

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
(Department) Tübingen
Abteilung Innere Medizin IV
(Schwerpunkte: Endokrinologie und Diabetologie, Angiologie,
Nephrologie und Klinische Chemie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-U. Häring**

**Bedeutung von MCP-1-Serum-Spiegeln und
CCR2-Polymorphismen für die endotheliale Funktion
in einem Diabetes-Risiko-Kollektiv**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Susanne Elisabeth Gauckler**

**aus
Tübingen**

2009

| | |
|---------------------|--------------------------------|
| Dekan | Professor Dr. I. B. Autenrieth |
| 1. Berichterstatter | Professor Dr. B. Balletshofer |
| 2. Berichterstatter | Professor Dr. U. A. Stock |

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1 Grundlagen | 1 |
| 1.1 Atherosklerose | 1 |
| 1.1.1 Definition Atherosklerose | 1 |
| 1.1.2 Pathogenese der Atherosklerose | 1 |
| 1.2 Chemokine | 3 |
| 1.2.1 Allgemein | 3 |
| 1.2.2 Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) | 4 |
| 1.2.3 Chemokin-Rezeptoren | 6 |
| 1.2.4 CCR2 | 6 |
| 1.2.5 Polymorphismen | 8 |
| 1.3 Endothelfunktion | 9 |
| 1.3.1 Physiologie des Endothels | 9 |
| 1.3.2 NO - Bildung und Wirkmechanismus | 11 |
| 1.3.3 Scherkräfte und NO | 13 |
| 1.3.4 Endotheliale Dysfunktion | 13 |
| 1.4 Fragestellung | 15 |
| 2 Methoden | 16 |
| 2.1 Probanden | 16 |
| 2.2 Messung der Endothelfunktion | 17 |
| 2.2.1 Prinzip | 17 |
| 2.2.2 Das Ultraschallgerät | 18 |
| 2.2.3 Anatomie und Sonomorphologie des Gefäßes | 18 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.2.4 | Untersuchungsablauf | 20 |
| 2.3 | Oraler Glukose-Toleranz-Test (oGTT) | 23 |
| 2.4 | Messung der MCP-1-Serum-Spiegel | 23 |
| 2.5 | Genotypisierung | 23 |
| 2.6 | PBMC- und Monozyten-Isolation | 24 |
| 2.7 | Monozyten-Transmigrationsmodell | 25 |
| 2.8 | Statistische Analysen | 26 |
| 3 | Ergebnisse | 27 |
| 3.1 | Ergebnisse im Gesamtkollektiv | 27 |
| 3.1.1 | Anthropometrische Daten des Gesamtkollektivs | 27 |
| 3.1.2 | Gefäßparameter | 28 |
| 3.1.3 | Laborparameter | 28 |
| 3.2 | Einfluss verschiedener Parameter auf die FMD | 29 |
| 3.3 | MCP-1 und FMD | 31 |
| 3.4 | CCR2-Polymorphismen und FMD | 32 |
| 3.4.1 | Genetische Analysen | 32 |
| 3.4.2 | Einfluss der Genotypen auf die FMD | 33 |
| 3.4.3 | Kardiovaskuläre Risikofaktoren in der CCR2-Promotor-Polymor- phismus T-960A (rs3918359)- Gruppe | 34 |
| 3.5 | Monozyten-Transmigrations-Modell | 36 |
| 4 | Diskussion | 38 |
| 4.1 | Diskussion der Methoden | 38 |
| 4.1.1 | Wahl der Probanden | 38 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.1.2 | Flussmedierte Dilatation FMD | 39 |
| 4.2 | Diskussion der Ergebnisse | 43 |
| 4.2.1 | Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die FMD | 43 |
| 4.2.2 | Zusammenhang von MCP-1 und FMD | 44 |
| 4.2.3 | Assoziation CCR2-Polymorphismus T-960A(rs3918359) und FMD | 47 |
| 4.2.4 | Monozyten-Transmigrationsmodell | 50 |
| 4.2.5 | Abschließende Diskussion und Ausblick | 51 |
| 5 | Zusammenfassung | 54 |
| 6 | Abkürzungen | 57 |
| | Literatur | 59 |
| | Danksagung | 73 |
| | Lebenslauf | 74 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----|---|----|
| 1 | NO - Bildung und Wirkung | 12 |
| 2 | Schemadarstellung und Foto: Schallkopfposition und Stauungsman- schette | 17 |
| 3 | Schema der Anatomie und Sonomorphologie der Gefäßwandschichten | 19 |
| 4 | Längsschnitt durch die Arteria brachialis zur Durchmesserbestimmung | 20 |
| 5 | PBMC- und Monozyten-Isolation | 24 |
| 6 | Schemadarstellung des Monozyten-Transmigrationsmodells | 25 |
| 7 | FMD und MCP-1-Serum-Spiegel. | 31 |
| 8 | Das CCR2-Gen | 32 |
| 9 | FMD bei den Genotypen des CCR2-Promotor-Polymorphismus T-960A | 34 |
| 10 | Anzahl der transmigrierten Monozyten nach 30 Minuten und nach zwei Stunden | 36 |

1 Grundlagen

1.1 Atherosklerose

1.1.1 Definition Atherosklerose

Die Weltgesundheitsorganisation WHO definierte 1958 Atherosklerose als eine „... variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterien-media“ [107].

1.1.2 Pathogenese der Atherosklerose

Über lange Zeit wurde die Entstehung atherosklerotischer Plaques größtenteils auf die Ablagerung von Lipiden in der Arterienwand zurückgeführt. Hohe Plasmacholesterinwerte, vor allem hohe LDL-Cholesterin-Werte, zählen immer noch zu den Hauptrisikofaktoren für die Atherosklerose-Entwicklung. Allerdings spielen zahlreiche weitere Faktoren eine wichtige Rolle.

1986 veröffentlichte Ross die sogenannte „response-to-injury“- Theorie. Darin beschrieb er die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen als Reaktion auf die Verletzung des Endothels. Als mögliche Ursachen für die Endothelschädigung nannte er erhöhte LDL-Cholesterin-Werte sowie die Wirkung freier Radikale, die durch Rauchen, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus entstehen; außerdem können unter anderem genetische Veränderungen, erhöhte Plasma-Homocystein-Werte und infektiöse Mikroorganismen das Endothel schädigen [112].

In späteren Veröffentlichungen wurden zunehmend inflammatorische Prozesse in den Vordergrund gestellt, bei denen aus Monozyten entstandene Makrophagen und spezifische Subtypen von T-Lymphozyten eine Rolle spielen [110]. Studien haben

gezeigt, dass die Plasma-Spiegel des C-Reaktiven Proteins (CRP) als Marker für entzündliche Geschehnisse prognostisch von Bedeutung sind. So bestehen Korrelationen der CRP-Spiegel mit dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen wie Koronare Herzkrankheit (KHK), Myokardinfarkt und Schlaganfall [105]. Außerdem konnten bei Mäusen mit Hyperlipidämie erhöhte CRP-Spiegel gemessen werden, die mit der Größe atherosklerotischer Läsionen assoziiert waren [125].

Die Entwicklung der Atherosklerose beginnt schon bevor erste morphologische Veränderungen im Bereich der Gefäßwand erkennbar sind. Verletzungen des Endothels sowie zahlreiche weitere schädigende Einflüsse auf das Endothel - dazu gehören die Wirkungen klassischer Atherosklerose-Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Nikotinabusus oder Diabetes mellitus - führen zur endothelialen Dysfunktion, die ein prämorphologisches Stadium in der Atherosklerose-Entwicklung darstellt [103, 144]. Damit verbunden ist eine Veränderung der homöostatischen Eigenschaften des Endothels; so sind sowohl die Anheftbarkeit von Monozyten und Thrombozyten an die Gefäßwand als auch die Permeabilität des Endothels erhöht. Außerdem kommt es zu einer vermehrten Bildung vasoaktiver Moleküle, Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie zu einer Zunahme der prokoagulatorischen Endothel-eigenschaften.

Die ersten morphologischen Veränderungen, die auch schon im Kindesalter entstehen können, werden als sogenannte „fatty streaks“ bezeichnet. Sie bestehen aus Schaumzellen (lipidreichen Makrophagen) und T-Lymphozyten, sind rein entzündlicher Natur und stellen reversible Gefäßveränderungen dar. Ausgehend davon kann es bei bestehender entzündlicher Aktivität zu einer gesteigerten Migration und Proliferation glatter Muskelzellen kommen. Dies führt zu einer Verdickung des Intima-Media-Komplexes und einer vermehrten Bildung von Bindegewebe, woraus am Ende eine sogenannte „fortgeschrittene, komplizierte Läsion“ entsteht. Im Inneren besteht diese aus Lipiden und nekrotischem Gewebe, außen wird sie von einer fibrösen Kappe überzogen. Solche Plaques sind nicht mehr reversibel und können Ursache für die

Stenosierung eines Gefäßes sein [111, 107, 14].

1.2 Chemokine

1.2.1 Allgemein

Chemokine sind Zytokine mit chemotaktischer Wirkung. Sie bilden ein weitumfassendes Kommunikationssystem, das von verschiedenen Zelltypen genutzt wird, und spielen eine wichtige Rolle bei der Reaktion des Gewebes auf Infektionen und auf Gewebeschädigung [113].

Gebildet werden Chemokine vor allem von Makrophagen, glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Adipozyten. Die Signalweiterleitung erfolgt über spezifische Rezeptoren, die eine Signaltransduktion mit einer Vielzahl zellulärer Antworten bewirken. Insbesondere kommt es zur Leukozyten-Chemotaxis und -Adhäsion an die Gefäßwand mit anschließender Diapedese und Akkumulation in der Gefäßwand und im Gewebe [113].

Bis jetzt sind mehr als 50 verschiedene Chemokine bekannt, die aufgrund ihrer molekularen Struktur am N-terminalen Ende in 4 Untergruppen unterteilt werden:

1. C-Chemokine mit nur einem Cystein; einziger Vertreter dieser Gruppe ist Lymphotaktin [68].
2. CC-Chemokine, bei denen 2 Cysteine benachbart liegen; sie interagieren mit mononukleären Zellen wie Monozyten, T-Lymphozyten und basophilen Granulozyten. Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist das Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) [24].
3. CXC-Chemokine, die eine andere Aminosäure zwischen 2 Cysteinen haben; sie interagieren mit polymorphonukleären Leukozyten, vor allem mit neutrophilen

Granulozyten. Zu dieser Gruppe gehört unter anderem das Interleukin-8 (IL-8) [49, 50].

4. CX3C-Chemokine mit 3 anderen Aminosäuren zwischen den beiden Cysteinen; eine solche Struktur besitzt nur Fraktalkin, ein Typ1-Transmembranprotein mit löslicher und membranständiger Domäne; als membranständiges Protein ist Fraktalkin ein effizienter Zelladhäsionsrezeptor für Zellen aus dem Blutstrom [60, 43], in der löslichen Form interagiert es mit Monozyten, T-Zellen und natürlichen Killer(NK)-Zellen [133].

1.2.2 Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)

Das Chemokin MCP-1 aus der Gruppe der CC-Chemokine wird von Makrophagen [146], glatten Muskelzellen [72], Endothelzellen [118] und Adipozyten [128] gebildet. Die Produktion dieses Chemokins wird durch proinflammatorische Zytokine wie Interleukine (IL-1, IL-4, IL-6, IL-8) oder TNF [13] stimuliert. Außerdem haben Studien gezeigt, dass aktivierte Thrombozyten und Thrombin die endotheliale Expression von MCP-1 steigern [48, 143]. Antiinflammatorisch wirksame Substanzen wie IL-10 und Dexamethason sowie verschiedene orale Antidiabetika und Statine bewirken dagegen eine Verringerung der MCP-1 Produktion [13, 108].

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Chemokine wie z.B. MCP-1 und IL-8 bei der Entwicklung atherosklerotischer Veränderungen von Bedeutung sind [121]: Sie triggern die Adhäsion von zirkulierenden Monozyten an die Arterienwand [49] und ermöglichen damit deren Eintritt in diese. Dort differenzieren die Monozyten dann zu Makrophagen und entwickeln sich durch Aufnahme von oxidiertem LDL-Cholesterin zu Schaumzellen; auch an diesem Vorgang ist MCP-1 beteiligt [24].

MCP-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Progression und Destabilisierung atherosklerotischer Plaques. Dabei kommt es zu einer Anhäufung von Schichten aus glatten Muskelzellen und lipidbeladenen Makrophagen [116]. Im Tierversuch mit ApoE-

knockout (und damit Atherosklerose-suszeptiblen) Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine Überproduktion von MCP-1 zu vermehrter Schaumzellbildung durch Akkumulation von Makrophagen und Aufnahme von oxidierten Lipiden führt [1]. Auf der anderen Seite schränkt eine Blockade von MCP-1 die Progression vorbestehender atherosklerotischer Läsionen ein und bewirkt eine Veränderung der Plaque-Zusammensetzung: weniger Makrophagen und Lymphozyten sowie weniger Fett, dafür mehr glatte Muskelzellen und Kollagen, was mehr Stabilität bedeutet [63, 85].

Es bestehen Zusammenhänge zwischen MCP-1 und kardiovaskulären Risikofaktoren wie arterieller Hypertonie, Nikotinabusus, Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus [36, 4, 35]. Des Weiteren konnten Korrelationen zwischen MCP-1 und einem erhöhten Risiko, einen Myokardinfarkt oder Schlaganfall zu erleiden, gezeigt werden; außerdem sind MCP-1 und andere Chemokine wichtige Mediatoren bei der Restenose nach PTCA [26, 82].

Ein weiterer großer Bereich, in dem MCP-1 eine bedeutende Rolle spielt, ist die Adipositas. Mit dieser verbunden sind eine Reihe von metabolischen Störungen wie Insulinresistenz, Dyslipidämie und Atherosklerose [141]. Dabei ist unter anderem die Produktion verschiedener Chemo- und Zytokine in Adipozyten und in Fettgewebs-Makrophagen und die damit verbundene Entzündungsreaktion von Bedeutung. Im Serum adipöser Mäuse konnten höhere MCP-1-Werte gemessen werden im Vergleich zu normalgewichtigen Mäusen [66]. Auch beim Menschen besteht eine Korrelation zwischen zirkulierendem MCP-1 und dem Body-Mass-Index (BMI). So bewirkt Gewichtsverlust eine Reduktion der MCP-1-Serum-Spiegel [27]. Ebenso konnten nach dreimonatigem Ausdauertraining (dreimal pro Woche 45-60 Minuten) bei Personen mit metabolischem Syndrom niedrigere MCP-1- und IL-8-Werte gemessen werden im Vergleich zum Ausgangswert [132]. In verschiedenen Studien wurde die Verbindung zu Insulinresistenz bzw. Diabetes mellitus untersucht. Ein Versuch mit Mäusen zeigte vermehrte Makrophageneinwanderung in das Fettgewebe sowie eine erhöhte systemische Insulinresistenz (das heißt eine schlechtere Glukose-Metabolisierung

verbunden mit mehr endogener Glukoseproduktion) bei Überexpression von MCP-1 im Fettgewebe [65]. Bei Diabetes-Patienten werden höhere MCP-1-Serum-Spiegel gemessen als bei gesunden Kontrollpersonen [80, 97].

Auch an der Angiogenese ist MCP-1 beteiligt: es induziert Proliferation und Migration der Endothelzellen bei der Gefäßneubildung. Dies ist auch im Rahmen von Tumorerkrankungen von Bedeutung, da verschiedene Tumoren MCP-1-Produzenten sind und MCP-1 damit direkt zur Tumor-Progression beitragen kann [115].

