiz dafür, dass für eine größere Aussagekraft hinsichtlich des Effektes von Sport auf molekulare Parameter die sportliche Betätigung der Probanden exakt erfasst werden muss. Auch wenn diese Ergebnisse sicherlich nur teilweise auf die hier untersuchten Parameter übertragbar sind, sollte der Effekt regelmäßigen Sports auf das Expressionsprofil von PBMCs nicht unterschätzt werden. In die hier durchgeführte Studie wurden ausschließlich Probanden mit durchschnittlicher sportlicher Aktivität sowie ohne außergewöhnliche Ernährungsgewohnheiten eingeschlossen, um derartige Effekte zu minimieren.

Auch der Einfluss verschiedener Medikamente muss – insbesondere beim Vergleich mit arteriosklerotisch bedingt erkrankten Patienten – berücksichtigt werden. Solche Patienten stehen beispielsweise häufig unter einer Dauermedikation mit Acetylsalicylsäure; ein Wirkstoff, für den bereits eine anti-inflammatorische Wirkung beschrieben wurde²⁰.

Diskussion

Da die Probengewinnung teilweise durch die Mitorganisatoren der hier beschriebenen Studie durchgeführt wurde, sind theoretisch Abweichungen bei den in den Abschnitten **3.3.1**, **3.4.3** und **3.4.4** beschriebenen Arbeitsschritten möglich. Da die Arbeitsschritte genormt und in gegenseitiger Kontrolle vorbereitet wurden, ist eine darauf zurückführbare Abweichung jedoch unwahrscheinlich.

Der Einfluss der Zell-Mischpopulation auf die Ergebnisse müsste in weiteren Untersuchungen überprüft werden. Für eine konkrete Betrachtung der Expressionsprofile von primären humanen Zellen sollten zudem in einem zweiten Schritt monozytäre Zellen aus den PBMCs isoliert werden. Da Monozyten in der PBMC-Fraktion nur ca. 10 % der Gesamtzellen ausmachen, setzt dies jedoch ein größeres Blutvolumen voraus, um eine ausreichende Zellmenge für weiterführende Untersuchungen zu erhalten. Da jedoch in ähnlichen Studien ebenfalls PBMCs untersucht wurden, wurde in dieser Arbeit zur besseren Vergleichbarkeit der Studien auf eine weitere Differenzierung verzichtet. Bei der Isolation einzelner Zelltypen aus dem Zellkollektiv ist eine ungewollte Stimulation der selektierten Zellen durch das Separationsverfahren möglich. Eine Expressionsanalyse der gesamten PBMC-Fraktion ohne Separationsverfahren schien daher für das Design der hier durchgeführten (Pilot-)Studie als erster Schritt naheliegend.

In solchen Studien sollte auch die Kinetik der ausgewählten Systeme in den entsprechenden Zellen untersucht werden, um zu verifizieren inwieweit Kurzzeiteffekte innerhalb dieser Systeme möglich sind. Gegebenenfalls müsste dann in folgenden Untersuchungen das Therapieintervall bzw. das Blutentnahmeintervall an die Kinetik der zu untersuchenden Systeme angepasst werden, um optimale Ergebnisse zu erzielen. In dieser Arbeit wurde zu Gunsten eines möglichst kurzen Untersuchungsintervalls auf derartige Anpassungen verzichtet. Ein weiterer limitierender Faktor dieser Arbeit sind die im Folgenden diskutierten interindividuellen Unterschiede der Probanden, wobei die gewählte Probandenzahl ($n = 26$) hier eine Verzerrung der Studienergebnisse durch derartige Faktoren unwahrscheinlicher macht.

5.3.6 Probanden und Compliance als limitierende Faktoren der Gefäßsport-Studie

Die in der Gefäßsport-Studie vorgenommenen Untersuchungen fanden an Primärproben aus Vollblut gesunder Probanden statt. Aufgrund der ambulanten Durchführung der Studie und des bewusst kurz gehaltenen Untersuchungsintervalls war jedoch die Kon-

trolle der Compliance der Probanden trotz vorgenommener Präventionsmaßnahmen nur begrenzt möglich. Bereits bei der Rekrutierung der Probanden wurde, im Rahmen der umfassenden Information und Aufklärung, die Notwendigkeit des Verzichts auf Sport oder anderweitige körperliche Anstrengung unmittelbar vor Beginn der Untersuchungen erläutert. Dennoch ist eine sportliche Betätigung der Probanden vor Studienbeginn nicht auszuschließen. Da vielfältige Einflüsse auf das Expressionsmuster in PBMCs, wie beispielsweise Ernährungsgewohnheiten, akute oder chronische Erkrankungen oder Verletzungen denkbar sind, wäre zum Ausschluss derartiger Einflussgrößen ein stationäres Setting notwendig.

5.4 Vergleich von passivem und aktivem Gefäßsport

5.4.1 Zusammenfassung aktiver Gefäßsport

In der Therapie von Patienten mit Erkrankungen vaskulärer Genese, insbesondere Patienten mit koronarer Herzkrankheit oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit, ist Sport seit Langem ein fester Bestandteil der Sekundär- und Tertiärprävention. In zahlreichen Studien konnte der protektive Effekt von verschiedenen Sportarten nachgewiesen werden. Begonnen mit der allgemeinen Senkung von kardiovaskulären Risikofaktoren wie Gewichtsreduktion, Senkung hypertensiver Blutdruckwerte in den normotonen Bereich, sowie die Senkung der Blutplasmakonzentrationen von Glukose, Cholesterol, Triglyceriden und LDL^{16,99,100}, konnte weiterhin die Erhöhung des Blutflusses in Kollateralarterien nachgewiesen werden¹⁹. Dieser Effekt wurde in bisherigen Studien teils auf einen NO-vermittelten Endotheleffekt, teils auf eine durch erhöhte Schubspannung induzierte Arteriogenese zurückgeführt. Generell scheint aktiver Gefäßsport sowohl lokale (Endotheleffekte) als auch systemische Effekte (Expressionsmuster zirkulierender Zellen wie PBMCs) hervorzurufen, wobei die genauen Mechanismen der endothelvermittelten Gefäßmodulation noch nicht vollständig geklärt sind^{111,112}. In dieser Studie konnten solche systemischen Effekte aktiven Gefäßsports auf die Expression Arteriogenese-relevanter Biomarker als Kurzeffekt nachgewiesen werden.

Jedoch muss neben den offensichtlichen Vorteilen des aktiven Gefäßsports auch die eingeschränkte Anwendbarkeit bei Patienten in höhergradigen Krankheitsstadien erwähnt werden. Sowohl Patienten mit höhergradiger KHK als auch solche mit fortgeschrittener pAVK wurden aufgrund des hohen Risikos gravierender Komplikationen in der Mehrzahl der Studien von einer Teilnahme ausgeschlossen, sodass Aussagen zur

Wirksamkeit in diesen Fällen bisher nicht möglich sind. Ebenfalls beeinträchtigen im klinischen Alltag die hohen Kosten für supervisierte Trainingsprogramme und der damit verbundene hohe Zeitaufwand die Compliance von Arzt und Patient. Sportprogramme ohne Supervision erzielen jedoch signifikant schlechtere Ergebnisse, sodass allein das Anhalten zu einem gesünderen und sportlich aktiveren Lebensstil in wenigen Fällen eine deutliche Besserung erzielt²⁹.

