

Aus dem

Charité Centrum für Innere Medizin

Klinik für Kardiologie und Pulmologie

Direktor: Prof. Dr. med. H.-P. Schultheiss

Habilitationsschrift

ENDOTHELIALE REGULATION:

UNTERSUCHUNGEN ZU HUMORALEN UND ZELLULÄREN FAKTOREN DER
ENDOTHELIALEN SCHÄDIGUNG UND REGENERATION

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Caroline Schmidt-Lucke

Eingereicht: April 2010

Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter/in:

2. Gutachter/in:

“...Bei Angiospasmen taucht wiederum die Frage auf, was Ursache und was Wirkung ist, ob sich ein Circulus vitiosus entwickelt, der die Gefäßkrämpfe vermehrt und die sklerotischen Veränderungen fortschreiten lässt....

Der Schwerpunkt der Arteriosklerosefolgen liegt zweifellos im peripheren Stromgebiet. Hierzu gehört auch der Coronarkreislauf,... ”

Prof. Dr. med. Hans Lucke

Aus: Grundzüge der Pathologischen Physiologie, Springer-Verlag, Berlin, 1934

„...Donc il n'est pas vrais,... qu'on guérisse une plaie d'artillerie par l'application d'une souris rôtie, qu'un jeune sang convenablement infusé rende la jeunesse à de vieilles veines ;...

Victor Hugo

Aus : Notre-Dame de Paris, 1831

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Das Endothel	5
1.2	Bedeutung der Endothelprogenitorzell-vermittelten endothelialen Regeneration für die Pathogenese der Atherosklerose	8
1.3	Rolle von Statinen bei endothelialer Schädigung und Regeneration	9
1.4	Immunologische Faktoren und Endotheldysfunktion	10
1.5	Parvovirus B19 und endotheliale Schädigung und Regeneration	11
2	Ziele und Fragestellungen	13
3	Originalarbeiten	14
3.1	Einfluss von erhöhter Perfusion der Beine auf lösliches VCAM-1 und VEGF bei gesunden Probanden	14
3.2	Konzentrationen von löslichem VCAM-1 und VEGF-Rezeptor (sFlt-1) und deren Endothelfunktion bei gesunden Rauchern	16
3.3	Reduzierte Anzahl zirkulierender Endothelprogenitorzellen beeinflussen zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse: Beweis für die klinische Relevanz des endogenen vaskulären Regenerationsprozesses	17
3.4	Verbesserung des Endothelzellschadens und des endothelialen Regeneration Index bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung nach 4 Wochen Statintherapie	18
3.5	Spezifische Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen in das Transplantat nach Herztransplantation	20
3.6	Interferon-β (IFNβ) moduliert den Endothelzellschaden bei Patienten mit kardialer Persistenz von Parvovirus B19	20
4	Diskussion	21
5	Zusammenfassung	30
6.	Literaturverzeichnis	31
	Danksagung	45
	Curriculum vitae, Stipendien und Auszeichnungen	46
	Erklärung	47

Abkürzungen

ACH	Azetylcholin
ACS	Akutes Koronarsyndrom
AMD	Azetylmedierte Dilatation
B19V	Parvovirus B19
CPC	zirkulierende Progenitorzelle
EC	Endothelzellen
EPC	Endothelprogenitorzelle
Flt-1	fms-like Tyrosinkinase-1
FMD	Flußmedierte Dilatation
HDL	high-density lipoprotein
HIF-1 α	hypoxia induced factor 1 alpha
IFN β	Interferon- β
KHK	koronare Herzerkrankung
LDL	low-density lipoprotein
NMD	Nitroglyzerin-medierte Dilatation
NO	Nitritoxid
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PC	Progenitorzelle
sFlt-1	soluble (lösliche) fms-like Tyrosinkinase-1
SDF-1 α	stromal cell derived factor-1 alpha
SNP	endothelunabhängige Vasodilatation auf Nitroprussid
Treg	regulatorische T-Zellen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1

Einleitung

1.1 Das Endothel

1.1.1 Funktion

Das Endothel ist das größte Organ des Menschen und wiegt in seiner Gesamtheit ca. 1kg, besteht aus ca. 10.000 Milliarden Zellen und bedeckt eine Oberfläche von 4.000-7.000m²¹. Ursprünglich wurde das Endothel als funktionslose Zellreihe angesehen, die die Grenze zwischen Gefäßlumen und Media bildet. Die Bedeutung des Endothels rückte 1980 in den Mittelpunkt der Kreislaufforschung mit der Beobachtung, dass Endothelzellen Stickstoffmonoxid (NO) als generellen Botenstoff synthetisieren². Die intensive Untersuchung von Endothelzellen seit ihrer Entdeckung 1929 haben Aufschlüsse über ihre Funktion und Rolle in der Pathophysiologie von kardiovaskulären Erkrankungen, arterieller Hypertonie, Autoimmunerkrankungen, Vaskulitiden, Kollagenosen und Herzinsuffizienz gebracht.

In den letzten Jahren wurde zudem das Potential der aus dem Knochenmark stammenden Progenitorzellen (PC) zur Regeneration des Endothels intensiv untersucht. Hieraus ergeben sich neue therapeutische Konzepte. Durch ihre strategische Position zwischen Blut und Gewebe regulieren Endothelzellen sowohl immunologische³ als auch nicht-immunologische Vorgänge.

Die Funktion des Endothels umfasst:

- Regulation des Stoffaustausches zwischen Gewebe und Blut,
- Produktion von für die Regulation des Blutdruckes wichtigen Substanzen, z. B. Stickstoffmonoxid (NO) und parakriner Faktoren (Endothelin, Prostaglandine, Endothelium-derived-hyperpolarisation factor).
- Beeinflussung der Aktivierung, Zelladhäsion und Transmigration von Monozyten, Makrophagen, T-Zellen, antigenpräsentierenden Zellen und Granulozyten, sowie Thrombozyten (z. B. Expression und / oder Sekretion von Adhäsionsmolekülen, wie ELAM-1, ICAM-1, VCAM-1, oder Stimulationsfaktoren (LOX, PECAM, Integrine, Selektine).
- Regulation der Lipidaufnahme
- Beeinflussung der Homöostase, Thrombolyse /Fibrinolyse über Bildung von Plasminogen Aktivator (t-PA), Thrombomodulin, Plasminogen Activator Inhibitor (PAI-I), Plättchen-Aktivierender Faktor (PAF) und von-Willebrand-Faktor (vWF).

1.1.2 Biomechanische und humorale Faktoren des Endothels

Alle Veränderungen im Blut – mechanischer Art wie Schubspannung, durch Konzentrationsänderungen vasoaktiver Substanzen bzw. metabolische Faktoren – werden durch das Endothel registriert und als Reaktion an die Gefäßwand weitergeleitet. Für die geometrische Ausrichtung, Wachstum, Produktion von parakrinen Faktoren, Wachstumsfaktoren, Expression von Adhäsionsmolekülen und das Zellüberleben ist der Scherstress des Blutflusses, dem die Endothelzellen kontinuierlich ausgesetzt sind, von entscheidender Bedeutung. Der laminare Scherstress ist im Bereich von Bifurkationen und atherosklerotischen Plaques gestört, wodurch sich das weitere Voranschreiten von atherosklerotischen Plaques erklären lässt. Die durch vaskuläre Einflüsse induzierte Genregulation beeinflusst das lokale inflammatorische Milieu, bewirkt Vasorelaxation und Modulation von Gefäßwachstum.

Bei der Entstehung der Frühform der Atherosklerose sind Endotheldysfunktion und die lokalisierte Expression von Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), das an der Adhäsion inflammatorischer Zellen am Endothel eine Rolle spielt, beteiligt. Nach endothelialer Schädigung bewirken veränderte endotheliale Produktion und Sekretion Inflammation, Vasokonstriktion und Plaqueformation. Die Messung von Zytokinprofilen dient als ein Surrogatparameter für den Endothelzellschaden und die Progression der Atherosklerose. Die *in vitro* gemessenen Muster der Protein- und Genexpression in Folge von Scherstress können in drei Kategorien eingeteilt werden: kurzfristiger Anstieg mit Abfall auf das Ausgangsniveau, eine biphasische Antwort und ein anhaltender Anstieg. Konzentrationen des löslichen VCAM-1 (sVCAM-1) zeigten einen initialen Anstieg und anschließenden Abfall, der nach der Stimulation anhält⁴⁻⁶. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist ein potentes Mitogen für Endothelzellen und Chemoattraktant für Monozyten und Progenitorzellen (PC)⁷. Sowohl Hypoxie als auch erhöhte aktive Perfusion induzieren die Hochregulierung von VEGF⁸. *In vitro* wird VEGF in Reaktion auf Scherstress, *in vivo* nur nach aktiver Muskelkontraktion erhöht^{4,9}.

Da VEGF bislang keine Daten über die Modulation von sVCAM-1 und VEGF beim Menschen vorliegen, die Messung dieser Parameter jedoch als Surrogatparameter für den Endothelzellschaden genutzt werden, untersuchten wir den Einfluss der aktiven und passiven Perfusionsänderung beim Menschen, wie in 3.1 dargestellt.

1.1.3 Risikofaktoren für die Entstehung der Endotheldysfunktion

Der Begriff Endotheldysfunktion wird in erster Linie im Sinne einer „klinischen Beschreibung“ benutzt. Es gibt hierfür keine klare Definition. Aus klinischer Sicht ist

die endothelabhängige Vasodilatation eine gut messbare Funktion, deren klinische Bedeutung offensichtlich ist und die für viele kardiovaskuläre Risikofaktoren untersucht worden ist¹⁰. Zu den klassischen Risikofaktoren, die Endotheldysfunktion auslösen, gehören Nikotinabusus, Hyperlipoproteinämie, arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus und genetische Disposition. Darüber hinaus wurden erhöhte ADMA-Spiegel, Hyperhomozysteinämie, Herzinsuffizienz¹¹ oder Immunreaktionen^{3, 12-14} wie bei Transplantatvaskulopathie^{13, 15} oder bei viralen Infektionen^{16, 17}, als Auslöser für Endotheldysfunktion beschrieben. Endotheldysfunktion mit konsekutiven Spasmen der Koronarien und resultierender Ischämie kann andererseits direkt zu Herzinsuffizienz führen^{18, 19}.

1.1.4 Marker der Endothelfunktion beim Menschen

Die endothelabhängige Dilatation kann nichtinvasiv am Unterarm, in der Mikrozirkulation der Haut und des Muskel, und invasiv an den Koronarien gemessen werden. Es besteht eine enge Korrelation zwischen koronarer und peripherer endothelabhängiger Vasodilatation²⁰. Sie wird nach einer 3-minütigen Kompression durch die sich anschließende reaktive Hyperämie²¹ oder nach intraarterieller Infusion von Azetylcholin² gemessen. Es lassen sich unterschiedliche Kompartimente des Gefäßsystems analysieren. Konduktanzgefäße lassen sich durch Dilatation mittels Ultraschall erfassen, durch Messung des Dopplersignals lassen sich Widerstandsgefäße (Arteriolen), und mittel Laserdoppler kutane und muskuläre Mikrozirkulation beurteilen^{10, 22}. Verminderte endothelabhängige Dilatation²³ ist ein Prognosemarker für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse²⁴ und Herzinsuffizienz²⁵. Jedoch ist die Endotheldysfunktion nicht nur bei der Genese der Atherosklerose involviert. Auch bei immunologisch bedingten Erkrankungen kommt es zur Endotheldysfunktion. Dies kann durch bakterielle oder virologische Infektionen^{16, 17}, bedingt sein oder auch Folge einer chronischen subklinischen Immunantwort, wie bei der Transplantatabstoßung sein. Koronare und periphere Endotheldysfunktion bei Patienten mit myokardialer Viruspersistenz können unabhängig von myokardialer Inflammation auftreten, sind jedoch bei gleichzeitiger Inflammation stärker ausgeprägt²⁶.

Die Sekretion des Mitogens Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) erfolgt endothelspezifisch. Hierüber werden Gefäßtonus, Permeabilität, Vasodilatation, Gefäßaussprossung, sowie Mobilisierung und das sogenannte „homing“, das Einwandern, von Endothelprognitorzellen⁷ gesteuert. VEGF interagiert mit dem Endothel über 2 membranübergreifende hochaffine Rezeptoren, fms-like Tyrosinkinase (Flt-1) und Kinase Insert domain-containing receptor (KDR)^{27, 28}. Im

Gegensatz zu KDR existiert eine lösliche Form der Flt-1 (sFlt-1), die von Endothelzellen synthetisiert wird^{29, 30}. Bei Anwesenheit von sFlt-1 im Serum werden die messbaren Spiegel von VEGF deutlich reduziert³¹. Darüber hinaus verhindert sFlt-1 die Signaltransduktion über die Bildung von Heterodimeren der membranständigen Flt-1 und KDR und agiert so als negativer dominanter Inhibitor *in vitro*³⁰. Erhöhte Spiegel von VEGF finden sich bei Patienten mit Atherosklerose, proliferativer Retinopathie, arteriellem Hypertonus, entzündlichen Erkrankungen und kardialer Ischämie³²⁻³⁷. Gesunde Raucher zeigten erhöhte sFlt-1-Spiegel im Vergleich zu Nichtrauchern³⁸.

Da Rauchen Endotheldysfunktion induziert, untersuchten wir die Hypothese, ob VEGF und sFlt-1 im Plasma mit der Endothelfunktion korrelieren und als Surrogatparameter gelten können. Diese Ergebnisse werden unter 3.2 subsumiert.

