

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl**

**Hemmung der Mobilisation und Funktion  
humaner endothelialer Vorläuferzellen durch den  
endogenen NO-Synthase-Inhibitor  
asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA)  
bei koronarer Herzkrankheit**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Sylvia Stein  
aus Biberach an der Riss**

**Würzburg, August 2010**

Referent: Professor Dr. Johann Bauersachs

Korreferent: Professor Dr. Kai Schuh

Dekan: Professor Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

13.05.2011

Die Promovendin ist Ärztin

Für meine Eltern und für Thomas

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	III
Abbildungsverzeichnis .....	V
Tabellenverzeichnis .....	VI
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
I. Einleitung .....	1
1. Das Endothel .....	1
2. Stickstoffmonoxid (NO) .....	3
3. Endotheliale Dysfunktion .....	5
4. Asymmetrisches Dimethylarginin – ADMA .....	8
4.1 Was ist ADMA? Eine Einführung .....	8
4.2 ADMA-Metabolismus .....	9
4.3 ADMA als kardiovaskulärer Risikofaktor .....	12
5. Endotheliale Vorläuferzellen (EPC) .....	14
5.1 EPC: Eine Einleitung .....	14
5.2 Charakteristika der EPC .....	15
5.3 Einfluss auf Mobilisierung und Funktion von EPC .....	17
II. Ziele der Doktorarbeit .....	19
III. Methoden .....	20
1. Studienteilnehmer .....	20
2. Gewinnung von mononukleären Zellen aus humanem Vollblut .....	20
3. Nachweis von CD34+/CD133+ Zellen .....	21
4. Messung von ADMA im Plasma .....	22
5. In-Vitro-Versuche mit endothelialen Progenitorzellen .....	23
5.1 EPC Zellkultur-Assay .....	23
5.2 Kolonie-bildende Einheiten (CFUs) .....	24
5.3 Inkorporations-Assay .....	24
5.4 Nachweis der eNOS-Aktivität in EPC .....	25

6. Statistische Analyse .....	25
IV. Ergebnisse .....	27
1. Ergebnisse der klinischen Studie .....	27
2. Ergebnisse der In-Vitro-Studien .....	32
2.1 EPC Zellkultur-Assay .....	32
2.2 Kolonie-bildende Einheiten (CFUs) .....	33
2.3 Inkorporations-Assay .....	35
2.4 Nachweis der eNOS-Aktivität in EPC .....	37
V. Diskussion .....	38
VI. Zusammenfassung .....	44
VII. Literaturverzeichnis .....	45

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Gefäßaufbau.....	1
Abbildung 2:	Homöostase des gesunden Endothels .....	2
Abbildung 3:	Funktion von NO im Endothel.....	4
Abbildung 4:	Wirkung von ROS und ADMA auf das Endothel.....	7
Abbildung 5:	Die L-Arginin-Derivate asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA), Monomethylarginin (L-NMMA) und symmetrisches Dimethylarginin (SDMA) .....	8
Abbildung 6:	Proteine mit Argininresten werden durch die Proteinmethyltransferasen (PRMT) methyliert.....	10
Abbildung 7:	Korrelation der ADMA-Konzentration im Plasma von Patienten mit dem Schweregrad der KHK bzw. der Zahl zirkulierender EPC.....	28
Abbildung 8:	Zusammenhang zwischen KHK bzw. ADMA und Anzahl der EPC.....	29
Abbildung 9:	EPC-Wachstum unter ADMA-Einfluss.....	32
Abbildung 10:	EPC-Kulturen unter ADMA-Einfluss.....	33
Abbildung 11:	CFUs unter ADMA-Einfluss.....	34
Abbildung 12:	Anzahl der gebildeten Kolonien je Platte (well) in Abhängigkeit von ADMA-Konzentration und Zugabe von Rosuvastatin.....	34
Abbildung 13:	Größe der einzelnen Kolonien bezogen auf die Kontrollgruppe.....	35
Abbildung 14:	Integration von EPC in gefäßähnliche Strukturen von HUVECs in Abhängigkeit von ADMA bzw. Rosuvastatin-Zugabe.....	36
Abbildung 15:	Anzahl der EPC, die sich in die gefäßähnlichen Strukturen der HUVECs integrieren abhängig von der ADMA-Konzentration.....	36
Abbildung 16:	Abnahme der eNOS-Aktivität in den EPC in Abhängigkeit von der ADMA-Konzentration.....	37

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Anzahl der EPC und CFUs bzw. Höhe des ADMA-Plasmaspiegels bei Patienten mit KHK-0 bis KHK-3 sowie weitere Charakteristika bezüglich Erkrankungen, Medikation und ausgewählter Laborwerte.....	31
------------	---	----

## Abkürzungsverzeichnis

ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
APC	Allophycocyanin
ApoE	Apolipoprotein E
ATP	Adenosintriphosphat
BH4	Tetrahydrobiopterin
CFU	colony forming unit
CRP	C-reaktives Protein
DDAH	Dimethyl-Arginin-Dimethylaminhydrolase
dil-ac-LDL	1,1'-Dioctdecyl-3,3',3'-Tetramethyl- Indocarbocyaninperchlorat-markiertes acetyliertes low- density-Lipoprotein
EBM2	Endothelial Blood Medium 2
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EPC	endotheliale Progenitorzellen / endotheliale Vorläuferzellen
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	granulocyte monocyte colony-stimulating factor
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HDL	high-density-Lipoprotein
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A
HUVECs	human umbilical vein endothelial cells
ICAM-1	intracellular adhesion molecule 1
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	low-density-Lipoprotein
L-NMMA	Monomethylarginin
MCP-1	monocyte chemoattractant protein



MMP-9	Matrixmetalloprotease 9
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NO	Stickstoff-Monoxid
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PGI 2	Prostazyklin
PI3K/Akt	Phosphatidylinositol-3-Kinase/Proteinkinase Akt
PRMTs	Proteinmethyltransferasen
ROS	reactive oxygen species
SDMA	symmetrisches Dimethylarginin
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
UEA-1	FITC-konjugiertes Lektin von Ulex europeus
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR-2	vascular endothelial growth factor-Rezeptor 2
vWF	von-Willebrand-Faktor

## I. Einleitung

### 1. Das Endothel

Das Endothel bildet die innerste Zellschicht von Blutgefäßen und ist mit ca. 5000m<sup>2</sup> [1] das größte Organ des Körpers. Es wird geschätzt, dass das Endothel ungefähr 1-1,5 kg wiegt und aus etwa  $10 \times 10^{12}$  Zellen besteht und somit der Zellmenge der Leber ähnelt [2, 3]. Lange Zeit wurde es lediglich als trennende Zellschicht zwischen dem fließenden Blut und der eigentlichen Gefäßwand betrachtet, welche im Wesentlichen aus der Gefäßmuskelschicht, der Media, und der Adventitia besteht, die das Gefäß in seine Umgebung einbettet [4].

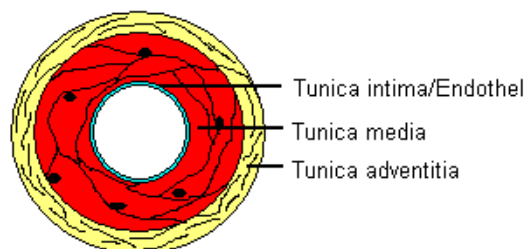


Abb. 1: Gefäßaufbau. Tunica intima, Tunica media und Tunica adventitia bilden die drei Schichten der Gefäßwand.

In den letzten Jahrzehnten wurden auch die enormen regulatorischen Eigenschaften des Endothels erkannt. Der mit dem Nobelpreis ausgezeichnete Forscher Robert Furchgott entdeckte 1980 die vasoreaktive Funktion des Endothels [5]: Ohne Intima (dies entspricht der einlagigen Zellschicht des Endothels und der darunter liegenden Basalmembran) kam es unter Einwirkung von Acetylcholin zu keiner Relaxation der Gefäßwände, während der gleiche Versuch mit intaktem Endothel zu einer Vasodilatation führte. Furchgott et al. schlossen auf einen Faktor, der von gesunden Endothelzellen sezerniert wird

und den sie endothelium-derived relaxing factor (EDRF) nannten [5]. Mittlerweile weiß man, dass es sich bei EDRF um Stickstoffmonoxid (NO) handelt, das auch von anderen Mediatoren wie Bradykinin, Serotonin, Noradrenalin, Adenosintriphosphat (ATP) und Histamin aus dem Endothel freigesetzt wird [6-8].

Seit der initialen Arbeit von Furchgott et al. wurden viele weitere Funktionen und Eigenschaften des Endothels entdeckt. Endothelzellen und von ihnen sezernierte Stoffe haben unter anderem Einfluß auf den Gefäßtonus, auf die Koagulation, auf Entzündungsreaktionen und die Angiogenese. Insgesamt ist das Endothel von enormer Bedeutung für die vaskuläre Homöostase [1, 3, 9, 10].

So sezernieren Endothel-Zellen eine Vielzahl an Faktoren, die entweder über mechanische (Druck und Scherkräfte) oder hormonelle Stimulation freigesetzt werden [1]. Dazu gehören vasodilatierende Substanzen wie NO, Prostazyklin ( $\text{PGI}_2$ ) und der sogenannte endothelial-derived hyperpolarizing factor, dessen genaue biochemische Struktur noch nicht bekannt ist [1, 3, 9]. Einige experimentelle Daten weisen darauf hin, dass es sich um ein Derivat aus dem Arachidonsäure-Stoffwechsel handeln könnte [11]. Auf der anderen Seite wirken vom Endothel freigesetzte Mediatoren auch vasokonstriktiv: Endothelin-1, der wirksamste Vasokonstriktor überhaupt, Angiotensin II, Prostaglandin  $\text{H}_2$  sowie reaktive Sauerstoffspezies [1, 3, 9]. Gesundes Endothel ist dabei in der Lage, ein Gleichgewicht zwischen relaxierenden und konstriktorisch wirkenden Faktoren aufrecht zu erhalten (siehe Abb. 2).

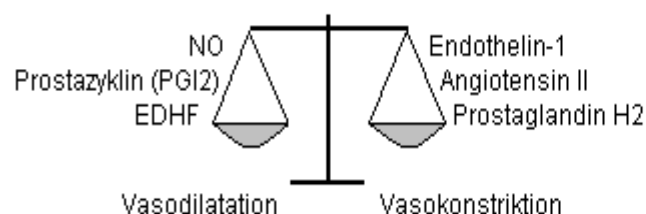


Abb. 2: Homöostase des gesunden Endothels. Durch die Freisetzung verschiedener Faktoren erhält das gesunde Endothel das Gleichgewicht zwischen Vasodilatation und Vasokonstriktion.

Zusätzlich spielt das Endothel eine entscheidende Rolle bei Entzündungsantworten des Körpers, wobei unter anderem intrazelluläre Adhäsionsmoleküle für Leukozyten gebildet werden wie ICAM-1 [9]. Auf der anderen Seite wirkt NO der Leukozyten-Adhäsion entgegen [12]. So entsteht auch hier ein Gleichgewicht. Ähnlich verhält es sich bei der Modulation von Plättchen-Aggregation, Gerinnung und Fibrinolyse [9].

Endothelzellen sind also weit mehr als eine einschichtige Barriere zwischen dem fließenden Blut und der Gefäßwand, sie haben vielmehr Anteil an den unterschiedlichsten regulatorischen Aufgaben.

## **2. Stickstoffmonoxid (NO)**

Einer der wichtigsten Faktoren, der von Endothelzellen freigesetzt wird und der in fast allen Bereichen der Endothelfunktion eine Rolle spielt, ist das zuerst entdeckte Stickstoffmonoxid NO.

Das nur wenige Sekunden [7] stabile freie Radikal NO wird nur aus unbeschädigtem Endothel unter Einwirkung von z.B. Scherkräften [12] freigesetzt [8]. Es entsteht aus der Aminosäure Arginin, die enzymatisch mittels Hydroxylierung [13] bzw. durch Abspaltung der Guanidino-Gruppe [14] in NO und Citrullin umgesetzt wird. Unterschiedliche Enzyme einer Familie, die sogenannten NO-Synthasen, bilden NO, wobei sie Tetrahydrobiopterin (BH4) und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) als Kofaktoren benötigen [1, 7, 13, 15].

Im Endothel findet sich die Calcium-Calmodulin-abhängige endotheliale NO-Synthase (eNOS) [15], deren Aktivierung über einen Anstieg der Calcium/Calmodulin-Konzentration erfolgt [13]. Weitere NO-Synthasen werden in Neuronen (dort dient das Gas NO als Neurotransmitter) und in Makrophagen exprimiert [8].

In subendothelialen Muskelzellen, die es durch Diffusion erreicht [14], bindet NO an die lösliche Guanylatzyklase, welche durch NO in ihre aktive Form überführt wird. Die Guanylatzyklase bildet aus Guanosintriphosphat (GTP)

zyklisches Guaninmonophosphat (cGMP), welches wiederum cGMP-abhängige Proteinkinasen aktiviert. Daraufhin kommt es über einen intrazellulären Kalzium-Abfall zur Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen und damit zur Vasodilatation [1, 7, 13, 15]. NO ist dabei von allen vasodilatatorisch wirkenden Faktoren der mit der stärksten Wirkung [12].

Zusätzlich diffundiert NO auch in das Gefäßlumen, wo es der Thrombozytenaggregation, der Monozyten-Adhäsion und der Expression von Chemokinen entgegen wirkt [13, 15]. Es verhindert außerdem die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und erhält somit eine ausgeglichene Struktur der Gefäße [12].

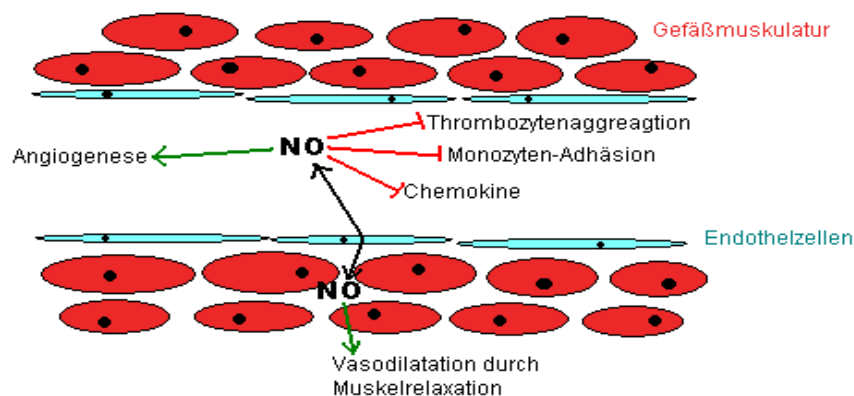


Abb. 3: Funktion von NO im Endothel. Stickstoffmonoxid wird von Endothelzellen freigesetzt. Es wirkt an der Gefäßmuskulatur relaxierend. Im Gefäßlumen hemmt es die Aggregation von Thrombozyten und die Adhäsion von Leukozyten an die Gefäßwand. Zusätzlich fördert es die Angiogenese.

Auch in der Angiogenese spielt NO eine zentrale Rolle. Es wird durch verschiedene angiogenetische Faktoren wie vascular endothelial growth factor (VEGF) freigesetzt [16], dem in diesem Zusammenhang eine herausragende Bedeutung zukommt [17]. NO führt u.a. zu einer vermehrten Proliferation und Migration der Endothelzellen und zu weniger Endothelzell-Verlust, da es die Apoptoserate der Zellen vermindert [16]. Darüber hinaus fördert NO in einem positiven Regelkreis wiederum die Freisetzung von VEGF [16, 17], sodass es auch über diesen Weg stimulierend auf die Angiogenese wirkt.

### 3. Endotheliale Dysfunktion

Ist das Endothel in seinen mannigfaltigen Funktionen nicht mehr intakt, spricht man von endothelialer Dysfunktion.

Unter dem Begriff endotheliale Dysfunktion wird das Ungleichgewicht zwischen Vasodilatation und Vasokonstriktion verstanden, in dem v.a. über NO-Mangel die Vasokonstriktion überwiegt und es gleichzeitig zu einem entzündlichen und thrombotischen Geschehen kommt [9, 18, 19].