1.2.3 Chemokin-Rezeptoren

Die Chemokin-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Sie werden vor allem von Leukozyten exprimiert und spielen bei der Regulation der Leukozyten-Migration und -Differenzierung sowie bei immunologischen Prozessen und pathologischen inflammatorischen Geschehnissen eine wichtige Rolle. Sie werden je nach Chemokin-Ligand in verschiedene Gruppen unterteilt und nach der jeweiligen Chemokin-Gruppe benannt: XCR, CCR, CXCR, CX3CR [84]. Die Signaltransduktionskaskade wird über eine Aktivierung von Phosphatidylinositol-3-Kinase vermittelt; dadurch steigt das intrazelluläre Inositoltrisphosphat an und führt zu vermehrter Calcium-Mobilisierung. Erhöhtes intrazelluläres Calcium bewirkt eine Aktivierung der Proteinkinase C und verschiedener Calcium-sensitiver Proteinkinasen. Zellaktivierungsmechanismen kommen in Gang, die zu Zellbewegung, Degranulation und Freisetzung von Superoxid-Anionen führen [83].

1.2.4 CCR2

Das Chemokin MCP-1 bindet mit hoher Affinität an den Chemokinrezeptor CCR2, der auf Monozyten [122], basophilen Granulozyten [88], dendritischen Zellen [123], NK-Zellen [86], aktivierten T-Zellen [100] und Endothelzellen [140] exprimiert wird.

Durch Zytokine wie Interferon- γ , IL-1 und TNF sowie durch Lipopolysaccharide wird die CCR2-Expression auf Monozyten verringert. Ebenso bewirkt auch die Bindung von MCP-1 an seinen Rezeptor über einen Rückkopplungsmechanismus eine Abnahme von CCR2 [130, 122]. Auch während der Reifung und Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen nimmt die Zahl der exprimierten CCR2 ab [96]. Eine vermehrte CCR2-Expression auf Monozyten findet man hingegen unter dem Einfluss von IL-10 [83]. Auf Endothelzellen wird CCR2 durch die Wirkung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und TNF vermehrt exprimiert [140], auf T-Zellen durch IL-2 [83].

Der Einfluss des MCP-1-Rezeptors CCR2 im Rahmen atherosklerotischer Veränderungen wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht. Modelle mit ApoE-knockout Mäusen unter Hochdosis-Cholesterin-Diät haben gezeigt, dass in Abwesenheit von CCR2 weniger Monozyten/ Makrophagen rekrutiert werden [94] und die atherosklerotischen Läsionen kleiner sind als bei der Kontrollgruppe aus nur ApoE-knockout Mäusen mit CCR2 [34, 53]. Ein Einfluss auf die Plasma-Lipid- oder -Lipoprotein-Konzentrationen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden [12].

In Mäuserarterien entwickelte sich in Abwesenheit von CCR2 weniger Intima-Hyperplasie nach Gefäßwandverletzung, womit auch die Bedeutung von CCR2 bei der Proliferation glatter Muskelzellen als Reaktion auf Gewebeverletzung gezeigt werden konnte [39, 109]. Blockierung des CCR2 nach Stenting reduzierte die neointimale Hyperplasie [62].

Han et al. untersuchten im Jahre 1999 Patienten mit Hypercholesterinämie. Bei diesen war im Vergleich zu normocholesterolämischen Personen eine höhere CCR2-Expression nachweisbar, also eine höhere Sensivität für MCP-1 und damit verbunden eine vermehrte Monozyten-Rekrutierung und Makrophagen-Ansammlung in der Gefäßwand [55]. Bei hohen LDL-Cholesterin-Werten ist die CCR2-Expression gesteigert, während hohe HDL-Cholesterin-Werte mit einer geringeren CCR2-Expression verbunden sind [55]. Weitere Studien von Han et al. identifizierten natives LDL-Cholesterin

als positiven Regulator, während oxidiertes LDL-Cholesterin die CCR2-Expression negativ beeinflusst. Es wird vermutet, dass dadurch Monozyten zurückgehalten werden und es zur pathologischen Ansammlung von Monozyten/Makrophagen in der Gefäßwand kommt [54, 57].

Die Bedeutung des CRP als Marker für zukünftige atherosklerotische Gefäßwandveränderungen konnte im Zusammenhang mit CCR2 gezeigt werden: Monozyten wurden mit CRP inkubiert, dadurch kam es zu vermehrter CCR2-Expression mit gesteigerter Chemotaxis vermittelt über MCP-1. Dies führt zu mehr Monozyten-Akkumulation in der Gefäßwand [56].

1.2.5 Polymorphismen

Das menschliche Genom besteht aus 3 bis 3,5 Milliarden Basen. Nur 3% davon kodieren für Gene und deren regulatorische Sequenzen [37]. Durch Mutationen entstehen Unterschiede in der Nukleotidsequenz homologer DNA-Bereiche. Man spricht dann vom Vorliegen zweier verschiedener Allele: Wildtyp und variante Form. Treten die Allel-Varianten mit einer Frequenz von mindestens 1-2% in der Population auf, so liegt ein genetischer Polymorphismus vor [15, 71]. Man geht davon aus, dass im Bereich der Gene und deren regulatorischer Sequenzen an jeder 1000. Base eine Mutation vorliegt [37].

Die häufigste Form (ca. 90% der Polymorphismen) sind so genannte Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (Single Nucleotide Polymorphism, SNP). Dabei wird im Rahmen eines einmaligen Mutationsereignisses im Laufe der menschlichen Evolution eine einzelne Base durch eine andere ersetzt. Da die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer erneuten Mutation derselben Base sehr gering ist, gelten sie als sehr stabil. Die übrigen 10% der Polymorphismen sind Insertions-, Deletions- und Mikrosatelliten-Polymorphismen [37].

Seltene Mutationen im menschlichen Genom können Ursache für monogene Er-

krankungen sein. Dagegen führen genetische Polymorphismen, also in der Population häufiger vorkommende Varianten, zu einem erhöhten genetischen Risiko für verschiedene Erkrankungen [19]. Dabei können mehrere Polymorphismen Einfluss auf ein phänotypisches Krankheitsbild haben. Die Zusammenhänge zwischen dem Vorliegen von Polymorphismen und der Ausprägung eines Phänotyps sind Gegenstand zahlreicher Studien; so liegen zum Beispiel auch Untersuchungen zu Polymorphismen in den Genen, die für MCP-1 und CCR2 kodieren, vor: Sowohl bei MCP-1 als auch bei seinem Rezeptor CCR2 wurde bisher jeweils ein klinisch relevanter Polymorphismus entdeckt und die Auswirkung auf die MCP-1-Wirkungen untersucht.

Das Vorkommen des MCP-1-Polymorphismus 2518-G/G konnte bei Patienten mit KHK vermehrt beobachtet werden [127]. Eine Studie von Tucci et al. mit Patienten mit arterieller Hypertonie zeigte eine Korrelation des genannten MCP-1-Polymorphismus mit der Atherosklerose-Entwicklung [134].

Bezüglich des CCR2-Polymorphismus Val64Ile im Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen liegen kontroverse Ergebnisse vor (siehe Kapitel 4.2.3).

1.3 Endothelfunktion

1.3.1 Physiologie des Endothels

Das einschichtige Endothel befindet sich als innerste Gefäßwandschicht an der Grenze zwischen Gefäßlumen und umliegendem Gewebe. Daher findet eine Interaktion sowohl mit zellulären und hormonellen Bestandteilen aus dem Blut als auch aus dem Gewebe statt. Das Endothel ist ein außerordentlich aktives auto- und parakrines Organ, das über die Produktion zahlreicher Botenstoffe Einfluss nimmt auf die Gefäßwandpermeabilität, die Hämostase, die Regulation des Gefäßtonus, das Proliferationsverhalten der glatten Muskelzellen, die Thrombozyten-Adhäsion und -

Aggregation, die Leukozyten-Interaktion und die Thrombogenität der Gefäßwand [6, 17, 117].

Die vasoaktiven Eigenschaften des Endothels lassen sich in zwei Gruppen einteilen [117]:

1. Metabolisierung von im Blut zirkulierenden vasoaktiven Substanzen und/ oder Aufnahme in das Endothel, dadurch Beeinflussung deren effektiver Konzentration
2. Bildung und Freisetzung verschiedener vasoaktiver Mediatoren.

Zur ersten Gruppe gehört beispielsweise die aktive Aufnahme biogener Amine in das Endothel und nachfolgend deren Desaminierung dort; außerdem werden im Blut zirkulierende ADP- und ATP-Moleküle in den Endothelzellen metabolisiert. Teil dieser Gruppe ist auch das Angiotensin Converting Enzyme (ACE), das als endotheliales Enzym die Bildung von Angiotensin II, einem potenten Vasokonstriktor, und im Gegenzug dazu die Inaktivierung von Bradykinin, das sehr stark vasodilatierend wirkt, katalysiert [117].

Die unter 2. genannte Bildung und Freisetzung vasoaktiver Mediatoren ist der funktionell bedeutendere Mechanismus bei der Regulation des Gefäßtonus [99]. Die Synthese der Mediatoren erfolgt als Reaktion auf verschiedene mechanische oder chemische Stimuli. Die wichtigsten im Endothel synthetisierten Vasodilatoren sind Stickstoffmonoxid (NO) (siehe Kapitel 1.3.2), Prostazyklin (PGI_2) und der Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF), der nach Stimulation mit Bradykinin und Acetylcholin gebildet wird. Stark vasokonstriktorisch wirkt Endothelin, außerdem das vor allem von Thrombozyten gebildete Thromboxan A_2 ; weiterhin findet eine Vasokonstriktion unter dem Einfluss des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems statt [117].

1.3.2 NO - Bildung und Wirkmechanismus

Stickstoffmonoxid (NO) wurde ursprünglich als endothelabhängiger relaxierender Faktor (Endothelium-derived relaxing factor, EDRF) bezeichnet [25]. Zur Entdeckung dieses Faktors trugen im Wesentlichen Furchgott et al. bei. Sie führten in-vitro Versuche an Kaninchen-Aorten durch und untersuchten die Wirkung verschiedener Stoffe wie Katecholamine, Natrium-Nitrit, Histamin und Acetylcholin auf die Regulation des Vasotonus. Im ersten Versuchsaufbau im Jahre 1953 verwendeten sie helikal aufgeschnittene Arterienabschnitte. Als überraschendes Ergebnis stellte sich heraus, dass Acetylcholin, welches als potenter Vasodilatator in vivo bekannt war, hier vasokonstriktorische Wirkung zeigte [45].

Zahlreiche weitere Versuche folgten, die sich unter anderem in der Präparationsmethode der Gefäßabschnitte unterschieden: helikal oder longitudinal aufgeschnittene Streifen oder transversal geschnittene Ringe. Als Ergebnis stellte sich heraus, dass nur Aorta-Präparate, die eine unbeschädigte Endothelzellschicht besaßen, mit Vasodilatation auf Acetylcholin reagierten, während die helikal oder longitudinal geschnittenen Präparate mit Endothelverletzung mit Vasokonstriktion reagierten [46].

Die Vermutung, dass Acetylcholin über einen in Endothelzellen gebildeten Mediator auf die glatten Muskelzellen der Gefäßwand wirkt, konnte durch den sogenannten „Sandwich-Versuch“ bestätigt werden. Dabei bewirkte Acetylcholin zwar bei von Endothel befreiter Aorta direkt keine Relaxierung, jedoch zeigte sich nach Auflegen der endothelfreien Seite auf einen intakten Gefäßabschnitt, also auf eine funktionsfähige Endothelzellschicht, auch im endothelfreien Aorta-Abschnitt eine Relaxierung [46].

1986 gelang es Furchgott schließlich, EDRF als Stickstoffmonoxid zu identifizieren [47].

Die NO-Produktion in den Endothelzellen wird von der endothelialen NO-Synthase

(eNOS) katalysiert, die überwiegend in der Plasmamembran lokalisiert ist. Das Enzym bildet NO aus L-Arginin, dabei entsteht gleichzeitig L-Citrullin. Die Aktivität der Synthese wird vor allem durch die Konzentration des freien intrazellulären Calciums geregelt. Unter Ruhebedingungen kommt es zu einer kontinuierlichen basalen NO-Produktion, die zusätzlich aber über eine Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden kann [16].

Zu diesen Faktoren zählen zahlreiche rezeptorabhängige Agonisten, physikalische Stimuli sowie pharmakologische Substanzen [117]. Beispiele für rezeptorabhängige Agonisten sind Acetylcholin, Bradykinin [73] und Insulin [10]. Bei den physikalischen Stimuli ist vor allem der Einfluss der Scherkräfte von Bedeutung (siehe Kapitel 1.3.3), zusätzlich kommt es bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck ($pO_2 < 50 \text{ mmHg}$) zu vermehrter NO-Bildung [117] (siehe Abbildung 1).

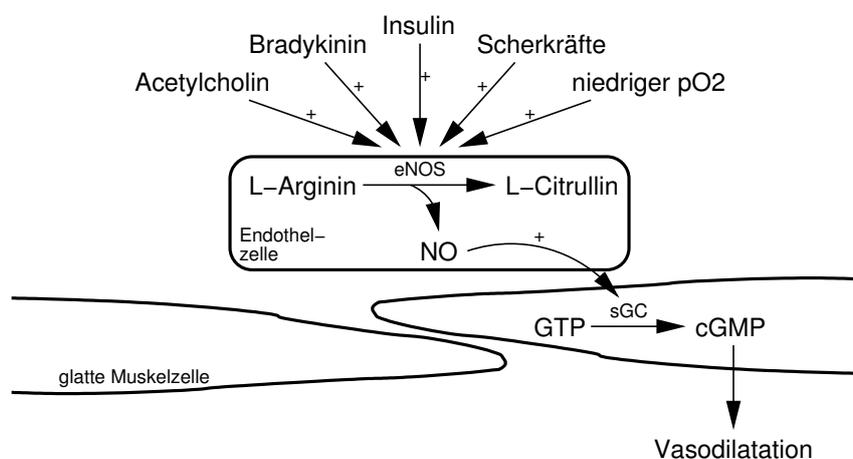


Abbildung 1: NO - Bildung und Wirkung

Das in den Endothelzellen gebildete NO diffundiert von dort zu den glatten Muskelzellen der Arterien-Media, wo es über eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) eine Erhöhung des intrazellulären zyklischen Guanosinmonophosphats (cGMP) bewirkt. cGMP-abhängige Proteinkinasen werden aktiviert und führen letztendlich über eine Senkung des intrazellulären Calciums zur Relaxation der glatten

Muskelzellen und damit zur Vasodilatation [117, 124].

NO spielt jedoch nicht nur eine zentrale Rolle bei der Regulation des Vasotonus sondern hat auch in weiteren Bereichen eine günstige Wirkung auf die Gefäße. Die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen wird reduziert, außerdem verfügt es über antithrombogene Eigenschaften durch Beeinflussung der Thrombozytenfunktion: als hochdiffusibles Gas gelangt NO in das Gefäßlumen und stimuliert dort wiederum eine sGC in Thrombozyten, welche die Umwandlung von GTP zu cGMP katalysiert. Ein cGMP-Anstieg bewirkt hier eine Hemmung der Blutplättchen-Aktivierung, also eine Hemmung von Adhäsion und Aggregation [117]. Des Weiteren reduziert NO die Monozyten- und Makrophagen-Adhäsion an die Zellwand und wirkt günstig auf inflammatorische Prozesse an der Zellwand [17].

1.3.3 Scherkräfte und NO

Durch den Blutfluss entstehen an der Endothelzelloberfläche Wandschubspannungen, die über Elemente der Glykokalix und des Zytoskeletts übertragen werden. Bei der Umwandlung der mechanischen in biochemische Signale ist ein mechanosensitiver calciumdurchlässiger Kaliumkanal beteiligt, der für eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration verantwortlich ist und somit eine Steigerung der eNOS-Aktivität bewirkt [30, 147].