In vitro wird die Apoptose von Endothelzellen (EC) durch proatherosklerotische Stimuli induziert, während atheroprotektive Substanzen (Statine, Vitamin C), ebenso wie Wandschubspannung, EC-Apoptose vermindern³⁹. Im Tierexperiment ist EC-Apoptose mit Endotheldysfunktion assoziiert⁴⁰. Zirkulierende apoptotische Mikropartikel sind beim akuten Koronarsyndrom erhöht und haben prokoagulatorische Eigenschaften⁴¹. Wenn EC sich von der Gefäßwand ablösen, führt dies zur Denudierung. Denudierte Gefäßareale, die entweder durch benachbarte EC oder durch Progenitorzellen (PC) gedeckt werden⁴², sind Ursache für Endotheldysfunktion. Vermehrte EC-Apoptose wird letztendlich zu einer erhöhten Replikation von benachbarten EC der Gefäßwand führen, mit der Folge einer vorzeitigen Alterung des Endothels⁴³, oder zu einem Verbrauch des mutmaßlich endlichen Vorrats an PC⁴⁴. Die Apoptose von humanen Endothelzellen *in vivo* ist noch nicht gezeigt worden. Wie unter 3.4 und 3.6 beschrieben, konnte die Entwicklung der flusszytometrische Methode genutzt werden, um den atherosklerotischen und inflammatorischen Einfluss auf die EC-Apoptose beim Menschen zu untersuchen.

Auf der anderen Seite lassen sich PC in der Zirkulation nachweisen, die einen Marker für die endotheliale Regeneration darstellen⁴⁵. PC werden insbesondere durch ischämische Stimuli⁴⁶ aus dem Knochenmark mobilisiert und zirkulieren im Blut⁴⁵. Sie sind beteiligt an dem Erhalt der endothelialen Integrität⁴², verbessern die kardiale Regeneration⁴⁷ und partizipieren an der Angiogenese⁴⁸.

1.2 Bedeutung der Endothelprogenitorzell-vermittelten endothelialen Regeneration für die Pathogenese der Atherosklerose

Die Integrität und funktionelle Aktivität der endothelialen Einzelschicht spielen eine wichtige Rolle in der Atherogenese. In vivo ist die Integrität der Gefäßwand Ergebnis von Endothelzellschaden und –regeneration. Denudierte Gefäßabschnitte können zum einen von benachbarten Endothelzellen, zum anderen durch Progenitorzellen (PC) oder Vorläuferzellen aus dem Knochenmark reendothelialisiert werden.

PC weisen hinsichtlich der Regenerationsfähigkeit Stammzeleigenschaften auf, sind jedoch auf einen künftigen Funktionsbereich festgelegt. Es finden sich PC in unterschiedlichen Organen, wie Herz, Muskulatur, Fettgewebe und Knochenmark. Als endotheliale Progenitorzellen (EPC) werden im Blut zirkulierende Zellen beschrieben, die zu Endothelzellen differenzieren. Da dieses Forschungsgebiet und die Nomenklatur sich derzeit sehr dynamisch entwickeln, wird im Folgenden, bis auf in der Originalpublikation (3.3), der Terminus Progenitorzelle verwendet werden.

Mehrere Studien haben eine Population von aus dem Knochenmark stammenden Zellen identifiziert⁷⁸, die sowohl aus mononukleären Zellen des Knochenmarks oder Bluts⁷⁹ isoliert werden können⁸⁰⁻⁸². Es existieren unterschiedliche zirkulierende Zellpopulationen, die an der endothelialen Regeneration teilnehmen^{78, 83}.

Diese Zellen exprimieren eine Reihe endothelialer Oberflächenmarker⁴⁸, inkorporieren bei der Neovaskularisation⁸⁴ und sind an der Reendothelialisierung denudierter Gefäßareale beteiligt⁴². Klinische Studien zeigen, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren die Anzahl zirkulierender PC reduzieren^{85, 86}. Diese Ergebnisse legen die Hypothese nahe, dass zirkulierende PC einen endogenen Reparaturmechanismus darstellen, der dem ständigen Schaden durch kardiovaskuläre Risikofaktoren entgegenwirkt und dysfunktionales Endothel ersetzt. Aus diesem Grund wurden die Anzahl zirkulierender PC mit dem Voranschreiten der atherosklerotische Krankheit korreliert. Hierdurch sollte die klinische Bedeutung des endogenen Heilungspotentials von zirkulierenden PC gezeigt werden. Dies wird unter 3.3 beschrieben.

1. 3 Rolle von Statinen bei endothelialer Schädigung und Regeneration

Die erwünschten pleiotropen Effekte der potenten LDL-Cholesterinsenker 3-Hydroxy-3-Methylglutanyl Coenzym A (HMG-CoA) Reduktase Inhibitoren (kurz: Statine) bei der Verlangsamung der Progression der Atherosklerose schließen die quantitative und qualitative Verbesserung der zirkulierenden PC mit ein⁸⁷. In vitro reduzieren Statine die oxidative stressinduzierte PC-Apoptose⁸⁸. In Tiermodellen verbessern Statine die knochenmarksabhängige Reendothelialisierung⁸⁹, erhöhen die Mobilisierung von PC und verbessern die Neovaskularisierung nach

experimentellem Herzinfarkt⁹⁰ und die Funktion hibernierendes Myokards durch die Mobilisierung von aus dem Knochenmark stammenden Progenitorzellen⁹¹.

Wegen des engen Zusammenhangs zwischen LDL-Cholesterin und der MACE-Ereignisrate in großen Studien mit Statintherapien, wird die LDL-Reduktion als der Schlüsselmechanismus für den klinischen günstigen Effekt angesehen⁹². Ezetimibe jedoch, ein potenter intestinaler Cholesterinabsorbtiionshemmer, reduziert sowohl als Monotherapie, wie in Kombination mit einem Statin signifikant das LDL-Cholesterin⁹³⁻⁹⁵. Der Einsatz von Ezetimibe, erlaubt die Differenzierung zwischen Lipidreduktion und potentiellen pleiotropen Mechanismen von Statinen. Atorvastatin, nicht jedoch Ezetimibe, verbessert die flußmedierte Dilatation und erhöht die Anzahl von Progenitorzellen im Knochenmark und Blut im Tiermodell⁹⁶. Ebenso erhöhte eine 4-wöchige Therapie mit Simvastatin, im Gegensatz zu Ezetimibe, die Anzahl funktionell aktiver PC und verbesserte die endotheliale Funktion bei Patienten mit Herzinsuffizienz⁹⁷.

Statine führen, im Gegensatz zur LDL-Reduktion durch Ezetimibe, bei Patienten mit KHK, zu verminderter Thrombozytenaktivität und Reduktion proinflammatorischer Zytokine⁹⁸. Zusammenfassend zeigen diese großen Studien einen positiven Effekt von Statinen bei Risikopatienten, der zum Teil unabhängig von der Cholesterinreduktion sein könnten. Es war das Ziel der unter 3.4 dargestellten Untersuchungen, den von Statinen induzierten Effekt auf Marker der endothelialen Regeneration und EC-Apoptose zu analysieren, im Vergleich zur alleinigen Lipidreduktion durch Ezetimibe.

1.4 Immunologische Faktoren und Endotheldysfunktion

Atherosklerotische Veränderungen sind durch sogenannte Schaumzellen, lipidhaltige Makrophagen oder dendritische Zellen gekennzeichnet⁴⁹. Bereits Rudolf Virchow konnte zeigen, dass Inflammation ursächlich an der Entstehung der Atherosklerose⁵⁰ beteiligt ist. Bereits in frühen atherosklerotischen Veränderungen wurden T-Zellen nachgewiesen^{51, 52}. Hierfür spricht auch, dass das Vorliegen einer viralen Infektion bei Kindern mit Endotheldysfunktion assoziiert ist¹⁷. Für das neue Auftreten einer atherosklerotischen Läsion sind die Inflammationsmarker CRP, sVCAM-1, E-Selektin, IL-6 und Endotoxin unabhängige Prädiktoren⁵³. Bei der instabilen Angina liegt eine generelle systemische Inflammation vor⁵⁴.

Die chronische subklinische Entzündung mit Entwicklung der kardialen Transplantatvaskulopathie (TVP) stellt eine Hauptlimitation im Langzeitverlauf der Herztransplantation dar. Obwohl die Pathogenese multifaktoriell ist, legt die Persistenz von inflammatorischen Zellen nahe, dass eine kontinuierliche perivaskuläre Inflammation die Hauptursache in der Entwicklung der TVP ist⁵⁵. Dies

führt zu konstanter EC-Schädigung⁵⁶⁻⁵⁹. Nach der Herztransplantation initiieren spezifische antigenpräsentierende Zellen des Empfängers die Immunantwort, in dem sie das Alloantigen den T-Zellen präsentieren⁶⁰. Die T-Zell Aktivierung ist mit der prompten und anhaltenden Expression des Oberflächenmarkers CD69 assoziiert⁶¹, der auch während einer akuten Abstoßung im peripheren Blut erhöht ist⁶². Auf der anderen Seite hat eine spezifische Subpopulation, sogenannte tolerogene dendritische Zellen⁶³, die Möglichkeit dieser Immunantwort entgegenzuwirken⁶⁴. Tolerogene dendritische Zellen führen zu verbessertem Überleben des Transplantats, entweder durch Depletion von alloreaktiven T-Zellen oder durch Expansion von immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen (Treg)⁶⁵⁻⁶⁸. Im Menschen werden diese Treg über die Oberflächenmarker CD4 und starke Expression von CD25⁶⁹, sowie Expression des forkhead/winged helix transcription factor FOXP3^{70, 71} definiert.

Treg sind immunsuppressiv über diverse Mechanismen: die Sekretion des endothelprotektiven IL-10⁷², Expression von TGF- β ⁷³, Induktion von Apoptose⁷⁴ oder kontaktabhängige Inhibition alloreaktiver T-Zellen⁷⁵, oder durch Konversion anderer T-Zellen in Tregs⁷⁶. Im Tierexperiment konnte das Voranschreiten der Atherosklerose durch IL-10-produzierende T-Zellen verlangsamt werden⁷⁷. Hierdurch konnte der Einfluss von Treg auf die vaskuläre Pathogenese gezeigt werden.

Da das hauptsächliche Vorliegen aktivierter T-Zellen die chronische perivaskuläre Entzündung vorantreiben könnte, untersuchten wir die potentielle anhaltende Aktivierung von T-Zellen in Bezug auf die Anzahl der tolerogenen Treg in Gegenwart einer effektiven lang anhaltenden Immunsuppression. Bei fehlenden Daten über das potentielle Einwandern in das Transplantat, haben wir darüber hinaus Anzahl distinkter T-Zellsubpopulationen und dendritischer Zellen nach transkoronarer Passage durch das Herztransplantat quantifiziert, wie in 3.5 dargestellt.

Akute oder chronische Entzündungen, wie bei bakteriellen oder viralen Infekten, können eine Aktivierung des Endothels induzieren^{16, 17}. Die Genese ist multifaktoriell und unspezifisch. Von besonderem Interesse ist bei der viralen Schädigung des Endothels das streng humanpathogene endothelspezifische Parvovirus B19^{99, 100}.

1.5 Parvovirus B19 und endotheliale Schädigung und Regeneration

Das vaskulotrope Parvovirus B19 (B19V) – Erreger der Ringelröteln - ist der Erreger, der am häufigsten (etwa 50%) mit einer inflammatorischen Kardiomyopathie (DCMi) assoziiert ist^{99, 100}.

Das B19V besteht aus zwei Kapselproteinen und dem Nichtstrukturprotein NS-1. NS-1 ist zytotoxisch¹⁰¹, transaktiviert Interleukin-6 (IL-6) und Tumor Nekrosis Faktor α (TNF α)¹⁰² und induziert STAT3-abhängig¹⁰³ direkt die Apoptose¹⁰⁴⁻¹⁰⁶, den programmierten Zelltod, von Endothelzellen. Das Virus benötigt die Rezeptoren P-Antigen, β 1 α v-Integrin, sowie Ku80 und Ku70, um eine Zelle zu infizieren¹⁰³. Diese Rezeptoren sind auf Endothelzellen, nicht jedoch auf Kardiomyozyten exprimiert. Die kardiale Persistenz dieses vaskulotropen Virus induziert Endotheldysfunktion^{26, 107}. Diese ist assoziiert mit sekundärer Myokardschädigung und linksventrikulärer Dysfunktion¹⁰⁷, und kann die klinischen Symptome der Angina pectoris und eingeschränkten körperlichen Belastbarkeit hervorrufen¹⁰⁸.

EC-Schädigung im Menschen führt zu Gefäßerosion mit konsequenter Endotheldysfunktion und erhöhter Anzahl zirkulierender EC^{41, 109, 110}. Über den Mechanismus der Schädigung von PC durch B19V ist bisher nichts bekannt. B19V-Persistenz im Knochenmark in erythroiden Vorläuferzellen ist bei einem Teil der Patienten nach Infektion dokumentiert^{111, 112}. PC mit endotheliale regenerativen Potential reifen in der Knochenmarksnische heran¹¹³. Sowohl eine direkte Schädigung von PC durch B19V, als auch eine indirekte Wirkung über eine funktionell eingeschränkte Knochenmarksnische sind vorstellbar. Dies könnte eine fehlerhafte Mobilisierung von PC, dysfunktionale PC oder die Distribution des Virus durch PC zur Folge haben.

Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine 6-monatige Therapie mit Interferon- β (IFN β ; Beneferon) die Elimination von entero- und adenoviralem Genom und Verbesserung der linksventrikulären Funktion sowie des klinischen Zustandes¹¹⁴ bewirkte. Allerdings führte die Gabe von IFN- β lediglich zu einer Reduktion der Viruslast mit B19V, mit deutlicher Verbesserung der klinischen Symptomatik¹¹⁵. Über den genauen Wirkmechanismus des IFN- β auf B19V-assoziierte endotheliale Schädigung liegen bislang keine Daten vor.

Wir untersuchten daher die Hypothese, dass B19V zu einer Beeinflussung der endothelialen Regeneration führt, und dass die Immunmodulation mit IFN- β einen Einfluss auf Endothelschädigung und –regeneration hat.

2 Ziele und Fragestellungen

Es werden in der vorgelegten Arbeit folgende Fragen bearbeitet:

- Führt die aktive und passive Erhöhung der Perfusion zu einer Konzentrationsänderung des Adhäsionsmoleküls sVCAM-1 und des Wachstumsfaktors VEGF?
- Korrelieren der endotheliale Wachstumsfaktor VEGF und sein löslicher Rezeptor sFlt-1 mit der endothelabhängigen Vasodilatation bei gesunden Rauchern und Kontrollprobanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren?
- Spielen Endothelvorläuferzellen eine Rolle bei der Progression der Atherosklerose beim Menschen?
- Werden die endotheliale Regeneration und die endotheliale Schädigung durch LDL-Reduktion oder durch pleiotrope Effekte von Statinen beeinflusst?
- Beeinflusst das chronisch inflammatorische Milieu nach Herztransplantation die Balance zwischen aktivierten und regulatorischen T-Zellen?
- Werden durch Parvovirus B19 induzierte endotheliale Schädigung und Regeneration durch Immunmodulation beeinflusst?

3 Originalarbeiten

3.1 Einfluss von erhöhter Perfusion der Beine auf lösliches VCAM-1 und VEGF bei gesunden Probanden

Schmidt-Lucke C, Reinhold D, Ansorge S, Klein HU, Schmidt-Lucke JA. Changes of plasma concentrations of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and vascular endothelial growth factor after increased perfusion of lower extremities in humans. *Endothelium*. 2003;10(3):159-65

Scherstress moduliert die vaskuläre Struktur und dessen Funktion durch Veränderung des endothelialen Zytoskeletts und durch Aktivierung von Signalkaskaden. Erhöhte Konzentrationen von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) finden sich bei Atherosklerose, kardialer und peripherer Ischämie und experimentell nach aktiver Erhöhung der Perfusion. Spiegel des löslichen Vascular Cellular Adhesion Molecule 1 (sVCAM-1) sind bei der inflammatorischen Atherosklerose ohne direkte Korrelation zur Krankheitsaktivität. *In vitro* induziert erhöhter Scherstress eine biphasische Antwort von sVCAM-1.

Um zu untersuchen, ob beim Menschen eine Perfusionsänderung *in vivo* ebenfalls eine Änderung der beiden atheroskleroseassoziierten Marker VEGF und sVCAM-1 bewirkt, wurden 2 unabhängige Studien durchgeführt. Hierzu wurde bei gesunden Probanden sowohl eine passive, wie aktive Perfusionserhöhung veranlasst.

In der ersten Studie wurde bei 24 gesunden Probanden die endothelabhängige Vasodilatation durch flußmedierte Dilatation (FMD) und intraarterielle (i.a.) Infusion von Azetylcholin und die endothelunabhängige Vasodilatation durch i.a. Infusion von Nitroglycerin mittels Venenverschlußplethysmographie der unteren Extremitäten analysiert. In der zweiten Studie wurden 10 Probanden 30 Minuten submaximal fahrradergometrisch belastet um eine Perfusionserhöhung der unteren Extremitäten zu erreichen. Anschließend wurde den Probanden in beiden Studien Blut aus der V. cubitalis zur Messung der systemischen Spiegel und aus der V. femoralis zur Messung lokaler Veränderungen entnommen.

Die Ausgangs-Plasmakonzentrationen von VEGF und sVCAM-1 korrelierten mit der endothelabhängigen Vasodilatation. Die endothelabhängige Vasodilatation bewirkte keine Änderung der VEGF-Spiegel, wohingegen die Infusion von Nitroglycerin einen 35%igen Anstieg ($p < 0,05$) bewirkte. Andererseits führte die aktive Perfusionserhöhung zu einem Abfall von VEGF nach 1 Stunde. Die lokalen sVCAM-1 Spiegel wurden nach Erhöhung des Scherstress durch Azetylcholin um 31%

($p < 0,001$) lokal und um 18% ($p < 0,05$) systemisch vermindert. Hingegen bewirkte die Perfusion von Nitroglyzerin eine ähnliche lokale und systemische Verminderung um 34% bzw. 36% ($p < 0,0019$). Ähnlich wie die in vitro Experimente, zeigte sich durch die aktive Perfusionserhöhung eine biphasische Konzentrationsänderung mit initialem Anstieg und folgendem Abfall um 9% ($p < 0,01$).

Die Ergebnisse dieser Studie belegten erstmals die Modulation von sVCAM-1 beim Menschen. Veränderungen von VEGF und sVCAM-1 sind zeit-, konzentrations- und substanzabhängig. Die kurzwirksamen Veränderungen des Wachstumsfaktors VEGF und des Adhäsionsmoleküls sVCAM-1, die Einfluss auf Atherosklerose und Mobilisierung und Homing von Endothelprogenitorzellen haben, können einen Teil der belastungsinduzierten vaskulären Protektion erklären.

3.2 Konzentrationen von löslichem VCAM-1 und VEGF-Rezeptor (sFlt-1) und deren Endothelfunktion bei gesunden Rauchern

Schmidt-Lucke C, Belgore F, Reinhold D, Ansorge S, Klein HU, Schmidt-Lucke JA, Lip GY. Soluble vascular endothelial growth factor, soluble VEGF receptor Flt-1 and endothelial function in healthy smokers. *Int J Cardiol.* 2005 Apr 20;100(2):207-12.

Wie in der vorherigen Arbeit gezeigt, kann körperliche Aktivität und Perfusionserhöhung mittels Nitroglyzerin die systemische Konzentration von VEGF im Plasma signifikant beeinflussen.

In der folgenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die VEGF Konzentrationen im Plasma durch chronischen Nikotinkonsum beeinflusst werden. Außerdem sollte der lösliche VEGF-Rezeptor, sFlt-1, der eine antagonisierende Funktion ausübt, untersucht werden. Der ELISA war gerade von der Arbeitsgruppe des Kooperationspartner G. Lip etabliert worden.

Bei 22 gesunden Rauchern und 22 alters- und geschlechtsentsprechenden Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren wurden endothelabhängige Dilatation – gemessen mittels flußmediierter Dilatation (FMD) und nach intraarterieller Infusion von Azetylcholin (AMD) -, endothelunabhängige Dilatation (NMD) der Beine mittels Venenverschußplethysmographie abgeleitet. Aus dem Plasma wurden simultan die Konzentrationen von VEGF und sFlt-1 durch einen ELISA bestimmt.

Während VEGF-Spiegel in beiden Gruppen vergleichbar waren, hatten Raucher signifikant niedrigere sFlt-1 Werte ($p < 0,01$). AMD war bei Rauchern niedriger als bei den Kontrollprobanden ($p < 0,01$). Raucher und Nichtraucher mit hoher (> 12 ml/100 ml Gewebe/Minute) AMD zeigten signifikant niedrigere VEGF Konzentrationen ($p < 0,001$). Beide Gruppen zeigten eine inverse Korrelation zwischen VEGF und AMD (Raucher: $r = -0,6$, $p < 0,01$; Kontrollen: $r = -0,71$, $p < 0,005$) und FMD (Raucher: $r = -0,56$, $p < 0,05$; Kontrollen: $r = -0,58$, $p < 0,005$). Die Konzentrationen von sFlt-1 korrelierten nicht mit denen von VEGF oder mit der endothelabhängigen Dilatation.

Mit den Daten dieser Studie konnte also gezeigt werden, dass gesunde Raucher eine eingeschränkte AMD der Beine aufweisen, und eine inverse Korrelation zwischen Plasma-VEGF, nicht aber von seinem Antagonisten sFlt-1, mit Markern der Endothelfunktion vorliegt. Wir schlussfolgerten, dass VEGF, jedoch nicht sFlt-1 bei der Pathogenese der Endotheldysfunktion bei gesunden Rauchern eine Rolle spielt.

3.3 Reduzierte Anzahl zirkulierender Endothelprogenitorzellen beeinflussen zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse: Beweis für die klinische Relevanz des endogenen vaskulären Regenerationsprozesses

Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kämper U, Dimmeler S, Zeiher AM. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation*. 2005 Jun 7;111(22):2981-7.

Der Erhalt der endothelialen Integrität spielt eine kritische Rolle bei der Prävention des Voranschreitens der Atherosklerose. Endotheliale Progenitorzellen (EPC) inkorporieren unter experimentellen Bedingungen bei der Neovaskularisation und sind an Reendothelialisierung von denudierten Gefäßarealen beteiligt. Daher könnten EPC einen endogenen Reparaturmechanismus darstellen, der dem anhaltenden schädigenden Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren auf das Endothel entgegenwirkt und dysfunktionales Endothel ersetzt.

Bei 120 Personen (43 Kontrollprobanden, 44 Patienten mit stabiler KHK und 33 Patienten mit akutem Koronarsyndrom) wurden EPC über die Oberflächenmarker CD34 (für hämatopoetische Stammzellen) und KDR (endothelialer Marker) definiert und mittels Flußzytometrie analysiert. Kardiovaskuläre Ereignisse (Tod, instabile Angina, Myokardinfarkt, erneute Intervention (PTCA), Bypass-Operation oder Schlaganfall) wurden als negatives Ergebnis über einen medianen Zeitraum von 10 Monaten gezählt. Patienten mit einem kardiovaskulärem Ereignis hatten signifikant niedrigere Anzahl zirkulierender EPC ($p < 0,05$). Die reduzierte Anzahl von EPC war mit einer signifikant erhöhten Anzahl von kardiovaskulären Ereignissen nach Kaplan-Meier Analyse assoziiert ($p = 0,0009$). In der multivariaten Analyse war die reduzierte Anzahl von EPC ein signifikanter Prädiktor einer schlechten Prognose, auch nach Korrektur für traditionelle Risikofaktoren und Krankheitsaktivität (Risiko 3,9, $p < 0,05$).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Anzahl zirkulierender EPC unabhängig das Voranschreiten der atherosklerotischen Erkrankung vorhersagt. Dies unterstützt die Hypothese der wichtigen Rolle eines endogenen Mechanismus der Reparatur von Gefäßen, wodurch der klinische Verlauf der KHK beeinflusst wird.

3.4 Verbesserung des Endothelzellschadens und des endothelialen Regeneration Index bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung nach 4 Wochen Statintherapie

Caroline Schmidt-Lucke, Stephan Fichtlscherer, Lothar Rössig, Ulrike Kämper und Stefanie Dimmeler. Improvement of endothelial damage and regeneration indexes in patients with coronary artery disease after 4 weeks of statin therapy

Bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung (KHK) beeinflusst eine hohe Anzahl zirkulierender Progenitorzellen (CPC) den klinischen Verlauf positiv. Im Gegensatz hierzu könnte die vermehrte Apoptose, der programmierte Zelltod, von Endothelzellen eine Zunahme der vaskulären Schädigung reflektieren. Mehrere Studien haben belegt, dass sowohl vaskuläre Schädigung wie auch Funktion und Anzahl von zirkulierenden Vorläuferzellen von Statinen positiv beeinflusst werden. Die Verfügbarkeit von Ezetimibe, einem potenten Cholesterolabsorbtiionshemmer, ermöglicht die Unterscheidung zwischen Lipidsenkung und pleiotropen Effekten von Statinen.

43 Patienten mit KHK erhielten entweder: neu Atorvastatin (Gruppe A; n=17), Ezetimibe zu vorbestehendem Statin (Gruppe B; n=14) oder Dosisescalation von Atorvastatin (Gruppe C; n=12) über 4 Wochen. Die Anzahl zirkulierender apoptotischer EC (CD45⁻CD146⁺vWF⁺Annexin-V⁺) und CPC (CD34⁺KDR⁺) wurden mittels Flußzytometrie bestimmt. Die LDL-Spiegel wurden in allen Behandlungsgruppen signifikant reduziert. Beide Statinarme, Gruppen A und C zeigten eine signifikanten Reduktion zirkulierender apoptotischer EC um 50% (jeweils $p < 0,01$). Gleichzeitig fand eine Verdopplung der Anzahl zirkulierender CPC in Gruppe A und C statt (jeweils $p < 0,01$). Hierdurch wurde der endotheliale Schädigungsindex, definiert durch das Verhältnis zirkulierender apoptotischer EC / CPC-Anzahl, in Gruppe A um 79% ($p < 0,01$) und in Gruppe C um 70% ($p < 0,05$) reduziert. Im Gegensatz hierzu hatte die alleinige LDL-Reduktion durch Ezetimibe keinen Effekt auf die Anzahl unterschiedlicher zirkulierender Zellen.

Mit den Daten dieser Studie konnte durch die simultane Vermehrung der CPC-Anzahl und Reduktion der Anzahl zirkulierender apoptotische EC nach 4-wöchiger Statintherapie ein neuartiger pleiotroper Effekt einer Statintherapie bei Patienten mit KHK gezeigt werden.

3.5 Spezifische Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen in das Transplantat nach Herztransplantation

Schmidt-Lucke C, Aicher A, Romagnani P, Gareis B, Romagnani S, Zeiher AM, Dimmeler S. Specific recruitment of CD4⁺CD25⁺⁺ regulatory T cells into the allograft in heart transplant recipients. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 May; 292(5):H2425-31.