Schon ab einem Alter von 30 Jahren kann beim Menschen eine etwas reduzierte endotheliale Funktion beobachtet werden [1], was darauf hinweist, dass es mit der normalen Alterung auch zur endothelialen Dysfunktion [15] kommt. Zudem sind jedoch viele Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen, z.B. Dyslipidämie, Bluthochdruck, Rauchen [1, 9, 15, 20] und Diabetes mellitus [20], mit endothelialer Dysfunktion assoziiert, die als Beginn der Arteriosklerose verstanden werden kann. Diese Risikofaktoren erhöhen den Endothelzell-Umsatz vor allem in Verbindung mit erhöhten Scherkräften (Bluthochdruck) und beschleunigen damit die im Alter übliche Zellalterung [15].

Auf der anderen Seite schützen Östrogene, sportliche Aktivität, ungesättigte Fettsäuren und Antioxidantien vor dem Entstehen atherosklerotischer Plaques, indem sie vasodilatierende Faktoren im Endothel erhöhen [15].

Im Mittelpunkt der pathologischen Endothelfunktion, die bis zu einer manifesten Arteriosklerose und Erkrankungen wie Herzinfarkt und Schlaganfall führen kann, steht eine Verminderung von Stickstoffmonoxid. Zu geringe NO-Produktion oder NO-Bioverfügbarkeit begünstigen zum Beispiel im Anfangsstadium der Arteriosklerose die Leukozytenadhäsion über die Expression bestimmter Moleküle wie vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) und monozyte chemoattractant protein (MCP-1) auf der Endotheloberfläche. Im weiteren Verlauf wird das Plaque-Wachstum und durch Aktivierung von Matrixmetalloproteasen mittels verminderter NO-Bioverfügbarkeit auch die Plaque-Ruptur gefördert.

Zusätzlich wird durch einen NO-Mangel die Thrombozyten-Aggregation nur unzureichend gehemmt, was über die fehlende Vasodilatation zu Hämostas

und damit unter Umständen zu Thrombus-Bildung und Gefäßverschluss führt [9, 19].

Oxidativer Stress bzw. die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) sind für die Entstehung eines NO-Mangels besonders wichtig und können über verschiedene Wege wirken. ROS entstehen durch unterschiedliche Enzyme, von denen die NADPH-Oxidase und die Xanthin-Oxidase die wichtigsten darstellen. [19] Eine vermehrte Bildung dieser ROS wird durch Angiotensin II, Diabetes [9] und auch durch eine Hyperhomocysteinämie [21] angeregt. Zum einen reagieren diese Sauerstoffspezies direkt mit NO und reduzieren so die Bioverfügbarkeit dieses Moleküls [3, 9, 19]. Zum anderen wirken sie über die Entkopplung der endothelialen NO-Synthase [3, 9, 18, 19, 22]. Dabei verbinden sich Sauerstoffspezies mit NO zu Peroxynitrit, was zur Oxidation des Kofaktors Tetrahydrobiopterin führt und damit die eNOS entkoppelt. Das Enzym katalysiert dann statt der NO-Produktion wiederum die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, was zu einem Teufelskreis führt.

ROS fördern zudem die Aktivität von Enzymen, die für die Bildung vasokonstriktorisch wirkender Faktoren verantwortlich sind, und erhöhen direkt die Kontraktionsfähigkeit der glatten Gefäßmuskulatur [3].

Zusätzlich wird NO auch durch oxidiertes Low-density-Lipoprotein (LDL) vermindert, das mittels ROS [9, 15, 23] entsteht und vermehrt dann aufgenommen wird, wenn die Endothelzellen einem erhöhten Turnover durch z.B. Scherkräfte unterliegen [15].

Über eine reduzierte Aktivität der eNOS wirkt darüber hinaus der wichtigste endogene eNOS-Inhibitor asymmetrisches Dimethyl-Arginin (ADMA). Durch ADMA wird die eNOS in ihrer Syntheseleistung reversibel gehemmt. ADMA reduziert zusätzlich die Aktivität der Telomerase, was zu einer beschleunigten Endothelzell-Alterung führt [24].

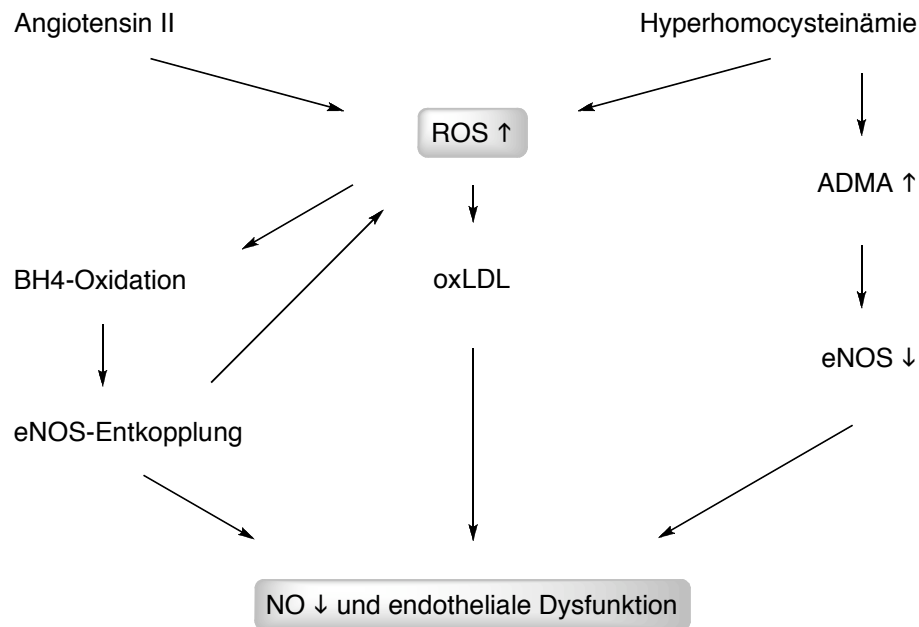


Abb. 4: Wirkung von ROS und ADMA auf das Endothel. Oxidative Sauerstoffspezies und asymmetrisches Dimethylarginin wirken über eine verminderte NO-Produktion, was zur Entstehung einer endothelialen Dysfunktion führen kann.

Die endotheliale Dysfunktion steht also am Beginn und im Mittelpunkt der Entstehung einer Arteriosklerose und den damit zusammenhängenden Erkrankungen wie Bluthochdruck, koronare Herzkrankheit (KHK), Diabetes mellitus, periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und Niereninsuffizienz. Damit wird diese Dysfunktion, die schon vor klinisch manifesten Herz-Kreislauf-Erkrankungen entsteht und gemessen [18, 19] werden kann, zu einem wichtigen prognostischen Marker für das Entstehen atherosklerotischer Plaques, die als Auslöser für Herzinfarkte und Schlaganfälle die häufigste Todesursache weltweit darstellen [25].



## 4. Asymmetrisches Dimethyl-Arginin – ADMA

### 4.1 Was ist ADMA? Eine Einführung

Asymmetrisches Dimethyl-Arginin (ADMA) ist ein im Körper vorkommendes Derivat der Aminosäure L-Arginin, das als endogener Inhibitor der NO-Synthase eine Rolle bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion und einer Arteriosklerose spielt [26].

Vallance et al. konnten 1992 zeigen, dass bei Patienten mit Niereninsuffizienz die NO-Synthase durch Abkömmlinge von L-Arginin gehemmt wird, die zusätzlich noch eine (Monomethylarginin; L-NMMA) oder zwei Methylgruppen (ADMA) an ihrem Stickstoffende tragen [27]. Dabei wirken zwar beide Derivate hemmend auf die NO-Synthase, jedoch kommt ADMA in 10 mal höherer Konzentration im Körper vor als L-NMMA [28], so dass sich die meisten Untersuchungen auf ADMA beschränkten. Zusätzlich gibt es noch ein symmetrisches Dimethyl-Arginin, das keinen Einfluß auf die NO-Produktion hat [29].

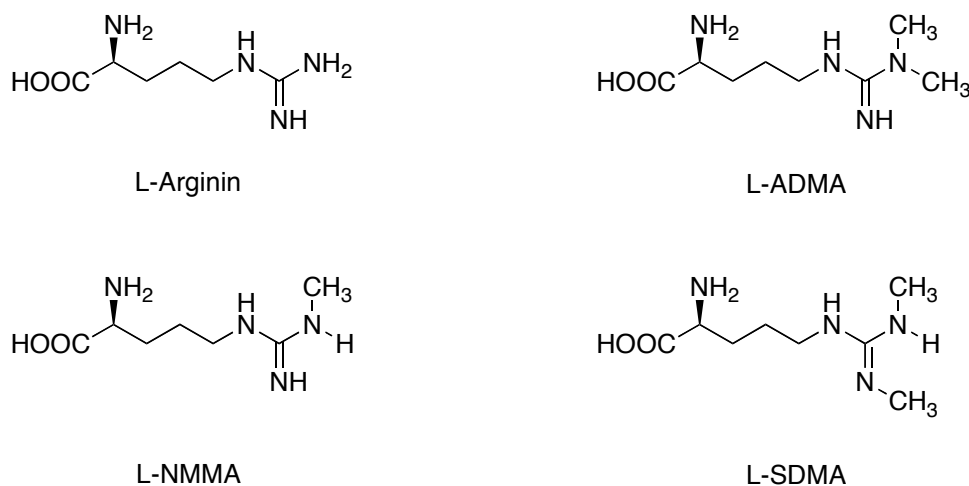


Abb. 5: Die L-Arginin-Derivate asymmetrisches Dimethyl-Arginin (ADMA), Monomethylarginin (L-NMMA) und symmetrisches Dimethyl-Arginin (SDMA)

In verschiedenen Untersuchungen konnte die inhibitorische Wirkung von ADMA nachgewiesen und seine Bedeutung für die Entstehung einer Arteriosklerose

gezeigt werden. Vallance et al. konnten bei in-vitro-Versuchen nachweisen, dass ADMA die aufbereitete NO-Synthase von Makrophagen konzentrationsabhängig hemmen kann [27]. Zusätzlich zeigte sich bei arteriellen Infusionen von ADMA in die A. brachialis gesunder Probanden eine durch Vasokonstriktion bedingte Abnahme des Blutflusses im Unterarm [27]. Die dabei verwendeten ADMA-Konzentrationen waren jedoch höher als sie selbst in pathologischen Situationen beim Menschen vorkommen. Andere Versuche orientierten sich darum an ADMA-Plasmawerten, die auch bei Patienten mit Herz-Kreislaufkrankungen und bei (noch) gesunden Personen gefunden werden (0,5-10  $\mu\text{mol/l}$ ) [26].

So konnten zum Beispiel nach einer intravenösen Gabe von ADMA sowohl eine Erhöhung des Blutdruckes und des systemischen Gefäßwiderstandes als auch eine verminderte Pumpleistung des Herzens festgestellt werden [30].

In einem Modell mit Apolipoprotein E (apoE)-Knockout-Mäusen mit daraus folgender Hypercholesterinämie zeigten sich nicht nur erhöhte ADMA-Serumkonzentrationen, sondern auch eine eingeschränkte Angiogenese, was man sich durch den über ADMA erfolgten NO-Mangel erklären kann [31].

Durch die Hemmung der NO-Synthase und den daraus resultierenden Mangel an NO wird ADMA zu einem wichtigen Risikofaktor für die Entstehung vieler kardiovaskulärer Erkrankung und auch zu einem prognostischen Marker.

## **4.2 ADMA-Metabolismus**

Asymmetrisches Dimethyl-Arginin entsteht aus der Proteolyse zuvor methylierter Argininreste in Proteinen [12]. Die Methylierung von Aminosäuren in Eiweißen dient der posttranslationalen Veränderung der Tertiärstruktur dieser Proteine [32]. Damit kann eine Modifikation der Protein-Eigenschaften erreicht werden, ohne dass eine neue Proteinsynthese für den Körper notwendig wird.

Für die Übertragung der Methylgruppen auf Argininreste sind S-Adenosyl-methionin-Protein-Arginin-N-Methyltransferasen verantwortlich (Protein-methyltransferasen; PRMTs) [29].

Als Methylgruppen-Donor dient S-Adenosylmethionin, das ein Zwischenprodukt aus dem Homocystein-Stoffwechsel ist. Die Übertragung der Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf ADMA konnte mittels radioaktiv markierter Methylgruppen nachgewiesen werden [33].

Die methylierten Arginin-Reste L-NMMA, SDMA und ADMA werden durch normale Proteolyse ins Zytoplasma freigesetzt, von dort aus gelangen sie dann in den Extrazellularraum und ins Plasma [29]. Dabei ist der intrazelluläre Anteil von ADMA wesentlich höher als im Plasma [34].

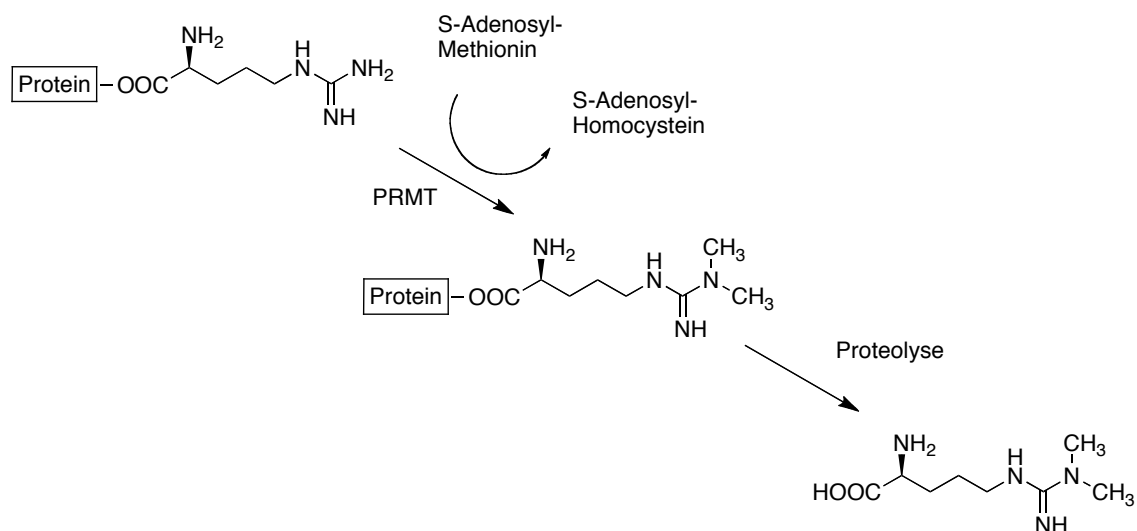


Abb. 6: Proteine mit Argininresten werden durch die Proteinmethyltransferasen (PRMT) methyliert. Dabei dient Adenosyl-Methionin als Methylgruppen-Donor. Proteolytisch wird anschließend ADMA freigesetzt.

Ursprünglich ging man davon aus, dass ADMA unverändert renal ausgeschieden wird und deshalb bei Niereninsuffizienz im Plasma ansteigt.

Ogawa et al. [35] konnten 1987 jedoch einen zusätzlichen enzymatischen Weg aufzeigen, der für über 90% des Abbaus von asymmetrischem Dimethylarginin verantwortlich ist [29]. Dabei wird ADMA – nicht aber SDMA – durch die Dimethyl-Arginin-Dimethylaminhydrolase (DDAH) in L-Citrullin und Dimethyl-

amin gespalten. So konnte bei transgenen Mäusen mit einer DDAH-Überexpression eine Verminderung der ADMA-Konzentration und eine Erhöhung der NOS-Aktivität nachgewiesen werden. Dabei kam es sowohl zu einem Blutdruck-Abfall [36] als auch zu einer verbesserten Angiogenese [37].

Die Aktivität von DDAH ist in Geweben mit hohem Protein-Turnover wie Leber, Niere oder Gehirn besonders hoch, DDAH findet sich aber auch in Aortengewebe, neutrophilen Granulozyten oder Makrophagen [29]. Je nach Gewebetyp sind zwei verschiedene Isoformen der DDAH vorherrschend. Während die DDAH I sich eher in Geweben mit ausgeprägter neuronaler NO-Synthase (nNOS) wie Gehirn und Nieren findet, zeigt sich eine Häufung der DDAH II in eNOS-reichen Geweben und Zellen, z.B. Herzmuskelzellen [12, 29, 38]. Vermutlich findet der hauptsächliche Abbau von asymmetrischem Dimethyl-Arginin mittels DDAH aber in Leber- und Nierenzellen statt [39].