5.4.2 Zusammenfassung passiver Gefäßsport

Als Alternative zum aktiven Gefäßsport als nicht-invasives Therapiekonzept kardiovaskulärer Erkrankungen gewinnt seit geraumer Zeit der passive Gefäßsport nach dem ECP-Prinzip zunehmend an Bedeutung. Initial wurde die ECP-Therapie zur Behandlung von Patienten mit beginnender KHK eingesetzt. Kürzlich konnte durch eine modifizierte Variante von ECP (Individual Shear Rate Therapy – ISRT) nun auch ein positiver Trainingseffekt auf durch pAVK hervorgerufene Symptome gezeigt werden. Entgegen früheren Empfehlungen besteht heute die Ansicht, dass auch Patienten mit fortgeschrittener KHK oder pAVK von einer solchen Therapie profitieren⁸³. Auch gesundheitsökonomisch gesehen kann der Einsatz von passivem Gefäßsport empfehlenswert sein, da selbst bei Patienten, die nicht mehr für aktiven Gefäßsport in Frage kommen, eine verbesserte Lebensqualität sowie eine geringere Hospitalisierungsrate nach passivem Gefäßsport erzielt werden kann¹¹³. Aktuell ist in Deutschland passiver Gefäßsport noch nicht flächendeckend verfügbar, sodass zum jetzigen Zeitpunkt nur verhältnismäßig wenige Patienten mithilfe des ECP-Prinzips therapiert werden können, obwohl jüngst veröffentlichte Studien auf ähnlich positive Langzeiteffekte von passivem Gefäßsport hinweisen. So konnte auch nach passivem Gefäßsport, vergleichbar mit aktivem Gefäßsport, eine verbesserte Glukosetoleranz und Verbesserung der Endothelfunktion beobachtet werden¹¹⁴⁻¹¹⁶.

Obwohl passiver Gefäßsport seit mehreren Jahren als erfolgreiche Therapie eingesetzt wird, sind die Mechanismen, die dem Therapieerfolg zugrunde liegen, bisweilen ungeklärt. Als wesentlicher Faktor der anti-arteriosklerotischen und pro-arteriogenen Wirkung passiven Gefäßsports wird jedoch die erhöhte Schubspannung vermutet, die wiederum die Endothelfunktion und Morphologie positiv beeinflusst. Hierbei spielt wahrscheinlich neben der Aktivierung des NO-Signalwegs auch die Beeinflussung proinflammatorischer Biomarker eine wesentliche Rolle¹¹⁷⁻¹¹⁹. In dieser Arbeit wurden die

Wirkmechanismen von passivem Gefäßsport näher beleuchtet, indem die Beeinflussung des Expressionsprofils zirkulierender PBMCs bewiesen wurde.

5.4.3 Wertung der Ergebnisse nach passivem und aktivem Gefäßsport

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von Expressionsmustern ausgewählter Gene in PBMCs, die auf ihre Eignung als diagnostische Marker von vaskulärem Remodelling und zur Beurteilung der Effektivität von Gefäßsport getestet wurden. Anhand der hier erhobenen Daten kann festgestellt werden, dass ein charakteristisches Expressionsprofil erkennbar ist, das allerdings in Abhängigkeit von individuellen Probandeneigenschaften unterschiedlich bewertet werden muss.

Desweiteren konnte in dieser Arbeit erstmalig festgestellt werden, dass der Kurzzeiteffekt von ECP-Therapie auf die hier ausgewählten Biomarker weitgehend mit konventionellem aktiven Gefäßsport vergleichbar ist. Die Veränderungen des Expressionsmusters in PBMCs gesunder Probanden nach aktivem und passivem Gefäßsport waren überwiegend durch eine Herunterregulation der untersuchten Parameter charakterisiert, sodass hier vornehmlich von einem anti-arteriosklerotischen Effekt auszugehen ist. Dieser Effekt scheint von beiden Therapieformen gleichermaßen erzielt zu werden. Die gegenläufig erscheinende Expression der Bradykinin-Rezeptoren weist jedoch auf eine Beeinflussung des KKS hin, die differenzierter zu betrachten ist. Beide Gefäßsportarten sollten im Hinblick auf ihre unterschiedliche physiologische Rolle bei der Entstehung von Arteriogenese und Arteriosklerose dringend weiter untersucht werden.

5.5 Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Beeinflussung der Expression der hier untersuchten Biomarker durch aktiven und passiven Gefäßsport erlauben die Wertung beider Therapiemethoden als potenziell anti-arteriosklerotisch. Diese Effekte, deren Ausprägung von Probanden- und Patienteneigenschaften abhängt, sind für die Prognose von Patienten mit KHK oder pAVK entscheidend. Die Rolle von proarteriogenen Leukozyten sollte jedoch im Detail in weiteren, spezifischeren Untersuchungen an zellulären Subpopulationen betrachtet werden, da hier ggf. andere inflammatorische Prozesse eine Rolle spielen. Das therapeutische Potenzial von Arteriogenese ist angesichts der anfangs beschriebenen Prävalenz kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität sowie der demographischen Entwicklung klinisch hoch relevant. Mit

Diskussion

sowohl passivem als auch aktivem Gefäßsport können nicht nur die Auswirkungen bestehender arteriosklerotischer Stenosen durch Ausbildung kollateraler Konduktanzarterien vermindert werden, sondern im Rahmen seiner anti-arteriosklerotischen Wirkung durch Risikoreduktion aktiv vorgebeugt werden. Während die Rolle aktiven Sports hierbei bereits gefestigt und allgemein anerkannt erscheint, konnte hier passiver Gefäßsport als kostengünstige und effektive Alternative zum konventionellen Training bestätigt werden. Insbesondere Patienten in fortgeschrittenen Stadien kardiovaskulärer Erkrankungen profitieren hier von einer Therapie.

Zur weiteren Etablierung passiven Gefäßsports als Alternative zum aktiven Gefäßsport ist eine weitere detaillierte Untersuchung des hier besprochenen pro-arteriogenen, sowie anti-arteriosklerotischen Effekts notwendig. In künftigen Studien sollte im direkten Vergleich von aktivem und passivem Gefäßsport insbesondere die Beeinflussung verschiedener kardiovaskulärer Risikofaktoren sowie weiterer pro-arteriogener Signalwege untersucht werden, um die Gleichwertigkeit beider Methoden zu untermauern. Beispielfähig wäre hier die Veränderung von Glykohämoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) als Langzeiteffekt, sowie der Serumkonzentrationen von high-density Lipoprotein (HDL) und LDL zu nennen. Auch eine differenzierte Betrachtung der Makrophagen-Subtypen M1, M2a, M2b und M2c und deren Beeinflussung durch aktiven oder passiven Gefäßsport wäre von großem Interesse.

Insbesondere die hier nur angedeutete gegenläufige Tendenz der B1R und B2R Expression nach aktivem und passivem Gefäßsport bedarf weiterer Untersuchungen, um gegebenenfalls bestehende Unterschiede zu beweisen und deren Relevanz für die Entstehung von Arteriogenese und / oder Arteriosklerose zu untermauern.