Eine Sonderform der Endothelschädigung liegt bei der Transplantatvaskulopathie vor. Es handelt sich hierbei vornehmlich um einen T-Zell-induzierten Endothelzellschaden. Auf der anderen Seite ist aus Tierversuchen bekannt, dass regulatorische T-Zellen (Treg) in Transplantate migrieren und Transplantattoleranz induzieren. Sie werden über die Oberflächenmarker CD3⁺CD4⁺CD25⁺⁺ charakterisiert und exprimieren den forkhead/winged Transkriptionsfaktor FOXP3.

Wir stellten die Hypothese auf, dass aktivierte T-Zellen und Treg die kontinuierliche Inflammation des Herztransplantats beeinflussen können, und dass das chronisch inflammatorische Milieu die Balance zwischen diesen beiden distinkten Zelltypen beeinflusst.

Daher wurde die Menge der aktivierten T-Zellen und CD4⁺CD25⁺⁺-Treg aus der kardialen und systemischen Zirkulation von Herztransplantierten quantifiziert. Um den Einfluss der Passage dieser Zellen durch das Transplantat zu untersuchen, wurden transkardiale Gradienten bestimmt. Hierzu wurde simultan Blut aus der Aorta, vor transkardialer Passage, und dem Koronarvenensinus, nach transkardialer Passage, bei 22 Herztransplantierten und 18 Kontrollprobanden untersucht. Die systemischen Spiegel von Treg waren bei Herztransplantierten ($8,9 \pm 1,3/\mu\text{l}$) im Vergleich zu Kontrollen signifikant niedriger ($15,8 \pm 1,6/\mu\text{l}$; $p=0,002$). Der relative Anteil von Treg bezogen auf die Leukozytenzahl war ebenfalls signifikant niedriger ($p<0,01$). Im Gegensatz hierzu waren die Anzahl zirkulierender aktivierter CD4⁺-T-Zellen in beiden Gruppen vergleichbar. Bei Transplantierten nahm die Anzahl der Treg nach transkardialer Passage signifikant ab ($3,0 \pm 0,3$ vs. $2,4 \pm 0,3$ % von CD4⁺ T-Zellen, $p<0,01$) und FOXP3⁺ T-Zellen migrierten in das Transplantat ein. Im Gegensatz hierzu nahm die Anzahl der CD4⁺-T-Zellen, selbst unter effektiver Immunsuppression, nach transkoronarer Passage durch das Transplantat zu.

Aus den Daten dieser Studien lässt sich schlussfolgern, dass die Anzahl zirkulierender immunsuppressiver Treg bei Patienten nach Herztransplantation reduziert sind. Die Rekrutierung von Treg in das Transplantat während transkoronarer Passage kann Toleranz gegenüber dem Transplantat während subklinischer Inflammation bewirken. Hierdurch könnte die Transplantatvaskulopathie beeinflusst werden.

3.6 Interferon- β (IFN β) moduliert den Endothelzellschaden bei Patienten mit kardialer Persistenz von Parvovirus B19

C. Schmidt-Lucke, Spillmann F, Bock T Van Linthout S, Lassner D, Kühl U, Schultheiss H-P, Tschöpe C. Interferon-beta modulates endothelial damage in patients with cardiac persistence of parvovirus B19.

Um zu testen, ob IFN β zu einer Reduktion des Parvovirus B19 (B19V) induzierten Endothelzellschadens führt, wurden der Einfluss einer IFN β -Therapie auf die endotheliale Schädigung bei Patienten mit kardialem Nachweis von B19V von länger als 6 Monaten in einer Phase-I Studie untersucht.

Die Replikation von B19V in kultivierten Endothelzellen (EC) wurde mittels quantitativer PCR von B19V quantifiziert und die Viabilität von EC vor und nach Zugabe von IFN β untersucht.

In vitro konnten EC mit B19V infiziert werden, dies führte zu einer verminderten Viabilität der EC ($p=0,007$). IFN β supprimierte die Replikation von B19V um 63% ($p=0,008$) in EC und erhöhte die Viabilität ($p=0,021$).

Zirkulierende apoptotische EC (CMAEC, CD45⁻CD146⁺vWF⁺annexin-V⁺) und EPC (CD34⁺KDR⁺) wurden aus dem Blut mittels Flußzytometrie bei 9 symptomatischen Patienten mit kardialer Persistenz von B19V vor und nach 6-monatiger Therapie mit 16 MioU IFN β und bei 9 unbehandelten gesunden Kontrollen quantifiziert. Die Endothelfunktion wurde mittels Ultraschall und flussmediierter Dilatation am Unterarm gemessen. Im Vergleich zu Kontrollen hatten Patienten mit B19V signifikant höhere Spiegel von CMAEC ($p=0,004$), die nach 6-monatiger Therapie normalisiert waren ($0,06 \pm 0,08\%$ vs. $0,01 \pm 0,006\%$, $p = 0,008$). Ähnliche Verbesserungen zeigten sich in der FMD ($4,7 [2,3 - 5,8]\%$ vs. $12,3 [11,3- 14,6]\%$, $p = 0,04$; $p=0,002$ vs. Kontrolle). Im Gegensatz dazu ($p = 0,017$) blieb die FMD bei den Patienten mit B19V, die nicht therapiert worden waren ($n=5$) eingeschränkt. Bei den Patienten mit persistierendem B19V wurden signifikant mehr EPC vor Therapie im Vergleich zu Kontrollen ($0,04 \pm 0,05$ vs. $0,01 \pm 0,004$; $p=0,02$) gemessen. Nach IFN β -Therapie war die Anzahl der EPC bei diesen Patienten normalisiert ($p=0,03$).

Wir haben also mit den Ergebnissen dieser Studie erstmalig bei einem viral induzierten Endothelzellschaden eine krankheitsverändernde Therapie gezeigt, spezifisch der Endothelzellapoptose, der über den eigentlichen Behandlungsraum anhielt.

4 Diskussion

In der vorgelegten Habilitationsschrift werden Ergebnisse zu dem Forschungsschwerpunkt der endothelialen Schädigung und Regeneration beim Menschen vorgelegt. Das Verständnis über den Einfluss von Faktoren auf das Endothel hat sich im Laufe der Jahre, in dem diese Arbeit entstand, stark gewandelt. Anfänglich herrschte die Vorstellung, dass lediglich so genannte „klassische Risikofaktoren“, wie Rauchen, Diabetes mellitus, Bluthochdruck, genetische Belastung und erhöhte Blutfette einen Einfluss auf das Endothel haben. Zunehmend wurde durch *in vitro*-Versuche erkannt, dass die unmittelbaren, lokalen Flussverhältnisse über so genannte Mechanotransduktoren auf der EC-Oberfläche entscheidend für das normale Funktionieren einer EC beitragen. Hierdurch werden Gene in der Zelle an- oder ausgeschaltet und hierüber Funktionalität, programmierter Zelltod – die Apoptose -, das Zytoskelett, entzündliche Aktivierung oder Sekretion bestimmter endothelialer Faktoren reguliert. Eine integrale Komponente für ein funktionstüchtiges Endothel ist die endotheliale Regeneration, bei der zirkulierende Progenitorzellen eine zentrale Rolle haben. Diese und die Endothelzellapoptose lassen sich medikamentös beeinflussen. Immunologische Aspekte wie bei einer chronischen subklinischen Transplantabstoßung lassen sich anhand zirkulierender dendritischer Zellen und unterschiedlicher Lymphozytenfraktionen erfassen. Letztendlich konnte auch ein spezifischer Einfluss des vaskulotropen humanen Parvovirus B19 auf die Endothelzellapoptose und endotheliale Regeneration gezeigt werden.

In der vorgestellten Arbeit (Einfluss von erhöhter Perfusion der Beine auf lösliches VCAM-1 und VEGF bei gesunden Probanden) wurde *in vivo* bei gesunden Kontrollprobanden untersucht, inwieweit sich aktive und passive Erhöhung der Perfusion auf den löslichen Marker der endothelialen Aktivierung, sVCAM-1, und auf den Stammzell mobilisierenden Faktor VEGF auswirkte.

Der Marker für endotheliale Schädigung, sVCAM-1, wurde unmittelbar nach passiver Perfusionserhöhung bei gesunden Probanden reduziert. Die lokale Suppression war ausgeprägter als die systemische, wodurch die lokale Komponente der endothelabhängigen Perfusionserhöhung gezeigt werden konnte. Nitroglycerin bewirkte eine systemische sVCAM-1-Reduktion, hingegen stieg sVCAM-1 durch die ergometrische Belastung zunächst an, um 1 Stunde später abzusinken. Diese Reaktionen spiegeln die Veränderungen der *in vitro* Daten wieder. Es ist vorstellbar, dass hierdurch kardiovaskuläre Ereignisse, die nach körperlicher Belastung

stattfinden, durch eine unmittelbare kurzzeitige endotheliale Aktivierung, getriggert werden könnten. Spiegel von sVCAM-1 als unabhängiger Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse wurde in späteren Arbeiten anderer Arbeitsgruppen kontrovers diskutiert¹¹⁶⁻¹¹⁸. Die Daten unserer Studie zeigten also erstmalig, dass die Spiegel von sVCAM-1 *in vivo* am Menschen modifiziert werden können. Diese kurzzeitigen Veränderungen sind zeit-, substanz- und perfusionspezifisch. Eine mögliche Erklärung für das Fehlen einer direkten Korrelation von sVCAM-1 und künftige kardiovaskuläre Ereignisse kann durch die durch uns aufgedeckten Phänomene der Modulation durch körperliche Aktivität bedingt sein.

Zu dem Zeitpunkt der Veröffentlichung der Arbeit lagen noch keine Arbeiten über den Effekt von physischer Belastung auf VEGF beim Menschen vor. Die Daten der vorgelegten Arbeit zeigen eine Reduktion von VEGF unmittelbar nach körperlicher Aktivität. Es lagen in der hier vorgestellten Studie keine Messungen zu einem späteren Zeitpunkt nach ergometrischer Belastung vor, so dass diese Ergebnisse nicht mit denen später publizierten¹²¹ vergleichbar sind. Die simultane Entnahme von Blutproben aus der V. brachialis und V. femoralis erlaubte die Beurteilung von lokalen gegenüber systemischen Veränderungen. Die Daten der nicht-endothelabhängigen Perfusionserhöhung durch Nitroglycerin zeigten jedoch eine vorwiegend lokale Zunahme von VEGF in der Zirkulation. Hier manifestiert sich übereinstimmend mit späteren Publikationen scherstressinduzierte VEGF-Erhöhung in dem betroffenen Perfusionsarealen¹¹⁹.

Wie neuere Daten belegen⁷, ist VEGF verantwortlich für die Rekrutierung von zirkulierenden und residenten Vorläuferzellen, die an der endothelialen Regeneration beteiligt sind¹²⁵. Hier wird VEGF über Induktion durch Hypoxie mit konsequenter Bildung von hypoxia induced factor (HIF) und nachfolgend SDF1- α generiert⁷. Bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung zeigt sich eine Assoziation zwischen der Höhe der VEGF-Bildung auf ischämische Stimuli und der Möglichkeit Kollateralen zu bilden¹²⁶. Die Stammzellmobilisierung hingegen ist ein komplexer Prozess, der über HIF-1 α , SDF-1 und VEGF induziert wird⁷. Dies geschieht nicht über scherstressabhängige Mechanismen¹²⁰.

Die Arbeitsgruppe von Hambrecht¹²¹ zeigte später, dass körperliche Aktivität bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) schon alleine durch Triggerung von Ischämie zu einer 3-fachen Erhöhung von VEGF¹²² und 4-fach vermehrten Anzahl von zirkulierenden Endothelprogenitorzellen (EPC) führt. Die Patienten mit subklinischer Belastung zeigten im Gegensatz hierzu keine Erhöhung von VEGF und CPC¹²³.

In der folgenden vorgestellten Arbeit sollte der lösliche VEGF-Rezeptor, sFlt-1, der eine antagonisierende Funktion auf VEGF ausübt, untersucht und die Beziehungen zu endothelabhängiger und –unabhängiger Vasodilatation bei gesunden Rauchern im Vergleich zu Kontrollen analysiert werden. VEGF-Konzentrationen sind bei kardiovaskulären Erkrankungen^{33, 36, 37} und in atherosklerotischen Plaques lokal erhöht¹²⁴. Experimentell verbessert exogenes VEGF die endothelabhängigen Reaktionen und Kollateralbildung unter ischämischen Bedingungen und kann außerdem zu erhöhter Plaquebildung beitragen¹²⁴. Da sFlt-1 VEGF neutralisiert, könnten vor therapeutischer Applikation von VEGF zur Induktion von Angiogenese bei KHK und pAVK größere Mengen VEGF nötig sein, um die antagonisierende Wirkung von sFlt-1 zu umgehen.

In der von uns bei gesunden Probanden durchgeführten Studie hatte Nikotinabusus keinen Einfluss auf VEGF. In einer früheren Studie war sFlt-1 bei gesunden Rauchern reduziert^{127, 128}, dieses Ergebnis wurde von uns reproduziert. Bei der von uns untersuchten Gruppe zeigte sich keine Korrelation zwischen sFlt-1, VEGF und endothelabhängiger Reaktion. Dies kann an dem gesunden von uns untersuchten Probandenkollektiv liegen, das keine symptomatischen Individuen einschloss. Außerdem ist ein einziger regulatorischer Zyklus nicht ausreichend, um die komplexen molekularen Mechanismen der vaskulären Antwort zu erklären. Mit den Daten dieser Studie konnte also gezeigt werden, dass gesunde Raucher eine eingeschränkte AMD der Beine aufweisen, und eine inverse Korrelation zwischen Plasma-VEGF, nicht aber von seinem Antagonisten sFlt-1, mit Markern der Endothelfunktion vorliegt. Wir schlussfolgerten, dass VEGF, jedoch nicht sFlt-1 bei der Pathogenese der Endotheldysfunktion bei gesunden Rauchern eine Rolle spielt.