Die ADMA-Konzentration wird also zum einen über eine erhöhte Synthese, zum anderen über einen verminderten Abbau bzw. eine eingeschränkte renale Clearance reguliert. Die Entstehung von ADMA wird zum Beispiel durch vermehrte proteolytische Spaltung von methylierten Eiweißen gefördert [29]. Auf der anderen Seite tragen eine eingeschränkte Nierenfunktion und ein unzulänglicher Abbau durch DDAH zur erhöhten Konzentration bei.

Vermutlich ist dabei der Weg über eine verminderte enzymatische Aktivität von DDAH von wesentlich größerer Bedeutung als eine vermehrte Produktion von ADMA.

DDAH stellt somit einen wichtigen Faktor dar im Gleichgewicht zwischen dem NO-System und ADMA. Eine verminderte Expression oder Aktivität dieses Enzyms würde also zu einer Anhäufung von ADMA in Zellen und im Plasma führen und damit der Entstehung der endothelialen Dysfunktion Vorschub leisten.

### 4.3 ADMA als kardiovaskulärer Risikofaktor

Asymmetrisches Dimethylarginin wird in seiner Gewebe- und Plasmakonzentration von verschiedenen Faktoren beeinflusst, wobei wahrscheinlich nur erhöhte ADMA-Spiegel von pathophysiologischer Bedeutung sind.

Erhöhte ADMA-Konzentrationen beim Menschen führen über eine Hemmung der NO-Synthese zur Entstehung einer endothelialen Dysfunktion bzw. zur Progression einer bereits bestehenden Arteriosklerose.

Bei Patienten mit einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit beobachtete man erhöhte ADMA-Werte [40]. Ähnliches ließ sich auch für Hyperglykämie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie [16, 26, 32, 34] und Rauchen [41] zeigen. DDAH ist ein Enzym, das auf oxidativen Stress reagiert und dabei in seiner Aktivität gehemmt wird [28, 39, 42].

Ito et al. zeigten die verminderte DDAH-Aktivität in kultivierten Endothelzellen unter Hinzugabe von oxidiertem LDL und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [43]. Dadurch erhöhten sich die ADMA-Spiegel im Plasma.

Als weiterer kardiovaskulärer Risikofaktor gilt Homocystein, das einen Teil des S-Adenosylmethionin-Soffwechsels (Methylgruppen-Donor für ADMA) darstellt [44]. Sowohl in tierexperimentellen Versuchen [21, 45] als auch in in-vitro-Studien [46] und beim Menschen [47] ließ sich eine Erhöhung der ADMA-Werte bei gleichzeitiger verminderter DDAH-Aktivität nachweisen.

Weitere pro-atherogene Wirkungen von ADMA sind die Entkopplung der eNOS [32, 34, 48] und eine beschleunigte Alterung von Endothelzellen [24].

Viele Studien betrachteten den Zusammenhang zwischen erhöhten ADMA-Werten und einer Hemmung der endothelialen NO-Synthase im Tiermodell oder in vitro. Einige Untersuchungen befassen sich jedoch auch mit ADMA als Marker für ein (zukünftiges) Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

Bei 225 Hämodialyse-Patienten, die über 3 Jahre beobachtet wurden, ergab sich mit einem Plasma-ADMA-Wert im oberen Drittel ein um das Dreifache erhöhte Mortalitätsrisiko (egal welcher Ursache) verglichen mit Patienten, die mit ihrem ADMA-Wert unter dem Median lagen [49]. Doch auch bei

nierengesunden Menschen kann ADMA als Marker für ein kardiovaskuläres Risiko herangezogen werden. So korrelierte bei über 100 gesunden Probanden die Intima-Media-Dicke der A. carotis mit der Höhe der im Plasma gemessenen ADMA-Konzentration. Die Intima-Media-Dicke wird mittels Ultraschall gemessen und gilt als nicht-invasive Meßmethode für einer Arteriosklerose [50]. Eine Fall-Kontroll-Studie mit Männern, die weder rauchten noch eine eingeschränkte Nierenfunktion hatten, zeigte einen positiven Zusammenhang mit der Höhe der ADMA-Werte und dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse. Dabei hatten diejenigen Probanden mit den höchsten ADMA-Werten (im oberen Viertel) ein um fast vierfach erhöhtes Risiko für ein akutes Koronarsyndrom [51].

Andere Studien konnten zeigen, dass ADMA als unabhängiger Voraussagewert herangezogen werden kann für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse. Bei ungefähr 500 Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit bestand eine positive Korrelation zwischen ADMA und dem Risiko für Herzinfarkt oder Schlaganfall, zudem war ADMA unabhängig von anderen Faktoren, was die Voraussagekraft betraf [52]. Ähnliche Aussagen ließ auch eine Studie mit Angina-pectoris-Patienten zu, die nach einer elektiven Koronarangioplastie 16 Monate lang kontrolliert wurden. Je höher ihr ADMA-Wert im Serum war, desto eher erlitten sie ein (weiteres) kardiovaskuläres Ereignis [53]. Auch hier zeigte sich ADMA als unabhängiger Prognosefaktor für das jeweilige Risiko. In der CARDIAC-Studie mit über 100 Patienten mit koronarer Herzerkrankung und ebenso vielen Kontrollpersonen war ADMA ein unabhängiger Marker für das kardiovaskuläre Risiko [54].

ADMA und die damit verbundene Entstehung einer endothelialen Dysfunktion und ihrer Folgen ist folglich ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung unterschiedlicher kardiovaskulärer Erkrankungen. Gleichzeitig scheint ADMA ein gemeinsamer Marker für viele verschiedene klassische kardiale und arteriosklerotische Risikofaktoren zu sein.

ADMA könnte in Zukunft auch als Laborwert wichtig werden für die Einschätzung eines individuellen Risikoprofils im Hinblick auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

## 5. Endotheliale Progenitorzellen (EPC)

### 5.1 EPC: Eine Einführung

Das Endothel wird ständig Schädigungen und Verletzungen ausgesetzt, sei es durch zunehmendes Alter, Lebensgewohnheiten, chronische Erkrankungen oder auch durch medizinische Interventionen (z.B. Ballondilatation).

Um atherosklerotischen Plaques und den damit zusammenhängenden Folgeerkrankungen vorzubeugen, ist die Reparatur von geschädigtem Endothel von herausragender Bedeutung. Geschieht dies nicht, kommt eine Kaskade in Gang, die mit der endothelialen Dysfunktion (siehe oben) beginnt und mit Herzinfarkt oder Schlaganfall enden kann. Auch nach einem erfolgten kardiovaskulären Ereignis benötigt der Körper Kompensationsmechanismen, z.B. das Einsprossen neuer Gefäße in Ischämiegebiete nach einem Myokardinfarkt. Lange Zeit ging man davon aus, dass allein ausdifferenzierte Endothelzellen für diese Reparatur verantwortlich seien. Ein Vorgang, den man Angiogenese nennt: die Teilung und Wanderung von Endothelzellen aus schon vorhandenen Gefäßen und dadurch das Aussprossen neuer Kapillaren in von Ischämie betroffene Gebiete [55, 56].

Asahara et al. konnten 1997 [55] erstmalig zeigen, dass auch endotheliale Vorläuferzellen (EPC) Anteil an diesen Reparaturarbeiten haben. Diese aus dem Knochenmark stammenden Zellen sind embryonalen Angioblasten nicht unähnlich: sie zeigen die Fähigkeit zur Zirkulation, Proliferation und Differenzierung in reife Endothelzellen [57]. Sie leisten einen Beitrag zur Endothelreparatur nach Schädigung und zur Neovaskularisierung nach Ischämie. Im Tierversuch verbesserten ex vivo kultivierte Zellen Neovaskularisierung und Kapillardichte nach einem Myokardinfarkt und führten zu einer verbesserten Perfusion und kardialen Funktion [58].

Beim Menschen konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass der EPC-Spiegel im peripheren Blut prädiktiv für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse ist [59]. Im höheren Lebensalter und bei Anwesenheit kardiovaskulärer Risikofaktoren nimmt auch die Funktion der endothelialen Vorläuferzellen ab [60].

Zunehmend wird deshalb nach Möglichkeiten gesucht, die herausragende Bedeutung der EPC auch therapeutisch nutzbar zu machen. Erste Pilotversuche, bei denen EPC nach Herzinfarkt oder bei pAVK nach vorheriger Kultivierung autolog transplantiert wurden, zeigen bisher vielversprechende Ergebnisse [58]. Ein weiterer Ansatz ist die Beeinflussung der Freisetzung aus dem Knochenmark und auch der Funktion durch verschiedene Faktoren und Medikamente, wobei vor allem Statine zum Einsatz kommen [61-63].

## 5.2 Charakteristika der EPC

Endotheliale Vorläuferzellen finden sich im Knochenmark, aus dem sie stammen, im peripheren Blut und im Nabelschnurblut [64]. Sie können zirkulieren, proliferieren und sich in reife Endothelzellen differenzieren.

Dass ein kleiner Teil der an der Reparatur und der Homöostase des Endothels beteiligten Zellen aus dem Knochenmark stammt, wurde in verschiedenen Studien an knochenmarktransplantierten Patienten gezeigt. Nach dem Empfang von fremdem Knochenmark wurden aus peripherem Blut Kolonien von endothelialen Zellen gezüchtet. Kolonien, die sich innerhalb von neun Tagen bildeten, stammten vom Empfänger und wurden als zirkulierende Endothelzellen charakterisiert. Zellen, die nach mehr als neun Tagen eine Kolonie mit enormer Proliferationsfähigkeit bildeten, entsprachen den Zellen des Knochenmarkspenders [57]. Heute wird oft in Versuchen davon ausgegangen, dass die sogenannten late-outgrowth Zellen den gesuchten EPC entsprechen.

Ähnliche Ergebnisse erhielten 1998 auch Shi et al. [56], die in einem Hundemodell zeigen konnten, dass bei knochenmarktransplantierten Tieren vom Spender stammende CD34 positive Zellen im peripheren Blut zirkulieren und Gefäßprothesen mit einer Endothelschicht überziehen können.

Eine weitere Möglichkeit, EPCs von anderen, reifen Endothelzellen zu unterscheiden, besteht in der unterschiedlichen Ausprägung von verschiedenen Oberflächenmarkern. Die häufigsten Proteine, die dafür verwendet werden, sind



CD 34, CD 133 und VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2). VEGFR-2 und CD 34 finden sich auf allen hämatopoetischen Stammzellen und auf reifen Endothelzellen, wohingegen CD 133 auf pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen vorkommt [57, 58]. Weitere Marker sind CD 45 (Leukozyten-Marker), VE-Cadherin, von-Willebrand-Faktor (vWF) und CD 14 [65]. Meist wird eine endotheliale Vorläuferzelle als CD133+/CD34+/VEGFR-2+/CD14- charakterisiert. Mit der Dauer der Kultur ändert sich die Ausprägung dieser Oberflächenproteine abhängig vom Differenzierungsgrad der Vorläuferzellen, die sich langsam zu Endothelzellen entwickeln. Sie exprimieren dann zunehmend Marker wie vWF und VE-Cadherin, die typisch sind für reife Endothelzellen [57, 66].

Insgesamt sind genaue Aussagen über die Zusammensetzung der Oberflächenmarker schwierig zu treffen, da sich in Kultur - auch abhängig von unterschiedlichen Kulturbedingungen [58] - verschiedene Zellen zu Endothelzellen entwickeln können, so zum Beispiel CD 14 positive Monozytenvorläufer oder CD 34 negative MAPCs (multipotent adult progenitor cells) [57, 58, 67]. Es ist bisher nicht geklärt, ob die zirkulierenden EPCs von einer Vorläuferzelle stammen oder unterschiedlichen Ursprungs sein können und ob unterschiedliche EPCs unterschiedliche Funktionen und Aufgaben wahrnehmen und therapeutisch verschiedene Ansätze möglich machen oder gar benötigen. Allen gemeinsam ist die große Replikations- und Proliferationsfähigkeit, also die typische klonale Wachstumsaktivität von Stammzellen [58, 67].

Um auszuschließen, dass in einer Kultur reife zirkulierende Endothelzellen oder differenzierte Monozyten wachsen, bedient man sich des sog. „Preplatings“. Dabei werden Zellen, die zu schnell auf dem Wachstumsmedium Fibronectin adhären, entfernt und nur die Zellen, die nach 9-14 Tagen wachsen, als EPC angesehen [57, 58].

In Kultur bilden EPC Kolonien und kapillarähnliche Formen, nach mehreren Wochen auch sogenannte Monolayer mit dem typischen Aussehen von Endothel, ferner produzieren sie NO, nehmen acetyliertes LDL auf und binden an Lektin [67-69].

### 5.3 Einfluss auf Mobilisierung und Funktion von EPC

Im Knochenmark befinden sich die endothelialen Vorläuferzellen in einer Nische aus Fibroblasten, Osteoblasten und Endothelzellen [66]. Erst durch verschiedene Faktoren werden sie freigesetzt und gelangen in die periphere Zirkulation, wo sie ihre Aufgaben wahrnehmen können. Proteinasen schneiden den EPC im Knochenmark den Weg frei, dazu gehören eine Elastase und Cathepsin G aus Leukozyten, welche durch granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), ein Granulozyten-Wachstumsfaktor, in ihrer Aktivität gesteigert werden [66]. Viel wichtiger aber ist die Matrix-Metalloprotease 9 (MMP-9), die lokal den löslichen cKit-Liganden freisetzt und so zur Mobilisierung der EPC beiträgt [58, 66, 69, 70]. MMP-9 wird wiederum durch VEGF und stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) beeinflusst [57, 58, 66, 69]. Diese beiden Faktoren werden in ischämischen Arealen produziert [66], aber auch in Tumorgewebe [57]. Auf einen VEGF-Reiz hin erfolgt ein sehr schneller Anstieg der EPC im peripheren Blut [57]. Dies konnte bei Patienten mit Verbrennungen oder nach einer Bypass-Operation gezeigt werden: endotheliale Progenitorzellen erhöhten sich im Blut auf das bis zu 50 Fache innerhalb von 12 Stunden, um nach 48-72 Stunden wieder auf ihren Ausgangswert abzufallen [57].

Weiteren Einfluss auf die Freisetzung von EPC aus dem Knochenmark haben Stoffe wie granulocyte monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF), Erythropoetin, sportliche Aktivität und Östrogene [57, 58, 66]. Östrogene erhöhen die Zirkulation und den Einbau von EPC in Zonen der Reendothelialisierung nach Intima-Verletzung von Gefäßen, zusätzlich fördert Estradiol die mitogene Aktivität und vermindert die Apoptose [71]. Auch Medikamente wie Statine (Hydroxy-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase-Inhibitoren, HmG-CoA-Reduktase-Inhibitoren) erhöhen den EPC-Spiegel im Blut, nach 7 Tagen konnte die EPC-Anzahl im Blut sogar bis zu verdoppelt werden [57, 58, 66]. Fast alle diese Faktoren - und auch MMP-9 und VEGF - sind allerdings von einem weiteren wesentlichen Faktor abhängig, nämlich der endothelialen NO-Synthase (eNOS). Bei eNOS-Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass es zu einer verminderten EPC-Freisetzung kam [66].

Ebenso kam es zu keinem VEGF-, MMP-9- oder sportinduzierten Anstieg der Vorläuferzellen [58, 66]. Auch Statine [66] und Östradiol [57] zeigten ohne eNOS keine Wirkung. Die endotheliale NO-Synthase spielt also auch hier eine herausragende Rolle.

Verschiedene klinische Studien befassen sich mit physiologischen, pathologischen und therapeutischen Faktoren, die EPC in ihrer Mobilisation, Zirkulation und Funktion beeinflussen.

Stress setzt EPC aus dem Knochenmark frei, pathophysiologisch zum Beispiel beim Herzinfarkt, physiologisch bei Sport und körperlicher Aktivität [72].

Im Alter sinkt die Anzahl der zirkulierenden EPC im Blut ab [57]. Möglicherweise geschieht dies durch eine Erschöpfung des Vorrates der Zellen im Knochenmark. Ähnliche Faktoren können auch bei bestimmten Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Risikokonstellationen dazu beitragen, dass die Vorläuferzellen in ihrer Zahl und Funktion beeinträchtigt werden [58, 64, 69, 72]. Es ist bekannt, dass Patienten mit Diabetes mellitus [58, 72] koronarer Herzkrankheit [72, 73] oder chronischer Herzinsuffizienz [74] erniedrigte EPC-Spiegel gegenüber der Normalbevölkerung aufweisen. Mononukleare Zellen, die durch Aspiration aus dem Knochenmark herzinsuffizienter Patienten gewonnen wurden, zeigten eine geringe Kulturbildung, eingeschränkte Wanderungsfähigkeit und nach Injektion in ischämisches Gewebe von Mäusen eine verminderte Funktion [74].