Weiterhin wäre die Untersuchung von gesunden Probanden, parallel zu kardiovaskulär erkrankten Patienten, ein wertvoller Beitrag, um die Effektivität von aktivem und passivem Gefäßsport hinsichtlich der Prävention von Arteriosklerose und der Induktion von Arteriogenese zu beurteilen.

6 Zusammenfassung

Diese Studie diente der Untersuchung verschiedener Arteriogenese-Biomarker (Kallikrein, Kininogen, B1R, B2R, MCP-1 und CCR2) auf ihre Eignung als diagnostische Marker zur Überwachung von Trainingseffekten. Hierbei wurde erstmalig auch der Effekt von aktivem und passivem Gefäßsport auf die Expression der ausgewählten Arteriogenese-Biomarker direkt miteinander verglichen.

Vor dem Hintergrund weltweit steigender Morbidität und Mortalität aufgrund kardiovaskulärer Erkrankungen gewinnt die Entwicklung neuer Konzepte kardiovaskulärer Akut- und Langzeittherapie sowie der Prävention derartiger Erkrankungen, große Bedeutung. Ein anerkanntes Konzept das Therapie und Prävention vereint, ist aktiver Gefäßsport. Aufgrund krankheitsbedingter Einschränkungen ist diese Therapieform jedoch einem großen Teil der betroffenen Patienten nicht zugänglich; diese könnten von passivem Gefäßsport nach dem ECP-Prinzip profitieren. Während der anti-arteriosklerotische Effekt im Wesentlichen präventiv wirkt, kann Arteriogenese die Beschwerden von kardiovaskulär erkrankten Patienten nachweislich mindern. Arteriogenese bezeichnet dabei die schubspannungs-induzierte Ausformung prä-existenter Kollateralarterien zu funktionellen Konduktanzarterien. Hierbei spielen insbesondere das in PBMCs aktivierte KKS sowie die MCP-1- / CCR2-Signalkaskade eine entscheidende Rolle.

Zur Charakterisierung der ausgewählten molekularen Marker wurde zunächst ein THP-1 Zell-Stimulationsmodell entwickelt, um Expressionsanalysen unter kontrollierten Bedingungen durchzuführen. Dieses Modell erlaubte die Analyse der Kurzzeiteffekte (60 Minuten) von unterschiedlichen stimulatorischen Reizen auf die Expression proarteriogener Markergene in einer humanen Monozyten-Zelllinie. Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Expressionsänderungen flossen in die Auswertung der anschließend durchgeführten Gefäßsport-Studie mit ein.

In der durchgeführten Gefäßsport-Studie wurden 26 junge (Alter 18 – 35 Jahre, mittleres Alter $23,37 \pm 1,85$ Jahre) gesunde Probanden im Abstand von mindestens einer Woche aktivem (Laufbandtraining) und passivem (ECP-Training) Gefäßsport unterzogen. Vor und nach dem jeweiligen Gefäßsport wurde Blut entnommen, aus dem direkt

Zusammenfassung

im Anschluss mittels Ficoll-Paque Dichtegradientenzentrifugation PBMCs isoliert wurden. Diese wurden aliquotiert, auf Trockeneis schockgefroren und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Nach Gewinnung von cDNA aus isolierter mRNA erfolgte die Expressionsanalyse durch qRT-PCR. Die für die qRT-PCR verwendeten DNA-Primer wurden nach den Gensequenzen der ausgewählten Arteriogenese-Biomarker entworfen. Die anschließende SPSS- und R-gestützte statistische Auswertung erfolgte unter Relativierung der absoluten Regulation gegen RPLPO als Housekeeping Gen.

Die Auswertung der Expressionsanalyse nach THP-1 Zell-Stimulation zeigte eine signifikant hochregulierte Expression von MCP-1 (Median 5,19, $p = 0,007$) nach Stimulation durch LPS, während CCR2 (Median 0,52, $p = 0,030$) nach Stimulation mit Lys-Bradykinin signifikant herunterreguliert wurde. Diese Ergebnisse lassen sich als durch LPS und Lys-Bradykinin hervorgerufene beginnende Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen deuten. Die Stimulation von THP-1 Zellen mittels unterschiedlichen G-CSF-Konzentrationen ergaben eine signifikante (50 ng/ml, Median 1,74, $p = 0,046$) bzw. tendenzielle, jedoch nicht signifikante (100 ng/ml, Median 1,73, $p = 0,054$) Hochregulation der Kallikrein-Expression.

Der Vergleich des Expressionsmusters aus Vollblut isolierter PBMCs gesunder Probanden vor und nach aktivem oder passivem Gefäßsport ergab – mit Ausnahme von B1R – eine generelle Tendenz zur Herunterregulation der in dieser Arbeit untersuchten Gene. So war die B2R-Expression nach passivem Gefäßsport signifikant herunterreguliert (Median 0,68, $p = 0,021$), während die B1R-Expression signifikant (Median 1,83, $p = 0,035$) hochreguliert wurde. Auch die MCP-1- und CCR2-Expression war nach passivem Gefäßsport zwar nicht signifikant, jedoch tendenziell herunterreguliert (MCP-1: Median 0,74, $p = 0,094$, CCR2: Median 0,91, $p = 0,091$). Diese Ergebnisse sind vereinbar mit der vorbeschriebenen anti-arteriosklerotischen Wirkung von Gefäßsport. Die Bedeutung der sich zeigenden, gegenläufig erscheinenden Regulation von B1R- und B2R-Expression nach aktivem und passivem Gefäßsport für die Induktion von Arteriogenese bzw. die Prävention von Arteriosklerose muss noch weiter eruiert werden. Interessant ist hier eine mögliche Hochregulation der B1R-Expression nach passivem Trai-

Zusammenfassung

ning, da speziell für B1R exprimierende PBMCs eine pro-arteriogene Wirkung nachgewiesen wurde.

In Zusammenschau der Ergebnisse zeigt diese Studie erstmals im direkten Vergleich einen Effekt von aktivem und passivem Gefäßsport auf Arteriogenese-relevante Parameter. Die nach beiden Therapieformen gleichermaßen feststellbare Herunterregulation der hier untersuchten Parameter aus KKS und MCP-1- / CCR2-Signalkaskade kann im Sinne eines anti-arteriosklerotischen Effekts gewertet werden und legt somit eine in ihrer Ausprägung vergleichbare protektive Wirkung beider Gefäßsportarten auf das kardiovaskuläre System nahe. Damit schafft diese Studie eine Basis zur weiteren molekularen Erforschung der Vergleichbarkeit von konventionellem und passivem Gefäßsport mit dem Ziel, in Zukunft die Therapie kardiovaskulär erkrankter Patienten durch etablierte molekulare, diagnostische Marker effektiver gestalten zu können.