Bei den Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nach vorübergehender Unterbrechung der Blutzufuhr eine reaktive Hyperämie hervorgerufen. Durch die Zunahme der Scherkräfte kommt es dabei zur NO-abhängigen Dilatation.

1.3.4 Endotheliale Dysfunktion

Rubanyi definierte 1993 die endotheliale Dysfunktion „... als teilweisen oder kompletten Verlust des Gleichgewichts zwischen dilatierenden und kontrahierenden Faktoren,

zwischen koagulierenden und antikoagulierenden Mediatoren oder wachstumshemmenden und wachstumsfördernden Substanzen“ [114].

Die endotheliale Dysfunktion stellt einen entscheidenden Schritt in der frühen Atherosklerose-Entwicklung dar [110]. Sie geht der Entstehung klinisch bedeutsamer Plaques voraus und besteht also schon, bevor sonomorphologisch Gefäßwandveränderungen diagnostiziert werden können [77].

Die endotheliale Funktion hängt zunächst vom Alter ab: mit steigendem Alter nimmt die Funktion der innersten Gefäßwandschicht ab; bei Frauen kann ein starker Abfall nach der Menopause beobachtet werden, also sobald die schützende Wirkung des Östrogens nicht mehr besteht [23]. Zahlreiche weitere Faktoren tragen zu verminderter Synthese bzw. zu vermehrtem Abbau von NO bei. Bis heute wurden einige Studien zur Assoziation verschiedener kardiovaskulärer Risikofaktoren mit endothelialer Dysfunktion durchgeführt. Balletshofer et al. zeigten den Zusammenhang von endothelialer Dysfunktion und Insulinresistenz bei jungen Verwandten 1. Grades von Typ 2-Diabetikern [8]. Außerdem ist die endotheliale Funktion bei Patienten mit arterieller Hypertonie [29], Hypercholesterinämie [149] und Diabetes mellitus [87] sowie bei Rauchern [150] und bei Personen mit positiver Familienanamnese in Bezug auf kardiovaskuläre Ereignisse [137] verschlechtert.

Durch die Möglichkeit, funktionelle Gefäßveränderungen mithilfe der Messung der Endothelfunktion früh zu detektieren, kann die endotheliale Dysfunktion als prämorphologisches Stadium zur Früherkennung einer Atherosklerose-Entwicklung herangezogen werden. Zu diesem Zeitpunkt, also vor der Entstehung morphologisch sichtbarer Plaques, sind die Veränderungen noch reversibel und können daher günstig beeinflusst werden [6].

Zur Ermittlung der Endothelfunktion hat sich neben der Bestimmung der acetylcholinabhängigen Dilatation im Bereich der Koronararterien die sonographische Messung der flussmedierten Dilatation (FMD) der Arteria brachialis etabliert (siehe Kapitel

2.2) [3].

1.4 Fragestellung

Bisher wurde in zahlreichen Studien zunächst die Bedeutung des MCP-1 und später auch die seines Rezeptors CCR2 bei klinisch manifester Atherosklerose untersucht. Es liegen Ergebnisse von Tiermodell-Versuchen sowie von in-vitro- und in-vivo-Studien vor, welche die Zusammenhänge von MCP-1 und CCR2 mit kardiovaskulären Risikofaktoren zeigen sowie die wichtige Rolle dieses Chemokins und seines Rezeptors bei der Progression und Destabilisierung bestehender Plaques belegen.

Welche Rolle MCP-1 und sein Rezeptor CCR2 im frühen Stadium der Atherosklerose spielen, in dem noch keine morphologischen Veränderungen an der Gefäßwand erkennbar sind, wurde bisher noch nicht untersucht. Daher haben wir in unserer Studie die endotheliale Funktion gemessen, die funktionelle Veränderungen in der Gefäßwand widerspiegelt, bevor sich manifeste Plaques entwickeln. Zunächst sollte untersucht werden, ob ein direkter Zusammenhang zwischen MCP-1 und endothelialer Dysfunktion besteht.

Des Weiteren ging es um die Frage, ob CCR2 einen Einfluss auf die endotheliale Funktion hat. Dazu suchten wir nach Polymorphismen im CCR2-Gen, die in der Studienpopulation mit einer Häufigkeit von mindestens 10% vertreten waren. Zusammenhänge zwischen dem Vorliegen einer varianten Form von CCR2 und der endothelialen Funktion wurden untersucht.

Als Studienpopulation wurden Probanden ausgewählt, bei denen ein erhöhtes Risiko besteht, an Diabetes zu erkranken (siehe Kapitel 2.1), da bei dieser Personengruppe eine erhöhte Prävalenz von endothelialer Dysfunktion gezeigt werden konnte [8].

2 Methoden

2.1 Probanden

Untersucht wurden insgesamt 248 Personen; nach Ausschluss von 6 Messungen (siehe Kapitel 3.1) wurden die Ergebnisse von 242 Probanden verwertet. Unter den Probanden waren 144 Frauen und 98 Männer mit einem Gesamt-Durchschnittsalter von $45 \pm 0,8$ Jahren. Diese Probanden waren Teilnehmer des Tübinger Lebensstil-Interventions-Programms TULIP, das die Erfassung früher Indikatoren für die Entstehung des Typ 2-Diabetes und deren mögliche Beeinflussung durch Lebensstiländerung untersucht. Bei Prädiabetikern besteht eine erhöhte Prävalenz von endothelialer Dysfunktion [8], weshalb diese Studienpopulation ausgewählt wurde. Ein erhöhtes Risiko, an Typ 2-Diabetes zu erkranken, lag aus einem oder mehreren der folgenden Gründe vor:

1. Übergewicht ($\text{BMI} > 27 \text{ kg/m}^2$)
2. Patient mit Typ 2- Diabetes in der Verwandtschaft ersten Grades
3. eingeschränkte Glukose-Toleranz
4. bei Frauen das Auftreten eines Gestationsdiabetes in der Vorgeschichte.

Personen mit bestehendem Typ 2-Diabetes wurden ausgeschlossen.

Zum Zeitpunkt der Untersuchung (entweder um 6:30 Uhr oder um 7:30 Uhr) waren die Probanden seit mindestens acht Stunden nüchtern und hatten in dieser Zeit weder geraucht noch andere vasoaktiv wirksame Substanzen oder Medikamente zu sich genommen.

2.2 Messung der Endothelfunktion

2.2.1 Prinzip

Zur Messung der Endothelfunktion wurde von Celermajer et al. 1992 eine nicht-invasive Methode beschrieben, bei der die endothelabhängige Vasodilatation bei reaktiver Hyperämie nach Ischämie bestimmt wird [22]. Diese flussabhängige bzw. flussmedierte Dilatation (FMD) wird postischämisch durch eine Zunahme der auf die Gefäßwand wirkenden Scherkräfte ausgelöst. Dabei werden - wie in Kapitel 1.3.3 beschrieben - die mechanischen Kräfte in den Endothelzellen in chemische Signale umgewandelt, welche dann eine Steigerung der Aktivität der eNOS bewirken. Durch die vermehrte Synthese von NO kommt es zur Relaxierung der glatten Muskelzellen in der Gefäßwand und damit zur Vasodilatation. Joannides et al. zeigten 1995, dass bei Blockierung der eNOS mit NG-monomethyl-L-Arginin die FMD ausbleibt. Damit konnte die Endothel-Abhängigkeit der Methode belegt werden [64].

Wie in Abbildung 2 dargestellt wird die FMD an der Arteria brachialis 2 bis 10 cm oberhalb der Ellenbeuge gemessen. Dazu wird ein hochauflösendes Ultraschallgerät mit einem 13MHz-Linearschallkopf verwendet (siehe Kapitel 2.2.2).

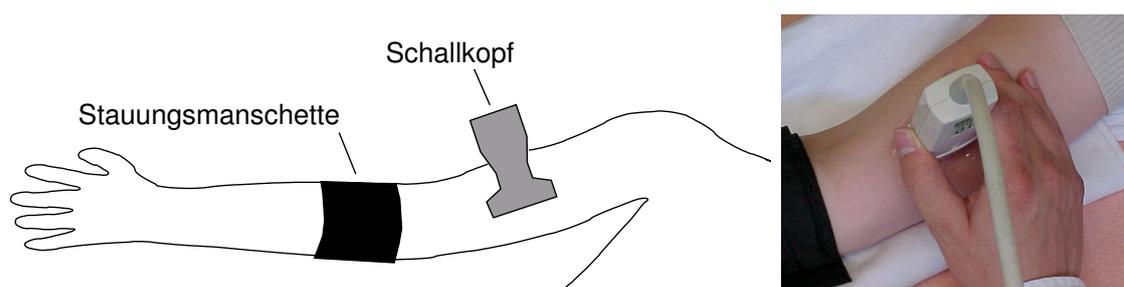


Abbildung 2: Schemadarstellung und Foto: Schallkopfposition und Stauungsmanschette

Da die Reaktivität der Gefäße durch zahlreiche Faktoren beeinflusst wird müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein, damit möglichst dieselben Basisbedingun-

gen vorliegen. Die Probanden müssen zum Zeitpunkt der Untersuchung seit mindestens acht Stunden nüchtern sein; außerdem dürfen vor der Untersuchung weder vasoaktive Medikamente eingenommen werden noch Nikotin, Koffein oder Vitamin-C-Präparate konsumiert werden. Daneben sollte der Untersuchungsraum angemessen temperiert und ruhig sein, um Kälte- und Stressfaktoren auszuschließen [31].

2.2.2 Das Ultraschallgerät

Für die Messung der FMD wurde ein herkömmliches Ultraschallgerät mit einem Linearschallkopf mit Frequenzen zwischen 7 und 13 MHz verwendet. Als Zusatzfunktion war ein EKG-Modul für die EKG-getriggerte Messung integriert, außerdem bestand die Möglichkeit, in einer simultanen PW-Doppler-Messung die Fließgeschwindigkeit zu bestimmen [31].

Wir verwendeten ein Gerät (ESAOTE AU5 Idea Biomedica®) mit einem Linearschallkopf mit einer Frequenz von 13 MHz. Die maximale Auflösung betrug 0,12 mm im Nahbereich bei einer maximalen Eindringtiefe von 4,5 cm.

2.2.3 Anatomie und Sonomorphologie des Gefäßes

Zum besseren Verständnis des Prinzips der Messung der FMD müssen anatomische sowie sonomorphologische Grundlagen berücksichtigt werden. Die Arterienwand besteht aus den folgenden drei Schichten (von innen nach außen):

- Intima: wird von Endothelzellen gebildet
- Media: enthält glatte Muskelzellen
- Adventitia: besteht vor allem aus Bindegewebe.

Im Ultraschallbild sind dann sowohl die sondennahe als auch die sondenferne Gefäßwand jeweils als Doppelkontur erkennbar: zwei parallel verlaufende echoreiche Linien, dazwischen eine echoarme Linie. Wendelhag et al. verglichen Anatomie und

Sonomorphologie der Arterie und unterschieden dabei sieben verschiedenen Echozonen [142]. Sie fanden für alle anatomischen Strukturen ein sonomorphologisches Korrelat außer für die Intimaschicht, deren Dicke unterhalb der Auflösungsgrenze liegt so dass sie nicht direkt abgebildet werden kann. Durch die Reflexion von Ultraschallwellen an der Grenzfläche zur Intima bzw. durch den Impedanzsprung an dieser Stelle wird ein vom Schallkopf weg in die Tiefe des Gewebes gerichteter Reflex erzeugt. So reicht bei der schallkopfnahen Wand der Reflex der Intima in das Gefäßlumen hinein, während er bei der schallkopffernen Wand im oberen Bereich des lumennahen Teils der Media zu erkennen ist.

Folgende Echozonen (EZ) werden unterschieden:

EZ 1: Adventitia der schallkopfnahen Wand

EZ 2: Media der schallkopfnahen Wand

EZ 3: Reflex der Intima der schallkopfnahen Wand

EZ 4: Gefäßlumen

EZ 5: Reflex der Intima der schallkopffernen Wand

EZ 6: Media der schallkopffernen Wand

EZ 7: Adventitia der schallkopffernen Wand

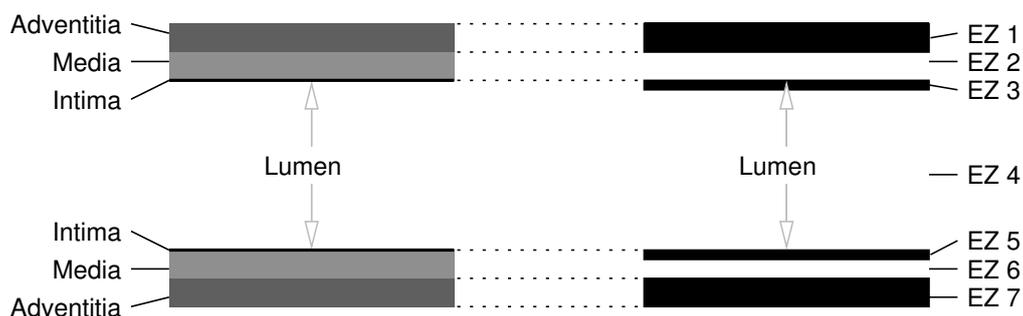


Abbildung 3: Schema der Anatomie und Sonomorphologie der Gefäßwandschichten

Jede Echozone besitzt ein „leading-edge“ und ein „far-edge“ (die obere bzw. un-

tere Begrenzung der Echozone). Dabei ist das leading-edge unabhängig von der Abbildungsqualität und den Geräteeinstellungen immer gleich, während das far-edge je nach Qualität des verwendeten Ultraschallgeräts und seiner Sendefrequenz variieren kann. Aus diesem Grund wird beispielsweise bei der Bestimmung des Gefäßdurchmessers sowie auch bei der Bestimmung der Intima-Media-Dicke die sogenannte „leading-edge-Methode“ angewandt, das heißt die Messpunkte liegen jeweils auf dem leading-edge. Zur Veranschaulichung siehe Abbildungen 3 und 4.

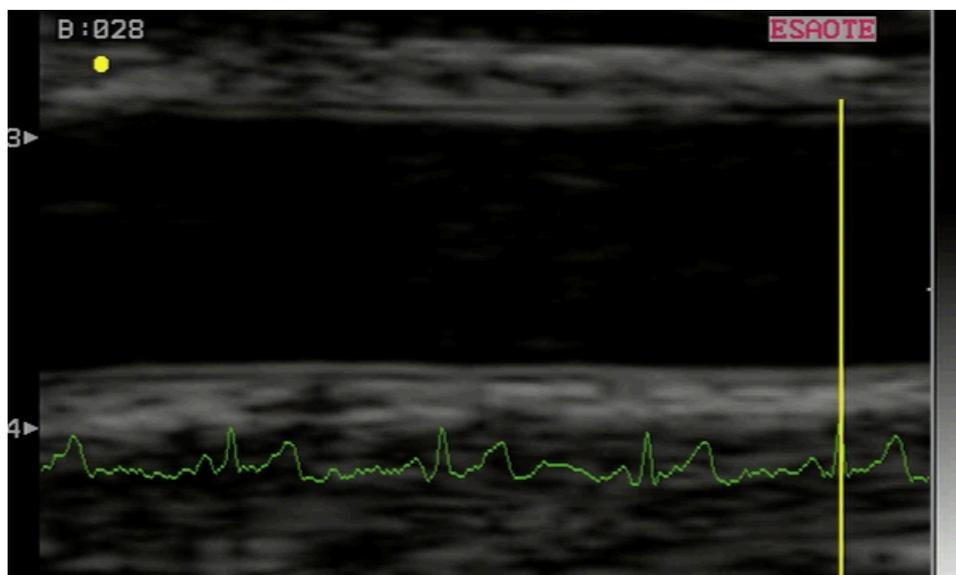


Abbildung 4: Längsschnitt durch die Arteria brachialis zur Durchmesserbestimmung

2.2.4 Untersuchungsablauf

1. Vorbereitung.

Unmittelbar vor der Untersuchung sollten übermäßige körperliche Belastungen vermieden werden, um die notwendige Erholungsphase bis zum Erreichen eines Ruhe-Vagotonus zu verkürzen. Zunächst wurde der nüchterne Proband entspannt und bequem gelagert. Für die Messung am rechten Arm wurde dieser

so gelagert, dass eine konstante Position während der gesamten Untersuchung gewährleistet werden konnte. Dann fand zur Überbrückung der Erholungsphase die Aufklärung für die nachfolgende Untersuchung statt. Hier wurden dem Probanden die genauen Versuchsabläufe dargestellt und die Zusammenhänge erläutert sowie eventuell aufgetretene Fragen beantwortet.