Patienten mit allgemeinen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Rauchen, Bluthochdruck und Hypercholesterinämie zeigen schon Einschränkungen der EPC-Funktion und -Zahl [58, 69]. Auch bisher klinisch unauffällige Patienten mit bestimmten Risikofaktoren zeigten erniedrigte EPC-Spiegel, und zwar niedriger, je höher der jeweilige Framingham-Risk-Score lag [64, 75].

Bisher konnte allerdings nicht eindeutig geklärt werden, ob niedrige EPC-Spiegel eher die Ursache oder die Folge dieser Risikofaktoren und Erkrankungen sind. Ebenso wenig weiß man, ob die genannten Risikofaktoren die Mobilisation und Überlebenszeit der EPC direkt beeinflussen oder ob sie vielmehr über ständige Endothelschädigungen zu einer Erschöpfung des Speichers im Knochenmark führen [64].

## II. Ziele der Doktorarbeit

Aufgrund der vorliegenden Erkenntnisse über die Eigenschaften von ADMA und die Rolle der endothelialen Vorläuferzellen prüften wir die Hypothese, dass ADMA einen direkten hemmenden Einfluß auf EPC ausübt und so auch über diesen Weg einer endothelialen Dysfunktion und damit dem kardiovaskulären Risiko Vorschub leistet.

In einer klinischen Studie untersuchten wir die Korrelation zwischen ADMA-Spiegeln im Plasma und der Anzahl zirkulierender EPC bei Patienten mit manifester koronarer Herzerkrankung.

Zusätzlich beschäftigten wir uns in in-vitro-Untersuchungen mit der Frage, inwieweit ADMA die EPC-Funktion unterdrückt und ob diese durch die Zugabe von Statinen wieder verbessert werden kann.

### **III. Methoden**

#### **1. Studienteilnehmer**

In die von der Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigten Studie wurden 80 Patienten eingeschlossen, die zur elektiven Herzkatheteruntersuchung wegen pektanginöser Beschwerden in die Klinik eingewiesen worden waren. Vor Einschluss in die Studie unterschrieben die Patienten eine Einverständniserklärung nach einem Informationsgespräch mit einem Arzt.

Die Patienten wurden in vier Gruppen (KHK-0, KHK-1, KHK-2, KHK-3, jeweils 20 Patienten) eingeteilt, die Zugehörigkeit zu einer Gruppe richtete sich nach dem Ergebnis der Koronarangiographie. Als Stenose wurde eine über 50%ige Engstelle einer Koronararterie gewertet. Entsprechend der Anzahl der betroffenen Herzkranzgefäße wurde bei den Patienten eine koronare 1-, 2- oder 3-Gefäßerkrankung diagnostiziert (KHK-1, KHK-2 oder KHK-3) oder ausgeschlossen (KHK-0).

Von den 80 Studienteilnehmern waren 49 Männer, das Alter lag zwischen 39 und 81 Jahren (mittleres Alter 66,1 +/- 1 Jahre).

#### **2. Gewinnung von mononukleären Zellen aus humanem Vollblut**

Sogenannte peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) können aus dem zirkulierenden venösen Blut isoliert werden [64]. Dazu wurde den an der Studie teilnehmenden Patienten aus der Ellenbeuge Blut in ein Ethylen-diamintetraessigsäure (EDTA)-Röhrchen abgenommen (ca. 10 ml) und sofort kühl gestellt. Noch am selben Tag wurde das gewonnene Blut weiter verarbeitet.

4 ml des EDTA-Blutes wurden mit der zweifachen Menge phosphatierter Pufferlösung (Phosphate Buffered Saline, PBS; mit 2 mM EDTA versetzt) gemischt. Danach folgte eine Dichte-Zentrifugation mit Ficoll® [64], wobei die

12 ml der verdünnten Zellsuspension langsam über das Medium (3 ml) geschichtet und anschließend für 30 Minuten bei 20°C und 1800 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert wurden.

Die Ficoll®-Zentrifugation nutzt die unterschiedliche Dichte der einzelnen Blutbestandteile, die sich von oben nach unten in Plasma, Leukozyten und Erythrozyten auftrennen. Die mittlere weiße Phase kann nach der Zentrifugation als Leukozyten-Saum abgenommen und weiterverarbeitet werden. Die so gewonnene Interphase wurde dann erneut mit PBS auf 15 ml aufgefüllt und zentrifugiert. Nach dieser erneuten Zentrifugation setzten sich die Leukozyten als Pellet ab. Der Überstand konnte dann abgenommen werden. Die verbleibenden Zellen wurden mit 500 µl CryoSFM Einfriermedium (PromoCell) resuspendiert und zunächst bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden sie zur endgültigen Lagerung in flüssigen Stickstoff gegeben.

Für in-vitro Versuche mit EPCs wurden die Zellen fünf gesunder freiwilliger Spender mittels Leukapherese (Cobe Spectra, Gombro, Deutschland) gewonnen und wie oben beschrieben gelagert.

### **3. Nachweis von CD34+/CD133+ Zellen**

Von jeder Probe, die man mittels Ficoll®-Dichte-Zentrifugation gewonnen hatte, wurden je 60 µl für die Inkubation mit den EPC-Antikörper CD34 und CD133 und für eine Isotyp-Kontrolle verwendet (insgesamt also 120 µl). Dafür wurden die Proben im Wasserbad bei 37°C zügig aufgetaut und auf Eis weiterverarbeitet. Nach einer Zentrifugation bei 1500 U/min und 4°C für fünf Minuten konnte der Überstand (hauptsächlich bestehend aus CryoSFM Einfriermedium) abgenommen und das übrig gebliebene Pellet mit 16µl MACS-Puffer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) resuspendiert werden.

Für die Kontrollen, die unspezifische Bindungen ausschließen sollten, verwendete man je 2 µl Allophycocyanin(APC)-markierte monoklonale IgG 2b Maus-Antikörper (1:33 verdünnt, BD Biosciences Pharmingen, 55745) und 2 µl

Fluorescein-Isothiocyanat(FITC)-markierte monoklonale IgG 2a Maus-Antikörper (BD Biosciences Pharmingen, 53456).

Die eigentlichen Antikörper für EPC waren je 2 µl CD 133/2 APC (1:3 verdünnt, Miltenyi Biotec, 120-001-241) und 2 µl CD 34 FITC (Miltenyi Biotec, 120-000-427), jeweils monoklonale antihumane Maus-Antikörper. Nach Zugabe der Antikörper wurden die Proben für fünf Minuten im Kühlschrank (4°C) inkubiert und anschließend mit 500 µl MACS-Puffer aufgefüllt, was die Reaktion der Antikörper mit den Zellen stoppte.

Im Cytometer (FACSCalibur von Becton Dickinson, Heidelberg) zählten wir je Probe 20.000 Zellen, die CD34/CD133 doppelt positiven Zellen wurden von zwei unabhängigen Untersuchern ausgewertet. Ihr Anteil an den PBMCs lag zwischen 0,05 und 0,22%.

#### **4. Messung von ADMA im Plasma**

Das Blut der Patienten (siehe oben) wurde auch für die ADMA-Messung verwendet. Dafür wurden ca. 5 ml der Probe bei 1500 g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Das daraus gewonnene Plasma wurde sofort bei -80°C eingefroren.

Aus Teilproben zu je 1 ml wurden durch Zentrifugation (7500 g, 20°C, 20 Minuten) Ultrafiltrate gewonnen (ca. 0,7-0,8 ml). Dabei wurden spezielle Filtereinsätze verwendet (Amicon Ultra Millipore von Millipore, Schwalbach).

Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) wurde massenspektrometrisch nachgewiesen und quantitativ bestimmt. Dafür wurde ein Massenspektrometer (Triple-stage quadruple mass spectrometer ThermoQuest TSQ 7000, Finnigan MAT, San Jose, Kalifornien) direkt mit einem Gaschromatographen verbunden (Trace 2000 series, ausgestattet mit einem Autosampler AS 2000, CE Instruments, Austin, Texas). Für die gaschromatographische Messung wurde eine Kieselglas-gefüllte Säule benutzt. Als Standard für die Messung diente synthetisches ADMA. Diese Bestimmungen wurden von Herrn PD Dr. D. Tsikas (Medizinische Hochschule Hannover) durchgeführt.

## 5. In-Vitro-Versuche mit endothelialen Progenitorzellen

### 5.1 EPC Zellkultur-Assay

Die durch Leukapherese bei fünf gesunden Probanden gewonnenen mononukleären Zellen wurden mit der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Jeweils  $2 \times 10^5$  dieser Zellen wurden dann für insgesamt vier Tage kultiviert. Dafür verwendeten wir mit Fibronektin vorbehandelte Platten (8-well chamber slides von Lab-Tek, Wiesbaden) und Endothelial Basal Medium-2 (EBM2), das mit EGM SingleQuots (enthält Wachstumsfaktoren) versetzt wurde (beides Cambrex, Verviers, Belgien). Nach acht Stunden wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und auf neue Platten gegeben. Damit wurde ausgeschlossen, dass die Zellkulturen von reifen zirkulierenden Endothelzellen stammen, da Endothelzellen zu diesem Zeitpunkt schon adhärent sind.

Von EPC ist bekannt, dass sie acetyliertes LDL aufnehmen und an Lektin binden [67-69]. Nach vier Tagen wurden die Zellen zweimal mit EBM2-Medium gewaschen, dem zuvor 1,1'-Dioctdecyl-3,3,3',3-tetramethyl-indocarbocyanin-perchlorat-markiertes acetyliertes low-density Lipoprotein (dil-ac-LDL) (Molecular Probes, Carlsbad, Kalifornien) und FITC-konjugiertes Lektin von *Ulex europaeus* (UEA-1, Sigma, Deisenhofen) zugefügt worden waren. Pro Milliliter enthielt das Medium 10  $\mu$ l dil-ac-LDL und 10  $\mu$ l UEA-1. Nach dem Waschen erfolgte eine erneute Inkubation der Zellen für 4 Stunden bei 37°C.

Danach betrachteten wir die Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop. Von zwei unabhängigen Untersuchern wurden mindestens 8 verschiedene, zufällig ausgewählte Felder ausgezählt und dabei nur die dil-ac-LDL und UEA-1 doppelt positiven Zellen gewertet.



## 5.2 Kolonie-bildende Einheiten (CFUs)

Die mittels Dichte-Zentrifugation gewonnenen Zellen wurden zusammen mit EndoCult Medium (StemCell Technologies, St. Katharinen) auf Fibronektin-vorbehandelte Platten gegeben.

Dabei wurden je  $5 \times 10^6$  der PBMCs aus der Leukapherese auf six-well plates aufgetragen, die Zellen der an der Studie teilnehmenden Patienten wurden in gleicher Anzahl ( $5 \times 10^6$ ) auf 12-well plates verteilt.

Nach 48 Stunden nahmen wir die nicht-adhärenenten Zellen ab und plattierten sie wiederholt auf 24-well Platten (auch hier mit Fibronektin behandelt). Nach weiteren drei Tagen wurden die bis dahin vorhandenen Kolonien (colony forming units = CFUs) bewertet und ausgemessen.

Eine Kolonie wird üblicherweise definiert als ein zentraler Kern mit runden Zellen, der von länglichen Zellen umgeben ist. Man geht davon aus, dass es sich dabei um die sog. early-outgrowth Endothelzellen handelt. Dass diese Zellen endothelialen Ursprungs sind, wurde in früheren Arbeiten [64] bestätigt, indem sie immunzytochemisch mit typischen Markern versehen wurden, darunter vWF, VEGFR-2 und CD31.

## 5.3 Inkorporations-Assay

In diesem Versuch wurde der Einbau von EPC während der Bildung gefäßähnlicher Strukturen durch Endothelzellen beobachtet.

$2 \times 10^4$  EPCs wurden mit dil-ac-LDL markiert und mit  $4 \times 10^4$  human umbilical vein endothelial cells (HUVECs, Cambrex, Verviers, Belgien) vermischt. Dies geschah unter Zugabe von 500  $\mu$ l EBM-2-Medium (versetzt mit EGM SingleQuots, beides Cambrex, Verviers, Belgien) auf einem 8-well Glasträger, der zuvor mit 200  $\mu$ l Matrigel (BD Biosciences, Heidelberg) behandelt worden war. Zusätzlich wurden entweder 0, 1, 5 oder 10  $\mu$ mol ADMA zugegeben, eine Gruppe wurde gleichzeitig mit 10  $\mu$ mol ADMA und 10  $\mu$ mol Rosuvastatin behandelt, wobei die Rosuvastatin-Konzentration auf einer früheren in vitro-

Studie basierte [76]. Die Zellen wurden für acht Stunden bei 37°C unter angefeuchteter 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert und anschließend unter dem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet.

Die Auswertung betrachtete die Anzahl der dil-ac-LDL-markierten EPCs, die sich in die röhrenförmigen Strukturen der Endothelzellen eingebaut hatten.

#### **5.4 Nachweis der eNOS-Aktivität in EPC**

Durch die Aktivität der endothelialen NO-Synthase entsteht aus L-Arginin unter anderem Nitrat. Dies kann mit <sup>15</sup>N-markiertem Arginin nachgewiesen werden.

Die EPCs wurden kultiviert und anschließend mit ADMA in aufsteigender Konzentration behandelt (0, 1, 5, 10 µM ADMA und 10 µM ADMA zusammen mit 10 µM Rosuvastatin). Im nächsten Schritt folgte die Inkubation mit 5 mmol L-[Guanidino-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-Arginin bei 37°C für acht Stunden.

Nachdem der Überstand abgenommen wurde, konnte die Umwandlung von L-[Guanidino-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-Arginin in <sup>15</sup>N-Nitrat gaschromatographisch-massenspektrometrisch bestimmt werden. Je mehr <sup>15</sup>N-Nitrat vorhanden war, desto stärker hatte eine Umwandlung stattgefunden und desto höher war die Aktivität der eNOS. Diese Bestimmungen wurden von Herrn PD Dr. D. Tsikas (Medizinische Hochschule Hannover) durchgeführt.

### **6. Statistische Analyse**

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe des Statistik-Programms StatView 5.0 (Abacus Concepts, Berkeley, Kalifornien) erstellt.

Die angegebenen Daten entsprechen Mittelwerten ± Standardfehler der Mittelwerte. Für die statistische Analyse wurde zuerst eine einseitige Varianzanalyse durchgeführt, dann folgten multiple Vergleichstests, wofür der „Fisher protected least-significant difference test“ zum Einsatz kam.

Beziehungen zwischen verschiedenen Variablen wurden mittels einfacher, polynomialer und multivariater Regressionsanalyse untersucht.

Eine statistische Signifikanz nahmen wir bei  $p < 0,05$  an.

## IV. Ergebnisse

### 1. Ergebnisse der klinischen Studie

Mit der klinischen Studie untersuchten wir, ob ein Zusammenhang zwischen der ADMA-Konzentration im Serum der Patienten und der Anzahl der im Blut zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen besteht.

Die Studienteilnehmer wurden in vier Gruppen zu je 20 Personen eingeteilt, abhängig von der Schwere der KHK. Patienten, die bei der Herzkatheteruntersuchung keine signifikanten Stenosen oder Läsionen (< 50% des Gefäßdurchmessers) aufwiesen, wurden der Gruppe KHK-0 zugewiesen. Die Gruppen KHK-1, KHK-2 und KHK-3 bestanden aus denjenigen Teilnehmern, die ein, zwei oder drei betroffene Koronargefäße hatten. In den einzelnen Gruppen bestand statistisch kein signifikanter Unterschied im Alter der Patienten. Betroffene mit einer nachgewiesenen koronaren Herzerkrankung zeigten im Durchschnitt höhere Gesamtcholesterin-Werte als die Gruppe KHK-0 ( $214,7 \pm 10,8$  mg/dl bei KHK-2 gegen  $187,1 \pm 7,8$  mg/dl bei KHK-0;  $p < 0,05$ ). Dieser Unterschied korrelierte jedoch nicht mit der Schwere der Erkrankung oder der Anzahl der zirkulierenden EPC (CD133/CD34 doppelt positive Zellen;  $r = -0,01$ ).