7 Verzeichnisse

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A.	lat. arteria
Aa.	lat. arteriae
ACE	engl. Angiotensin Converting Enzyme
Art.Nr.	Artikelnummer
B1R	engl. bradykinin receptor B1
B2R	engl. bradykinin receptor B2
CCR2	C-C Chemokin-Rezeptor 2
cDNA	engl. complementary DNA
Ct	engl. Cycle Threshold
DNA	engl. Desoxyribonucleic acid
EC	Endothelzelle(n)
ECP	engl. External Counterpulsation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
et al.	lat. et alii / et aliae / et alia
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	engl. Fluorescence activated cell sorting
FBS	engl. Fetal Bovine Serum
g	Einheit für Erdanziehungskraft
G-CSF	engl. Granulocyte-Colony stimulating Factor
GM-CSF	engl. Granulocyte-Monocyte-Colony stimulating Factor
HbA _{1c}	Glykohämoglobin A _{1c}
HDL	engl. High-Density Lipoprotein
HMW-Kininogen	engl. High Molecular Weight Kininogen
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
ISRCTN	engl. International Standard Randomised Controlled Trial

Verzeichnisse

	Number
ISRT	engl. Individual Shear Rate Therapy
KKS	Kallikrein-Kinin-System
LDL	engl. Low-Density Lipoprotein
LMW-Kininogen	engl. Low Molecular Weight Kininogen
LPS	Bakterielles Lipopolysaccharid
MAPK	engl. Mitogen-activated protein-Kinase
MCP-1	engl. Monocyte chemoattractant Protein 1
min	Minuten
MMP	Matrix-Metalloproteasen
NF- κ B	engl. Nuclear Factor κ B
NO	Stickstoff-Monoxid
PLC	Phospholipase C
PBMC	engl. Peripheral Blood Mononuclear Cells
qRT-PCR	engl. Quantitative Real-Time-Polymerase Chain Reaction
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	engl. Ribonucleid acid
RPLP0	engl. Acidic ribosomal phosphoprotein P0
RPMI	engl. Roswell Park Memorial Institute
sek	Sekunden
siRNA	engl. small interfering RNA
TH	T-Helferzellen
TLR	engl. Toll-like Rezeptor
TNF- α	engl. Tumor Necrosis Factor α
VEGF	engl. Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	engl. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
WHO	engl. World Health Organisation

7.2 Literaturverzeichnis

1. Todesursachen in Deutschland 2014. Fachserie 12 Reihe 4. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt; 15.12.2015.
2. Mackay J, Mensah GA, Mendis S, Greenlund K. The Atlas of Heart Disease and Stroke. Geneva: World Health Organization; 2004.

Verzeichnisse

3. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. Geneva: World Health Organization; 2011.
4. Jennings RB, Murry CE, Steenbergen C, Jr., Reimer KA. Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation* 1990;82:112-12.
5. Allen EV, Pruitt RD, Silber EN, Katz LN, Stamper J. Recent Myocardial Infarction. *Circulation* 1953;7:445-454.
6. Fung E, Helisch A. Macrophages in collateral arteriogenesis. *Frontiers in Physiology* 2012;3:353.
7. Virchow R. Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. Berlin; 1858.
8. Thoma R. Ueber die Genese und die Lokalisationen der Arteriosklerose. *Virchows Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin* 1923;245:78-122.
9. Classification of atherosclerotic lesions: report of a study group (meeting held in Washington, D.C. from 7 to 11 October 1957). Geneva: World Health Organization; 1958.
10. Syverson D. Theorien zur Pathogenese der Arteriosklerose. Berlin: Charité - Universitätsmedizin Berlin; 2013.
11. McMillan GC. Atherosclerotic disease and the vessel wall. *Experimental and Molecular Pathology* 1979;31:163-168.
12. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circulation Research* 2014;114:1852-1866.
13. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011;473:317-325.
14. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 2011;145:341-355.
15. Zucker H, Dean D, Guay-Broder C, Kousvelari E, Kelley C, Watson J, Zimmerberg J, Durfor C, Fink D, Frey J, Goodman J, Weber D, Witten C, Bielitzki J, Goldblatt M, Rudolph JDA, Col. Vandre R, Davison S, Pellis N, Hight-Walker A, Heineken F, Roco M. 2020: A New Vision
A Future for Regenerative Medicine. Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Services; 2005.

16. Bondke Persson A, Buschmann EE, Lindhorst R, Troidl K, Langhoff R, Schulte KL, Buschmann I. Therapeutic arteriogenesis in peripheral arterial disease: combining intervention and passive training. *Vasa* 2011;40:177-187.
17. Persson AB, Buschmann IR. Vascular growth in health and disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2011;4:14.
18. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine* 2000;6:389-395.
19. Buschmann EE, Utz W, Pagonas N, Schulz-Menger J, Busjahn A, Monti J, Maerz W, le Noble F, Thierfelder L, Dietz R, Klauss V, Gross M, Buschmann IR, Arteriogenesis N. Improvement of fractional flow reserve and collateral flow by treatment with external counterpulsation (Art.Net.-2 Trial). *European Journal of Clinical Investigation* 2009;39:866-875.
20. Dülsner A, Gatzke N, Glaser J, Hillmeister P, Li M, Lee EJ, Lehmann K, Urban D, Meyborg H, Stawowy P, Busjahn A, Nagorka S, Persson AB, Buschmann IR. Acetylsalicylic acid, but not clopidogrel, inhibits therapeutically induced cerebral arteriogenesis in the hypoperfused rat brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2012;32:105-114.
21. Kanlop N, Thommasorn S, Palee S, Weerateerangkul P, Suwansirikul S, Chattipakorn S, Chattipakorn N. Granulocyte colony-stimulating factor stabilizes cardiac electrophysiology and decreases infarct size during cardiac ischaemic/reperfusion in swine. *Acta Physiol (Oxf)* 2011;202:11-20.
22. Heil M, Schaper W. Influence of Mechanical, Cellular, and Molecular Factors on Collateral Artery Growth (Arteriogenesis). *Circulation Research* 2004;95:449-458.
23. Shyy YJ, Hsieh HJ, Usami S, Chien S. Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994;91:4678-4682.
24. Troidl C, Jung G, Troidl K, Hoffmann J, Mollmann H, Nef H, Schaper W, Hamm CW, Schmitz-Rixen T. The Temporal and Spatial Distribution of Macrophage Subpopulations During Arteriogenesis. *Current Vascular Pharmacology* 2013;11:5-12.
25. Buschmann IR, Hofer IE, van Royen N, Katzer E, Braun-Dulleaus R, Heil M, Kostin S, Bode C, Schaper W. GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis* 2001;159:343-356.