2. EKG.

Um eine R-Zacken-getriggerte Messung durchführen zu können wurden EKG-Elektroden angelegt. Anschließend wurden Blutdruck und Puls gemessen. Für die spätere Stauung wurde eine Blutdruckmanschette am proximalen Unterarm angelegt.

3. Gefäßdarstellung.

Zwischen 2 und 10 cm proximal der Ellenbeuge wurde mit dem Linearschallkopf ein geeigneter Längsschnitt durch die Arteria brachialis aufgesucht. Ziel war es, zur genauen Bestimmung des Durchmessers eine möglichst optimale Darstellung der einzelnen Gefäßwandschichten zu erreichen. Um den Durchmesser immer an derselben Stelle messen zu können wurde die Schallkopfposition exakt markiert.

4. Gefäßruhedurchmesser.

Bei optimaler Bildeinstellung und maximal möglicher Vergrößerung wurde im Cine-loop jeweils enddiastolisch zum Zeitpunkt einer R-Zacke an drei Positionen der Gefäßdurchmesser gemessen. Anschließend wurde das Bild weitere zweimal neu eingestellt und der Durchmesser wieder R-Zacken-getriggert an jeweils drei Stellen bestimmt. Insgesamt konnte so ein Mittelwert für den Ruhedurchmesser aus neun Einzelmesswerten ermittelt werden.

Um die durch die Stauung hervorgerufene Strömungszunahme dokumentieren zu können wurde an der markierten Schallkopfposition die Fließgeschwindigkeit in Ruhe als Ausgangswert bestimmt. Dies geschah mittels PW-Duplexsono-

graphie unter Winkelkorrektur.

5. Suprasystolische Stauung.

Über einen Zeitraum von fünf Minuten wurde die Blutdruckmanschette am Unterarm auf einen Wert, der mindestens 50mmHg über dem systolischen Ruhe-Blutdruck lag, aufgepumpt.

6. Reaktive Hyperämie.

Nach plötzlichem Lösen der Stauung wurde zunächst erneut die Fließgeschwindigkeit in der Arteria brachialis an der markierten Stelle gemessen, um eine Steigerung des Blutflusses zu zeigen. Dies stellt die Grundvoraussetzung für die endothelabhängige Dilatation in diesem Versuchsaufbau dar, da nur dann von vermehrter Scherkraft-Wirkung auf die Endothelzellen und daraus folgender eNOS-Aktivierung ausgegangen werden kann.

In dem Zeitfenster zwischen 45 und 60 Sekunden nach Lösen der Stauung wurde dann erneut ein Längsschnitt durch das Gefäß eingestellt. Aufgrund der kurzen Zeitspanne von 15 Sekunden wurde nur anhand dieser Einstellung der Gefäßdurchmesser bestimmt: zu den Zeitpunkten von drei verschiedenen R-Zacken wurden jeweils drei Messungen vorgenommen, so dass auch wieder neun Messwerte gemittelt werden konnten.

7. Endothel-unabhängige Dilatation.

Die endothel-unabhängige Dilatation wurde nach einer Erholungsphase von 15 Minuten bestimmt. Durch erneute Messung des Ruhedurchmessers wurde überprüft, ob die Ausgangsbedingungen wieder erreicht waren. Dann wurden 0,4mg Glyceryltrinitrat (GTN) in Form von einem Hub Nitrolingual® sublingual verabreicht. Über mögliche Nebenwirkungen (wie z.B. Kopfschmerzen) wurde der Proband vorher informiert. Nach vier Minuten erfolgte erneut die mehrfache Messung und anschließende Mittlung der Einzelwerte für den Durchmesser.

2.3 Oraler Glukose-Toleranz-Test (oGTT)

Der oGTT wurde um 9:00 Uhr morgens nach mindestens zehn Stunden Nahrungskarenz mit einer 75g Glukose enthaltenden Lösung (Dextro® O.G-T.) durchgeführt. Über eine Verweilkanüle wurde nach den vorgeschriebenen Zeitintervallen (zu Beginn, dann nach 30, 60, 90 und 120 Minuten) venöses Blut zur Blutglukose- und Insulinbestimmung abgenommen.

Für die Bewertung galten die von der American Diabetes Association (ADA) und der World Health Organisation (WHO) 1998 festgelegten Kriterien [2]. Ein 2-Stunden-Plasma-Glukose-Wert von mehr als 200mg/dl ist ein Diagnosekriterium für das Vorliegen eines Diabetes mellitus und führte zum Ausschluss aus der Studie. Der Insulinsensitivitätsindex ISI wurde nach den Kriterien von Matsuda und De Fronzo berechnet [79].

2.4 Messung der MCP-1-Serum-Spiegel

Mithilfe eines „enzyme-linked-immuno-sorbent-assay“ (ELISA) von Bender MedSystems® wurden die MCP-1-Serum-Spiegel gemäß dem vorgegebenen Protokoll ermittelt. Bis zur Bestimmung wurden die Serumproben bei -80°C gelagert.

2.5 Genotypisierung

Die DNA-Isolierung erfolgte aus EDTA-Vollblut. Dazu wurde ein kommerzieller DNA Isolation Kit (NucleoSpin; Macherey-Nagel, Düren, Germany) verwendet.

Um den Promotor und die Exons des Gens, das für CCR2 kodiert, zu vervielfältigen, wurden Oligonukleotid-Primer hergestellt. Nach 14 überlappenden Reaktionen erhielt man Amplifikationsprodukte zwischen 385 und 492 Basenpaaren. Die PCR-Produkte wurden dann mithilfe eines ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing

Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) bidirektional sequenziert.

Die Lokalisation von CCR2-Polymorphismen wurde gemäß der Gene Bank Nomenclature ENSG00000121807 bestimmt.

2.6 PBMC- und Monozyten-Isolation

Periphere mononukleäre Zellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) wurden aufgrund ihrer Dichte mithilfe von Ficoll-Hypaque Dichtegradienten-Zentrifugation (Dichte 1,077g/ml) von den anderen Blutzellen getrennt; dazu wurden 150ml heparinisiertes Blut verwendet.

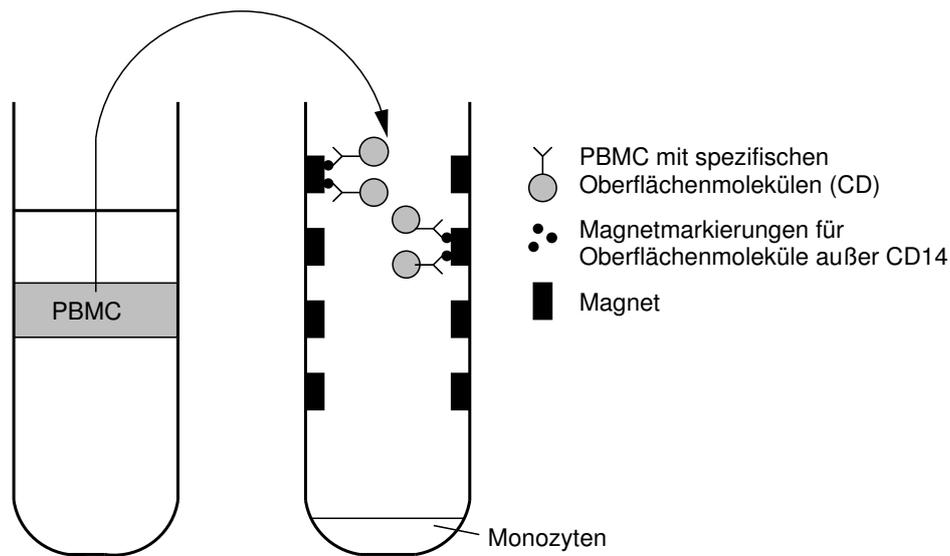


Abbildung 5: PBMC- und Monozyten-Isolation

Die Isolierung der Monozyten aus dem PBMC-Zellgemisch erfolgte mithilfe eines Isolation Magnetic Bead Kit II (Miltenyi Biotec, Auburn; Calif). Um eine Aktivierung der Monozyten zu verhindern wurde eine CD14-negative Isolierung durchgeführt: magnetmarkierte Antikörper gegen die Oberflächenmoleküle der PBMC-Zellen mit Ausnahme der Oberflächenmoleküle der CD14-positiven Monozyten wurden zu

dem PMBC-Zellgemisch hinzugefügt. Im nächsten Schritt wurden alle magnetmarkierten Zellen von den Magneten abgefangen, so dass nur die nicht-markierten CD14-positiven Monozyten frei filtriert wurden (siehe Abb. 5). Dabei konnte im Filtrat ein Reinheitswert $>95\%$ erreicht werden, was durch FACScan[®] (Becton Dickinson) bestimmt wurde.

2.7 Monozyten-Transmigrationsmodell

Das Monozyten-Transmigrationsmodell wurde wie in bisherigen Studien beschrieben durchgeführt [69, 131]. Die verwendete Membran mit einem Durchmesser von 6,5mm und einer Porengröße von $5\mu\text{m}$ (Corning[®]) wurde mit 0,2 prozentiger Gelatine beschichtet. In einem EBM-2-Medium wurde die Membran mit 5×10^4 humanen Endothelzellen der Arteria iliaca bepflanzt, die sich zu einer zusammenhängenden Schicht ausbreiteten. Anschließend wurden 1×10^6 isolierte Monozyten von 5 T/T-Trägern und 5 A/A-Trägern des CCR2-Polymorphismus T-960A (rs3918359) in RPMI-Medium auf die Endothelzellschicht gegeben (siehe Abb. 6).

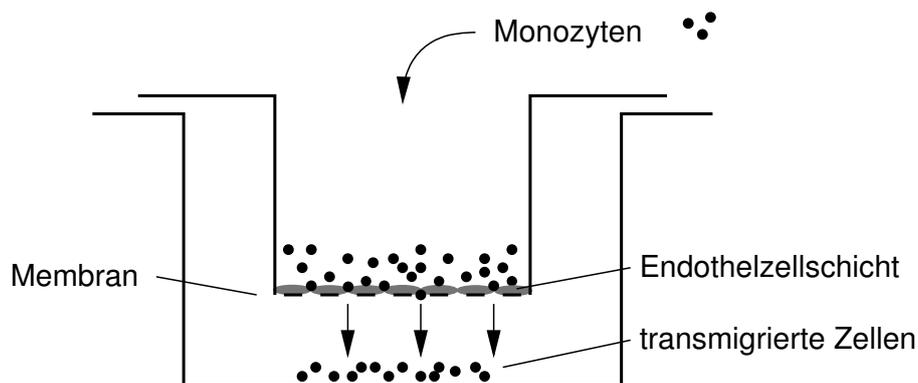


Abbildung 6: Schemadarstellung des Monozyten-Transmigrationsmodells

Nach 30 Minuten sowie nach zwei Stunden wurden die Monozyten, die in dieser Zeit durch die Endothelzellschicht hindurchgewandert waren und sich im Auffangbehälter unter der Membran befanden, mittels FACS gezählt. Nach Wiederholung des

Versuchsaufbaus wurde jeweils aus den beiden Zahlen der transmigrierten Monozyten der Mittelwert gebildet. Dabei war derjenigen Person, die die FACS-Analyse auswertete, der CCR2-Genotyp nicht bekannt.

2.8 Statistische Analysen

Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

Für die statistische Auswertung der Daten wurde die JMP-Software 4.0.4 (SAS Institute®, Cary, NC, USA) verwendet. Haplotypen wurden mithilfe des THESIAS-Programms analysiert.

Der statistische Vergleich von Genotypen wurde anhand einer linearen Regressionsanalyse durchgeführt, beim Vergleich von Genotypen mit anderen kategorischen Variablen wie Geschlecht oder Rauchen wurde der χ^2 -Test angewendet. Für Post-hoc Analysen diente der Tukey-Kramer Test. Univariate Tests wurden eingesetzt für die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren sowie für die Parameter, bei denen bekannt ist, dass sie die FMD beeinflussen (z.B. der basale Arterienradius). Für normalverteilte Variablen wurde der t-Test verwendet, für nicht-normalverteilte Variablen der Wilcoxon/ Kruskal-Wallis Rangsummentest. Bei den multivariaten linearen Regressionsanalysen mit der FMD als abhängiger Variable wurden alle univariaten signifikanten Parameter und Parameter mit einem p-Wert $<0,1$ berücksichtigt.

Als statistisch signifikant galt ein p-Wert $\leq 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse im Gesamtkollektiv

Das Gesamtkollektiv umfasste 248 TULIP-Probanden (siehe Abschnitt 2.1). Die Messergebnisse von vier Teilnehmern, bei denen eine extrem schlechte Abbildungsqualität vorlag, wurden nicht verwertet. Zwei weitere Probanden, die mit Steroiden oder nicht-steroidalen Antiphlogistika behandelt wurden, wurden ausgeschlossen, da dadurch auch die inflammatorischen Geschehnisse an der Gefäßwand beeinflusst werden. Letztendlich wurden also die Daten von 242 Probanden ausgewertet.

3.1.1 Anthropometrische Daten des Gesamtkollektivs

Unter den Probanden befanden sich 144 Frauen und 98 Männer. Das Durchschnittsalter aller Probanden lag bei $45 \pm 0,8$ Jahren. Die Frauen waren im Durchschnitt $44 \pm 1,0$ Jahre alt, die Männer $47 \pm 1,3$. 212 Probanden waren Nicht-Raucher, 26 rauchten, bei vier Probanden liegen hierüber keine Informationen vor.

| Parameter | Mittelwert | \pm Standardfehler des Mittelwerts |
|--------------------------------|------------|--------------------------------------|
| Alter (Jahre) | 45 | 0,8 |
| Alter der Frauen (Jahre) | 44 | 1,0 |
| Alter der Männer (Jahre) | 47 | 1,3 |
| BMI (kg/m^2) | 30,1 | 0,4 |
| Blutdruck syst. (mmHg) | 129 | 1,2 |
| Blutdruck diast. (mmHg) | 81 | 0,8 |

Tabelle 1: Anthropometrische Daten im Gesamtkollektiv ($n = 242$). BMI = Body mass index; syst. = systolisch; diast. = diastolisch

Der Body mass index (BMI) lag im Gesamtkollektiv bei $30,1 \pm 0,4 \text{ kg}/\text{m}^2$. Dies entspricht in der WHO-Klassifikation einer Adipositas Grad I.

Der mittlere systolische Blutdruck betrug $129 \pm 1,2$ mmHg, der mittlere diastolische Wert lag bei $81 \pm 0,8$ mmHg.

3.1.2 Gefäßparameter

Der basale Gefäßdurchmesser der Arteria brachialis betrug im Gesamtkollektiv $3,8 \pm 0,04$ mm. Nach Lösen der fünfminütigen suprasystolischen Stauung hatte die Fließgeschwindigkeit des Blutes in der Arteria brachialis im Mittel um $69,5 \pm 1,7$ cm/s zugenommen. Die FMD lag im Durchschnitt bei $6,31 \pm 0,24\%$.