Das Vorhandensein eines Diabetes mellitus zeigte einen Zusammenhang mit der Anzahl der betroffenen Gefäße ( $p < 0,004$ ), Bluthochdruck war im untersuchten Studienkollektiv vom Ausmaß der Erkrankung unabhängig.

Patienten, die unter einer schwereren Form der KHK litten, wurden signifikant häufiger mit einem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor (Statin) ( $p < 0,001$ ) oder einem Nitrat ( $p < 0,05$ ) behandelt als andere. Bei der restlichen Medikation zeigten sich keine relevanten Unterschiede in der Art und Häufigkeit der Behandlung.

Die Höhe des Serum-ADMA-Spiegels korrelierte mit der Schwere der koronaren Herzkrankheit. Je mehr Gefäße von Läsionen betroffen waren, desto höher war

die gemessene ADMA-Konzentration ( $0,47 \pm 0,02 \mu\text{mol/l}$  bei KHK-0 gegen  $0,58 \pm 0,02 \mu\text{mol/l}$  bei KHK-3;  $p < 0,001$ , Abb. 7).

Die Anzahl der zirkulierenden Progenitorzellen zeigte einen direkten Zusammenhang mit der Anzahl der colony forming units dieser Zellen in Kultur ( $r = 0,83$ ;  $p < 0,0001$ ). Beide nahmen bei zunehmender Schwere der Erkrankung ab.

Zwischen der Höhe der ADMA-Konzentration im Plasma und der Anzahl der Progenitorzellen im peripheren Blut bestand eine inverse Korrelation ( $r = -0,69$ ;  $p < 0,0001$ , Abb. 7).

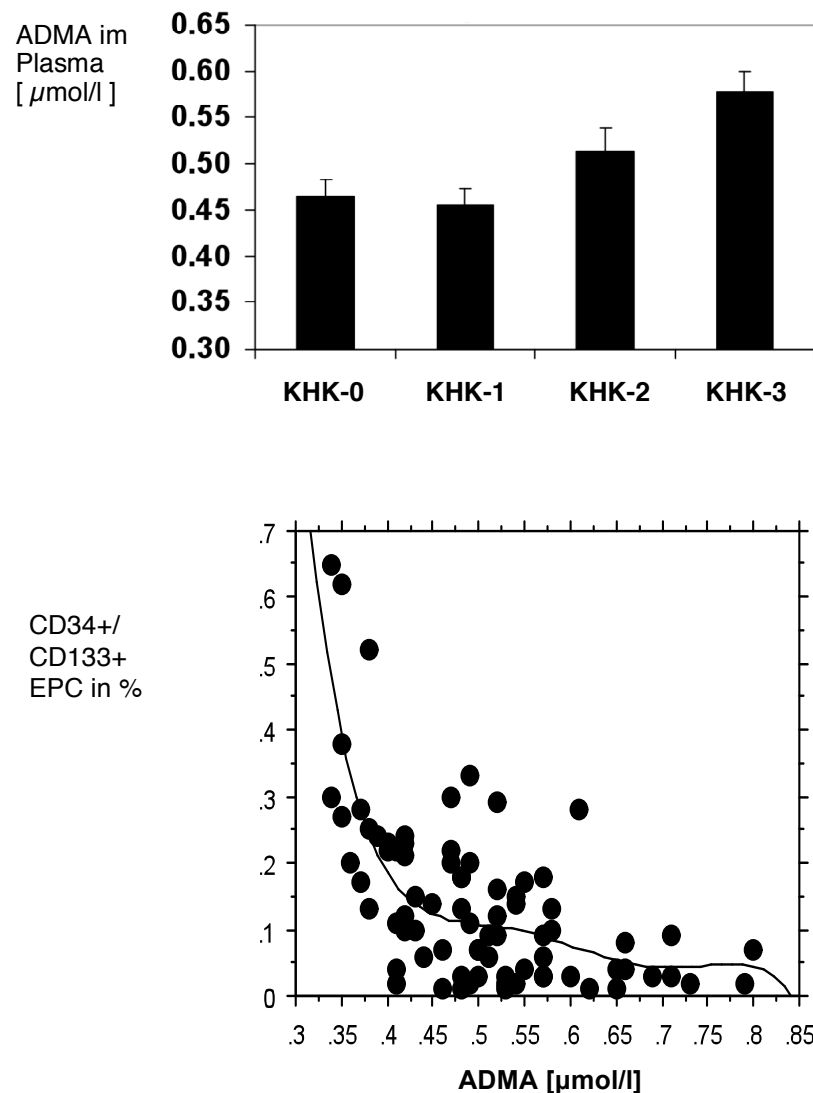


Abb. 7: Korrelation der ADMA-Konzentration im Plasma von Patienten mit dem Schweregrad der KHK bzw. der Zahl zirkulierender EPC. Die ADMA-Konzentration im Plasma nimmt mit steigender Schwere der KHK zu (oben,  $p < 0,001$ ). Je höher die ADMA-Konzentration im Plasma wird, desto weniger EPC sind nachweisbar (unten,  $r = -0,69$ ,  $p < 0,0001$ ).

Die CD133/CD34 doppelt positiven Zellen waren bei koronarer 3-Gefäßerkrankung gegenüber KHK-0 um 77,3% reduziert (CD133/CD34 doppelt pos. Zellen in Prozent der PBMCs bei KHK-0:  $0,22 \pm 0,03\%$ ; bei KHK-3:  $0,05 \pm 0,01\%$ ;  $p < 0,0001$ , Abb. 8).

Ähnlich verhielt sich die Anzahl der colony forming units (CFU) zum ADMA-Spiegel ( $r = -0,75$ ;  $p < 0,0001$ ). Die Kolonien zeigten sich bei Patienten aus der Gruppe KHK-3 um 50,3% reduziert verglichen mit Patienten, die nicht an koronarer Herzerkrankung litten (KHK-0:  $16,7 \pm 1,2$  Kolonien/well; KHK-3:  $8,3 \pm 0,7$  Kolonien/well;  $p < 0,0001$ , Abb. 8).

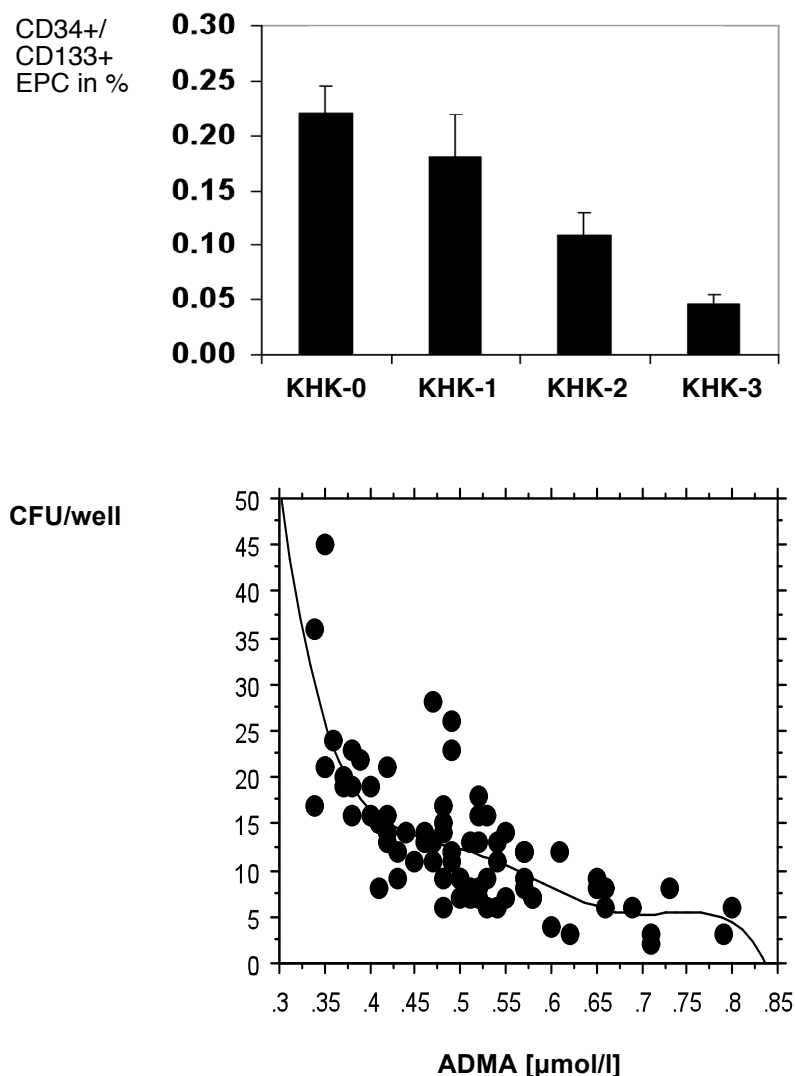


Abb. 8: Zusammenhang zwischen KHK bzw. ADMA und Anzahl der EPC. Mit zunehmender Ausprägung der KHK sinkt die Anzahl der EPC im zirkulierenden Blut (oben,  $p < 0,01$  für KHK-0 bis KHK-2 bzw.  $p < 0,0001$  für KHK-3). Je höher die ADMA-Konzentration im Plasma der Patienten ist, desto weniger Kolonien an EPC wachsen in Kultur (unten,  $r = -0,75$ ,  $p < 0,0001$ ).

Mittels einer multivariaten Regressionsanalyse konnten wir zeigen, dass sowohl die Schwere der Koronarerkrankung (standardisierter Koeffizient, - 0,43;  $p < 0,01$ ) als auch die Höhe des ADMA-Plasmaspiegels (standardisierter Koeffizient, - 0,51;  $p < 0,0001$ ) unabhängig voneinander mit der Anzahl der zirkulierenden CD133+/CD34+ Vorläuferzellen zusammenhängen.

Zusätzlich wurden weitere mögliche Einflussgrößen untersucht, die aber allesamt keine Korrelation zeigten:

- Alter
- Kreatinin i.S.
- Leukozyten
- Hämoglobin
- C-reaktives Protein (CRP)
- Bluthochdruck
- Diabetes mellitus
- Medikamenteneinnahme (ASS, Clopidogrel, ACE-Hemmer, Angiotensin-Rezeptor-Blocker, Beta-Blocker, Statine, Nitrate)
- Gesamtcholesterin
- Low-density Lipoprotein (LDL)
- High-density Lipoprotein (HDL)

In einer ähnlichen Analyse zeigte sich, dass allein die ADMA-Spiegel im Blut der Patienten die Anzahl der gebildeten Kolonien endothelialer Zellen in Kultur signifikant voraussagen konnte (standardisierter Koeffizient, - 0,67;  $p < 0,0001$ ).

	Kontrollgruppe n=20	KHK 1 n=20	KHK 2 n=20	KHK 3 n=20	Patienten insg. n=80	p-Wert KHK 0 gg. KHK 3
Alter (Jahre)	64,6 ± 1,8	63,7 ± 1,0	66,7 ± 2,0	69,5 ± 3,0	66,1 ± 1,1	0,11
männlich (%)	55	60	65	65	61,3	0,75
CD34+/CD133+	0,22 ± 0,03	0,18 ± 0,04	0,11 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,14 ± 0,01	<0,0001
CFU (Anzahl/well)	16,7 ± 1,2	16,8 ± 2,1	10,7 ± 1,2	8,3 ± 0,2	13,1 ± 1,6	<0,0001
ADMA (µmol/l)	0,47 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,51 ± 0,03	0,58 ± 0,02	0,50 ± 0,01	<0,001
Bluthochdruck (%)	70	65	90	85	77,5 ± 1,3	0,26
Diabetes (%)	5	30	25	35	23,8 ± 1,5	0,004
Medikation bei Aufnahme (%)						
ASS	75	90	85	75	81,25	1
Clopidogrel	15	25	20	10	17,5	0,68
ACE-Hemmer/AT- Antagonist	50	65	60	55	57,5	0,75
Beta-Blocker	50	55	70	75	62,5	0,11
Statin	20	50	55	75	50	<0,001
Nitrat	0	30	15	30	18,8	≤0,015
Creatinin (mg/dl)	0,84 ± 0,06	0,92 ± 0,04	0,99 ± 0,06	0,98 ± 0,06	0,93 ± 0,03	0,08
Cholesterin gesamt (mg/dl)	187,1 ± 7,8	204,6 ± 9,9	214,7 ± 10,8	180,9 ± 10,5	196,4 ± 4,9	≤0,048 (gg.KHK 2 <0,05)
LDL-Cholesterin (mg/dl)	105,9 ± 6,9	118,1 ± 8,2	126,2 ± 9,3	96,5 ± 7,1	111,3 ± 4,0	0,39
HDL-Cholesterin (mg/dl)	54,4 ± 3,2	50,9 ± 3,4	51,6 ± 3,5	48,6 ± 3,7	51,4 ± 1,7	0,24
Hämoglobin (g/dl)	14,3 ± 0,4	14,1 ± 0,4	14,2 ± 0,3	13,3 ± 0,3	14,0 ± 0,2	0,07
CRP (mg/dl)	0,84 ± 0,23	0,60 ± 0,16	0,52 ± 0,10	0,83 ± 0,20	0,70 ± 0,09	0,97
Leukozyten (1000/µl)	6,9 ± 0,4	7,0 ± 0,4	7,9 ± 0,5	7,9 ± 0,6	7,4 ± 0,2	0,15

Tab. 1: Anzahl der EPC und CFUs bzw. Höhe des ADMA-Plasmaspiegels bei Patienten mit KHK-0 bis KHK-3 sowie weitere Charakteristika bezüglich Erkrankungen, Medikation und ausgewählter Laborwerte.



## 2. Ergebnisse der In-vitro-Studien

### 2.1 EPC Zellkultur-Assay

Im Rahmen der Zellkultur-Versuche wurden die dil-ac-LDL / UEA-1 doppelt positiven Zellen, die den EPC entsprechen, mit aufsteigenden Konzentrationen an ADMA behandelt.

Den einzelnen Assays (jeweils  $n = 5$ ) wurden jeweils 1, 5, oder 10  $\mu\text{M}$  ADMA zugegeben. Zusätzlich gab es Zellkulturen zur Kontrolle ohne ADMA-Zugabe und Kulturen, die sowohl mit 10  $\mu\text{M}$  ADMA als auch mit 10  $\mu\text{M}$  Rosuvastatin, einem HMG-CoA-Reduktase-Hemmer, behandelt wurden. Dabei zeigte sich, dass ADMA das Wachstum der Zellen in Kultur konzentrationsabhängig hemmt. Abb. 9 zeigt die Anzahl der EPC in Kulturen mit ADMA-Zugabe, die im Vergleich zum Ausgangswert in Kulturen ohne ADMA gezählt werden konnten. In maximaler Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  senkte ADMA die Anzahl der dil-ac-LDL/UEA-1 doppelt positiven Zellen nach vier Tagen in Kultur auf bis zu  $37 \pm 4\%$  ( $p < 0,0001$ ;  $n = 5$ ) ihres Ausgangswertes.

Die Zellen, die gleichzeitig mit ADMA und Rosuvastatin behandelt wurden, zeigten keine Änderung in ihrem Proliferationsverhalten. Rosuvastatin wirkte hier also der ADMA-Wirkung entgegen.

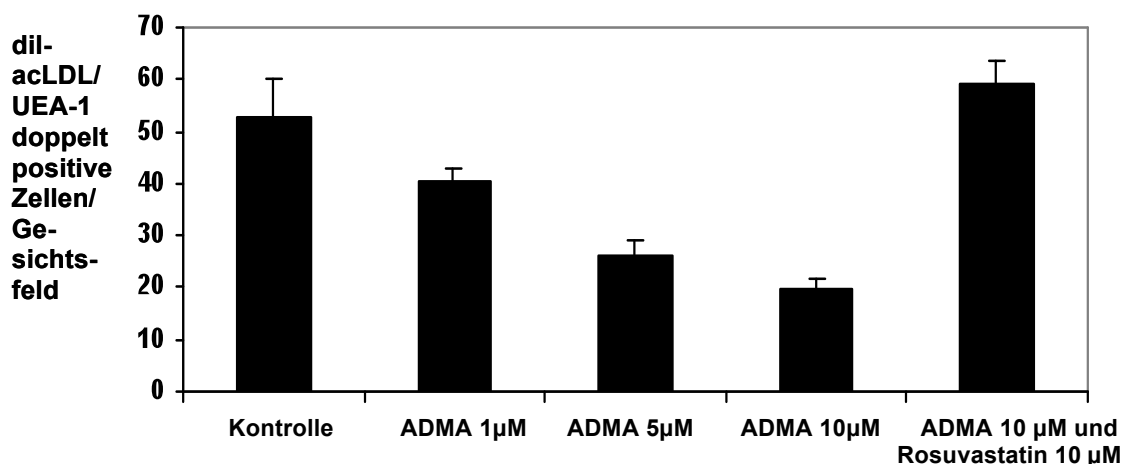


Abb. 9: EPC-Wachstum unter ADMA-Einfluss. EPC (hier mit dil-ac-LDL und UEA-1 markiert) zeigen in Kultur unter Zugabe von ADMA nach 4 Tagen ein konzentrationsabhängig vermindertes Wachstum. Die Zugabe von Rosuvastatin hemmt die Wirkung von ADMA ( $P < 0,001$  bzw.  $< 0,0001$ ).