26. Hillmeister P, Lehmann KE, Bondke A, Witt H, Duelsner A, Gruber C, Busch HJ, Jankowski J, Ruiz-Noppinger P, Hossmann KA, Buschmann IR. Induction of cerebral arteriogenesis leads to early-phase expression of protease inhibitors in growing collaterals of the brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2008;28:1811-1823.
27. Dülsner A, Gatzke N, Glaser J, Hillmeister P, Li M, Lee EJ, Lehmann K, Urban D, Meyborg H, Stawowy P, Busjahn A, Nagorka S, Persson AB, Laage R, Schneider A, Buschmann IR. Granulocyte colony-stimulating factor improves cerebrovascular reserve capacity by enhancing collateral growth in the circle of Willis. *Cerebrovascular Diseases* 2012;33:419-429.
28. Schierling W, Troidl K, Troidl C, Schmitz-Rixen T, Schaper W, Eitenmüller IK. The role of angiogenic growth factors in arteriogenesis. *Journal of Vascular Research* 2009;46:365-374.
29. Regensteiner JG, Meyer TJ, Krupski WC, Cranford LS, Hiatt WR. Hospital vs home-based exercise rehabilitation for patients with peripheral arterial occlusive disease. *Angiology* 1997;48:291-300.
30. Ingber DE. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *Journal of Cell Science* 2003;116:1157-1173.
31. Ingber DE. Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *Journal of Cell Science* 2003;116:1397-1408.
32. Ingber DE. Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. *Circulation Research* 2002;91:877-887.
33. Tripmacher R. Untersuchungen zu Wirkungen einer eingeschränkten Energiesynthese auf Funktionen von humanen Immunzellen. Berlin: Charité - Universitätsmedizin Berlin; 2005.
34. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* 2004;25:677-686.
35. Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, Kostin S, Martin S, Clauss M, Schaper W. Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 2002;283:H2411-2419.
36. Schachter M. Kallikreins (Kininogenases) - A Group of Serine Proteases with Bioregulatory Actions. *Pharmacological Reviews* 1979;31:1-17.

37. Bader M. Kallikrein-Kinin System in Neovascularization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2009;29:617-619.
38. Kaschina E, Stoll M, Sommerfeld M, Steckelings UM, Kreutz R, Unger T. Genetic kininogen deficiency contributes to aortic aneurysm formation but not to atherosclerosis. *Physiol Genomics* 2004;19:41-49.
39. Hillmeister P, Persson PB. The Kallikrein-Kinin system. *Acta Physiol (Oxf)* 2012;206:215-219.
40. Magerl M, Bader M, Gompel A, Joseph K, Kaplan AP, Kojda G, Renné T, Wirth M, Maurer M, Church MK. Bradykinin in health and disease: proceedings of the Bradykinin Symposium 2012, Berlin 23-24 August 2012. *Inflammation Research* 2014;63:173-178.
41. Rodrigues ES, Silva RF, Martin RP, Oliveira SM, Nakaie CR, Sabatini RA, Merino VF, Pesquero JB, Bader M, Shimuta SI. Evidence that kinin B2 receptor expression is upregulated by endothelial overexpression of B1 receptors. *Peptides* 2013;42:1-7.
42. Holzer P. Acid sensing by visceral afferent neurones. *Acta Physiol (Oxf)* 2011;201:63-75.
43. Duchene J, Cayla C, Vessillier S, Scotland R, Yamashiro K, Lecomte F, Syed I, Vo P, Marrelli A, Pitzalis C, Cipollone F, Schanstra J, Bascands JL, Hobbs AJ, Perretti M, Ahluwalia A. Laminar Shear Stress Regulates Endothelial Kinin B1 Receptor Expression and Function: Potential Implication in Atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2009;29:1757-1763.
44. Stein JH, Congbalay RC, Karsh DL, Osgood RW, Ferris TF. The Effect of Bradykinin on Proximal Tubular Sodium Reabsorption in the Dog: Evidence for Functional Nephron Heterogeneity. *Journal of Clinical Investigation* 1972;51:1709-1721.
45. Wang Y, Yang JN, Arner A, Boels PJ, Fredholm BB. Adenosine A(1) receptors and vascular reactivity. *Acta Physiol (Oxf)* 2010;199:211-220.
46. Silvestre JS, Bergaya S, Tamarat R, Duriez M, Boulanger CM, Levy BI. Proangiogenic Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Is Mediated by the Bradykinin B2 Receptor Pathway. *Circulation Research* 2001;89:678-683.
47. Dahl TD, Hultström M, Iversen BM, Helle F. Adenosine sensitization after angiotensin II stimulation in afferent arterioles from normal rats does not occur during two-kidney, one-clip hypertension. *Acta Physiol (Oxf)* 2011;201:289-294.

48. Duchene J, Ahluwalia A. The kinin B1 receptor and inflammation: new therapeutic target for cardiovascular disease. *Current Opinion in Pharmacology* 2009;9:125-131.
49. Phillips RJ, Lutz M, Premack B. Differential signaling mechanisms regulate expression of CC chemokine receptor-2 during monocyte maturation. *J Inflamm (Lond)* 2005;2:14.
50. Heil M, Ziegelhoeffer T, Wagner S, Fernández B, Helisch A, Martin S, Tribulova S, Kuziel WA, Bachmann G, Schaper W. Collateral Artery Growth (Arteriogenesis) After Experimental Arterial Occlusion Is Impaired in Mice Lacking CC-Chemokine Receptor-2. *Circulation Research* 2004;94:671–677.
51. Fantuzzi L, Borghi P, Ciolli V, Pavlakis G, Belardelli F, Gessani S. Loss of CCR2 Expression and Functional Response to Monocyte Chemotactic Protein (MCP-1) During the Differentiation of Human Monocytes: Role of Secreted MCP-1 in the Regulation of the Chemotactic Response. *Blood* 1999;94:875-883.
52. Prior BM, Lloyd PG, Yang HT, Terjung RL. Exercise-induced vascular remodeling. *Exercise and Sport Sciences Reviews* 2003;31:26-33.
53. Emanuelli C, Bonaria Salis M, Stacca T, Pintus G, Kirchmair R, Isner JM, Pinna A, Gaspa L, Regoli D, Cayla C, Pesquero JB, Bader M, Madeddu P. Targeting Kinin B1 Receptor for Therapeutic Neovascularization. *Circulation* 2002;105:360-366.
54. Kränkel N, Madeddu P. Helping the circulatory system heal itself: manipulating kinin signaling to promote neovascularization. *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 2009;7:215-219.
55. Hillmeister P, Gatzke N, Dulsner A, Bader M, Schadock I, Hoefler I, Hamann I, Infante-Duarte C, Jung G, Troidl K, Urban D, Stawowy P, Frentsch M, Li M, Nagorka S, Wang H, Shi Y, le Noble F, Buschmann IR. Arteriogenesis is modulated by bradykinin receptor signaling. *Circulation Research* 2011;109:524-533.
56. Smith RS, Jr., Gao L, Chao L, Chao J. Tissue kallikrein and kinin infusion promotes neovascularization in limb ischemia. *Biological Chemistry* 2008;389:725-730.
57. Stone OA, Richer C, Emanuelli C, van Weel V, Quax PH, Katare R, Kränkel N, Campagnolo P, Barcelos LS, Siragusa M, Sala-Newby GB, Baldessari D, Mione M, Vincent MP, Benest AV, Al Haj Zen A, Gonzalez J, Bates DO, Alhenc-Gelas F, Madeddu P. Critical Role of Tissue Kallikrein in Vessel Formation and Maturation:

Implications for Therapeutic Revascularization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2009;29:657-664.

58. Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circulation Research* 1997;80:829-837.

59. Charo IF, Peters W. Chemokine Receptor 2 (CCR2) in Atherosclerosis, Infectious Diseases, and Regulation of T-Cell Polarization. *Microcirculation* 2003;10:259-264.

60. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998;394:894-897.