Der Erhalt der endothelialen Integrität spielt eine kritische Rolle bei der Prävention des Voranschreitens der Atherosklerose. Kardiovaskuläre Risikofaktoren induzieren Endothelzellschädigung und eine Kaskade proinflammatorischer Ereignisse, wodurch die Entstehung eines atherosklerotischen Plaques voranschreitet⁴⁹. Letztendlich verursachen Plaqueerosion und -ruptur Herzinfarkte und plötzlichen Herztod¹³⁵. Daher ist der Erhalt der endothelialen Integrität von entscheidender Bedeutung. Frühere Studien hatten eine, wahrscheinlich aus dem Knochenmark stammende Population von Vorläuferzellen, so genannte zirkulierende endotheliale Progenitorzellen (EPC) identifiziert. Diese werden aus mononukleären Zellen isoliert⁸⁰ und exprimieren eine Reihe endothelialer Oberflächenmarker¹³⁶, und sind unter experimentellen Bedingungen bei der Neovaskularisation¹³⁷⁻¹³⁹ und an der Reendothelialisierung von denudierten Gefäßarealen⁴² beteiligt. Daher könnten zirkulierende Progenitorzellen (PC) einen endogenen Reparaturmechanismus darstellen, der dem anhaltenden schädigenden Einfluss kardiovaskulärer

Risikofaktoren auf das Endothel entgegenwirkt und dysfunktionales Endothel ersetzt. Wir untersuchten daher prospektiv, ob die Anzahl zirkulierender PC mit dem Voranschreiten der Atherosklerose korreliert, und ob sich somit ein klinisch aussagekräftiges Potential für eine anhaltende endotheliale Regeneration durch PC etablieren lässt.

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Studie bestätigen und erweitern vorher publizierte Daten, wonach PC ein Surrogatparameter für vaskuläre Funktion⁸⁵ und kumulatives kardiovaskuläres Risiko sind⁸⁶. Erstmals zeigten unsere Daten, dass eine reduzierte Anzahl von zirkulierenden PC unabhängig das Voranschreiten der Atherosklerose vorhersagt. Hiermit belegten die Daten der vorgestellten Studie klinisch die Hypothese, dass zirkulierende PC an der vaskulären Reparatur beteiligt sind. Kurz nach Publikation wurden unsere Ergebnisse von der Arbeitsgruppe von Nickenig bestätigt¹⁴⁰. Zuvor war gezeigt worden, dass die Anzahl zirkulierender PC mit der Endothelfunktion⁸⁶, das Vorliegen eines Apoplex¹⁴¹ und Kollateralbildung bei Patienten mit KHK¹⁴² korreliert, und so war eine wichtige Rolle für zirkulierende PC in der vaskulären Homöostase nahe gelegt worden. Zusammengefasst konnte mit dieser Studie weiter belegt werden, dass zirkulierende PC wichtig für den Erhalt der funktionellen Integrität des Endothels sind und bedeutende Funktionen für den vaskulären Erhalt bei anhaltendem risikofaktor-induziertem Endothelzellschaden innehaben.

Die Reduzierung zirkulierender PC kann sekundär Folge eine Vielzahl von Mechanismen sein: Erschöpfen eines Vorrats von Vorläuferzellen im Knochenmark, reduzierte Mobilisierung oder eingeschränktes Überleben und / oder Differenzierung. Die signifikante inverse Korrelation zwischen Patientenalter und Anzahl zirkulierender PC-Anzahl ist bereits zuvor beschrieben worden^{85, 86}, und unsere Daten deuten an, dass ein anhaltender Endothelzellschaden letztendlich zu einem Entleeren und Erschöpfen eines mutmaßlich endlichen Vorrats an PC führt¹⁴³. Darüber hinaus beeinflussen Risikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose, wahrscheinlich auch direkt die Mobilisierung und das Überleben von PC über verminderte Verfügbarkeit von NO. Hierfür sprechen die Daten von Studien über Mäuse, denen die NO-Synthase fehlt. Bei diesen Tieren liegt eine starke Einschränkung der ischämie- und belastungsinduzierten Mobilisierung von PC vor¹¹³. Außerdem werden PC von Patienten mit ausgeprägtem Risikoprofil schneller seneszent⁸⁵. Letztendlich können Risikofaktoren die Mechanismen negativ beeinflussen, die das Einwandern und die Differenzierung von zirkulierenden PC erleichtern¹²⁵. Es liegt nahe, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren synergistisch auf verschiedenen Mechanismen einwirken, die in einer reduzierten Anzahl von zirkulierenden PC resultieren. In einer neueren Arbeit wurden diese Ergebnisse

weiter bestätigt, da die intrakoronare Injektion von PC die Endothelfunktion verbessert¹⁴⁴.

Es ist daher sinnvoll, die Anzahl von zirkulierenden PC bei Patienten mit ausgeprägtem Risikoprofil zu kontrollieren um neue therapeutische Ansätze zu identifizieren mit denen der endogene vaskuläre Regenerationsmechanismus verbessert und darüber das Voranschreiten der kardiovaskulären Erkrankung modifiziert werden kann.

In mehreren großen Multizenterstudien konnten die Effekte von Statinen zugunsten eines längeren ereignisfreien Überlebens bei Patienten mit atherosklerotischer Erkrankung gezeigt werden⁹². Ebenso verbessern Statine sowohl Anzahl wie Funktion von Progenitorzellen⁸⁷. Das Vorhandensein des potenten Cholesterinsenkens Ezetimibe⁹³⁻⁹⁵ erlaubt die Wirkung der alleinigen Lipidreduktion von der der pleiotropen Effekte der Statine auf die endotheliale Regeneration und Schädigung zu analysieren. Wir reproduzierten mit der von uns vorgestellten Studie nicht nur die positive Wirkung von Statinen auf die endotheliale regenerative Kapazität, sondern zeigten eine signifikante Abnahme der Endothelzellapoptose, als Hinweis auf eine verminderte endotheliale Schädigung. Diese Effekte fanden sich sowohl bei der de novo Statintherapie, wie bei der Dosisescalation der Statine. Unsere klinischen Daten zeigten somit, dass die Statintherapie, am ehesten unabhängig von der LDL-Lipidreduktion, den Endothelzellschaden reduzierten. Die Endothelzellapoptose lässt sich vor allem im Bereich der Plaquentstehung nachweisen³⁹. Zirkulierende apoptotische Mikropartikel sind beim akuten Koronarsyndrom erhöht, haben prokoagulatorische Eigenschaften⁴¹ und können somit zum Voranschreiten der Atherosklerose beitragen. Wir untersuchten daher, ob der zugrunde liegende Mechanismus der erhöhten Anzahl reifer zirkulierender EC durch den programmierten Zelltod, die EC-Apoptose, bedingt sein könnte. Interessanterweise reduzierte Atorvastatin spezifisch die Anzahl der apoptotischen zirkulierenden EC und somit konnte der spezifische antiapoptotische *in vitro*³⁹ Effekt der Statine beim Menschen reproduziert werden. Diese Studie zeigte erstmals eine therapeutische Option, um den stark regulierten Prozess der Apoptose *in vivo* zu beeinflussen. Die reziproken Veränderungen zweier distinkter Zellpopulationen belegt, dass Statine den Endothelzellschaden über die Endothelregeneration hinaus positiv beeinflussen. Weiterführende Analysen lassen sich anhand dieser klinischen Studie nicht durchführen. Im Gegensatz hierzu bewirkte die alleinige Lipidreduktion durch Ezetimibe keine Änderung der Surrogatparameter der endothelialen Schädigung und Regeneration. Das Ausmaß der LDL-Reduktion durch Ezetimibe war in unserer Studie signifikant und ähnlich wie die der beiden anderen Therapiearmen. Ähnlich wie andere Studien deuten unsere

Daten darauf hin, dass die Effekte der Statintherapie am ehesten unabhängig von der LDL-Reduktion sind.

Atherosklerotische Veränderungen sind durch inflammatorische Zellen in den Plaques gekennzeichnet^{49,51, 52}. Das Vorliegen einer viralen Infektion ist bei Kindern unspezifisch mit Endotheldysfunktion assoziiert ist¹⁷. Bei der instabilen Angina liegt eine generelle systemische Inflammation vor⁵⁴. Das Endothel hat eine zentrale Rolle in der Interaktion mit immunkompetenten Zellen, wie Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und T-Zellen³.

Die chronische subklinische Inflammation mit Entwicklung der kardialen Transplantatvaskulopathie (TVP) stellt eine Limitierung für den Langezeiterfolg nach Herztransplantation dar. Obwohl die Pathogenese multifaktoriell ist, legt die Anwesenheit von inflammatorischen Zellen nahe, dass die kontinuierliche perivaskuläre Entzündung die Hauptursache für die TVP ist⁵⁵. Die chronisch anhaltende Inflammation trägt zu Endothelverletzung, Intimahyperplasie und Proliferation der glatten Muskelzellen bei⁵⁷. Auf der anderen Seite werden immunsuppressive sog. regulatorische T-Zellen⁶⁹ in einer Subpopulation von T-Zellen gefunden, die über die Oberflächenmarker CD4 und CD25, sowie über den Transkriptionsfaktor FOXP3^{71, 129} definiert werden. Diese Zellen agieren über verschiedene zell-zell-kontaktabhängige und parakrine Mechanismen und reduzieren so u. a. die Entwicklung experimentell induzierter Atherosklerose⁷⁷. Die Erhöhung der Toleranz bei Patienten nach Herztransplantation könnte also durch eine verringerte chronische subklinische Abstoßung zu einer verbesserten Transplantatakzeptanz führen. Obwohl die meisten Treg in lymphatischem Geweben gefunden werden, wandern diese auch in Transplantate ein, wo sie stark immunsuppressiv wirken¹³⁰. Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass Treg bei der Suppression von Transplantatabstoßungen mitwirken, während zu dem Zeitpunkt der Studie Daten über Treg am Menschen fehlten. Die Daten unserer Studie zeigten erstmalig die Anwesenheit von Treg im Transplantat bei Patienten. Der negative transkardiale Gradient von Treg legt eine konstante Rekrutierung und Migration zirkulierender Treg in das Transplantat. Tatsächlich konnten Treg immunhistologisch in humanen Biopsien von Transplantaten über den spezifischen Transkriptionsfaktor FOXP3 in Abwesenheit einer Abstoßung gezeigt werden. Da es sich hier um eine klinische Studie handelt, können keine Aussagen über Funktion oder Schicksal dieser Zellen gemacht werden. Obwohl andere Studien zeigten, dass die immunsupprimierende Aktivität von Treg über die Freisetzung von Interleukin-10 (IL-10) und Transforming growth factor- β (TGF- β)⁶⁵ veranlasst wird, agieren Treg vornehmlich über zell-zell-kontaktabhängige Mechanismen⁷⁴. Das heißt, dass die observierte Korrelation zwischen IL-10 und TGF- β -Spiegel und die Anzahl der

zirkulierenden Treg entweder auf deren Produktion durch CD4⁺CD25⁺⁺-Zellen oder anderer regulatorischer T-Zellen zurückzuführen ist, die hauptsächlich über die Freisetzung löslicher Zytokine^{72, 75} wirkt. IL-10 hat einen hohen vaskuloprotektiven Einfluss und verlangsamt die Entstehung von Atherosklerose¹³¹. Obwohl der Effekt von TGF-β auf die Transplantatvaskulopathie kontrovers beurteilt wird, legen die erhöhten TGF-Werte in tolerierten Transplantaten eine Wirkung auf Transplantattoleranz nahe¹³². Die Gabe von Tregs im Tiermodell vermindert die Entstehung der Transplantatvaskulopathie¹³³, wie spätere Daten zeigten. Die reduzierte Anzahl zirkulierender CD4⁺CD25⁺⁺ bei Herztransplantierten impliziert niedrigere Anzahl immunsuppressiver Treg. Dies könnte entweder durch eine Reduktion von CD25 auf der Oberfläche von CD4⁺-T-Zellen durch das immunsuppressive Regime oder durch Erschöpfung bei anhaltend Rekrutierung eines mutmaßlichen endlichen Vorrats dieser Zellen resultieren. Tatsächlich führte Cyclosporin A zu einer Reduzierung von Treg¹³⁴. Der negative transkardiale Gradient von CD4⁺CD25⁺⁺-Treg koinzidiert mit einem Anstieg des Aktivierungsmarkers CD69 auf CD4⁺-T-Zellen nach transkoronarer Passage. Dies deutet auf eine spezifische Rekrutierung von Treg als Versuch, die Immunantwort im Transplantat zu unterdrücken, trotz systemischer Immunsuppression. Die konstante Präsentation von Alloantigenen durch Endothelzellen könnte die kontinuierliche Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen erklären³. Tatsächlich zeigten unsere Daten von transkoronaren Gradienten zirkulierender Zellen von Patienten nach Nierentransplantation keine Änderungen von Treg oder aktivierten CD4⁺-T-Zellen.