In Abb. 10 sind die Fluoreszenz-markierten Zellen zu sehen, wie sie sich unter dem Mikroskop darstellten. Es zeigt sich eine deutliche Reduktion der EPC bei Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  ADMA, die sich bei gleichzeitiger Rosuvastatin-Gabe nicht nachweisen lässt.

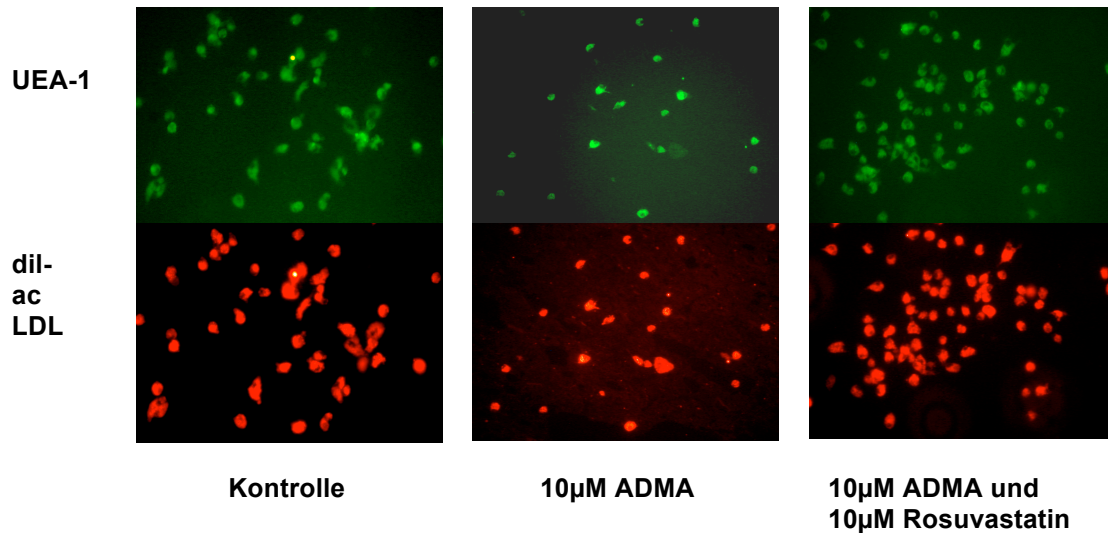


Abb.10: EPC-Kulturen unter ADMA-Einfluss. Im Fluoreszenz-Mikroskop zeigt sich deutlich der Unterschied zwischen Kulturen mit ADMA-Zugabe und solchen, die entweder keinerlei Behandlung unterzogen wurden oder gleichzeitig Rosuvastatin erhielten. ADMA reduziert das Wachstum der EPC deutlich.

## 2.2 Kolonie-bildende Einheiten (CFUs)

Die Kolonien, die sich in Zellkultur bildeten, wurden ebenso wie oben beschrieben mit unterschiedlichen Konzentrationen von ADMA behandelt (1, 5, 10  $\mu\text{M}$ ). Auch hier führten wir eine Kontrolle ohne ADMA durch. Darüber hinaus legten wir eine Kultur an, die sowohl mit 10  $\mu\text{M}$  ADMA als auch mit 10  $\mu\text{M}$  Rosuvastatin behandelt wurde.

Als Kolonie galt wiederum ein Kern bestehend aus runden Zellen, der von länglich geformten Zellen umgeben war. Abb. 11 zeigt die Kolonien und ihr Verhalten unter ADMA-Einfluss sowie unter zusätzlicher Gabe des Statins Rosuvastatin.

Sowohl Anzahl der Kolonien als auch ihre jeweilige Größe nahmen unter ADMA-Einfluss konzentrationsabhängig ab.

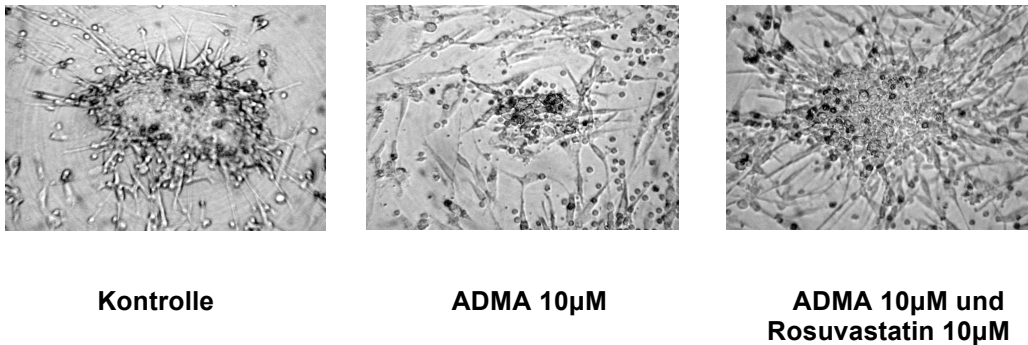


Abb.11: CFUs unter ADMA-Einfluss.  
Unter dem Lichtmikroskop zeigt sich eine deutliche Verminderung der Kolonie-Größe unter ADMA-Einfluss, wohingegen Zellen unter gleichzeitiger Behandlung mit Rosuvastatin Kolonien bildeten, die denen der Kontrollgruppe entsprachen.

Die Anzahl der Kolonien reduzierte sich unter ADMA, bei Mitbehandlung mit Rosuvastatin normalisierte sich die Kolonie-Zahl jedoch auf die Werte, die zuvor ohne ADMA erreicht worden waren (Abb. 12).

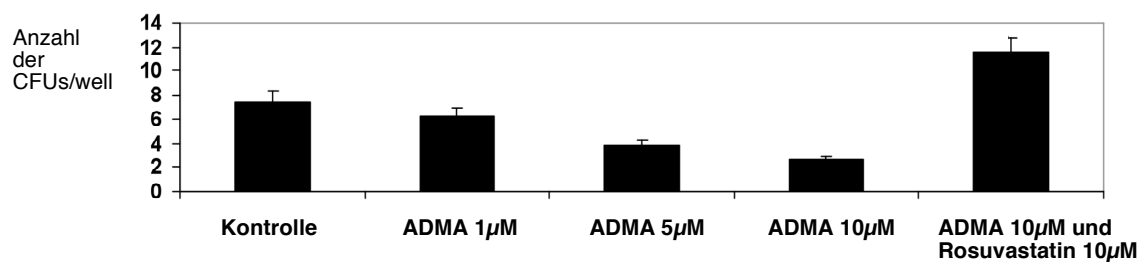


Abb.12: Anzahl der gebildeten Kolonien je Platte (well) in Abhängigkeit von ADMA-Konzentration und Zugabe von Rosuvastatin ( $p < 0,05$  bis  $p < 0,0001$ ).

Das Größenwachstum der Kolonien wurde von uns als ein Marker für die Proliferationsfähigkeit der endothelialen Progenitorzellen eingeschätzt. ADMA

hemmte das Wachstum der Kolonien, teilweise erreichten sie nur  $29 \pm 9\%$  ( $p < 0,0001$ ;  $n = 5$ ) der Koloniegrößen ohne ADMA (Abb. 13).

Auch hier hob die Zugabe von Rosuvastatin die anti-proliferative Wirkung von ADMA auf.

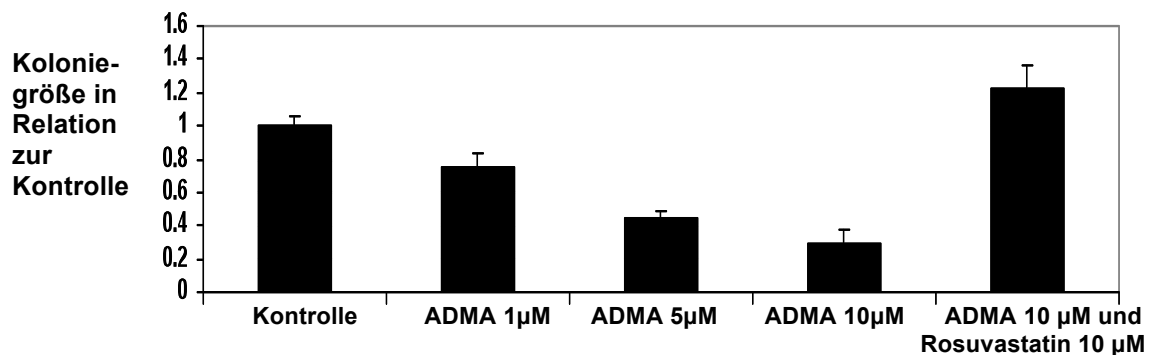


Abb.13: Größe der einzelnen Kolonien bezogen auf die Kontrollgruppe ( $p < 0,05$  bis  $p < 0,0001$ ).

### 2.3 Inkorporations-Assay

Humane endotheliale Zellen aus Nabelschnurblut (HUVECs) bilden in Kultur röhrenförmige gefäßähnliche Strukturen. In diesem Assay untersuchten wir, inwieweit es zu einem Einbau der EPC in diese Strukturen kommt. Zu diesem Zweck wurden die EPC mit dil-ac-LDL markiert. In Abb. 14 ist zu sehen, wie sich die EPC (im Fluoreszenzmikroskop rot dargestellt) in die Gefäßvorläufer aus HUVECs (im Fluoreszenzmikroskop grün) integrieren. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen zeigten EPCs, die zuvor für 24 Stunden mit ADMA behandelt waren, wesentlich weniger ausgeprägt die Fähigkeit, sich in gefäßähnliche Strukturen von HUVECs zu integrieren.

dil-ac-  
LDL/UEA-1  
doppelt  
pos. Zellen  
im Fluores-  
zenz-  
Mikroskop

und im  
Licht-  
Mikroskop

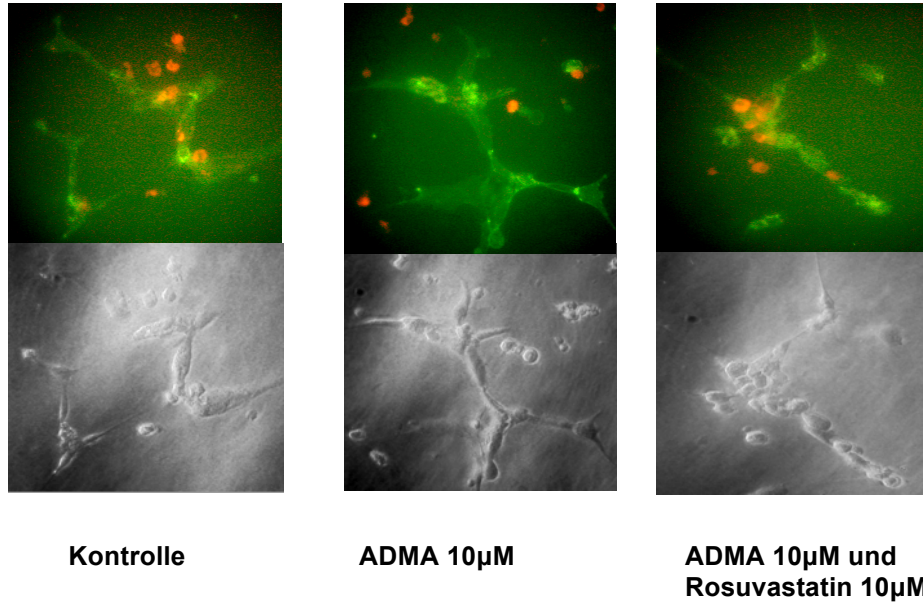


Abb.14: Integration von EPC in gefäßähnliche Strukturen von HUVECs in Abhängigkeit von ADMA- bzw. Rosuvastatin-Zugabe.

Abb. 15 zeigt die Anzahl der EPC, die sich unter Einfluss unterschiedlicher ADMA-Konzentrationen (1, 5 und 10 µM ADMA) in die gefäßähnlichen Strukturen einfügen. ADMA unterdrückte dabei diese Fähigkeit konzentrationsabhängig auf bis zu  $27 \pm 11\%$  ( $p < 0,0001$ ;  $n = 5$ ). Unter Zusatz von 10 µM Rosuvastatin zur maximalen ADMA-Konzentration von 10 µM zeigten die Zellen eine normale Einbau-Rate in die Gefäßvorläufer.

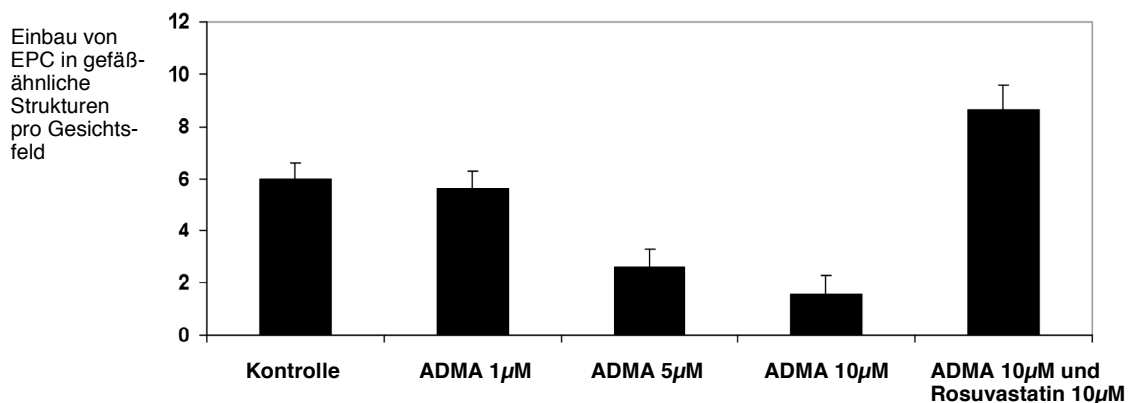


Abb.15: Anzahl der EPCs, die sich in die gefäßähnlichen Strukturen der HUVECs integrieren abhängig von der ADMA-Konzentration ( $p < 0,05$  bis  $p < 0,0001$ ).

## 2.4 Nachweis der eNOS-Aktivität in EPC

Da bekannt ist, dass die Funktion der endothelialen Progenitorzellen zumindest zum Teil von NO abhängt [58, 66], untersuchten wir die Aktivität der endothelialen NO-Synthase unter Einfluss verschiedener ADMA-Konzentrationen. Die Aktivität der eNOS in den EPC wurde gemessen, wobei auch hier ADMA in unterschiedlichen Konzentrationen (1, 5, 10  $\mu\text{mol}$ ) den EPC zugegeben wurde. Ebenso wurden die EPC gleichzeitig mit 10  $\mu\text{mol}$  ADMA und 10  $\mu\text{mol}$  Rosuvastatin behandelt. Auch in diesem Versuch zeigte sich, dass ADMA konzentrationsabhängig die eNOS-Aktivität der Zellen beeinträchtigt. Die eNOS-Aktivität nahm bis auf  $64 \pm 6\%$  ( $p < 0,05$ ;  $n = 5$ ) der ursprünglichen Werte unbehandelter Zellen ab. Rosuvastatin hemmte die Wirkung von ADMA und führte zu einer normalen Aktivität des Enzyms. Abb. 16 zeigt die eNOS-Aktivität in den EPC, die unter Einfluss der verschiedenen ADMA-Konzentrationen und Rosuvastatin-Zugabe gemessen werden konnte.