61. Schirmer SH, Buschmann IR, Jost MM, Hofer IE, Grundmann S, Andert JP, Ullrich S, Bode C, Piek JJ, van Royen N. Differential effects of MCP-1 and leptin on collateral flow and arteriogenesis. *Cardiovascular Research* 2004;64:356-364.

62. Voskuil M, Hofer IE, van Royen N, Hua J, de Graaf S, Bode C, Buschmann IR, Piek JJ. Abnormal monocyte recruitment and collateral artery formation in monocyte chemoattractant protein-1 deficient mice. *Vascular Medicine* 2004;9:287-292.

63. Ensembl Genome Browser. 2014, at <http://www.ensembl.org/index.html>.)

64. Cunningham F, Amode MR, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S, Carvalho-Silva D, Clapham P, Coates G, Fitzgerald S, Gil L, Giron CG, Gordon L, Hourlier T, Hunt SE, Janacek SH, Johnson N, Juettemann T, Kahari AK, Keenan S, Martin FJ, Maurel T, McLaren W, Murphy DN, Nag R, Overduin B, Parker A, Patricio M, Perry E, Pignatelli M, Riat HS, Sheppard D, Taylor K, Thormann A, Vullo A, Wilder SP, Zadissa A, Aken BL, Birney E, Harrow J, Kinsella R, Muffato M, Ruffier M, Searle SM, Spudich G, Trevanion SJ, Yates A, Zerbino DR, Flicek P. Ensembl 2015. *Nucleic Acids Research* 2014.

65. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 2007;23:1289-1291.

66. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 2012;40:e115.

67. R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. . R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, at <https://www.R-project.org/>.)

68. Tangirala RK, Murao K, Quehenberger O. Regulation of expression of the human monocyte chemotactic protein-1 receptor (hCCR2) by cytokines. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272:8050-8056.
69. Hillmeister P, Gatzke N, Dülsner A, Bader M, Schadock I, Hoefler I, Hamann I, Infante-Duarte C, Jung G, Troidl K, Urban D, Stawowy P, Frentsch M, Li M, Nagorka S, Wang H, Shi Y, le Noble F, Buschmann IR. Arteriogenesis Is Modulated By Bradykinin Receptor Signaling. *Circulation Research* 2011;109:524-533.
70. Bockmann S, Paegelow I. Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 2000;68:587-592.
71. Kränkel N, Kuschnerus K, Müller M, Speer T, Mocharla P, Madeddu P, Bader M, Lüscher TF, Landmesser U. Novel Insights Into the Critical Role of Bradykinin and the Kinin B2 Receptor for Vascular Recruitment of Circulating Endothelial Repair-Promoting Mononuclear Cell Subsets: Alterations in Patients With Coronary Disease. *Circulation* 2013;127:594-603.
72. Blaes N, Girolami JP. Targeting the 'Janus face' of the B2-bradykinin receptor. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2013;17:1145-1166.
73. Candelario J, Chachisvilis M. Activity of Bradykinin B Receptor Is Regulated by Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids. *PloS One* 2013;8:e68151.
74. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the Kinin Receptor Family: from Molecular Mechanisms to Pathophysiological Consequences. *Pharmacological Reviews* 2005;57:27-77.
75. Sakamoto H, Aikawa M, Hill CC, Weiss D, Taylor WR, Libby P, Lee RT. Biomechanical Strain Induces Class A Scavenger Receptor Expression in Human Monocyte/Macrophages and THP-1 Cells: A Potential Mechanism of Increased Atherosclerosis in Hypertension. *Circulation* 2001;104:109-114.
76. Chanput W, Mes J, Vreeburg RA, Savelkoul HF, Wichers HJ. Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: a tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. *Food Funct* 2010;1:254-261.
77. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology* 2014.

78. Hoefler IE, Grundmann S, van Royen N, Voskuil M, Schirmer SH, Ulusans S, Bode C, Buschmann IR, Piek JJ. Leukocyte subpopulations and arteriogenesis: Specific role of monocytes, lymphocytes and granulocytes. *Atherosclerosis* 2005;181:285-293.
79. Bergaya S, Meneton P, Bloch-Faure M, Mathieu E, Alhenc-Gelas F, Lévy BI, Boulanger CM. Decreased Flow-Dependent Dilation in Carotid Arteries of Tissue Kallikrein-Knockout Mice. *Circulation Research* 2001;88:593-599.
80. Janke D, Jankowski J, R uth M, Buschmann IR, Lemke HD, Jacobi D, Knaus P, Spindler E, Zidek W, Lehmann K, Jankowski V. The "Artificial Artery" as In Vitro Perfusion Model. *PloS One* 2013;8:e57227.
81. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, Hiratzka LF, Murphy WR, Olin JW, Puschett JB, Rosenfield KA, Sacks D, Stanley JC, Taylor LM, Jr., White CJ, White J, White RA, Antman EM, Smith SC, Jr., Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Gibbons RJ, Hunt SA, Jacobs AK, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B, American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular S, Society for Cardiovascular A, Interventions, Society for Vascular M, Biology, Society of Interventional R, Guidelines AATFoP. ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients with Peripheral Arterial Disease (Lower Extremity, Renal, Mesenteric, and Abdominal Aortic): a collaborative report from the American Associations for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (writing committee to develop guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease)--summary of recommendations. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 2006;17:1383-1397; quiz 1398.
82. Braith RW, Conti CR, Nichols WW, Choi CY, Khuddus MA, Beck DT, Casey DP. Enhanced External Counterpulsation Improves Peripheral Artery Flow-Mediated Dilation in Patients With Chronic Angina: A Randomized Sham-Controlled Study. *Circulation* 2010;122:1612-1620.
83. Thakkar BV, Hirsch AT, Satran D, Bart BA, Barsness G, McCullough PA, Kennard ED, Kelsey SF, Henry TD. The efficacy and safety of enhanced external counterpulsation in patients with peripheral arterial disease. *Vascular Medicine* 2010;15:15-20.