Nachdem erneut Ruhebedingungen eingetreten waren, wurde GTN sublingual verabreicht. Die durchschnittliche Dilatation der Arteria brachialis vier Minuten nach Applikation betrug $18,82 \pm 0,48\%$.

| Parameter | Mittelwert | \pm Standardfehler des Mittelwerts |
|---------------------|------------|--------------------------------------|
| Diameter basal (mm) | 3,8 | 0,04 |
| Flusszunahme (cm/s) | 69,5 | 1,7 |
| FMD (%) | 6,31 | 0,24 |
| GTN Dil. (%) | 18,82 | 0,48 |

Tabelle 2: Gefäßparameter im Gesamtkollektiv. Diameter basal = Ruhedurchmesser der Arteria brachialis; FMD = flussmedierte Dilatation der Arteria brachialis; GTN Dil. = Gefäßdilatation nach sublingualer Gabe von Glyceroltrinitrat.

3.1.3 Laborparameter

Aus Tabelle 3 sind die erhobenen Laborparameter zu entnehmen.

Der Nüchtern-Blutzuckerwert lag mit $93,69 \pm 0,72$ mg/dl im Normbereich; ebenso als normal einzustufen ist der durchschnittliche Zwei-Stunden-Plasma-Glukose-Wert von $124,33 \pm 1,98$ mg/dl. Der Insulin-Sensitivitäts-Index konnte auf $13,7 \pm 0,53$ berechnet werden.

Die Mittelwerte der bestimmten Blutfettwerte (Triglyceride, Gesamt-Cholesterin, HDL- und LDL-Cholesterin) im Gesamtkollektiv lagen im Normbereich.

Das Homocystein lag bei $9,6 \pm 0,19 \mu\text{g/l}$, das hsCRP bei $2,2 \pm 0,2 \text{ mg/l}$. Beide Werte sind als normal einzustufen. Der MCP-1-Serum-Spiegel wurde im Gesamtkollektiv auf $199,5 \pm 6,5 \text{ pg/ml}$ bestimmt. Da MCP-1 bisher in klinischen Laboruntersuchungen nicht bestimmt wird, liegt hierfür kein Referenzbereich vor. In Studien sind Werte ab 180 pg/ml gemessen worden.

| Parameter | Mittelwert | \pm Standardfehler des Mittelwerts |
|---------------------------------|------------|--------------------------------------|
| Nüchtern-BZ (mg/dl) | 93,69 | 0,72 |
| 2h Glukose (mg/dl) | 124,33 | 1,98 |
| ISI | 13,7 | 0,53 |
| Triglyceride (mmol/l) | 1,4 | 0,07 |
| Gesamtcholesterin (mmol/l) | 5,0 | 0,06 |
| HDL-C (mmol/l) | 1,3 | 0,02 |
| LDL-C (mmol/l) | 3,2 | 0,05 |
| hsCRP (mg/l) | 2,2 | 0,2 |
| Homocystein ($\mu\text{g/l}$) | 9,6 | 0,19 |
| MCP-1 (pg/ml) | 199,5 | 6,5 |

Tabelle 3: Laborparameter im Gesamtkollektiv. BZ = Blutzucker; 2h Glukose = 2-Stunden-Plasma-Glukose-Wert beim oGTT; ISI = Insulin-Sensitivitäts-Index; HDL-C = High density lipoprotein cholesterol; LDL-C = Low density lipoprotein cholesterol; hsCRP = high sensitive C-reactive protein; MCP-1 = Monocyte chemoattractant protein-1.

3.2 Einfluss verschiedener Parameter auf die FMD

Wir untersuchten den Einfluss verschiedener bekannter kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die FMD. Dazu gehörten folgende Parameter: Alter, Geschlecht, Blutdruck, Nüchtern-Blutzucker, 2-Stunden-Plasma-Glukose-Wert, Triglyceride, Gesamtcholesterin, HDL- und LDL-Cholesterin, Homocystein und Nikotinkonsum.

Zunächst wurden univariate Analysen durchgeführt, dabei ergaben sich die in Tabelle 4 aufgeführten p-Werte. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zeigte sich hier für Alter und FMD sowie für Geschlecht und FMD (Frauen: FMD = $6,9 \pm 0,3\%$; Männer: FMD = $5,5 \pm 0,3\%$; $p = 0,0028$). Der systolische Blutdruck verfehlte mit einem p-Wert von 0,0547 knapp das statistische Signifikanzniveau, ebenfalls nicht signifikant waren die übrigen untersuchten Parameter Nüchtern-Blutzucker, 2-Stunden-Plasma-Glukose-Wert, Triglyceride, Gesamtcholesterin, HDL- und LDL-Cholesterin, Homocystein und Nikotin.

| Parameter | p |
|-------------------|--------|
| Alter | 0,0009 |
| Geschlecht | 0,0028 |
| Blutdruck syst. | 0,0547 |
| Nüchtern-BZ | 0,2546 |
| 2h Glukose | 0,8104 |
| Triglyceride | 0,1091 |
| Gesamtcholesterin | 0,4189 |
| HDL-C | 0,7777 |
| LDL-C | 0,7251 |
| Homocystein | 0,7488 |
| Nikotin | 0,4938 |

Tabelle 4: Univariate Korrelation der FMD mit klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren. syst. = systolisch; BZ = Blutzucker; 2h Glukose = 2-Stunden-Plasma-Glukose-Wert beim oGTT; HDL-C = High density lipoprotein cholesterol; LDL-C = Low density lipoprotein cholesterol.

Die univariat signifikanten Parameter Alter und Geschlecht wurden anschließend in einer multivariaten Analyse untersucht, zusätzlich bereinigt um den basalen Durchmesser sowie um den systolischen Blutdruck. Dabei konnte weiterhin ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Alter und FMD ($p = 0,0009$, $r = -0,213$), nicht jedoch zwischen Geschlecht und FMD ($p = 0,054$) gezeigt werden.

Eine negative Korrelation zwischen basalem Arterienradius und der FMD war bereits bekannt [22]. Wir untersuchten diesen Zusammenhang auch und konnten wie erwartet zeigen, dass die FMD mit steigendem basalem Arterienradius abnahm ($p < 0,0001$, $r = -0,414$).

3.3 MCP-1 und FMD

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen MCP-1-Serum-Spiegeln und der FMD konnte nicht festgestellt werden, der p-Wert lag bei 0,90 (siehe Abb. 7).

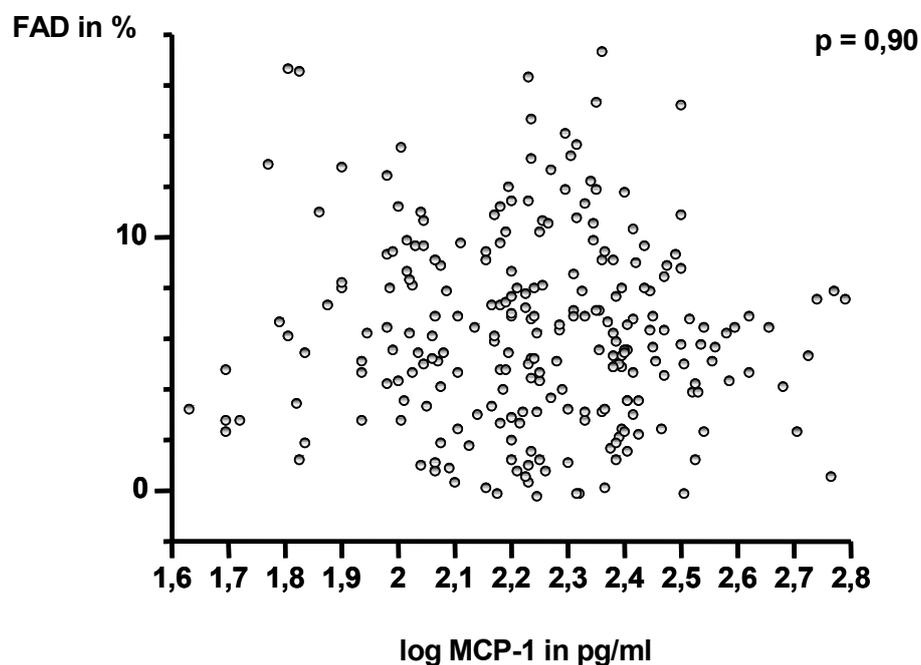


Abbildung 7: FMD und MCP-1-Serum-Spiegel.

3.4 CCR2-Polymorphismen und FMD

3.4.1 Genetische Analysen

Bei der Sequenzierung des CCR2-Gens konnten in unserem Diabetes-Risiko-Kollektiv insgesamt acht Polymorphismen identifiziert werden. Sieben davon liegen im Bereich des Promotors und der Exons, einer in Intron 1 (siehe Abb. 8). Polymorphismen, die mit einer Häufigkeit von mehr als 10% vertreten waren, wurden analysiert. Dies traf für sechs Polymorphismen zu, von denen sich vier im Bereich des Promotors befinden, einer in Intron 1 und einer in Exon 2. Zwei weitere auf Exon 2 lokalisierte Polymorphismen (V64I (rs1799864) und V52V(rs3918367)) waren mit weniger als 10% vertreten und wurden daher nicht weiter analysiert.

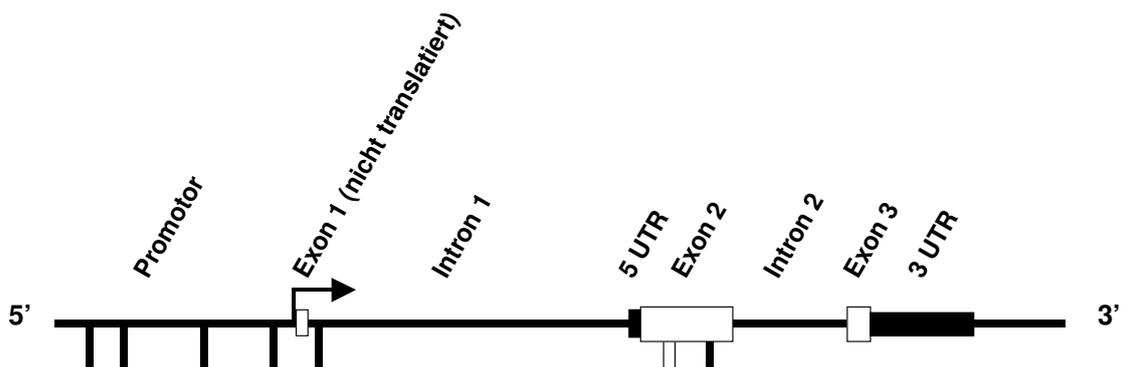


Abbildung 8: Das CCR2-Gen

Die analysierten Genotypen auf dem CCR2-Gen waren wie folgt verteilt:

| | | | | |
|------------------------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| Promotor A-1221C (rs3918358) | A/A: 40,5% | A/G: 50,0% | C/C: 9,5%; | p(HWE)=0,12 |
| Promotor T-960A (rs3918359) | T/T: 52,5 % | T/A: 37,2% | A/A: 10,3%; | p(HWE)=0,12 |
| Promotor A-327G (rs3749461) | A/A: 84,7% | A/G: 15,3% | G/G: 0,0%; | p(HWE)=0,22 |
| Promotor A-59G (rs3092964) | A/A: 52,1% | A/G: 42,6% | G/G: 5,4%; | p(HWE)=0,18 |
| Intron 1 G/A (rs3918361) | G/G: 52,1% | G/A: 42,6% | A/A: 5,4%; | p(HWE)=0,18 |
| Exon 2 N260N (rs1799865) | T/T: 40,5% | T/C: 50,0% | C/C: 9,5%; | p(HWE)=0,12 |

Die Allel-Häufigkeiten dieser Polymorphismen lagen innerhalb des Hardy-Wein-

berg-Gleichgewichts und im „linkage disequilibrium“ (alle $D' \geq 0,86$, alle $p < 0,0001$).

3.4.2 Einfluss der Genotypen auf die FMD

Der Zusammenhang zwischen den Genotypen aller Polymorphismen, die in einer Häufigkeit $>10\%$ vertreten waren, und der FMD wurde untersucht.

Eine signifikant erhöhte FMD konnte bei Probanden gemessen werden, die das A-Allel des CCR2-Promotor-Polymorphismus T-960A trugen ($p = 0,007$). Die Signifikanz war auch nach Anpassung von Alter, Geschlecht, basalem Gefäßdurchmesser und systolischem Blutdruck noch gegeben ($p = 0,01$; power 0,85; Signifikanz-Niveau erreicht ab 137 Probanden). Siehe dazu Tabelle 5 und Abbildung 9.

| Parameter | Wildtyp (T/T) n=127 | Heterozygot (T/A) n=90 | Homozygot (A/A) n=25 | p univariat |
|---------------------|---------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------|
| Diameter basal (mm) | 3,8 ± 0,06 | 3,8 ± 0,07 | 3,7 ± 0,14 | 0,65 |
| Flusszunahme (cm/s) | 70,3 ± 2,3 | 68,2 ± 2,9 | 69,7 ± 5,4 | 0,94 |
| FMD (%) | 5,6 ± 0,3 | 6,7 ± 0,4 | 8,3 ± 0,8 | 0,007 |
| GTN Dil. (%) | 18,3 ± 0,6 | 19,2 ± 0,8 | 20,0 ± 2,2 | 0,49 |

Tabelle 5: Gefäßparameter in den Genotyp-Gruppen des CCR2-Promotor-Polymorphismus T-960A (rs3918359). Diameter basal = Ruhedurchmesser der Arteria brachialis; FMD = flussmedierte Dilatation der Arteria brachialis; GTN Dil. = Dilatation nach sublingualer Gabe von Glyceroltrinitrat

Zwischen den verschiedenen Genotyp-Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied in der Vasodilatation nach sublingualer Gabe von GTN, daher konnte ausgeschlossen werden, dass subendotheliale Schäden vorlagen, die auch die FMD beeinflussen würden.

G-Allel-Träger des CCR2-Promotor-Polymorphismus A-59G (rs3092964) sowie A-Allel-Träger des CCR2-Intron 1-Polymorphismus G/A (rs3918361) zeigten ebenfalls eine leichte Erhöhung der FMD:

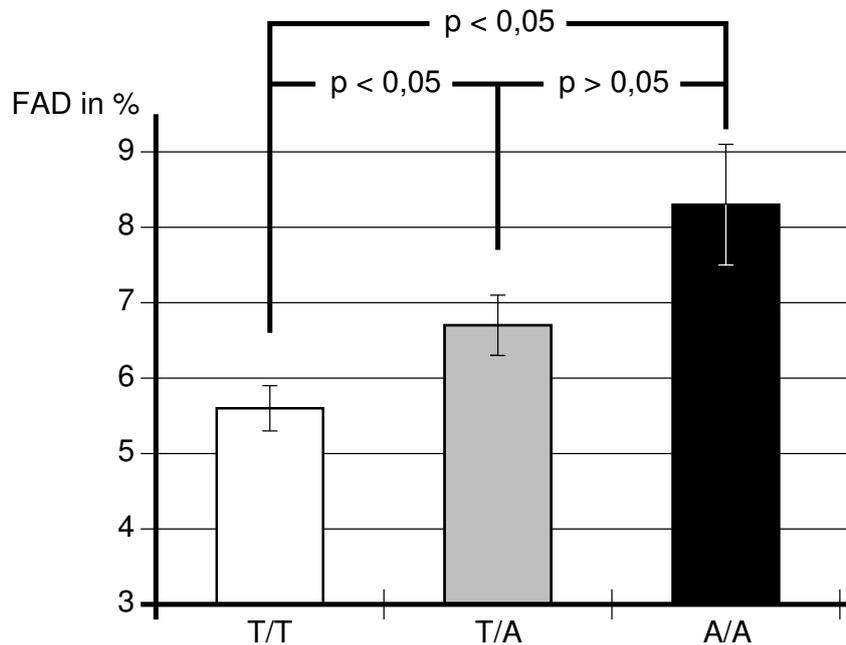


Abbildung 9: FMD bei den Genotypen des CCR2-Promotor-Polymorphismus T-960A

A/A: $5,7 \pm 0,3\%$; A/G: $7,0 \pm 0,39\%$; G/G: $7,5 \pm 1,14\%$ bei A-59G;

G/G: $5,7 \pm 0,3\%$; G/A: $7,0 \pm 0,39\%$; A/A: $7,5 \pm 1,14\%$ bei G/A (jeweils $p=0,04$).