Mit dieser Studie haben wir erstmalig die Anwesenheit von Treg im menschlichen Herztransplantat zeigen können. Die konstante Rekrutierung und Migration in das Transplantat und die anhaltende Aktivierung innerhalb des Transplantats kann letztendlich zur Dysbalance zwischen regulatorischen und aktivierten T-Zellen führen. Prospektive Daten, die die Entwicklung der Transplantatvaskulopathie analysieren, werden den Einfluss residenter und zirkulierender regulatorischer T-Zellen auf diese Erkrankung bestätigen müssen. Mittel, die die Anzahl von Treg erhöhen, bzw. ihre Aktivität in ein Transplantat dirigieren, könnten eine interessante Option sein für die Induktion oder den Erhalt der Toleranz gegenüber einem Transplantat in der Langzeitbehandlung von Herztransplantierten.

Das vaskulotrope Parvovirus B19 (B19V) ist der Erreger, der am häufigsten (etwa 50%) mit einer inflammatorischen Kardiomyopathie (DCMi) assoziiert ist. B19V könnte zum einen EC direkt schädigen¹⁴⁵ und Apoptose induzieren mit konsekutiver Denudierung von Gefäßen und endothelialer Dysfunktion¹⁰⁷, zum anderen könnte eine Endothelfunktionsstörung bei Persistenz des B19V im Knochenmark indirekt

durch Schädigung der für die endotheliale Regeneration notwendigen Progenitorzellen verursacht werden.

Die Ergebnisse der vorgestellten Studie bestätigen einen B19V-induzierten assoziierten EC-Schaden. Wir konnten zeigen, dass B19V EC infiziert und EC-Apoptose involviert ist in der Pathogenese des extrinsischen viralen EC-Schadens bei Patienten mit B19V. Wichtiger jedoch, konnte der EC-Schaden durch Immunmodulation mit IFN- β reduziert werden. Dieser Effekt hielt bei Patienten über den eigentlichen Behandlungszeitraum an, als Hinweis auf eine krankheitsmodifizierende Intervention von IFN- β . Die zugrunde liegenden Mechanismen der EC-Schädigung durch B19V sind komplex.

Um zu untersuchen, ob Immunmodulation die Funktion von EC nach Infektion von B19V beeinflussen kann, wurde die Viabilität von EC nach Zugabe von IFN- β untersucht. Die reduzierte Viabilität von EC konnte durch INF- β wieder verbessert werden und die virale Replikation wurde dadurch reduziert. Diese Daten zeigen, dass der B19V-induzierte Schaden bei EC zumindest teilweise durch eine direkte Virus-Zell-Interaktion mediiert wird.

Es sollte weiterhin untersucht werden, ob diese in vitro Daten einen Ansatz bieten, die eingeschränkte Endothelfunktion bei Patienten mit durch eine 6-monatige IFN- β -Therapie zu verbessern. Hierzu sollten verschiedene Aspekte des EC-Schadens in vivo in einer Phase-1-Studie untersucht werden.

Die inverse Korrelation zwischen zirkulierenden EC und FMD suggeriert einen ähnlichen Mechanismus, der zur EC-Apoptose und Endotheldysfunktion in dieser Krankheitsentität führt. Die simultane Messung verschiedener Reifungsstadien von PC und reifen EC erlaubte die Unterscheidung zwischen Gefäßwandschaden und regenerativer Kapazität. Die vermehrte Anzahl von CD34⁺KDR⁺-PC, sowie des unreiferen Stadiums von CD133⁺KDR⁺ bei Patienten mit B19V und Angina deutet auf eine möglicherweise ischämieausgelöste Mobilisierung dieser Zellen. Bedeutsam ist, dass bei diesen Patienten mit viral induziertem EC-Schaden, im Gegensatz zu Patienten mit klassischen Risikofaktoren^{83, 85}, eine Mobilisierung von PC möglich ist. Unsere aktuellen vorläufigen Ergebnisse zeigen allerdings, dass die Funktion dieser PC stark eingeschränkt ist.

IFN- β , das einen positiven Effekt bei Patienten mit entero- oder adenoviraler Persistenz und LV-Dysfunktion hatte¹¹⁴, zeigte bei Patienten mit B19V nach 6-Monaten eine Reduktion der zirkulierenden muren EC und Normalisierung der Endotheldysfunktion. Im Gegensatz hierzu blieb die Endothelfunktion bei Patienten mit B19V ohne Therapie unverändert schlecht, womit eine spontane Verbesserung unwahrscheinlich ist. Dies ist die erste Studie, die eine Verbesserung des Endothelzellschadens durch Immunmodulation belegt. Gleichzeitig normalisierte sich die Anzahl zirkulierender PC und atypische Angina trat seltener auf. Ein weiterer

Hinweis auf die initial erhöhte Mobilisierung von PC sind die ischämieausgelösten erhöhten VEGF-Spiegel, die unter IFN- β abfielen. Hiermit also konnten unsere klinischen Daten belegen, dass B19V zu dem kontinuierlichem EC-Schaden in vivo beiträgt und dass Immunmodulation einen viral induzierten EC-Schaden beeinflussen kann.

5 Zusammenfassung

In der vorgelegten Arbeit werden Ergebnisse zu dem Forschungsschwerpunkt der endothelialen Schädigung und Regeneration beim Menschen vorgelegt. Das Verständnis über den Einfluss von Faktoren auf das Endothel hat sich im Laufe der Jahre, in dem diese Arbeit entstand, stark gewandelt.

Anfänglich herrschte die Vorstellung, dass lediglich so genannte „klassische Risikofaktoren“, wie Rauchen, Diabetes mellitus, Bluthochdruck, genetische Belastung und erhöhte Blutfette einen Einfluss auf das Endothel haben.

Beim Menschen werden zur Messung der Endothelfunktion, deren Störung ein essentieller Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose ist, Surrogatparameter wie die endothelabhängige Dilatation oder humorale und zelluläre Messgrößen herangezogen. Unmittelbare, lokale Flussverhältnisse schalten Gene in der Zelle an oder aus und regulieren hierüber Funktionalität, programmierten Zelltod – die Apoptose-, das Zytoskelett, entzündliche Aktivierung oder Sekretion bestimmter endothelialer Faktoren. Dies beeinflusst entscheidend die Konzentration löslicher humoraler Faktoren wie VEGF und lösliches VCAM. Die Konzentration des löslichen Flt-1 im Blut, dem Antagonisten von VEGF, scheint keinen direkten Einfluss auf die Endotheldysfunktion zu haben. Für die Integrität des Endothels sind sowohl endotheliale Schädigung, wie auch das Ausmaß der endothelialen Regeneration entscheidend. Eine niedrige Anzahl zirkulierender Progenitorzellen, ein Surrogatparameter für die endotheliale Regeneration, hat einen wichtigen Einfluss auf, und ist prädiktiv, für das Auftreten zukünftiger kardiovaskulärer Komplikationen. Die endotheliale Regeneration einerseits und das Ausmaß der Endothelzellapoptose andererseits lassen sich medikamentös durch Statine beeinflussen. Im Gegensatz hierzu hat die alleinige potente Lipidreduktion durch Ezetimibe keinen Einfluss auf die endotheliale Schädigung und Regeneration gehabt. Hierdurch wurde ein weiterer pleiotroper Effekt der Statine belegt. Das Endothel interagiert mit immunkompetenten Zellen. Hier kommt ihm eine Schlüsselrolle bei der chronischen subklinischen Transplantatabstoßung mit Entwicklung der Transplantatvaskulopathie zu. Es konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung zirkulierender Lymphozyten nach Passage durch ein Transplantat beeinflusst wird, und dass es zu einer Migration von tolerogenen Zellen in das humane Transplantat kommt. Virale Infekte führen nicht nur unspezifisch zu einer vorübergehenden Schädigung und Aktivierung des Endothels. Durch Infektion mit dem humanen Parvovirus B19 ließen sich spezifisch Schädigung von reifen Endothelzellen, wie auch Beeinflussung der Zellen der endothelialen Regeneration nachweisen.

Zusammenfassend werden in dieser Arbeit Untersuchungen zu humoralen und zellulären Faktoren der endothelialen Schädigung und Regeneration bei Patienten mit atherosklerotischer und immunologisch bedingter endothelialer und kardialer Schädigung vorgestellt.

Literaturverzeichnis

1. Wagner DD, Frenette PS. The vessel wall and its interactions. *Blood*. 2008;111(11):5271-5281.
2. Furchgott RF ZJ. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288:373-376.
3. Choi J, Enis DR, Koh KP, Shiao SL, Pober JS. T lymphocyte-endothelial cell interactions. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:683-709.
4. A M Malek GHG, V J Dzau, and S Izumo. Fluid shear stress differentially modulates expression of genes encoding basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor B chain in vascular endothelium. *J Clin Invest*. 1993;92(4):2013-2021.
5. Mitsumata M, Fishel RS, Nerem RM, Alexander RW, Berk BC. Fluid shear stress stimulates platelet-derived growth factor expression in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1993;265(1):H3-8.
6. Malek AM, Izumo S. Control of endothelial cell gene expression by flow. *Journal of Biomechanics*. 1995;28(12):1515-1528.
7. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Yung S, Chimenti S, Landsman L, Abramovitch R, Keshet E. VEGF-Induced Adult Neovascularization: Recruitment, Retention, and Role of Accessory Cells. *Cell*. 2006;124(1):175-189.
8. Conklin BS, Zhong D-s, Zhao W, Lin PH, Chen C. Shear Stress Regulates Occludin and VEGF Expression in Porcine Arterial Endothelial Cells. *Journal of Surgical Research*. 2002;102(1):13-21.
9. Ando J, Tsuboi H, Korenaga R, Takada Y, Toyama-Sorimachi N, Miyasaka M, Kamiya A. Shear stress inhibits adhesion of cultured mouse endothelial cells to lymphocytes by downregulating VCAM-1 expression. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1994;267(3):C679-687.
10. Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Thomas O, Deanfield JE. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J*. 1995;74(3):247-253.
11. Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, Malagutti P, Bugli AM, Bragotti LZ, Francolini G, Mauro E, Castoldi G, Ferrari R. CD34+ and Endothelial Progenitor Cells in Patients With Various Degrees of Congestive Heart Failure. *Circulation*. 2004;110(10):1209-1212.

12. Hillebrands J-L, Klatter FA, van den Hurk BMH, Popa ER, Nieuwenhuis P, Rozing J. Origin of neointimal endothelium and α -actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *J. Clin. Invest.* 2001;107(11):1411-1422.
13. Shimizu K SS, Aikawa M, Fukumoto Y, Rabkin E, Libby P, Mitchell RN. Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth-muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy. *Nat Med.* 2001;7(6):738-741.
14. Song L, Leung C, Schindler C. Lymphocytes are important in early atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 2001;108(2):251-259.
15. Valujskikh A HP. Emerging roles of endothelial cells in transplant rejection. *Curr Opin Immunol.* 2003;15(5):493-498.
16. Vallbracht KB, Schwimmbeck PL, Seeberg B, Kuhl U, Schultheiss H-P. Endothelial dysfunction of peripheral arteries in patients with immunohistologically confirmed myocardial inflammation correlates with endothelial expression of human leukocyte antigens and adhesion molecules in myocardial biopsies. *Journal of the American College of Cardiology.* 2002;40(3):515-520.
17. Charakida M, Donald AE, Terese M, Leary S, Halcox JP, Ness A, Smith GD, Golding J, Friberg P, Klein NJ, Deanfield JE, for the ALSPAC (Avon Longitudinal Study of Parents and Children) Study Team. Endothelial Dysfunction in Childhood Infection. *Circulation.* 2005;111(13):1660-1665.
18. Tschöpe C, Westermann D, Steendijk P, Kasner M, Rudwaleit M, Schwimmbeck P, Poller W, Schultheiss H-P. Coronary vasospasms induced acute diastolic dysfunction in a patient with Raynaud's phenomenon. *Clinical Research in Cardiology.* 2006;95(6):344-348.
19. Yilmaz A, Mahrholdt H, Athanasiadis A, Vogelsberg H, Meinhardt G, Voehringer M, Kispert E-M, Deluigi C, Baccouche H, Spodarev E, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U. Coronary vasospasm as the underlying cause for chest pain in patients with PVB19-myocarditis. *Heart.* 2008:hrt.2007.131383.
20. Anderson T, Uehata A, Gerhard M, Meredith I, Knab S, Delagrangé D, Lieberman E, Ganz P, Creager M, Yeung A. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol.* 1995;26(5):1235-1241.
21. Taneva E BK, Wiens L, Makarova R, Schmidt-Lucke C, Luley C, Westphal S. Early effects on endothelial function of atorvastatin 40 mg twice daily and its withdrawal. *Am J Cardiol.* 2006;97:1002-1006.