84. Foley WT. Treatment of Gangrene of the Feet and Legs by Walking. *Circulation* 1957;15:689-700.
85. Gardner AW, Poehlman ET. Exercise Rehabilitation Programs for the Treatment of Claudication Pain. A Meta-analysis. *JAMA* 1995;274:975-980.
86. Girolami B, Bernardi E, Prins MH, Ten Cate JW, Hettiarachchi R, Prandoni P, Girolami A, Büller HR. Treatment of Intermittent Claudication With Physical Training, Smoking Cessation, Pentoxifylline, or Nafronyl: A Meta-analysis. *Archives of Internal Medicine* 1999;159:337-345.
87. Pontes FL, Jr., Bacurau RF, Moraes MR, Navarro F, Casarini DE, Pesquero JL, Pesquero JB, Araújo RC, Piçarro IC. Kallikrein kinin system activation in post-exercise hypotension in water running of hypertensive volunteers. *International Immunopharmacology* 2008;8:261-266.
88. Lee CW, Stabile E, Kinnaird T, Shou M, Devaney JM, Epstein SE, Burnett MS. Temporal Patterns of Gene Expression After Acute Hindlimb Ischemia in Mice: Insights Into The Genomic Program For Collateral Vessel Development. *Journal of the American College of Cardiology* 2004;43:474-482.
89. Kränkel N, Katare RG, Siragusa M, Barcelos LS, Campagnolo P, Mangialardi G, Fortunato O, Spinetti G, Tran N, Zacharowski K, Wojakowski W, Mroz I, Herman A, Manning Fox JE, MacDonald PE, Schanstra JP, Bascands JL, Ascione R, Angelini G, Emanuelli C, Madeddu P. Role of kinin B2 receptor signaling in the recruitment of circulating progenitor cells with neovascularization potential. *Circulation Research* 2008;103:1335-1343.
90. Hansson GK, Libby P, Tabas I. Inflammation and plaque vulnerability. *Journal of Internal Medicine* 2015.
91. Tang J, Lobatto ME, Hassing L, van der Staay S, van Rijs SM, Calcagno C, Braza MS, Baxter S, Fay F, Sanchez-Gaytan BL, Duivenvoorden R, Sager H, Astudillo YM, Leong W, Ramachandran S, Storm G, Perez-Medina C, Reiner T, Cormode DP, Strijkers GJ, Stroes ES, Swirski FK, Nahrendorf M, Fisher EA, Fayad ZA, Mulder WJ. Inhibiting macrophage proliferation suppresses atherosclerotic plaque inflammation. *Sci Adv* 2015;1.
92. Serra AJ, Santos MH, Bocalini DS, Antônio EL, Levy RF, Santos AA, Higuchi ML, Silva JA, Magalhães FC, Baraúna VG, Krieger JE, Tucci PJ. Exercise training inhibits

inflammatory cytokines and more than prevents myocardial dysfunction in rats with sustained beta-adrenergic hyperactivity. *Journal of Physiology* 2010;588:2431-2442.

93. Silva JA, Jr., Santana ET, Manchini MT, Antônio EL, Bocalini DS, Krieger JE, Tucci PJ, Serra AJ. Exercise Training Can Prevent Cardiac Hypertrophy Induced by Sympathetic Hyperactivity with Modulation of Kallikrein-Kinin Pathway and Angiogenesis. *PloS One* 2014;9:e91017.

94. Touati S, Montezano AC, Meziri F, Riva C, Touyz RM, Laurant P. Exercise training protects against atherosclerotic risk factors through vascular NADPH oxidase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase downregulation in obese rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2015;42:179-185.

95. Roseguini BT, Arce-Esquivel AA, Newcomer SC, Yang HT, Terjung R, Laughlin MH. Intermittent pneumatic leg compressions enhance muscle performance and blood flow in a model of peripheral arterial insufficiency. *J Appl Physiol (1985)* 2012;112:1556-1563.

96. Brix M, Buschmann EE, Zietzer A, Jaurigue JA, Li L, Jungk C, Buschmann I, Janke D, Hillmeister P. Long-term individual shear rate therapy counterpulsation enhances plasma nitrite release in patients with PAD. *Vasa* 2016:1-9.

97. van Royen N, Piek JJ, Buschmann IR, Hofer I, Voskuil M, Schaper W. Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovascular Research* 2001;49:543-553.

98. Schaper W. Collateral circulation: Past and present. *Basic Research in Cardiology* 2009;104:5-21.

99. Aires L, Silva G, Martins C, Marques E, Lagoa MJ, Ribeiro JC, Rêgo C, Nascimento H, Pereira PR, Santos-Silva A, Belo L, Mota J. Exercise intervention and cardiovascular risk factors in obese children. Comparison between obese youngsters taking part in a physical activity school-based programme with and without individualised diet counselling: the ACORDA project. *Annals of Human Biology* 2015:1-8.

100. Hur S, Kim SR. The Effects of Exercise Therapy on CVD Risk Factors in Women. *J Phys Ther Sci* 2014;26:1367-1370.

101. Zietzer A, Buschmann EE, Janke D, Li L, Brix M, Meyborg H, Stawowy P, Jungk C, Buschmann I, Hillmeister P. Acute physical exercise and long-term individual shear

rate therapy increase telomerase activity in human peripheral blood mononuclear cells. *Acta Physiol (Oxf)* 2016.

102. Gjevestad GO, Holven KB, Ulven SM. Effects of Exercise on Gene Expression of Inflammatory Markers in Human Peripheral Blood Cells: A Systematic Review. *Current Cardiovascular Risk Reports* 2015;9:34.

103. Brunelli DT, Chacon-Mikahil MP, Gáspari AF, Lopes WA, Bonganha V, Bonfante IL, Bellotto ML, Libardi CA, Cavaglieri CR. Combined Training Reduces Subclinical Inflammation in Obese Middle-Age Men. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2015;47:2207-2215.

104. Heaney JL, Phillips AC, Drayson MT, Campbell JP. Serum free light chains are reduced in endurance trained older adults: Evidence that exercise training may reduce basal inflammation in older adults. *Experimental Gerontology* 2016.

105. Kennedy MD, Davidson WJ, Wong LE, Traves SL, Leigh R, Eves ND. Airway inflammation, cough and athlete quality of life in elite female cross-country skiers: A longitudinal study. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports* 2015.

106. Connolly PH, Caiozzo VJ, Zaldivar F, Nemet D, Larson J, Hung SP, Heck JD, Hatfield GW, Cooper DM. Effects of exercise on gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. *J Appl Physiol (1985)* 2004;97:1461-1469.

107. Kimsa MC, Strzalka-Mrozik B, Kimsa MW, Gola J, Kochanska-Dziurawicz A, Zebrowska A, Mazurek U. Differential Expression of Inflammation-related Genes after Intense Exercise. *Prague Medical Report* 2014;115:24-32.

108. Kemmler W, Scharf M, Lell M, Petrasek C, von Stengel S. High versus Moderate Intensity Running Exercise to Impact Cardiometabolic Risk Factors: The Randomized Controlled RUSH-Study. *Biomed Res Int* 2014;2014:843095.

109. Werner C, Fürster T, Widmann T, Pöss J, Roggia C, Hanhoun M, Scharhag J, Büchner N, Meyer T, Kindermann W, Haendeler J, Böhm M, Laufs U. Physical Exercise Prevents Cellular Senescence in Circulating Leukocytes and in the Vessel Wall. *Circulation* 2009;120:2438-2447.

110. Zietzer A, Hillmeister P. Leucocyte telomere length as marker for cardiovascular ageing. *Acta Physiol (Oxf)* 2014;211:251-256.

111. Colleran PN, Li Z, Yang HT, Laughlin MH, Terjung RL. Vasoresponsiveness of collateral vessels in the rat hindlimb: influence of training. *Journal of Physiology* 2010;588:1293-1307.