Diese beiden Polymorphismen sind jedoch zu 100% miteinander verknüpft, d.h. sie kommen immer gemeinsam vor. Auch mit dem CCR2-Promotor-Polymorphismus T-960A treten die beiden genannten Polymorphismen gehäuft auf ($D' = 0,98$; $p < 0,0001$).

Da der Einfluss auf die FMD bei dem CCR2-Promotor-Polymorphismus T-960A (rs3918359) am stärksten war, haben wir uns im Folgenden auf diesen konzentriert.

3.4.3 Kardiovaskuläre Risikofaktoren in der CCR2-Promotor-Polymorphismus T-960A (rs3918359)- Gruppe

Die untersuchten Parameter sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Beim Vergleich der Genotypen innerhalb der untersuchten Polymorphismus-Grup-

| Parameter | Wildtyp (T/T) n=127 | Heterozygot (T/A) n=90 | Homozygot (A/A) n=25 | p univariat |
|------------------------------------|---------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------|
| Alter (Jahre) | 46 ± 1,0 | 45 ± 1,3 | 37 ± 2,7 | 0,009 |
| Geschlecht (w/m) | 71/56 | 60/30 | 13/12 | 0,2 |
| Blutdruck syst. (mmHg) | 129 ± 1,7 | 130 ± 2,1 | 128 ± 1,9 | 0,77 |
| Blutdruck diast. (mmHg) | 81 ± 1,1 | 81 ± 1,2 | 80 ± 1,9 | 0,93 |
| Triglyceride (mmol/l) | 1,5 ± 0,1 | 1,4 ± 0,09 | 1,3 ± 0,12 | 0,67 |
| Gesamtcholesterin (mmol/l) | 5,1 ± 0,09 | 4,9 ± 0,1 | 4,8 ± 0,15 | 0,11 |
| HDL-C (mmol/l) | 1,3 ± 0,03 | 1,4 ± 0,04 | 1,4 ± 0,06 | 0,52 |
| LDL-C (mmol/l) | 3,3 ± 0,07 | 3,1 ± 0,08 | 2,9 ± 0,13 | 0,04 |
| Nüchternglukose (mg/dl) | 93,7 ± 1,08 | 93,7 ± 1,08 | 90,1 ± 1,98 | 0,14 |
| 2h Glukose (mg/dl) | 124,33 ± 2,52 | 124,33 ± 3,6 | 122,52 ± 7,2 | 0,85 |
| ISI | 13,9 ± 0,7 | 12,6 ± 0,8 | 16,9 ± 2,1 | 0,1 |
| hsCRP (mg/l) | 2,1 ± 0,3 | 2,3 ± 0,3 | 2,2 ± 0,6 | 0,62 |
| MCP-1 (pg/ml) | 193 ± 8,8 | 208 ± 10,4 | 202 ± 25,2 | 0,32 |
| Homocystein (µg/l) | 9,2 ± 0,2 | 9,9 ± 0,3 | 9,9 ± 1,1 | 0,34 |
| Raucher (ja/nein) (4 unbekannt) | 11/114 (2 fehlen) | 11/78 (1 fehlt) | 4/20 (1 fehlt) | 0,45 |

Tabelle 6: Anthropometrische Daten und Laborparameter in den Genotyp-Gruppen des CCR2-Promotor-Polymorphismus T-960A (rs3918359) (T-960A). w = weiblich, m = männlich;

HDL-C = High density lipoprotein cholesterol; LDL-C = Low density lipoprotein cholesterol; 2h Glukose = 2-Stunden-Plasma-Glukose-Wert beim oGTT; ISI = Insulin-Sensitivitäts-Index; hsCRP = high sensitive C-reactive protein; MCP-1 = Monocyte chemoattractant protein-1

pe konnten weder bei systolischen und diastolischen Blutdruckwerten noch bei Lipidstoffwechsel- und Glukoseparametern signifikante Unterschiede gefunden werden. Die Homocystein-Werte in den Genotyp-Gruppen waren vergleichbar; ein Zusammenhang zu den Rauchgewohnheiten der Probanden ergab sich nicht. Die Serumspiegel der Entzündungsmarker wie hsCRP und auch MCP-1 waren unabhängig vom Genotyp.

Zwar waren die für den CCR2-Promotor-Polymorphismus T-960A homozygoten (A/A) Probanden in der univariaten Analyse signifikant jünger als heterozygote (T/A) oder Wildtyp-(T/T)-Probanden ($p = 0,009$); in multivariaten linearen Regressionsanalysen hatte das Alter jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die FMD ($p = 0,1$).

Eine Tendenz zu niedrigeren LDL-Cholesterin-Werten bei A-Allel-Trägern konnte beobachtet werden, allerdings konnte hier nach Anpassung von Alter und Geschlecht kein statistisch signifikanter Unterschied gezeigt werden ($p = 0,11$).

3.5 Monozyten-Transmigrations-Modell

Aus heparinisiertem venösem Blut wurden zunächst durch Dichtegradienten-Zentrifugation periphere mononukleäre Zellen (PBMC) von den übrigen Blutzellen getrennt, daraus wurden dann die Monozyten isoliert (siehe Kapitel 2.6).

Transmigrierte Zellen

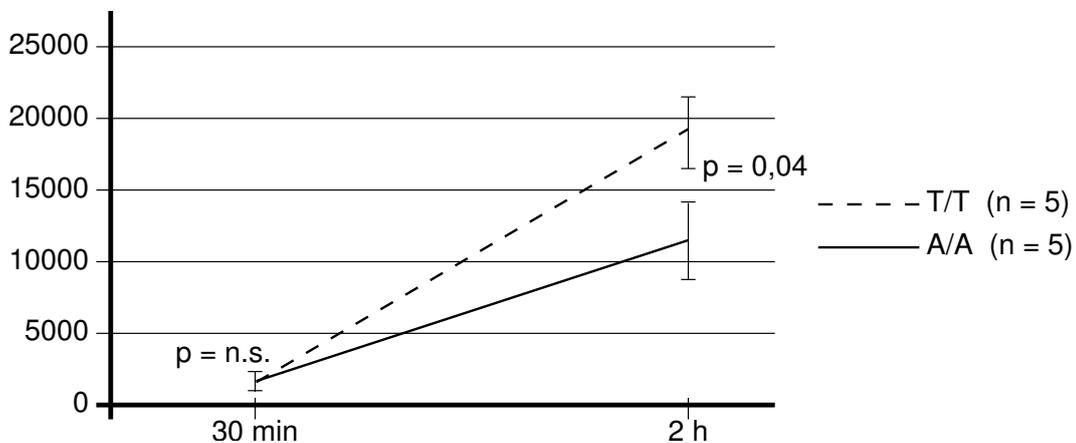


Abbildung 10: Anzahl der transmigrierten Monozyten nach 30 Minuten und nach zwei Stunden

Nachdem die Monozyten auf die Endothelzellschicht gebracht worden waren, wurden sie zunächst nach 30 Minuten und dann nochmal nach zwei Stunden eingesammelt und durch FACS-Analyse gezählt. Bei der ersten Zählung nach 30 Minuten er-

gab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotyp-Gruppen des CCR2-Promotor-Polymorphismus T-960A. Nach zwei Stunden jedoch zeigten die Monozyten der homozygoten A-Allel-Träger eine signifikant reduzierte Transmigrationsrate im Vergleich zu Wildtyp-Monozyten, das heißt weniger homozygote A/A-Monozyten waren durch die Endothelzellschicht gewandert (A/A: 11495 ± 2794 versus T/T: 19226 ± 2550 Zellen; $p = 0,04$; Wilcoxon Rangsummentest). Siehe hierzu Abbildung 10.

4 Diskussion

Die Entwicklung der Atherosklerose ist schon seit vielen Jahren Gegenstand zahlreicher Studien. Dabei lag der Schwerpunkt bisher vor allem auf Stadien, in denen bereits morphologisch sichtbare atherosklerotische Veränderungen der Gefäßwand vorhanden waren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Frühstadium in der Entwicklung der Atherosklerose untersucht, die endotheliale Dysfunktion: der Einfluss des Chemokins MCP-1 und seines Rezeptors CCR2 auf die flussmedierte Dilatation als Maß für die endotheliale Dysfunktion wurde untersucht.

Im Folgenden werden zunächst die Wahl der Probanden sowie die Messmethode für die Endothelfunktion diskutiert. Anschließend werden die Ergebnisse im Einzelnen besprochen und am Ende deren klinische Bedeutung erörtert.

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Wahl der Probanden

An den Untersuchungen nahmen 242 Probanden des Tübinger Lebensstil-Interventions-Programms TULIP teil (siehe Kapitel 2.1). Kriterien für die Teilnahme waren verschiedene Faktoren, die das Risiko erhöhen, an Typ-2-Diabetes zu erkranken. Diese Personengruppe wurde deshalb so gewählt, weil im Rahmen zahlreicher Studien bei Prädiabetikern eine Verschlechterung der Endothelfunktion gemessen werden konnte.

Balletshofer et al. veröffentlichten im Jahr 2000 Ergebnisse einer Studie mit Verwandten ersten Grades von Typ-2-Diabetikern. Bei diesen Probanden konnte eine signifikante Korrelation zwischen endothelialer Dysfunktion und Insulinresistenz gezeigt werden, unabhängig von klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Alter, Nikotinabusus, BMI und Serumlipidkonzentration [8]. In einer weiteren Studie von Balletshofer et al. wurde zusätzlich noch die Intima-Media-Dicke (IMD) als früher Marker

für atherosklerotische Gefäßwandveränderungen gemessen. Wieder lag eine Korrelation von Insulinresistenz und endothelabhängiger Vasodilatation vor, allerdings konnte kein Unterschied in der IMD insulinresistenter gegenüber insulinsensitiver Nicht-Diabetiker festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass die mit Insulinresistenz einhergehenden Veränderungen das prämorphologische Stadium der Entwicklung der Atherosklerose betreffen [9]. In den vergangenen Jahren wurden ähnliche Fragestellungen untersucht; dabei konnte mehrfach gezeigt werden, dass bei insulinresistenten Probanden die FMD erniedrigt war im Vergleich zu Kontrollgruppen mit insulinsensitiven Teilnehmern, d.h. bei Insulinresistenz lag eine eingeschränkte Endothelfunktion vor [5, 81, 106, 126].

Es kommt also schon im Frühstadium der Entwicklung eines Typ-2-Diabetes, solange die Kriterien für dessen Diagnose (Nüchtern-Blutzuckerwert ≥ 126 mg/dl oder Gelegenheits-Blutzuckerwert ≥ 200 mg/dl und Symptome eines Diabetes oder Zwei-Stunden-Plasma-Glukose-Wert im oGTT ≥ 200 mg/dl [61]) noch nicht erfüllt sind, zu einer Schädigung der Endothelfunktion. Die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion ist also in der ausgewählten Studienpopulation, in der verschiedene Diabetes-Risikofaktoren vorhanden sind, erhöht.

4.1.2 Flussmedierte Dilatation FMD

Für die Messung der Endothelfunktion stehen verschiedene etablierte Methoden zur Verfügung, deren gemeinsames Prinzip darin besteht, durch pharmakologische oder physikalische Stimuli eine endothelabhängige Dilatation des Gefäßes zu provozieren [20]. Durch den jeweiligen Stimulus wird die Aktivität der endothelialen NO-Synthase gesteigert, was eine vermehrte Produktion und Freisetzung von NO zur Folge hat und schließlich zu einer Vasodilatation im betroffenen Gefäßabschnitt führt. Die Messung der Zunahme des Arterienradius kann dann entweder angiographisch (z.B. am Koronarsystem), plethysmographisch (als indirekter Hinweis) oder sonographisch

erfolgen. Ist die Vasodilatation weniger stark ausgeprägt bzw. bleibt sie aus, so liegt eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit zugrunde. Dies ist Hinweis auf eine funktionelle Einschränkung des Endothels, also auf eine endotheliale Dysfunktion. Um auszuschließen, dass die weitere NO-Signalübermittlung vom Endothel zur glatten Muskelzelle oder die dort stattfindende Wirkung des NO gestört ist, wird im Anschluss an jede Messung die endothelunabhängige, NO-vermittelte Vasodilatation überprüft. Dazu wird die prozentuale Dilatation nach Gabe von GTN gemessen.

In der vorliegenden Studie wurde zur Bestimmung der Endothelfunktion die flussassoziierte Dilatation gemessen (siehe Kapitel 2.2). Diese Methode hat gegenüber der pharmakologisch induzierten Vasodilatation durch Substanzen wie Acetylcholin oder Bradykinin den Vorteil, dass sie nicht-invasiv ist. Weder eine arterielle Punktion noch die intraarterielle Verabreichung von Pharmaka sind erforderlich, wodurch die damit verbundenen Komplikationen und Nebenwirkungen wegfallen. Aus diesem Grund kann die FMD wiederholt auch an asymptomatischen, jungen Probanden ohne relevante Risiken durchgeführt werden.

Die Messung kann an oberflächlichen Arterien wie der A. brachialis und der A. femoralis durchgeführt werden. Vergleichende Untersuchungen von Celermajer et al. ergaben, dass zwischen den Messergebnissen am Arm und am Bein keine signifikanten Unterschiede bestehen [22]. Da die A. brachialis einfacher zugänglich ist wird die FMD meist dort gemessen.

Zahlreiche Faktoren beeinflussen die Messung der FMD. So unterliegt die Reaktivität der Gefäße zirkadianen Schwankungen [40, 42], weshalb die Messung jeweils morgens zwischen 6:30 Uhr und 8:30 Uhr durchgeführt wurde. Hyperglykämie [67] oder Hyperlipidämie [33, 138] kurz vor oder noch während der Messung vermindern die FMD, daher wurde bei den Probanden auf eine Nüchternphase von mindestens acht Stunden vor Untersuchungsbeginn sowie auf eine ausgewogene Ernährung im

Vorfeld geachtet [31]. Rauchen hat neben dem langfristig schädigenden Effekt auf die Endothelfunktion auch kurzfristig Einfluss auf die FMD [75]; aus diesem Grund mussten die Probanden mindestens zehn Stunden vor der Messung auf Nikotin verzichten. Ebenso durften sie in diesem Zeitraum weder Tee oder Kaffee noch Vitamin-C-Präparate konsumieren [38, 91, 93]. Die Einnahme vasoaktiver Medikamente muss idealerweise über einen Zeitraum von vier Halbwertszeiten pausiert werden, sofern dies aus klinischer Sicht möglich ist [31]. Nicht zuletzt spielen auch Stressfaktoren eine Rolle [51], daher fand die Untersuchung in einem ruhigen, konstant temperierten Raum statt.

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen waren die genannten Basisbedingungen erfüllt.