22. Schmidt-Lucke C, Borgström P, Schmidt-Lucke JA. Low frequency flowmotion/(vasomotion) during patho-physiological conditions. *Life Sciences*. 2002;71(23):2713-2728.
23. de Jongh RT, Serne EH, IJzerman RG, de Vries G, Stehouwer CDA. Impaired Microvascular Function in Obesity: Implications for Obesity-Associated Microangiopathy, Hypertension, and Insulin Resistance. *Circulation*. 2004;109(21):2529-2535.
24. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic Impact of Coronary Vasodilator Dysfunction on Adverse Long-Term Outcome of Coronary Heart Disease. *Circulation*. 2000;101(16):1899-1906.
25. Fischer D, Rossa S, Landmesser U, Spiekermann S, Engberding N, Hornig B, Drexler H. Endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure is independently associated with increased incidence of hospitalization, cardiac transplantation, or death. *Eur Heart J*. 2005;26(1):65-69.
26. Vallbracht KB, Schwimmbeck PL, Kuhl U, Rauch U, Seeberg B, Schultheiss H-P. Differential Aspects of Endothelial Function of the Coronary Microcirculation Considering Myocardial Virus Persistence, Endothelial Activation, and Myocardial Leukocyte Infiltrates. *Circulation*. 2005;111(14):1784-1791.
27. Neufeld G CT, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*. 1999;13:9-22.
28. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386:671-674.
29. Hornig C BT, Bartsch W, Yayon A, Weich HA. Detection and quantification of complexed and free soluble human vascular endothelial growth factor receptor-1 (sVEGFR-1) by ELISA. *J Immunol Methods*. 1999;226(1-2):169-177.
30. Kendall RL TK. Inhibition of vascular endothelial growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:10705-10709.
31. Kroll J WJ. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem-Biophys-Res-Commun*. 1998;252(3):743-746.
32. Belgore FM BA, Li-Saw-Hee FL, Beevers DG, Lip GY. Plasma levels of vascular endothelial growth factor and its soluble receptor (SFlt-1) in essential hypertension. *Am J Cardiol*. 2001;87(6):805-807.
33. Couffinhal T KM, Witzenbichler B, Chen D, Murohara T, Losordo DW, Symes J, Isner JM. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor

- (VEGF/VPF) in normal and atherosclerotic human arteries. *Am J Pathol.* 1997;150(5):1673-1685.
34. Chaturvedi N FJ, Pokras F, Rottiers R, Papazoglou N, Aiello LP; EUCLID Study Group. Circulating plasma vascular endothelial growth factor and microvascular complications of type 1 diabetes mellitus: the influence of ACE inhibition. *Diabet Med.* 2001;18(4):288-294.
 35. Lip PL BF, Blann AD, Hope-Ross MW, Gibson JM, Lip GY. Plasma VEGF and soluble VEGF receptor FLT-1 in proliferative retinopathy: relationship to endothelial dysfunction and laser treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(8):2115-2119.
 36. Blann AD BF, Constans J, Conri C, Lip GY. Plasma vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in patients with hyperlipidemia and atherosclerosis and the effects of fluvastatin or fenofibrate. *Am J Cardiol.* 2001;87(10):1160-1163.
 37. Blann AD BF, McCollum CN, Silverman S, Lip PL, Lip GY. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1, in the plasma of patients with coronary or peripheral atherosclerosis, or Type II diabetes. *Clin Sci (Lond).* 2002;102(2):187-194.
 38. Belgore FM LG, Blann AD. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1, in smokers and non-smokers. *Br J Biomed Sci.* 2000;57(3):207-213.
 39. Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM. Suppression of Apoptosis by Nitric Oxide via Inhibition of Interleukin-1beta -converting Enzyme (ICE)-like and Cysteine Protease Protein (CPP)-32-like Proteases. *J. Exp. Med.* 1997;185(4):601-608.
 40. Asai K, Kudej RK, Shen Y-T, Yang G-P, Takagi G, Kudej AB, Geng Y-J, Sato N, Nazareno JB, Vatner DE, Natividad F, Bishop SP, Vatner SF. Peripheral Vascular Endothelial Dysfunction and Apoptosis in Old Monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(6):1493-1499.
 41. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2000;101(8):841-843.
 42. Walter D, Rittig K, Bahlmann F, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo D, Asahara T, Isner J. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation.* 2002;105(25):3017-3024.

43. Hoffmann J, Haendeler J, Aicher A, Rossig L, Vasa M, Zeiher AM, Dimmeler S. Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide. *Circ Res*. 2001;89(8):709-15.
44. Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, Wang T, Gregg D, Ramaswami P, Phippen AM, Annex BH, Dong C T, DA. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation*. 2003;108(4):457-463.
45. Shi Q, Rafii S, Wu M, Wijelath E, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage L, Moore M, Storb R, Hammond W. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*. 1998;92(2):362-367.
46. Shintani S MT, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001;103(23):2776-2779.
47. Pourati Ia, Kimmelstiel Ca, Rand Wb, Karas Ra. Statin use is associated with enhanced collateralization of severely diseased coronary arteries. *American Heart Journal*. 2003;146(5):876-881.
48. Rafii, S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest*. 2000;105(1):17-19.
49. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105(9):1135-1143.
50. Virchow R von. Die Entzündung. *Handbuch der Speziellen Pathologie und Therapie. Allgemeine Störungen der Ernährung und des Blutes*. 1854:46-94.
51. Kiechl S, Egger G, Mayr M, Wiedermann CJ, Bonora E, Oberhollenzer F, Muggeo M, Xu Q, Wick G, Poewe W, Willeit J. Chronic Infections and the Risk of Carotid Atherosclerosis : Prospective Results From a Large Population Study. *Circulation*. 2001;103(8):1064-1070.
52. Knoflach M MB, Mayerl C, Sedivy R, Wick G. Atherosclerosis as a paradigmatic disease of the elderly: role of the immune system. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2003;23(1):117-132.
53. Torzewski J, Torzewski M, Bowyer DE, Frohlich M, Koenig W, Waltenberger J, Fitzsimmons C, Hombach V. C-Reactive Protein Frequently Colocalizes With the Terminal Complement Complex in the Intima of Early Atherosclerotic Lesions of Human Coronary Arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18(9):1386-1392.
54. Buffon A, Biasucci LM, Liuzzo G, D'Onofrio G, Crea F, Maseri A. Widespread Coronary Inflammation in Unstable Angina. *N Engl J Med*. 2002;347(1):5-12.
55. Hruban RH, Beschorner WE, Baumgartner WA, Augustine SM, Reitz BA, Hutchins GM. Accelerated arteriosclerosis in heart transplant recipients is

- associated with a T-lymphocyte-mediated endothelialitis. *Am J Pathol.* 1990;137(4):871-882.
56. Shimizu K, Aikawa M, Takayama K, Libby P, Mitchell R. Direct anti-inflammatory mechanisms contribute to attenuation of experimental allograft arteriosclerosis by statins. *Circulation.* 2003;108(17):2113-2120.
 57. Shi C, Lee W, He Q, Zhang D, Fletcher DJ, Newell J, Haber E. Immunologic basis of transplant-associated arteriosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(9):4051-4056.
 58. Nagano H, Libby P, Taylor MK, Hasegawa S, Stinn JL, Becker G, Tilney NL, Mitchell RN. Coronary arteriosclerosis after T-cell-mediated injury in transplanted mouse hearts: role of interferon-gamma. *Am J Pathol.* 1998;152(5):1187-1197.
 59. Szeto W, Krasinskas A, Kreisel D, Krupnick A, Popma S, Rosengard B. Depletion of recipient CD4+ but not CD8+ T lymphocytes prevents the development of cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation.* 2002;73(7):1116-1122.
 60. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y-J, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767-811.
 61. Lopez-Cabrera M, Santis A, Fernandez-Ruiz E, Blacher R, Esch F, Sanchez-Mateos P, Sanchez-Madrid F. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *J. Exp. Med.* 1993;178(2):537-547.
 62. Posselt A, Vincenti F, Bedolli M, Lantz M, Roberts J, Hirose R. CD69 expression on peripheral CD8 T cells correlates with acute rejection in renal transplant recipients. *Transplantation.* 2003;76(1):190-195.
 63. Hackstein H, Thomson A. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(1):24-35.
 64. Steinman RM, Nussenzweig MC. Inaugural Article: Avoiding horror autotoxicus: The importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *PNAS.* 2002;99(1):351-358.
 65. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med.* 2000;192(9):1213-1222.

66. Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breittmayer J, Cottrez F, Groux H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity*. 2003;18(5):605-617.
67. Moseman E, Liang X, Dawson A, Panoskaltsis-Mortari A, Krieg A, Liu Y, Blazar B, Chen W. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2004;173(7):4433-4442.
68. Sato K, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T. Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells. *Blood*. 2003;101(9):3581-3589.
69. O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med*. 2004;10(8):801-805.
70. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):330-336.
71. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299(5609):1057-1061.
72. Hara M, Kingsley C, Niimi M, Read S, Turvey S, Bushell A, Morris P, Powrie F, Wood K. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J Immunol*. 2001;166(6):3789-3796.
73. Fukaura H, Kent SC, Pietruszewicz MJ, Khoury SJ, Weiner HL, DA H. Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J Clin Invest*. 1996;98(1):70-77.
74. Janssens W, Carlier V, Wu B, VanderElst L, Jacquemin MG, Saint-Remy JM. CD4(+)/CD25(+) T cells lyse antigen-presenting B cells by Fas-Fas ligand interaction in an epitope-specific manner. *J Immunol*. 2003;171(9):4604-4612.
75. Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(6):389-400.
76. Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and Induced CD4+CD25+ Cells Educate CD4+CD25- Cells to Develop Suppressive Activity: The Role of IL-2, TGF- β , and IL-10. *J Immunol*. 2004;172(9):5213-5221.
77. Mallat Z, Gojova A, Brun V, Esposito B, Fournier N, Cottrez F, Tedgui A, Groux H. Induction of a regulatory T cell type 1 response reduces the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation*. 2003;108(10):1232-1237.
78. Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J. Clin. Invest*. 2005;115(3):572-583.

79. Aicher A, Rentsch M, Sasaki K-i, Ellwart JW, Fandrich F, Siebert R, Cooke JP, Dimmeler S, Heeschen C. Nonbone Marrow-Derived Circulating Progenitor Cells Contribute to Postnatal Neovascularization Following Tissue Ischemia. *Circ Res*. 2007.
80. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner J. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964-967.
81. Gehling UM, ES, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*. 2000;95(10):3106-3112.
82. Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood*. 2005;106(5):1525-1531.
83. Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U, Dimmeler S, Zeiher AM. Reduced Number of Circulating Endothelial Progenitor Cells Predicts Future Cardiovascular Events: Proof of Concept for the Clinical Importance of Endogenous Vascular Repair. *Circulation*. 2005;111(22):2981-2987.
84. Tse HF, KY, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet*. 2003;361(93519):47-49.
85. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003;348(7):593-600.
86. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, S D. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*. 2001;89(1):E1-7.
87. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher A, Dimmeler S. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation*. 2001;103(24):2885-2890.
88. Urbich C, Knau A, Fichtlscherer S, Walter DH, Bruhl T, Potente M, Hofmann WK, de Vos S, Zeiher AM, Dimmeler S. FOXO-dependent expression of the proapoptotic protein Bim: pivotal role for apoptosis signaling in endothelial progenitor cells. *FASEB J*. 2005:04-2727fje.
89. Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Bohm M, Dirnagl U, Nickenig G. Bone Marrow-Derived Progenitor Cells Modulate Vascular Reendothelialization and

- Neointimal Formation: Effect of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(10):1567-1572.
90. Landmesser U, Engberding N, Bahlmann FH, Schaefer A, Wiencke A, Heineke A, Spiekermann S, Hilfiker-Kleiner D, Templin C, Kotlarz D, Mueller M, Fuchs M, Hornig B, Haller H, Drexler H. Statin-Induced Improvement of Endothelial Progenitor Cell Mobilization, Myocardial Neovascularization, Left Ventricular Function, and Survival After Experimental Myocardial Infarction Requires Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation.* 2004;110(14):1933-1939.
91. Suzuki G, Iyer V, Cimato T, Canty JM, Jr. Pravastatin Improves Function in Hibernating Myocardium by Mobilizing CD133+ and cKit+ Bone Marrow Progenitor Cells and Promoting Myocytes to Reenter the Growth Phase of the Cardiac Cell Cycle. *Circ Res.* 2009;104(2):255-264.
92. Halcox JPJ, Deanfield JE. Beyond the laboratory: clinical implications for statin pleiotropy. *Circulation.* 2004;109:II-42-II-48.
93. Ballantyne CM, Hourii J, Notarbartolo A, Melani L, Lipka LJ, Suresh R, Sun S, LeBeaut AP, Sager PT, Veltri EP, Ezetimibe Study Group. Effect of ezetimibe coadministered with atorvastatin in 628 patients with primary hypercholesterolemia: a prospective, randomized, double-blind trial. *Circulation.* 2003;107(19):2409-2415.
94. Davidson MH, McGarry T, Bettis R, Melani L, Lipka LJ, LeBeaut AP, Suresh R, Sun S, Veltri EP. Ezetimibe coadministered with simvastatin in patients with primary hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40(12):2125-2134.
95. Bruckert E, Giral P, P T. Perspectives in cholesterol-lowering therapy: the role of ezetimibe, a new selective inhibitor of intestinal cholesterol absorption. *Circulation.* 2003;107:3124-3131-3128.
96. Emile R, Mohler III YS, Jonni Moore, Andrew Bantly, Damir Hamamdzic, Mervin Yoder, Daniel J. Rader, Mary Putt, Lifeng Zhang, Michael Parmacek, Robert L. Wilensky,. Diabetes reduces bone marrow and circulating porcine endothelial progenitor cells, an effect ameliorated by atorvastatin and independent of cholesterol. *Cytometry Part A.* 2009;75A(1):75-82.
97. Landmesser U, Bahlmann F, Mueller M, Spiekermann S, Kirchhoff N, Schulz S, Manes C, Fischer D, de Groot K, Fliser D, Fauler G, Marz W, Drexler H. Simvastatin Versus Ezetimibe: Pleiotropic and Lipid-Lowering Effects on Endothelial Function in Humans. *Circulation.* 2005;111(18):2356-2363.
98. Piorkowski M, Fischer S, Stellbaum C, Jaster M, Martus P, Morguet AJ, Schultheiss H-P, Rauch U. Treatment With Ezetimibe Plus Low-Dose