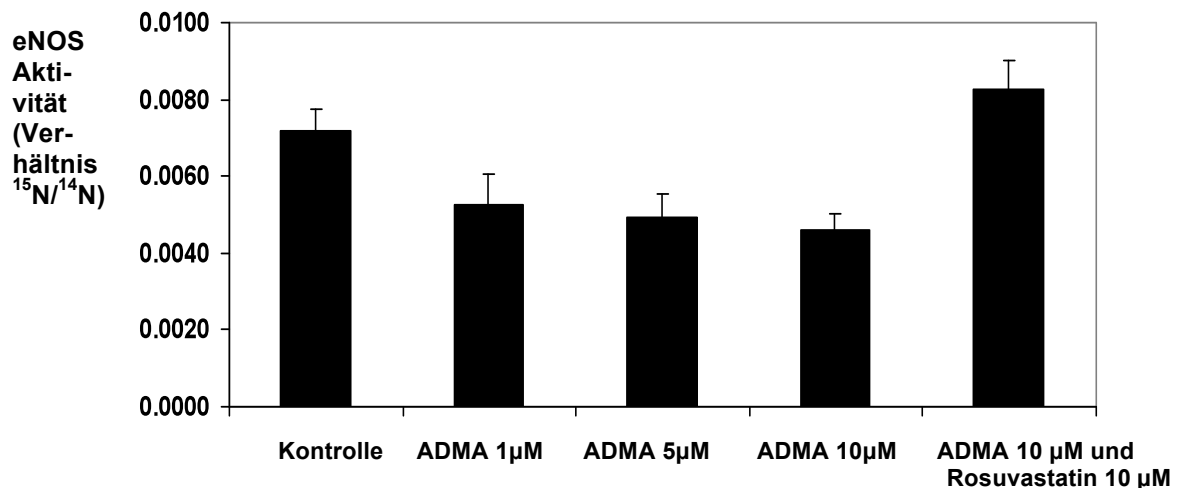


Abb.16: Abnahme der eNOS-Aktivität in den EPC in Abhängigkeit von der ADMA-Konzentration. Gleichzeitige Gabe von Rosuvastatin hebt die ADMA-Wirkung auf ( $p < 0,05$  bis  $p < 0,01$ ).

## V. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit ein Zusammenhang zwischen erhöhten ADMA-Werten im Plasma und erniedrigten Zellzahlen der endothelialen Vorläuferzellen dargestellt werden. Die Schwere der Erkrankung und die erhöhten ADMA-Spiegel waren negativ mit der Anzahl der Progenitorzellen korreliert. Weitere In-vitro-Versuche bestätigten diese Ergebnisse. Die Proliferationsfähigkeit, die Differenzierung und die Funktion der endothelialen Vorläuferzellen nahmen unter ADMA-Einfluss ab, ebenso verhielt es sich mit der Aktivität der endothelialen NO-Synthase in den untersuchten Zellen. Alle diese Parameter normalisierten sich bei Zugabe des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Rosuvastatin.

Dass hohe ADMA-Plasmaspiegel eine prognostische Bedeutung haben für das kardiovaskuläre Risiko und das Auftreten von Herzinfarkten oder Schlaganfällen, zeigte die sogenannte AtheroGene-Studie. Dabei wurden über 1800 Patienten mit koronarer Herzkrankheit eingeschlossen und über durchschnittlich 2,6 Jahre beobachtet [77]. Zum einen konnte die Bedeutung von ADMA als Biomarker für das individuelle kardiovaskuläre Risiko untermauert werden, zum anderen konnte aber auch gezeigt werden, dass die Patienten, die im oberen Drittel der gemessenen ADMA-Werte lagen ( $> 0,7 \mu\text{mol/l}$ ), ein um das 2,5-fache erhöhtes Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis hatten verglichen mit den Patienten mit niedrigen ADMA-Werten. Ein Grund für die Erhöhung des kardiovaskulären Risikos ist wohl die Hemmung der Angiogenese. Dies ließ sich bei ApoE-Knockout-Mäusen mit Hypercholesterinämie zeigen, bei denen weit höhere ADMA-Werte im Serum gefunden wurden als bei Wildtypen [31]. Ein subkutan eingepflanztes Plättchen ließ aufgrund der Kapillareinsprossung auf die Angiogenese schließen, welche bei hypercholesterinämischen Mäusen wesentlich geringer ausfiel. Auch die lokale ADMA-Gabe in diese Plättchen bei gesunden Tieren hatte einen

ähnlichen Effekt, sodass ADMA als ein Stoff gesehen werden kann, der die Angiogenese endogen hemmt.

Auf der anderen Seite haben endotheliale Progenitorzellen einen großen Anteil an Neovaskularisierung und Angiogenese [57, 58, 78], wobei die endotheliale NO-Synthase und NO von herausragender Bedeutung für die Mobilisierung und Differenzierung dieser Zellen sind [70].

Somit sind die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit auf den Zusammenhang zurückzuführen, dass ADMA die endotheliale NO-Synthase und damit die NO-Produktion hemmt, was vermutlich zu einer verminderten Gefäßreparatur und –neubildung durch die EPC führt. Das Kolonie-Wachstum der endothelialen Progenitorzellen wurde durch die Zugabe von ADMA in vitro dosisabhängig gemindert, was zumindest zum Teil durch den hemmenden Einfluss von ADMA auf die eNOS erklärt werden kann. Auch die in den endothelialen Progenitorzellen gemessene Aktivität der eNOS zeigte sich in Abhängigkeit von ADMA vermindert, und zwar umso stärker, je höher die ADMA-Konzentration war.

Bei den Patienten mit koronarer Herzkrankheit korrelierte die Anzahl der betroffenen Gefäße mit im Serum gemessenem ADMA, wobei sich zeigte, dass die Patienten mit einem höheren Erkrankungsgrad höhere ADMA-Werte aufwiesen. Umgekehrt verhielt es sich mit den endothelialen Vorläuferzellen. Sie nahmen mit zunehmender Schwere der Erkrankung ab.

Von den klassischen Risikofaktoren und Begleiterkrankungen bei KHK konnte allein bei Diabetes mellitus Typ 2 ein Zusammenhang gezeigt werden. Mit dem Ausmaß der KHK nahm zudem der Anteil der Patienten mit Diabetes signifikant zu.

Es ist bekannt, dass Diabetiker ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen haben, insbesondere das Herzinfarkt-Risiko ist in diesem Patientenkollektiv erhöht [79]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die endothelialen Vorläuferzellen bei Diabetikern in ihrer Funktion beeinträchtigt sind, was sich in verminderter Proliferation, Adhäsion und der Bildung tubulärer gefäßähnlicher Strukturen zeigt [73, 80].



Obwohl gezeigt werden konnte, dass bei Patienten mit Hypercholesterinämie sowohl die EPC-Anzahl als auch die –Funktion abnehmen [81], war dies in unserem Patientenkollektiv nicht nachzuweisen. In der Gruppe ohne KHK waren die Cholesterin-Werte zwar niedriger als in den Gruppen mit KHK, insgesamt waren die Werte in den KHK-Gruppen aber unabhängig von dem Ausmaß der KHK und von der Anzahl der EPC.

Auch sonstige Laborparameter wie C-reaktives Protein, von dem beschrieben wurde, dass es die eNOS und damit die EPC hemmt [82], zeigten keine Korrelation mit der Schwere der Erkrankung. Ähnlich verhielt es sich auch mit eingenommenen Medikamenten.

Wir konnten keinen Zusammenhang zwischen der Anzahl der zirkulierenden EPC, dem Erkrankungsgrad und dem Alter der Patienten ausmachen, da in unserem Kollektiv keine großen Altersunterschiede auftraten. Vermutlich nehmen die endothelialen Vorläuferzellen im Alter aber ab [83, 84].

Insgesamt erwies sich ADMA nach multivariaten Regressionsanalysen als der einzige Parameter, der prognostischen Wert hatte für die Anzahl der zirkulierenden EPC im Blut der Patienten und die in vitro gebildeten Kolonien, unabhängig von allen oben genannten Risikofaktoren und Einflussgrößen.

Natürlich lässt sich nicht endgültig ausschließen, dass der Zusammenhang zwischen ADMA-Serumwerten und der Anzahl der im peripheren Blut zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen aufgrund einer Ko-Korrelation besteht, da beide Faktoren mit der koronaren Herzkrankheit unabhängig voneinander zusammenhängen können.

Allerdings zeigen die In-vitro-Versuche, dass ein hemmender Einfluss von ADMA auf die EPCs in Kultur zumindest wahrscheinlich ist. Zwischen der Anzahl der zirkulierenden CD34+/CD133+ Progenitorzellen der Patienten und der Anzahl und Größe ihrer endothelialen Kolonien in vitro konnte eine signifikante positive Korrelation gesehen werden. ADMA hemmte sowohl das Wachstum dil-ac-LDL/UEA-1 doppelt positiver Zellen in Kultur und ihren Einbau in gefäßähnliche tubuläre Strukturen, als auch die Proliferation der endothelialen Kolonien. Alle diese Zellen wurden mittels Dichte-Zentrifugation

gewonnen und stammen somit aus dem großen Pool der sogenannten peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMC = peripheral blood mononuclear cells). Es ist nicht auszuschließen, dass ADMA nicht nur EPC und hämatopoetische Stammzellen hemmt, sondern auch andere Vorläuferzellen.

Die ADMA-Konzentrationen, die wir für unsere In-vitro-Versuche verwendeten, waren höher als die ADMA-Konzentrationen, die bei den Patienten im Blut gefunden wurden. Es ist jedoch bekannt, dass ADMA im Plasma in geringeren Konzentrationen auftritt als lokal im Gewebe [37]. Somit entsprechen die von uns angewandten Konzentrationen vermutlich denen, die auch im Körper in bestimmten Geweben erreicht werden können.

In allen unseren In-vitro-Versuchen normalisierten sich die Ergebnisse unter der Zugabe von Rosuvastatin, einem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor (Statin). Selbst bei den höchsten ADMA-Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  ließ sich der hemmende Effekt von ADMA bei gleichzeitiger Gabe von Rosuvastatin nicht mehr nachweisen.

Statine sind für ihre lipidsenkende Wirkung bekannt. In letzter Zeit wurden aber weitere Eigenschaften nachgewiesen, die sie in den Blickpunkt des Interesses rückten. Die sogenannten pleiotropen Statin-Effekte, die unabhängig von der Cholesterinsenkung sind und auch schneller eintreten als diese, sind zur Zeit Gegenstand weiterer Forschung.

Die positiven Wirkungen auf das Herz-Kreislauf-System sind wesentlich vielfältiger als bisher angenommen. So verbessern Statine die endotheliale Dysfunktion unter anderem durch antiinflammatorische und antioxidative Eigenschaften und durch ein erhöhtes Angebot an NO [62]. Vor allem die Wirkung auf die endotheliale NO-Synthese scheint von herausragender Bedeutung zu sein. Bei eNOS-Knockout-Mäusen konnte nach einem Myokardinfarkt trotz Statingabe keine Verbesserung der linksventrikulären Funktion, der Vasorelaxation, der Neovaskularisierung oder der EPC-Mobilisierung beobachtet werden, wohingegen die Wildtypen von dieser medikamentösen Behandlung profitierten [85].

Statine erhöhen die Aktivität der endothelialen NO-Synthase und die Halbwertszeit ihrer mRNA [63, 86]. Die eNOS wird posttranslational durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase/Proteinkinase Akt (PI3K/Akt) phosphoryliert, wodurch die NO-Produktion im Endothel ansteigt. Diese Kinase wird durch Statine aktiviert [63, 86, 87].

Zusätzlich werden auch die endothelialen Vorläuferzellen von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren beeinflusst.

So wird die Zellalterung der EPC unter Statin-Gabe verlangsamt, was sich wohl durch den Einfluss von Statinen auf verschiedene Zell-Zyklus-Proteine bzw. deren Genexpression erklären lässt [88]. Auch über den oben erwähnten PI3K/Akt-Weg haben Statine eine schnelle positive Wirkung auf die Mobilisierung und Differenzierung der Progenitorzellen aus dem Knochenmark [61, 63]. KHK-Patienten, die vier Wochen lang ein Statin einnahmen, zeigten einen Anstieg der zirkulierenden EPC auf das Dreifache [89]. Dabei wirken sie genauso stark wie der natürlich im Körper vorkommende vascular endothelial growth factor (VEGF), welcher bislang als die Substanz galt, die am besten die Freisetzung der EPC aus dem Knochenmark bewirkt [61, 63].

Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Statine die VEGF-Konzentration im Knochenmark erhöhten und die eNOS-Aktivität im Knochenmark bei mit Statinen behandelten Tieren anstieg [90]. Über diesen Weg lässt sich die vermehrte Freisetzung von zirkulierenden EPC erklären.

Die direkte Wirkung von Statinen auf ADMA konnte nicht zweifelsfrei gezeigt werden. In einer multizentrischen randomisierten placebokontrollierten Doppelblindstudie konnte zwar nach sechswöchiger Therapie mit Rosuvastatin bei Patienten mit Hypercholesterinämie ein Rückgang des ADMA-Serumspiegels beobachtet werden [91], bei ähnlichen Versuchen mit Simvastatin und Atorvastatin konnte dieser Effekt allerdings nicht gesehen werden. Die ADMA-Werte blieben gleich [92]. Bei unseren Versuchen jedenfalls zeigte sich eine Verbesserung der Funktion und Differenzierung der EPC auf Normalwerte unter Rosuvastatin-Gabe trotz ADMA.

Auch hier verwendeten wir eine relativ hohe Statin-Dosis bei den In-vitro-Versuchen, welche sich aber in früheren Arbeiten als sinnvoll erwiesen hatte,

da in vitro höhere Dosen benötigt werden als in vivo, um die verschiedenen Statin-Effekte zu zeigen [76, 93, 94].

Im Gegensatz zu anderen Studien konnten wir keinen positiven Einfluss von Statinen auf die Anzahl und Funktion der EPC finden. Obwohl Patienten mit diagnostizierter koronarer Herzkrankheit eher mit Statinen behandelt wurden als Patienten ohne KHK, zeigte sich kein erhöhter Spiegel der im Blut zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen. Das betroffene Kollektiv hatte sogar eher weniger Vorläuferzellen. Dafür mag es verschiedene Gründe geben. Vielleicht müsste man die tägliche Statin-Dosis erhöhen, um die pleiotropen Effekte neben der lipidsenkenden Wirkung zu erreichen. Hinweise hierfür ließen sich auch in einer Studie zeigen, in der Patienten nach einem akuten Koronarsyndrom hochdosiert mit Statinen behandelt wurden. Diese Patienten zeigten ein wesentlich besseres Langzeitergebnis im Hinblick auf kardiovaskuläre Ereignisse und Todesfälle als Patienten ohne diese intensive Therapie [95]. Es ist möglich, dass die Patienten in unserer Studie ohne Statin-Einnahme eine noch niedrigere Anzahl an EPC hätten. Zudem könnte auch der ADMA-Einfluss stärker sein als die stimulatorische Wirkung der Statine.

Eventuell führen auch nicht alle Statine zu der gewünschten Mobilisierung der Progenitorzellen und ihrer Funktionsverbesserung. Es ist nicht auszuschließen, dass diese Effekte nicht gruppenabhängig, sondern abhängig von einzelnen Statinen sind.

In Zukunft müsste dies noch näher untersucht werden. Vielleicht ergeben sich auch Hinweise auf neue Medikamente, die gezielt ADMA senken können und auf diesem Weg zu einem verbesserten Ergebnis bei koronarer Herzkrankheit führen könnten.

In der Kardiologie könnten zukünftig für eine individuelle kardiovaskuläre Risikoeinschätzung sowohl die Anzahl der EPC [59, 60] als auch die Höhe des ADMA-Plasmaspiegels bestimmt werden. Zudem könnte therapeutisch sowohl die EPC-Funktion verbessert als auch der ADMA-Spiegel gesenkt werden. Dies könnte langfristig zu einem verminderten Auftreten einer KHK führen oder den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen und sollte weiter untersucht werden.

## VI. Zusammenfassung

Intaktes Endothel und die ausreichende Funktion der endothelialen NO-Synthase (eNOS) sind Voraussetzungen für gesunde Gefäße. Eine endotheliale Dysfunktion besteht bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren bzw. manifester koronarer Herzerkrankung (KHK). Endotheliale Vorläuferzellen (EPC) sind ein wichtiger Faktor für die Aufrechterhaltung der Homöostase des Endothels.

Im klinischen Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Vorläuferzellen mit zunehmender Schwere der KHK in geringerem Maß im Blut zirkulieren. Die Anzahl der EPC war bei Patienten mit einer koronaren 3-Gefäßerkrankung um 77 % geringer, die Anzahl der kolonie-bildenden Einheiten (CFUs) um 50,3%, jeweils verglichen mit Patienten ohne KHK.