Auch Unterschiede in der methodischen Vorgehensweise haben Einfluss auf die Messergebnisse. So liegen Studien vor, in denen verschiedene Positionen der Stauungsmanschette verglichen werden: bei einer Stauung am proximalen Unterarm ist die Zunahme der Fließgeschwindigkeit geringer ausgeprägt und es werden niedrigere FMD-Werte gemessen im Vergleich zu einer Stauung am Oberarm [11, 32, 76, 139]. Hier spielt einerseits die Größe des ischämischen Gebiets eine Rolle (je größer das Gebiet ist, desto mehr nimmt die Fließgeschwindigkeit nach Lösen der Stauung zu; die dadurch bedingte Verstärkung der Scherkraftwirkung führt zu höheren FMD-Werten). Andererseits sind auch die Metabolite, die sich im Ischämie-Gebiet ansammeln, von Bedeutung: bei der Oberarm-Stauung liegt die Messposition distal der Stauungsmanschette, d.h. im Ischämie-Gebiet. Daher haben neben der Scherkraftwirkung auch die angesammelten Metabolite sowie der niedrige pO_2 einen Einfluss auf die Gefäßdilatation, es kommt also neben einer endothelabhängigen zusätzlich auch zu einer endothelunabhängigen Dilatation. Da bei der vorliegenden Untersuchung nur die endothelabhängige Vasodilatation untersucht werden sollte, wurde die Stauungsmanschette am Unterarm angelegt. So hatten die akkumulierten Metabolite im Ischämie-Gebiet keinen Einfluss auf die gemessene Dilatation. Außerdem ist

bei dieser Messmethode die Einstellung des Gefäßdurchmessers einfacher möglich (bei Stauung am Oberarm liegt der Messbereich innerhalb des Ischämiebereichs, es kommt also während der Stauung zu einer Gewebeverschiebung und zum Gefäßkollaps [6, 31]).

Die Ischämiezeit im Rahmen der Messungen betrug fünf Minuten. Nach dieser Zeit wird eine maximale Durchmesserzunahme erreicht, die auch durch längere Stauung nicht gesteigert werden kann [31, 74]. 45 bis 60 Sekunden nach Lösen der Stauung wurde die Messung des Gefäßdurchmessers vorgenommen, da in diesem Zeitraum bei Unterarmstauung die maximale Zunahme gemessen werden kann [135]. Weiterhin wurde die Messung EKG-getriggert enddiastolisch durchgeführt, um den Einfluss pulsatiler Schwankungen zu vermeiden.

Auch die Untersuchererfahrung spielt eine Rolle. Balletshofer et al. veröffentlichten im Jahr 2001 Ergebnisse einer Studie zur intra- und interindividuellen Variabilität bei der FMD-Messung. Sie konnten zeigen, dass nach 30 Trainingsmessungen unter Anleitung eines erfahrenen Ausbilders die intraindividuelle Variabilität, gemessen am Median der absoluten Abweichung der Messwerte für den Gefäßdurchmesser, bei 0,9% lag und auch weitere Trainingsmessungen keine signifikante Verbesserung erbrachten [7].

Zusammenfassend wurden die Bedingungen und Voraussetzungen, die in den Leitlinien der „International Brachial Artery Reactivity Task Force“ empfohlen werden, erfüllt [31].

Unabhängig von den erläuterten biologischen und methodischen Einflussgrößen auf die FMD sind zahlreiche weitere Faktoren bekannt, die die Endothelfunktion bzw. die endothelabhängige Dilatation beeinflussen. Zunächst hängt die FMD vom basalen Gefäßdurchmesser ab (je größer der Durchmesser desto kleiner der FMD-Wert) [22]. Dieser Zusammenhang muss bei der Bewertung der Messergebnisse immer berück-

sichtigt werden. Weiterhin haben verschiedene kardiovaskuläre Risikofaktoren Einfluss auf die Endothelfunktion; dazu liegen viele Studien vor, in denen die FMD als Messmethode für die endotheliale Dysfunktion dient: mit zunehmendem Alter [23], bei Rauchern [22, 150], bei Personen mit Insulinresistenz [8] oder Diabetes mellitus [28, 87], bei Hypertonikern [29, 90], bei Probanden mit Hypercholesterinämie [149], bei Personen mit positiver kardiovaskulärer Familienanamnese [137] und bei Patienten mit bekannter KHK [22] konnte eine Verminderung der endothelabhängigen Dilatation beobachtet werden.

Um zu zeigen, dass die Messung der Endothelfunktion an peripheren Gefäßen auch mit der koronaren Endothelfunktion korreliert und dass mit Hilfe der FMD Aussagen über die Endothelfunktion im Allgemeinen gemacht werden können, wurde 1995 von Anderson et al. folgende Studie durchgeführt: Bei 50 Patienten wurde mittels Herzkatheteruntersuchung die vasomotorische Antwort der koronaren Gefäße auf Acetylcholin gemessen, außerdem wurde die periphere Endothelfunktion über die FMD bestimmt. Bei den Personen, die eine koronare endotheliale Dysfunktion aufwiesen (in Form von einer Vasokonstriktion auf Acetylcholin), war auch die FMD signifikant erniedrigt. Ebenso war die FMD bei Patienten mit manifester KHK im Vergleich zu Personen mit angiographischem Ausschluss einer KHK signifikant verschlechtert [3].

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die FMD

Bei den vorliegenden Untersuchungsdaten konnte in der univariaten Analyse ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Alter bzw. Geschlecht und FMD beobachtet werden. In der multivariaten Analyse verfehlte jedoch das Geschlecht knapp ($p = 0,054$) das statistische Signifikanzniveau. Beide Faktoren konnten schon in zahlrei-

chen Studien als Einflussgrößen auf die FMD identifiziert werden [21, 23, 41, 59]. Zum Beispiel untersuchten Celermajer et al. 1994 ein Gesamtkollektiv von 238 Probanden (103 Männer und 135 Frauen), bei dem sie mit steigendem Alter eine Verschlechterung der FMD messen konnten. Außerdem zeigten sie beim Vergleich der FMD von Frauen mit der von Männern eine erst später einsetzende Abnahme der FMD bei Frauen beginnend mit dem Eintritt in die Menopause. Dies ist auf den protektiven Effekt des Östrogens zurückzuführen [23].

Bei der Betrachtung der Blutdruckwerte konnte in der univariaten Analyse kein statistisch signifikanter Einfluss auf die FMD gezeigt werden (das statistische Signifikanzniveau wurde mit einem p-Wert von 0,055 knapp verfehlt). Auch CRP und Homocystein sowie Hyperlipidämie und Nikotinkonsum als weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren beeinflussten die FMD nicht signifikant.

4.2.2 Zusammenhang von MCP-1 und FMD

Es liegen mehrere Studien vor, die die Zusammenhänge zwischen MCP-1 und kardiovaskulären Risikofaktoren sowie zwischen MCP-1 und dem Vorkommen von kardiovaskulären Erkrankungen untersuchen und belegen, allerdings ist die Datenlage nicht einheitlich. So korreliert der MCP-1-Serum-Spiegel bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS) sowohl mit „traditionellen“ Risikofaktoren für Atherosklerose - dazu gehören Alter, das Vorkommen von KHK in der Familienanamnese, Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, erhöhtes hs-CRP - als auch mit einem erhöhten Risiko, einen Myokardinfarkt oder Schlaganfall zu erleiden oder zu sterben [36, 4, 35]. Auch bei der Restenosierung nach PTCA sind MCP-1 und andere Chemokine wichtige Mediatoren [26, 82]. Hier ist vor allem die neointimale Hyperplasie von Bedeutung, bei der glatte Muskelzellen aktiviert werden, einwandern und proliferieren [104]. Furukawa et al. führten eine Studie mit Mäusen durch, bei der durch Inhibierung von MCP-1 kurz vor und kurz nach arterieller Gefäßwandverletzung

die neointimale Hyperplasie signifikant reduziert werden konnte [44]. In Schweinearterien konnte eine gesteigerte MCP-1-Produktion nach arterieller Gefäßwandverletzung beobachtet werden [146].

In einer Studie von Tucci et al. wurden die Zusammenhänge zwischen arterieller Hypertonie, Entzündung im Bereich des Endothels und MCP-1 untersucht. Bei den Patienten mit arterieller Hypertonie konnten signifikant höhere MCP-1-Serum-Spiegel gemessen werden im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Außerdem bestand eine positive Korrelation zwischen MCP-1 und CRP, IL-6 und Gesamtcholesterin, wohingegen das Geschlecht sowie Dauer und Therapie der Hypertonie keinen Einfluss auf die MCP-1-Serum-Spiegel hatten [134].

Aufgrund der dargestellten Forschungsergebnisse, die eine Korrelation von MCP-1 mit kardiovaskulären Risikofaktoren sowie kardiovaskulären Erkrankungen nahelegen, stellte sich folgende Frage: Besteht bereits ein Zusammenhang zwischen MCP-1-Serum-Spiegeln und der endothelialen Dysfunktion als frühe Stufe in der Entwicklung der Atherosklerose?

Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von MCP-1 auf die FMD als Messgröße für die Endothelfunktion untersucht. Ein signifikanter Zusammenhang konnte nicht gezeigt werden. Hier könnte eine Rolle spielen, dass das Chemokin nicht nur im Bereich des Gefäßendothels sondern auch in anderen Geweben, beispielsweise im Fettgewebe, gebildet wird, und so die Menge an zirkulierendem MCP-1 nicht mit der am Endothel lokal wirksamen Menge übereinstimmt.

Neben der Bildung von MCP-1 in Makrophagen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen wird das Chemokin auch in Adipozyten gebildet. In einer Studie mit Mäusen konnten Takahashi et al. im Jahr 2003 bei adipösen Tieren im Vergleich zu normalgewichtigen Mäusen 7,2-mal mehr MCP-1-mRNA in Adipozyten messen. Mit der vermehrten Menge an mRNA waren auch erhöhte Werte von zirkulierendem MCP-1 messbar [128]. Christiansen et al. zeigten 2005 ähnliche Ergebnisse mit isolierten

menschlichen Zellen. Aus Adipozyten konnten sie im Vergleich zu Stromavaskularzellen deutlich mehr MCP-1-mRNA isolieren, außerdem bestand auch hier eine signifikante Korrelation zwischen der aus subkutanem Fettgewebe isolierten MCP-1-mRNA und zirkulierendem MCP-1 [27]. So ist es denkbar, dass vergleichbar hohe Werte an zirkulierendem MCP-1, das unter anderem im Fettgewebe produziert worden ist, messbar sind, obwohl die lokale, von den Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Makrophagen gebildete Menge im Bereich der Gefäßwand geringer ist.

Zur Untersuchung der lokalen MCP-1-Produktion im Rahmen der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen führten Takaye et al. 1993 eine Studie durch, in der sie in Autopsien gewonnene Arterienabschnitte in unterschiedlichen Atherosklerose-Stadien verwendeten: diffuse intimale Hyperplasie, „fatty-streak“-Läsionen und atherosklerotische Plaques. Mit einem spezifischen Antikörper für MCP-1 konnten sie die Lokalisation des Chemokins bestimmen. Im Stadium der diffusen intimalen Hyperplasie konnten vor allem die Endothelzellen als MCP-1-Produzenten identifiziert werden. Außerdem waren die subendothelialen Makrophagen reich an MCP-1. Mit fortschreitendem Stadium der Atherosklerose nahm die MCP-1-Produktion in den Endothelzellen ab, gleichzeitig war immer mehr MCP-1 in den Makrophagen zu finden [129].

Die MCP-1-Produktion in Endothelzellen und in glatten Muskelzellen kann durch unterschiedliche Faktoren erhöht werden. So zeigen Studienergebnisse von Schratzberger et al. aus dem Jahr 1998 eine Zunahme der MCP-1-Freisetzung aus Endothelzellen nach Stimulation durch neutrophile Granulozyten. Als Folge davon konnte eine Steigerung der Makrophagenchemotaxis beobachtet werden, die wiederum durch MCP-1-Antikörper verhindert werden konnte [118]. Zwei Jahre zuvor führten Kranzhofer et al. Untersuchungen bezüglich des Zusammenhangs zwischen Thrombose und Atherosklerose durch. Sie konnten eine Steigerung der MCP-1-Produktion in glatten Muskelzellen unter dem Einfluss von aktiviertem Thrombin zeigen [72]. Eine Studie mit Schweinearterien direkt nach De-Endothelialisierung wurde ebenfalls im Jahr 1996 von Wysocki et al. durchgeführt. Dabei konnte eine frühe Makropha-

geneinwanderung im verletzten Gefäßabschnitt und eine MCP-1-Produktion in den Makrophagen gezeigt werden [146].

Diese und zahlreiche weitere Studien zeigen die lokale MCP-1-Produktion durch verschiedene Zellen im Bereich der Gefäßwand. Denkbar wäre ein Zusammenhang zwischen lokaler MCP-1-Konzentration und endothelialer (Dys-)Funktion. Da aber bei der Messung des MCP-1-Serum-Spiegels die Gesamtmenge an zirkulierendem MCP-1 bestimmt wird, also auch einschließlich des im Fettgewebe gebildeten MCP-1, wäre es möglich, dass der Effekt des lokal an der Gefäßwand gebildeten und dort wirksamen MCP-1 in diesem Gesamtwert nicht wiedergegeben wird.

Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt versucht, näher an den Ort heranzugehen, an dem die Übertragung der MCP-1-Wirkung auf die Zielzellen stattfindet: am MCP-1-Rezeptor CCR2.

4.2.3 Assoziation CCR2-Polymorphismus T-960A(rs3918359) und FMD

Im Rahmen der transendothelialen Migration kommt es zunächst zur Adhäsion von zirkulierenden Monozyten an die Gefäßwand, anschließend rollen sie an dieser entlang. Die lockere Anheftung wird durch Selektine vermittelt und ist reversibel. Vermehrte MCP-1-Expression auf Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Makrophagen in entzündeten Gefäßabschnitten bewirkt über Bindung an CCR2, der unter anderem auf zirkulierenden Monozyten exprimiert wird (siehe Kapitel 1.2.4), eine Festigung der Adhäsion und damit einen weiteren Schritt bei der Einwanderung in die Gefäßwand [49]. An der stärkeren Anheftung sind Integrine beteiligt, die durch die Bindung von MCP-1 an CCR2 aktiviert werden [78]. Anschließend wandern die Monozyten durch das Endothel, differenzieren zu Makrophagen und wandeln sich durch die Aufnahme von oxidiertem LDL-Cholesterin in Schaumzellen um. Diese wiederum produzieren weitere Chemokine und Wachstumsfaktoren [24, 49].

Um näher an dieses lokal am Endothel stattfindende Geschehen heranzukommen sollte in der vorliegenden Arbeit CCR2 genauer untersucht werden. Es liegen Studien mit ApoE-knockout Mäusen vor, die die wichtige Rolle des CCR2 im Rahmen der Atherosklerose-Entwicklung belegen: Dawson et al. veröffentlichten 1999 Ergebnisse von Versuchen mit CCR2^{-/-}- und ApoE^{-/-}-Mäusen. Im Vergleich zu nur ApoE^{-/-}-Mäusen war bei diesen die mittlere Größe der Läsionen im Bereich der Aorta dreimal kleiner [34]. Ähnliche Ergebnisse konnten auch Guo et al. 2003 zeigen [53].

Ebenso konnte beobachtet werden, dass nach einer Verletzung der Gefäßwand in Abwesenheit von CCR2 weniger Intima-Hyperplasie folgte als bei Vorhandensein des Rezeptors, das heißt CCR2 ist auch bei der Stimulation der glatten Muskelzellen zur Proliferation beteiligt [39, 109].