- Atorvastatin Compared With Higher-Dose Atorvastatin Alone: Is Sufficient Cholesterol-Lowering Enough to Inhibit Platelets? *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;49(10):1035-1042.
99. Kuhl U, Noutsias M, Seeberg B, al. e. Immunohistological evidence for a chronic intramyocardial inflammatory process in dilated cardiomyopathy. *Heart*. 1996;75:295-300.
 100. Kuhl U, Pauschinger M, Seeberg B, Lassner D, Noutsias M, Poller W, Schultheiss H. Viral Persistence in the Myocardium Is Associated With Progressive Cardiac Dysfunction. *Circulation*. 2005;112(13):1965-1970.
 101. Moffat S, Yaegashi N, Tada K, Tanaka N, Sugamura K. Human Parvovirus B19 Nonstructural (NS1) Protein Induces Apoptosis in Erythroid Lineage Cells. *J Virol*. 1998;72:3018-3028.
 102. Fu Y, Ishii KK, Munakata Y, Saitoh T, Kaku M, Sasaki T. Regulation of tumor necrosis factor alpha promoter by human parvovirus B19 NS1 through activation of AP-1 and AP-2. *J Virol*. 2002;76:5295-5403.
 103. Duechting A, Tschöpe C, Kaiser H, Lamkemeyer T, Tanaka N, Aberle S, Lang F, Torresi J, Kandolf R, Bock C-T. Human Parvovirus B19 NS1 Protein Modulates Inflammatory Signaling by Activation of STAT3/PIAS3 in Human Endothelial Cells. *J. Virol*. 2008:JVI.00891-00808.
 104. Brian D. Poole YVK, and Stanley J. Naides. Parvovirus B19-Induced Apoptosis of Hepatocytes. *J. Virol*. 2004;78:7775-7783.
 105. Poole BD, Karetny YV, Naides S. Parvovirus B19-Induced Apoptosis of Hepatocytes. *J. Virol*. 2004;78:7775-7783.
 106. Poole BD, Zhou J, Grote A, Schiffenbauer A, Naides SJ. Apoptosis of Liver-Derived Cells Induced by Parvovirus B19 Nonstructural Protein. *J. Virol*. 2006;80(8):4114-4121.
 107. Tschöpe C, Bock C-T, Kasner M, Noutsias M, Westermann D, Schwimmbeck P-L, Pauschinger M, Poller W-C, Kuhl U, Kandolf R, Schultheiss H-P. High Prevalence of Cardiac Parvovirus B19 Infection in Patients With Isolated Left Ventricular Diastolic Dysfunction. *Circulation*. 2005;111(7):879-886.
 108. Bultmann BD, Klingel K, Sotlar K, Bock CT, Baba HA, Sauter M, R. K. Fatal parvovirus B19-associated myocarditis clinically mimicking ischemic heart disease: an endothelial cell-mediated disease. *HUm Pathol*. 2003;34:92-95.
 109. Ferreira AC, Peter AA, Mendez AJ, Jimenez JJ, Mauro LM, Chirinos JA, Ghany R, Virani S, Garcia S, Horstman LL, Purow J, Jy W, Ahn YS, de Marchena E. Postprandial Hypertriglyceridemia Increases Circulating Levels of Endothelial Cell Microparticles. *Circulation*. 2004;110(23):3599-3603.

110. Rossig L, Dimmeler S, Zeiher AM. Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis. *Basic Res Cardiol*. 2001;96(96(1)):11-22.
111. Lundqvist A TT, Bostic J, Söderlund M, Broliden K. Clinical and laboratory findings in immunocompetent patients with persistent parvovirus B19 DNA in bone marrow. *Scand J Infect Dis*. 1999;31:11-16.
112. Cassinoti P BG, Fopp M, Siegl G. Evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in bone marrow. *J Med Virol*. 1997;53:229-232.
113. Aicher AH, C Mildner-Rihm, C Urbich, C Ihling, C Technau-Ihling, K Zeiher, AM Dimmeler, S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med*. 2003.
114. Kuhl U PM, Schwimbeck PL, Seeberg B, Lober C, Noutsias M, Poller W, Schultheiss H-P. Interferon- β Treatment Eliminates Cardiotoxic Viruses and Improves Left Ventricular Function in Patients With Myocardial Persistence of Viral Genomes and Left Ventricular Dysfunction. *Circulation*. 2003;107:2793-2798.
115. Kühl U SH-P. Interferon- β therapy in inflammatory cardiomyopathies. *unpublished*. 2009.
116. Postadzhiyan AS TA, Kehayov I, Finkov B. Circulating soluble adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and their association with clinical outcome, troponin T and C-reactive protein in patients with acute coronary syndromes. *Clin Biochem*. 2008;41 (3):126-133.
117. Luc G AD, Evans A, Amouyel P, Ferrieres J, Bard JM, Elkhailil L, Fruchart JC, Ducimetiere P; PRIME Study Group. Circulating soluble adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and incident coronary heart disease: the PRIME Study. *Atherosclerosis*. 2003;170 (1):169-176.
118. Grewal J CS, Frohlich J, Mancini GB. Assessment of novel risk factors in patients at low risk for cardiovascular events based on Framingham risk stratification. *Clin Invest Med*. 2003;26 (4):158-165.
119. Misra S, Fu AA, Puggioni A, Karimi KM, Mandrekar JN, Glockner JF, Juncos LA, Anwer B, McGuire AM, Mukhopadhyay D. Increased shear stress with upregulation of VEGF-A and its receptors and MMP-2, MMP-9, and TIMP-1 in venous stenosis of hemodialysis grafts
10.1152/ajpheart.00650.2007. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294(5):H2219-2230.
120. Milkiewicz M DJ, Fudalewski T, Ispanovic E, Aghasi M, Haas TL. HIF-1 α and HIF-2 α play a central role in stretch-induced but not shear-stress-induced angiogenesis in rat skeletal muscle. *J Physiol*. 2007;583:753-766.

121. Linke A ES, Hambrecht R. Effects of exercise training upon endothelial function in patients with cardiovascular disease. *Front Biosci.* 2008;13:424-432.
122. Sandri M AV, Gielen S, Linke A, Lenk K, Kränkel N, Lenz D, Erbs S, Scheinert D, Mohr FW, Schuler G, Hambrecht R. Effects of exercise and ischemia on mobilization and functional activation of blood-derived progenitor cells in patients with ischemic syndromes: results of 3 randomized studies. *Circulation.* 2005;111 (25):3391-3399.
123. Adams V, Lenk K, Linke A, Lenz D, Erbs S, Sandri M, Tarnok A, Gielen S, Emmrich F, Schuler G, Hambrecht R. Increase of Circulating Endothelial Progenitor Cells in Patients with Coronary Artery Disease After Exercise-Induced Ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(4):684-690.
124. Celletti FL WJ, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, Dake MD. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med.* 2001;7(4):425-429.
125. Dimmeler S, Zeiher AM. Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis? *J Mol Med.* 2004;83(10):671-677.
126. Schultz A LL, Hochberg I, Beyar R, Stone T, Skorecki K, Lavie P, Roguin A, Levy AP. Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF: significance for the development of the coronary artery collateral circulation. *Circulation.* 1999;100(5):547-552.
127. Belgore FM BA, Lip GY. Measurement of free and complexed soluble vascular endothelial growth factor receptor, Flt-1, in fluid samples: development and application of two new immunoassays. *Clin Sci (Lond).* 2001;100(5):567-575.
128. Wasada T KR, Katsumori K, Naruse M, Omori Y. Plasma concentration of immunoreactive vascular endothelial growth factor and its relation to smoking. *Metabolism.* 1998;47(1):27-30.
129. O'Garra A VP. Twenty-first century Foxp3. *Nat Immunol.* 2003;4(4):304-306.
130. Salama AD NN, Clarkson MR, Harmon WE, Sayegh MH. Regulatory CD25+ T cells in human kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(6):1643-1651.
131. Fischbein M, Yun J, Laks H, Irie Y, Oslund-Pinderski L, Fishbein M, Bonavida B, Ardehali A. Regulated interleukin-10 expression prevents chronic rejection of transplanted hearts. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, The.* 2003;126(1):216-223.
132. Josien R, Douillard P, Guillot C, Muschen M, Anegon I, Chetritt J, Menoret S, Vignes C, Souillou JP, Cuturi MC. A critical role for transforming growth

- factor-beta in donor transfusion-induced allograft tolerance. *J Clin Invest.* 1998;102(11):1920-1926.
- 133.** Ueno T HA, Clarkson MR, Albin MJ, Yamaura K, Boenisch O, Popoola J, Wang Y, Yagita H, Akiba H, Ansari MJ, Yang J, Turka LA, Rothstein DM, Padera RF, Najafian N, Sayegh MH. The emerging role of T cell Ig mucin 1 in alloimmune responses in an experimental mouse transplant model. *J Clin Invest.* 2008;118 (2):742-751.
- 134.** Wood KS, S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(3):199-210.
- 135.** Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang Y-H, Smialek J, Virmani R. Coronary Risk Factors and Plaque Morphology in Men with Coronary Disease Who Died Suddenly. *N Engl J Med.* 1997;336(18):1276-1282.
- 136.** Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MAS, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000;95(3):952-958.
- 137.** Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner J, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med.* 1999;5(4):434-438.
- 138.** Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003;9:653-660.
- 139.** Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S. Relevance of Monocytic Features for Neovascularization Capacity of Circulating Endothelial Progenitor Cells. *Circulation.* 2003;108(20):2511-2516.
- 140.** Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Bohm M, Nickenig G. Circulating Endothelial Progenitor Cells and Cardiovascular Outcomes
10.1056/NEJMoa043814. *N Engl J Med.* 2005;353(10):999-1007.
- 141.** Taguchi A, Matsuyama T, Moriwaki H, Hayashi T, Hayashida K, Nagatsuka K, Todo K, Mori K, Stern DM, Soma T, Naritomi H. Circulating CD34-Positive Cells Provide an Index of Cerebrovascular Function. *Circulation.* 2004;109(24):2972-2975.
- 142.** Lambiase PD, Edwards RJ, Anthopoulos P, Rahman S, Meng YG, Bucknall CA, Redwood SR, Pearson JD, Marber MS. Circulating Humoral Factors and Endothelial Progenitor Cells in Patients With Differing Coronary Collateral Support. *Circulation.* 2004;109(24):2986-2992.
- 143.** Dimmeler S, Vasa-Nicotera M. Aging of progenitor cells: limitation for regenerative capacity? *J Am Coll Cardiol.* 2003;42 (12):2081-2082.

- 144.** Erbs S, Linke A, Schuler G, Hambrecht R. Intracoronary Administration of Circulating Blood-Derived Progenitor Cells After Recanalization of Chronic Coronary Artery Occlusion Improves Endothelial Function
10.1161/01.RES.0000214407.58341.c8. *Circ Res.* 2006;98(5):e48-.
- 145.** Burgert H, Maryanski J, Kvist S. "E3/19K" protein of adenovirus type 2 inhibits lysis of cytolytic T lymphocytes by blocking cell-surface expression of histocompatibility class I antigens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84:1356-1360.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich gerne denjenigen meinen aufrichtigen Dank aussprechen, die mir auf meinem bisherigen akademischen Weg mit Rat und Tat zur Seite standen und damit direkt oder indirekt zum Gelingen der Habilitation beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Professor Stefanie Dimmeler, Herrn Professor A. Zeiher und Herrn Prof. H.-P. Schultheiss. Sie gaben mir durch ihre langjährigen, großzügigen Unterstützungen die Gelegenheit, diese Arbeit zu erstellen. Eine offene, sachbezogene und kontinuierliche Diskussionskultur sowie die uneingeschränkte Unterstützung zur Bereitstellung notwendiger Mittel sind auf das Engste mit ihren Personen verknüpft und bieten die besten Voraussetzungen für motiviertes und erfolgreiches Arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls meinen Kooperationspartnern, die mit konstruktiven Diskussionen, fruchtbaren Ideen und letztendlich durch ihre Motivation zum Gelingen der Habilitation beigetragen haben. Besonders erwähnen möchte ich Prof. Alexandra Aicher, Prof. Carsten Tschöpe, Prof. Hans-Dieter Volk.

Der Arbeitsgruppe gilt mein allerherzlichster Dank, ohne ihr Engagement und ihre konstruktiven Anregungen wären viele der vorliegenden Ergebnisse nicht möglich gewesen. Im Labor waren oder sind aktiv tätig: Dr. Thomas Zobel als Biologe, Marzena Sosnowski und Karen Böhme als MTAs; Tanja Winczeck als medizinische Doktorandin.

Allen Mitarbeitern in den entsprechenden Arbeitsgruppen, die hier nicht explizit erwähnt wurden, die Arbeit aber dennoch unterstützt haben, möchte ich ebenfalls auf das aller Herzlichste danken.

Denjenigen Mitarbeitern und Kollegen in der Klinik für Kardiologie des Universitätsklinikums Charité, die mich mit ihrer Diskussionsbereitschaft oder praktischen Hilfe bei der Verwirklichung dieser Arbeit unterstützt haben und die ich nicht namentlich erwähnt habe, möchte ich auf das aller herzlichste danken.

Mein Dank gilt vor allem der Rahel-Hirsch-Stiftung, die die Erstellung vorliegender Forschungsarbeit durch ein Stipendium in den Jahren 2007 bis 2009 förderte und dadurch den Abschluss in diesem Zeitraum möglich gemacht hat.

Für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Umsetzung der experimentellen Arbeiten danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Berlin-Brandenburgischen Zentrums für Regenerative Therapien sowie der universitären Forschungsförderung der Forschungskommission der Charité.

Last but not least gilt mein ganz besonderer Dank André und Fritzchen, die mich mit ihrem immerwährenden, liebevollen Verständnis durch die letzten Jahre begleitet haben.

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

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....
Datum

.....
Unterschrift