112. Prior BM, Yang HT, Terjung RL. What makes vessels grow with exercise training? *J Appl Physiol* (1985) 2004;97:1119-1128.
113. Lawson WE, Hui JC, Kennard ED, Linnemeier G. Enhanced External Counterpulsation Is Cost-Effective in Reducing Hospital Costs in Refractory Angina Patients. *Clinical Cardiology* 2015;38:344-349.
114. Beck DT, Martin JS, Casey DP, Avery JC, Sardina PD, Braith RW. Enhanced external counterpulsation improves endothelial function and exercise capacity in patients with ischaemic left ventricular dysfunction. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2014;41:628-636.
115. Martin JS, Beck DT, Aranda JM, Jr., Braith RW. Enhanced external counterpulsation improves peripheral artery function and glucose tolerance in subjects with abnormal glucose tolerance. *J Appl Physiol* (1985) 2012;112:868-876.
116. Arora RR, Chou TM, Jain D, Fleishman B, Crawford L, McKiernan T, Nesto RW. The Multicenter Study of Enhanced External Counterpulsation (MUST-EECP): Effect of EECP on Exercise-Induced Myocardial Ischemia and Anginal Episodes. *Journal of the American College of Cardiology* 1999;33:1833-1840.
117. Yang DY, Wu GF. Vasculoprotective properties of enhanced external counterpulsation for coronary artery disease: Beyond the hemodynamics. *International Journal of Cardiology* 2013;166:38-43.
118. Zhang Y, He X, Liu D, Wu G, Chen X, Ma H, Du Z, Dong Y, Jin Y, He W, Wang K, Lawson WE, Hui JC, Zheng Z. Enhanced External Counterpulsation Attenuates Atherosclerosis Progression Through Modulation of Proinflammatory Signal Pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2010;30:773-780.
119. Casey DP, Conti CR, Nichols WW, Choi CY, Khuddus MA, Braith RW. Effect of Enhanced External Counterpulsation on Inflammatory Cytokines and Adhesion Molecules in Patients With Angina Pectoris and Angiographic Coronary Artery Disease. *American Journal of Cardiology* 2008;101:300-302.

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Anzahl der in Deutschland im Jahr 2014 Gestorbenen nach ausgewählten Todesursachen. Adaptiert nach ¹	11
Abbildung 2	Darstellung der prinzipiellen Mechanismen der Arteriogenese. Adaptiert nach ¹⁷	14
Abbildung 3	Darstellung ausgewählter Mechanismen des Kallikrein-Kinin-Systems	20
Abbildung 4	Darstellung ausgewählter Mechanismen der MCP-1-Wirkung auf im Blut zirkulierende Monozyten. Adaptiert nach ⁵¹	21
Abbildung 5	Darstellung der Beimpfung einer 6-Well-Platte gemäß des THP-1 Zell-Stimulationsansatzes	29
Abbildung 6	Schichtung nach Zentrifugation von verdünntem Vollblut mit Ficoll-Paque PLUS	30
Abbildung 7	Darstellung der Versuchsanordnung nach dem Cross-Over-Prinzip	36
Abbildung 8	Kallikrein-Expressionsänderung von THP-1 Zellen nach Stimulation mittels verschiedener Agentien	41
Abbildung 9	B1R-Expressionsänderung von THP-1 Zellen nach Stimulation mittels verschiedener Agentien	42
Abbildung 10	B2R-Expressionsänderung von THP-1 Zellen nach Stimulation mittels verschiedener Agentien	43
Abbildung 11	MCP-1-Expressionsänderung von THP-1 Zellen nach Stimulation mittels verschiedener Agentien	44
Abbildung 12	CCR2-Expressionsänderung von THP-1 Zellen nach Stimulation mittels verschiedener Agentien	45
Abbildung 13	Kallikrein-Expressionsänderung von PBMCs nach passivem und aktivem Gefäßsport	46
Abbildung 14	Kininogen-Expressionsänderung von PBMCs nach passivem und aktivem Gefäßsport	47
Abbildung 15	B1R-Expressionsänderung von PBMCs nach passivem und aktivem Gefäßsport	48
Abbildung 16	B2R-Expressionsänderung von PBMCs nach passivem	49

Verzeichnisse

	und aktivem Gefäßsport	
Abbildung 17	MCP-1-Expressionsänderung von PBMCs nach passivem und aktivem Gefäßsport	50
Abbildung 18	CCR2-Expressionsänderung von PBMCs nach passivem und aktivem Gefäßsport	51

7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Tabellarische Auflistung der verwendeten Materialien	25ff
Tabelle 2	Expressionsänderungen nach THP-1-Zell-Stimulation	40
Tabelle 3	Expressionsänderungen nach passivem und aktivem Gefäßsport	40

8 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Constantin Clemens Benedict Jungk, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Molekulare Untersuchung der Akuteffekte von aktivem und passivem Gefäßsport auf die Expression von Arteriogenese-Biomarkern in zirkulierenden mononukleären Zellen des peripheren Blutes“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Constantin Clemens Benedict Jungk hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Zietzer A, Brix M, Janke D, **Jungk C**, Buschmann I, Buschmann E, Hillmeister P. The molecular effect of personal shear rate therapy on vascular-biology. 43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Angiologie (P 5.2). Hamburg, 05.09.2014

Beitrag im Einzelnen:

Gemeinsame Planung der PSRT-1-Studie sowie gemeinsames Erstellen des Ethikantrags, vorbereitende Arbeiten (Primerherstellung und –testung, Methodenentwicklung etc.), Einbestellung und Vorbereitung der Probanden, engmaschige Überwachung des passiven sowie des aktiven Gefäßsports, Durchführung der Blutentnahmen und Probenaufbereitung, Genanalyse von Kallikrein, Kininogen, B1R und B2R für die PSRT-1-Studie.

Publikation 2:

Zietzer A, Buschmann EE, Janke D, Li L, Brix M, Meyborg H, Stawowy P, **Jungk C**, Buschmann I, Hillmeister P. Acute physical exercise and long-term individual shear rate therapy increase telomerase activity in human peripheral blood mononuclear cells. Acta Physiol (Oxf) 2016.

Beitrag im Einzelnen:

Gemeinsame Planung der PSRT-1-Studie sowie gemeinsames Erstellen des Ethikantrags, Einbestellung und Vorbereitung der Probanden, Probanden, engmaschige Überwachung des passiven sowie des aktiven Gefäßsports, Durchführung der Blutentnahmen und Probenaufbereitung

Eidesstattliche Versicherung

Publikation 3:

Brix M, Buschmann EE, Zietzer A, Jaurigue JA, Li L, **Jungk C**, Buschmann I, Janke D, Hillmeister P. Long-term individual shear rate therapy counterpulsation enhances plasma nitrite release in patients with PAD. *Vasa* 2016:1-9.

Beitrag im Einzelnen

Siehe Publikation 1

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

9 Lebenslauf

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

10 Teilpublikationen

Brix M, Buschmann EE, Zietzer A, Jaurigue JA, Li L, **Jungk C**, Buschmann I, Janke D, Hillmeister P. Long-term individual shear rate therapy counterpulsation enhances plasma nitrite release in patients with PAD. *Vasa* 2016:1-9.

Zietzer A, Buschmann EE, Janke D, Li L, Brix M, Meyborg H, Stawowy P, **Jungk C**, Buschmann I, Hillmeister P. Acute physical exercise and long-term individual shear rate therapy increase telomerase activity in human peripheral blood mononuclear cells. *Acta Physiol (Oxf)* 2016.

Posterpublikationen

Zietzer A., Brix M., Janke D., **Jungk C.**, Buschmann I., Buschmann E., Hillmeister P. The molecular effect of personal shear rate therapy on vascular-biology. 43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Angiologie (P 5.2). Hamburg, 05.09.2014.

Danksagung

11 Danksagung

Meine Danksagung wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.