Bei diesen Patienten konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich die Konzentration des endogenen eNOS-Inhibitors asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) im Plasma mit zunehmender Schwere der KHK erhöhte ( $0,47 \pm 0,02$   $\mu\text{mol/l}$  bei fehlender KHK gegenüber  $0,58 \pm 0,02$   $\mu\text{mol/l}$  bei koronarer 3-Gefäßerkrankung).

ADMA ist über eine Hemmung der eNOS an der Entstehung und Aufrechterhaltung einer endothelialen Dysfunktion beteiligt. Über diesen Weg wird vermutlich auch die Funktion der EPC erheblich eingeschränkt.

Dies konnten wir anhand der In-vitro-Versuche mit EPC gesunder Spender zeigen. Dabei reduzierte sich unter ADMA-Einfluß die Anzahl der EPC in Kultur, die Anzahl und Größe der CFUs und ihre Funktion bzw. ihre Fähigkeit, sich in gefäßähnliche Strukturen zu integrieren. Eine gleichzeitige Gabe des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Rosuvastatin wirkte in all diesen In-vitro-Versuchen der hemmenden Wirkung von ADMA entgegen.

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals eine inverse Korrelation zwischen ADMA-Spiegeln und der Anzahl und Funktion der EPC. Der negative Einfluss auf EPCs ist vermutlich ein wichtiger Mechanismus, über den ADMA der Entstehung und dem Fortschreiten kardiovaskulärer Erkrankungen Vorschub leistet.

---

**VII. Literaturverzeichnis**

1. Herrmann, J. and A. Lerman, *The endothelium: dysfunction and beyond*. J Nucl Cardiol, 2001. **8**(2): p. 197-206.
2. Borlak, J., et al., *Verapamil: metabolism in cultures of primary human coronary arterial endothelial cells*. Drug Metab Dispos, 2003. **31**(7): p. 888-91.
3. Feletou, M. and P.M. Vanhoutte, *Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture)* 10.1152/ajpheart.00292.2006. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(3): p. H985-1002.
4. Schiebler, T.H. and W. Schmidt, *Anatomie: Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen*. 8. Auflage 1999, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York.
5. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
6. Klinke, R. and S. Silbernagl, *Lehrbuch der Physiologie*. 3. Auflage 2000, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York.
7. Horn, F., *Biochemie des Menschen*. 1. Auflage 2002, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York.
8. Karow, T. and R. Lang-Roth, *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 12. Auflage 2004.
9. Endemann, D.H. and E.L. Schiffrin, *Endothelial dysfunction*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(8): p. 1983-92.
10. Fishman, A.P., *Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities*. Ann N Y Acad Sci, 1982. **401**: p. 1-8.
11. Thum, T. and J. Borlak, *Mechanistic role of cytochrome P450 monooxygenases in oxidized low-density lipoprotein-induced vascular*

- injury: therapy through LOX-1 receptor antagonism?* Circ Res, 2004. **94**(1): p. e1-13.
12. Cooke, J.P., *Does ADMA cause endothelial dysfunction?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(9): p. 2032-7.
  13. Löffler, G. and P.E. Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie*. 5. Auflage 1997, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York.
  14. Lüllmann, H., K. Mohr und M. Wehling, *Pharmakologie und Toxikologie*. 15. Auflage 2003, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York.
  15. Vanhoutte, P.M., *Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease*. Circ J, 2003. **67**(7): p. 572-5.
  16. Cooke, J.P., *NO and angiogenesis*. Atheroscler Suppl, 2003. **4**(4): p. 53-60.
  17. Milkiewicz, M., et al., *Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(3): p. 333-57.
  18. O'Riordan, E., et al., *Endothelial cell dysfunction: the syndrome in making*. Kidney Int, 2005. **67**(5): p. 1654-8.
  19. Landmesser, U., B. Hornig, and H. Drexler, *Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis?* Circulation, 2004. **109**(21 Suppl 1): p. II27-33.
  20. Landmesser, U. and H. Drexler, *The clinical significance of endothelial dysfunction*. Curr Opin Cardiol, 2005. **20**(6): p. 547-51.
  21. Lentz, S.R., *Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1646-54.
  22. Landmesser, U., et al., *Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension*. J Clin Invest, 2003. **111**(8): p. 1201-9.
  23. Szmítko, P.E., et al., *Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II*. Circulation, 2003. **108**(17): p. 2041-8.
  24. Scalera, F., et al., *Endogenous nitric oxide synthesis inhibitor asymmetric dimethyl L-arginine accelerates endothelial cell senescence*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(10): p. 1816-22.
  25. [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html).

26. Boger, R.H., *Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) als kardiovaskulärer Risikofaktor*. Dtsch Med Wochenschr, 2004. **129**(15): p. 820-4.
27. Vallance, P., et al., *Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure*. Lancet, 1992. **339**(8793): p. 572-5.
28. Cooke, J.P., *Asymmetric dimethylarginine (ADMA): an endogenous inhibitor of angiogenesis*. Eur J Clin Pharmacol, 2006. **62 Suppl 1**: p. 115-21.
29. Tran, C.T., J.M. Leiper, and P. Vallance, *The DDAH/ADMA/NOS pathway*. Atheroscler Suppl, 2003. **4**(4): p. 33-40.
30. Achan, V., et al., *Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(8): p. 1455-9.
31. Jang, J.J., et al., *Angiogenesis is impaired by hypercholesterolemia: role of asymmetric dimethylarginine*. Circulation, 2000. **102**(12): p. 1414-9.
32. Boger, R.H., *Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk marker in cardiovascular medicine and beyond*. Ann Med, 2006. **38**(2): p. 126-36.
33. Boger, R.H., et al., *LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases*. Circ Res, 2000. **87**(2): p. 99-105.
34. Boger, R.H., *The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor*. Cardiovasc Res, 2003. **59**(4): p. 824-33.
35. Ogawa, T., M. Kimoto, and K. Sasaoka, *Occurrence of a new enzyme catalyzing the direct conversion of NG,NG-dimethyl-L-arginine to L-citrulline in rats*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. **148**(2): p. 671-7.
36. Dayoub, H., et al., *Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence*. Circulation, 2003. **108**(24): p. 3042-7.



37. Jacobi, J., et al., *Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase reduces tissue asymmetric dimethylarginine levels and enhances angiogenesis*. *Circulation*, 2005. **111**(11): p. 1431-8.
38. Leiper, J.M., et al., *Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases*. *Biochem J*, 1999. **343 Pt 1**: p. 209-14.
39. Beltowski, J. and A. Kedra, *Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a target for pharmacotherapy*. *Pharmacol Rep*, 2006. **58**(2): p. 159-78.
40. Boger, R.H., et al., *Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease*. *Circulation*, 1997. **95**(8): p. 2068-74.
41. Jiang, D.J., et al., *Involvement of DDAH/ADMA/NOS pathway in nicotine-induced endothelial dysfunction*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **349**(2): p. 683-93.
42. Leiper, J., et al., *S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(21): p. 13527-32.
43. Ito, A., et al., *Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase*. *Circulation*, 1999. **99**(24): p. 3092-5.
44. Boger, R.H., *Association of asymmetric dimethylarginine and endothelial dysfunction*. *Clin Chem Lab Med*, 2003. **41**(11): p. 1467-72.
45. Boger, R.H., et al., *Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(6): p. 1557-64.

46. Stuhlinger, M.C., et al., *Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine*. *Circulation*, 2001. **104**(21): p. 2569-75.
47. Boger, R.H., et al., *Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans*. *Clin Sci (Lond)*, 2001. **100**(2): p. 161-7.
48. Sydow, K. and T. Munzel, *ADMA and oxidative stress*. *Atheroscler Suppl*, 2003. **4**(4): p. 41-51.
49. Zoccali, C., et al., *Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study*. *Lancet*, 2001. **358**(9299): p. 2113-7.
50. Miyazaki, H., et al., *Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis*. *Circulation*, 1999. **99**(9): p. 1141-6.
51. Valkonen, V.P., et al., *Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine*. *Lancet*, 2001. **358**(9299): p. 2127-8.
52. Mittermayer, F., et al., *Asymmetric dimethylarginine predicts major adverse cardiovascular events in patients with advanced peripheral artery disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(11): p. 2536-40.
53. Lu, T.M., et al., *Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse cardiovascular events after percutaneous coronary intervention*. *Eur Heart J*, 2003. **24**(21): p. 1912-9.
54. Schulze, F., et al., *Asymmetric dimethylarginine is an independent risk factor for coronary heart disease: results from the multicenter Coronary Artery Risk Determination investigating the Influence of ADMA Concentration (CARDIAC) study*. *Am Heart J*, 2006. **152**(3): p. 493 e1-8.
55. Asahara, T., et al., *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis*. *Science*, 1997. **275**(5302): p. 964-7.
56. Shi, Q., et al., *Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells*. *Blood*, 1998. **92**(2): p. 362-7.

57. Khakoo, A.Y., Finkel, T., *Endothelial progenitor cells*. *Annu Rev Med*, 2005. **56**: p. 79-101.
58. Urbich, C. and S. Dimmeler, *Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology*. *Circ Res*, 2004. **95**(4): p. 343-53.
59. Schmidt-Lucke, C., et al., *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): p. 2981-7.
60. Werner, N., et al., *Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(10): p. 999-1007.
61. Dimmeler, S., et al., *HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(3): p. 391-7.
62. Davignon, J., *Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins*. *Circulation*, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. III39-43.
63. Walter, D.H., A.M. Zeiher, and S. Dimmeler, *Effects of statins on endothelium and their contribution to neovascularization by mobilization of endothelial progenitor cells*. *Coron Artery Dis*, 2004. **15**(5): p. 235-42.
64. Hill, J.M., et al., *Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(7): p. 593-600.
65. Rumpold, H., et al., *Endothelial progenitor cells: a source for therapeutic vasculogenesis?* *J Cell Mol Med*, 2004. **8**(4): p. 509-18.
66. Aicher, A., A.M. Zeiher, and S. Dimmeler, *Mobilizing endothelial progenitor cells*. *Hypertension*, 2005. **45**(3): p. 321-5.
67. Fadini, G.P., C. Agostini, and A. Avogaro, *Characterization of endothelial progenitor cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **336**(1): p. 1-2.
68. Walenta, K., et al., *In vitro differentiation characteristics of cultured human mononuclear cells-implications for endothelial progenitor cell biology*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **333**(2): p. 476-82.
69. Hristov, M. and C. Weber, *Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance*. *J Cell Mol Med*, 2004. **8**(4): p. 498-508.

70. Aicher, A., et al., *Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells*. Nat Med, 2003. **9**(11): p. 1370-6.
71. Iwakura, A., et al., *Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury*. Circulation, 2003. **108**(25): p. 3115-21.
72. Kanaganayagam, G. and M.S. Marber, *ADMaring Endothelial Progenitor Cells Accident, Association, or Antecedent*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(9): p. 1702-4.
73. Eizawa, T., et al., *Decrease in circulating endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease*. Heart, 2004. **90**(6): p. 685-6.
74. Heeschen, C., et al., *Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease*. Circulation, 2004. **109**(13): p. 1615-22.
75. [www.nhlbi.nih.gov/about/framingham/index.html](http://www.nhlbi.nih.gov/about/framingham/index.html)
76. Laufs, U., et al., *Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice*. Brain Res, 2002. **942**(1-2): p. 23-30.
77. Schnabel, R., et al., *Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: Results from the Atherogene Study*. Circ Res, 2005. **97**: p. e53-e59.
78. Losordo, D.W. and S. Dimmeler, *Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies*. Circulation, 2004. **109**(22): p. 2692-7.
79. Haffner, S.M., et al., *Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction*. N Engl J Med, 1998. **339**(4): p. 229-34.
80. Tepper, O.M., et al., *Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures*. Circulation, 2002. **106**(22): p. 2781-6.

81. Chen, J.Z., et al., *Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia*. Clin Sci (Lond), 2004. **107**(3): p. 273-80.
82. Verma, S., et al., *C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease*. Circulation, 2004. **109**(17): p. 2058-67.
83. Scheubel, R.J., et al., *Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting*. J Am Coll Cardiol, 2003. **42**(12): p. 2073-80.
84. Thum T, H.S., Froese S, Klink I, Stichtenoth DO, Galuppo P, Jakob M, Tsikas D, Anker SD, Poole-Wilson PA, Borlak J, Ertl G, Bauersachs J., *Age-dependent impairment of endothelial progenitor cells is corrected by growth-hormone-mediated increase of insulin-like growth-factor-1*. Circ Res., 2007. **100**(3): p. 434-43.
85. Bauersachs, J., et al., *Improvement of left ventricular remodeling and function by hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibition with cerivastatin in rats with heart failure after myocardial infarction*. Circulation, 2001. **104**: p. 982-5.
86. Liao, J.K. and U. Laufs, *Pleiotropic effects of statins*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. **45**: p. 89-118.
87. Harris, M.B., et al., *Acute activation and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(2): p. H560-6.
88. Assmus, B., et al., *HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes*. Circ Res, 2003. **92**(9): p. 1049-55.
89. Vasa, M., S. Fichtlscherer, and K. Adler, *Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease*. Circulation, 2001. **103**: p. 2073-80.

90. Bauersachs, J. et al., *Bone marrow molecular alterations after myocardial infarction: Impact on endothelial progenitor cells*. Cardiovasc Res, 2006. **70**: p. 50-60
91. Lu, T.M., et al., *Effect of rosuvastatin on plasma levels of asymmetric dimethylarginine in patients with hypercholesterolemia*. Am J Cardiol, 2004. **94**(2): p. 157-61.
92. Valkonen, V.P., et al., *Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and risk of acute coronary events. Does statin treatment influence plasma ADMA levels?* Atheroscler Suppl, 2003. **4**(4): p. 19-22.
93. Laufs, U. and J.K. Liao, *Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase*. J Biol Chem, 1998. **273**(37): p. 24266-71.
94. Grosser, N., et al., *Rosuvastatin upregulates the antioxidant defense protein heme oxygenase-1*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **325**(3): p. 871-6.
95. Cannon, C.P., et al., *Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes*. N Engl J Med, 2004. **350**(15): p. 1495-504.

## Danksagung

Mein Dank geht an all diejenigen Menschen, die mich auf meinem Weg zum Dokortitel tatkräftig und geduldig unterstützt haben, sei es durch aktive Hilfe und Anleitung, durch Ratschläge und fachliche Unterstützung oder durch seelischen Beistand.

Dies gilt im Besonderen für

Herrn Prof. Dr. med. Johann Bauersachs, dessen Angebot, in seinem Arbeitskreis tätig zu werden, diese Doktorarbeit erst ermöglicht hat

Herrn Prof. Dr. Dr. med. Thomas Thum, der mich von der ersten Minute an mit Begeisterung und Geduld betreut hat, der alle Fragen beantwortet und alle Entwürfe gelesen hat, und der auch einmal ausserhalb des Labors anzutreffen war

Frau Sabrina Thum, die an allen Versuchen zum einen durch guten Rat, zum anderen durch tatkräftige Unterstützung beteiligt war

meine Oma Ria, die nicht müde wurde, sich nach dem Fortschreiten des Doktorarbeit-Prozesses zu erkundigen

meine Eltern, die mich während der ganzen Zeit meiner Dissertation und des Studiums (und eigentlich schon immer) in allem unterstützt haben

und Thomas Hampel (für alles).

## **Lebenslauf**

Sylvia Stein  
geboren am 3. Juli 1982 in Biberach an der Riss

### **Schulbildung**

1988-1992	Birkendorf-Grundschule, Biberach
1992-2001	Wieland-Gymnasium, Biberach Abitur

### **Studium**

2001-2008	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
08/2003	Ärztliche Vorprüfung
06/2008	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation

### **Praktisches Jahr**

08/2006-07/2007	Innere Medizin in der Medizinischen Klinik I der Universität Würzburg
	Innere Medizin an der University of Edinburgh, Schottland
	Chirurgie in der Missionsärztlichen Klinik Würzburg
	Gynäkologie und Geburtshilfe in der Neuen Frauenklinik des Kantonsspitals Luzern, Schweiz

### **Berufserfahrung**

09/2008-04/2009	Assistenzärztin für Chirurgie im Isar Medizin Zentrum, München
seit 04/2009	Assistenzärztin für Chirurgie im Klinikum Starnberg