In der Erforschung der Funktion von Rezeptoren und deren Liganden ist das Vorkommen von Polymorphismen zunehmend von Bedeutung. Liegt eine solche Variation im Genom vor so besteht dann einerseits die Möglichkeit, dass die Funktion durch den Polymorphismus nicht beeinträchtigt ist, andererseits ist es aber auch möglich, dass beim Vorliegen einer Genotyp-Variante die Funktion entweder stärker oder schwächer ausgeprägt ist. Einige Studien, die das Ziel hatten, die Funktion von MCP-1 und CCR2 näher zu untersuchen, beschäftigten sich mit Polymorphismen im MCP-1- bzw. CCR2-Gen. So gibt es Arbeiten über einen MCP-1-Polymorphismus (2518-G/G), der bei Patienten mit KHK vermehrt beobachtet wurde und bei Patienten mit arterieller Hypertonie mit dem Vorkommen von Atherosklerose korreliert war [127, 134]. Hier wird vermutlich - wenn der Polymorphismus vorliegt - die normale MCP-1-Wirkung im Rahmen der Atheroskleroseentstehung verstärkt. So könnte es durch eine stärkere oder vermehrte MCP-1-Bindung an CCR2 zu mehr Monozyten-Rekrutierung, -Adhäsion und -Transmigration kommen, wodurch die Entstehung atherosklerotischer Plaques begünstigt wird.

Außerdem wurde ein CCR2-Polymorphismus identifiziert (Val64Ile), für den allerdings kontroverse Ergebnisse bezüglich klinischer Zusammenhänge vorliegen. Bei diesem Val64Ile-Polymorphismus kommt es durch Austausch einer Base (Guanin) durch eine andere (Alanin) an Basenpaar 190 zu einem Aminosäurewechsel von Valin zu Isoleucin an Position 64. Studien von Ortlepp et al. sowie von Petrkova et al. zeigten eine Assoziation dieses Polymorphismus mit einem erhöhten Myokardinfarkt-Risiko [89, 95]. Dagegen konnten Gonzalez et al. bei Myokardinfarkt-Patienten keine signifikante Korrelation mit dem Polymorphismus zeigen [52]. Szalai et al. ermittelten sogar ein reduziertes KHK-Risiko bei Personen mit dem CCR2-Polymorphismus Val64Ile [127]. Eine weitere Studie zeigt weniger koronararterielle Verkalkung im Zusammenhang mit dem Polymorphismus [136].

Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das CCR2-Gen auf Polymorphismen untersucht, um über den Einfluss verschiedener Rezeptor-Genotypen auf die FMD mehr über die Funktion des Rezeptors im Zusammenhang mit endothelialer Dysfunktion herauszufinden. Insgesamt konnten acht Polymorphismen identifiziert werden, sechs davon waren mit einer Häufigkeit von mehr als 10% vertreten und wurden weiter analysiert. Der bisher in Arbeiten beschriebene CCR2-Polymorphismus Val64Ile war nur mit weniger als 10% vertreten und wurde deshalb nicht weiter untersucht. Bei der genaueren Analyse der Polymorphismen und der Untersuchung des Zusammenhangs der einzelnen Genotypen mit der FMD zeigte sich auch nach Anpassung des Alters und des Geschlechts in multivariaten linearen Regressionsanalysen eine signifikante Korrelation zwischen dem Vorkommen des A-Allels des Promotor-Polymorphismus T-960A und höheren FMD-Werten als Zeichen einer guten bzw. erhaltenen Endothelfunktion.

Aus diesem Ergebnis ergab sich die Vermutung, dass die Genotyp-Variation des CCR2 einen Einfluss auf die normale Funktion des Rezeptors haben könnte. So könnte beim Vorliegen des A-Allels dieses Polymorphismus die Interaktion zwischen MCP-1 und CCR2 gestört sein und folglich die Monozyten-Rekrutierung und -Adhäsion an

die Gefäßwand mit anschließender Diapedese vermindert sein. Auch die in der Gefäßwand stattfindende Entzündungsreaktion, die durch die Einwanderung und Differenzierung der Monozyten hervorgerufen wird, wäre damit abgeschwächt.

4.2.4 Monozyten-Transmigrationsmodell

Um dieser Hypothese nachzugehen wurde im Monozyten-Transmigrationsmodell die pathophysiologische Rolle der Monozyten in der frühen Atheroskleroseentwicklung untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei A-Allel-Trägern des CCR2-Promotor-Polymorphismus T-960A (bei denen auch eine bessere FMD gemessen werden konnte) nach zwei Stunden deutlich weniger Monozyten durch die Endothelzellschicht gewandert waren im Vergleich zu Wildtyp-Monozyten. Dadurch wird die Vermutung verstärkt, dass durch die Beeinträchtigung der Funktion des CCR2, verursacht durch den Polymorphismus im CCR2-Promotor, eine Störung in der Interaktion von MCP-1 und CCR2 vorliegt. Diese hat dann eine verminderte Monozyten-Adhäsion und -Migration in die Gefäßwand und damit eine verminderte Entwicklung atherosklerotischer Veränderungen zur Folge.

Die Monozyten-Migration durch das Endothel wurde bereits in verschiedenen Studien *in vitro* untersucht. So veröffentlichten Park et al. im Jahr 2001 Ergebnisse von Untersuchungen zur MCP-1-Freisetzung aus Endothelzellen und der dadurch vermittelten Monozyten-Transmigration durch die Endothelzellschicht: im Transmigrationsmodell konnten sie zeigen, dass bei vermehrter MCP-1-Expression auch die Monozyten-Transmigrationsrate erhöht war [92]. Auch Kinard et al. führten 2001 eine ähnliche Studie durch, allerdings verwendeten sie eine Co-Kultur aus Endothelzellen und glatten Muskelzellen. Sie konnten ebenfalls in Verbindung mit erhöhter MCP-1-Expression eine vermehrte Monozyten-Adhäsion und -Transmigration beobachten. Durch Verwendung eines MCP-1-Antikörpers konnte die Adhäsion von Monozyten an die Endothelschicht und die Durchwanderung durch das Endothel deutlich verringert

werden [70]. Eine frühere Studie von Randolph et al. aus dem Jahr 1995 zeigte ebenfalls eine MCP-1-vermittelte Monozyten-Transmigration durch das Endothel, die durch MCP-1-Antikörper blockiert werden konnte. Allerdings wurde dabei eine Abhängigkeit vom Konzentrationsgradienten festgestellt: steigt die MCP-1-Konzentration im oberen Kompartiment im Vergleich zu der Konzentration des endogen produzierten MCP-1, so fällt die Transmigrationsrate. Umgekehrt konnte bei Hinzugabe von MCP-1 im unteren Kompartiment eine vermehrte Monozytenmigration beobachtet werden [102].

Anders als bei der vorliegenden Arbeit wurde in den beschriebenen Studien die Konzentration des MCP-1 verändert, und Unterschiede in der Monozyten-Transmigrationsrate wurden in Abhängigkeit davon bewertet. Dabei wurde die MCP-1-Konzentration einerseits durch eine Hinzugabe von MCP-1 [102], andererseits durch eine Steigerung der endogenen MCP-1-Produktion [92, 70] erhöht. In den hier vorliegenden Untersuchungen wurden die Grundbedingungen im Versuchsaufbau nicht verändert und immer das gleiche Medium verwendet, so dass jeweils gleichbleibende MCP-1-Konzentrationen vorlagen. Eine Veränderung der Transmigrationsrate wurde hier also nicht durch unterschiedliche MCP-1-Konzentrationen hervorgerufen. Stattdessen konnte ein Zusammenhang zwischen einer höheren Migrationsrate und Monozyten, die das A-Allel des CCR2-Promotor-Polymorphismus T-960A tragen, festgestellt werden.

4.2.5 Abschließende Diskussion und Ausblick

Höhere FMD-Werte, also eine verstärkte vasodilatatorische Reaktion auf die Scherkräftwirkung ausgelöst durch eine postischämische Blutfluss-Zunahme, sind Ausdruck einer gesteigerten endothelialen NO-Produktion. Bei Blockierung der eNOS mit L-NMMA im Rahmen der FMD-Messung bleibt die Dilatation aus bzw. es tritt sogar eine geringe Vasokonstriktion ein. Damit konnten Joannides et al. 1995 den Nachweis für die NO-Abhängigkeit der FMD erbringen [64]. Die gesteigerte NO-Wirkung

kann einerseits durch eine Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit, andererseits durch eine Verstärkung der NO-Wirkung an der Zielzelle verursacht sein. Durch die Messung der endothelunabhängigen Vasodilatation - ausgelöst durch GTN - kann letzteres ausgeschlossen werden: Dabei wird nach exogener NO-Zufuhr (z.B. sublingual) nur die Signalübertragung von NO auf die Zielzelle, die glatte Muskelzelle, sowie die Wirkung dort überprüft.

Bei der endothelunabhängigen Vasodilatation ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen A-Allel-Trägern und Wildtyp-Probanden. Man kann also davon ausgehen, dass den höheren FMD-Werten, für die ein Zusammenhang mit dem Vorkommen des CCR2-Promotor-Polymorphismus T-960A gezeigt werden konnte, eine vermehrte NO-Bioverfügbarkeit zugrunde liegt. Da im Rahmen von Studien zur Atherosklerose-Entwicklung die endotheliale Dysfunktion als pathologisches Ereignis untersucht wird, wurde bisher nach Ursachen für eine reduzierte, nicht für eine erhöhte Menge an bioaktivem NO gesucht: Zum Einen kann ein beschleunigter Abbau von NO durch Sauerstoffradikale zugrunde liegen [58], wie dies im Zusammenhang mit verschiedenen kardiovaskulären Risikofaktoren (z.B. Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie) gezeigt werden konnte [18]. Zum Anderen kann die Ursache bei der eNOS liegen: die Expression der eNOS in Endothelzellen kann reduziert sein [145] oder die Signalwege, die zur Aktivierung der eNOS führen, können gestört sein [120]. Außerdem kann ein Mangel an Substraten oder Cofaktoren für die eNOS bestehen, der zu verminderter NO-Produktion führt [98].

Die gemessenen höheren FMD-Werte bei A-Allel-Trägern des CCR2-Promotor-Polymorphismus lassen also eine weniger stark verminderte und damit bessere NO-Bioverfügbarkeit vermuten. Da die Monozyten-Transmigrationsrate bei den Polymorphismus-Trägern im Vergleich zu Wildtyp-Probanden vermindert ist, ist ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der durch das Endothel gewanderten Monozyten und der Verminderung der bioaktiven NO-Menge zu vermuten. Aufgrund von weniger Zelladhäsion und -einwanderung ist die dadurch hervorgerufene Entzündungsreaktion in

der Gefäßwand abgeschwächt. Eine daraus folgende Reduktion des oxidativen Stresses könnte über weniger Sauerstoffradikal-Bildung zu vermindertem Abbau von NO und damit zur erhöhten FMD führen. Hier sind weitere Untersuchungen zum Einfluss von MCP-1 und CCR2 im Rahmen des Pathomechanismus der Endothelschädigung erforderlich.

5 Zusammenfassung

In der Atheroskleroseentwicklung spielen das Chemokin MCP-1 und sein Rezeptor CCR2 eine bedeutende Rolle. Nach der Rekrutierung von Monozyten und der Adhäsion an die Gefäßwand durch Adhäsionsmoleküle triggert MCP-1 deren Durchtritt durch das Endothel. Dort differenzieren die Monozyten zu Makrophagen und entwickeln sich durch die Aufnahme von oxidiertem LDL-Cholesterin zu Schaumzellen.

Noch bevor hämodynamisch relevante Plaques an der Arterienwand klinisch symptomatisch werden, zeigt das Endothel unter dem Einfluss proatherosklerotischer Faktoren relevante Funktionsstörungen (siehe Kapitel 1.3). Diese funktionellen Veränderungen des Gefäßendothels stellen nach heutiger Auffassung die erste Stufe in der Entwicklung der Atherosklerose dar. Die Diagnostik dieser „Frühstadien“ ist von großer Bedeutung, weil die Gefäßwandveränderungen in diesem Stadium noch prinzipiell reversibel sind und morphologische Veränderungen durch entsprechende Intervention potentiell verhindert bzw. zumindest in ihrer Entwicklung gebremst werden können.

Bisher liegen zahlreiche Studien vor, die den Zusammenhang zwischen MCP-1 bzw. CCR2 und morphologischen Veränderungen an der Gefäßwand untersuchen. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit geht es um die Frage, ob bereits ein Zusammenhang zwischen MCP-1/CCR2 und dem prämorphologischen Stadium der Atherosklerose, der endothelialen Dysfunktion, besteht.

Zu diesem Zweck untersuchten wir querschnittsanalytisch 242 Probanden im Rahmen des Tübinger Lebensstil-Interventions-Programms (TULIP-Studie) (siehe Kapitel 2.1). Der Einfluss des MCP-1 sowie seines Rezeptors CCR2 auf die Endothelfunktion wurde untersucht. Dazu wurden die MCP-1-Serum-Spiegel bestimmt, außerdem wurde CCR2 auf Polymorphismen untersucht. Die Endothelfunktion wurde über die Messung der endothelabhängigen Vasodilatation (FMD) mit hochauflösendem Ultraschall (13MHz) bestimmt.

Ein direkter Zusammenhang zwischen MCP-1-Serum-Spiegel und der FMD konnte nicht beobachtet werden. Bei der Untersuchung des CCR2-Gens konnten insgesamt acht Polymorphismen identifiziert werden, davon waren sechs mit einer Häufigkeit von mehr als 10% vertreten und wurden weiter analysiert. Die FMD war bei Trägern des A-Allels des CCR2-Promotor-Polymorphismus T-960A signifikant besser.

Zur Erfassung der funktionellen Relevanz dieses Polymorphismus wurde im Transmigrationsmodell die Migration der Monozyten durch das Endothel untersucht. Auch hier konnte bei Vorliegen der homozygot mutierten Variante eine gestörte Transmigration von Monozyten nachgewiesen werden. Dies wäre im Sinne einer verminderten Inflammation an der Gefäßwand bei Polymorphismus-Trägern zu interpretieren.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass möglicherweise genetisch determinierte antiinflammatorische Schutzmechanismen mit einer erhaltenen (oder zumindest besseren) NO-abhängigen Endothelfunktion assoziiert sind. Damit könnten Träger des A-Allels des CCR2-Promotor-Polymorphismus T-960A ein geringeres Risiko für das Auftreten atherosklerotischer Spätschäden aufweisen. Als zweites Ergebnis kann festgehalten werden, dass MCP-1-Serum-Spiegel keinen zuverlässigen Frühindikator für eine endotheliale Dysfunktion darstellen.

6 Abkürzungen

| | |
|--------------|---|
| A. | Arteria |
| Abb. | Abbildung |
| ACE | Angiotensin converting enzyme |
| ACS | Acute coronary syndrome (akutes Koronar-Syndrom) |
| ADA | American Diabetes Association |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| ApoE | Apolipoprotein E |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BMI | Body Mass Index |
| BZ | Blutzucker |
| CCR2 | Chemokinrezeptor 2 |
| cGMP | cyclic guanosine monophosphate (zyklisches Guanosinmonophosphat) |
| (hs)CRP | (hochsensitives) C-reaktives Protein |
| DNA | Desoxyribonucleinacid |
| EBM-2-Medium | Endothelial cell basal medium-2 |
| EDHF | Endothelium-derived hyperpolarizing factor |
| EDRF | Endothelium-derived relaxing factor |
| EDTA | Ethylene diamine tetraacetic acid (Ethylendiamintetra-Essigsäure) |
| EKG | Elektrokardiogramm |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| eNOS | endotheliale NO-Synthase |
| EZ | Echozone |
| FACS | Fluorescence activated cell sorting |
| FMD | Flussmedierte Dilation |
| GTN | Glycerylnitrat |
| HDL-C | High density lipoprotein cholesterol |

| | |
|-------------------|---|
| HWE | Hardy Weinberg equilibrium |
| IL | Interleukin |
| IMD | Intima-Media-Dicke |
| ISI | Insulin-Sensitivitäts-Index |
| KHK | Koronare Herzkrankheit |
| LDL-C | Low density lipoprotein cholesterol |
| L-NMMA | L-N ^G -Monomethylarginin |
| MCP-1 | Monocyte chemoattractant protein-1 |
| MHz | Megahertz |
| mmHG | Millimeter-Quecksilbersäule |
| mRNA | messenger ribonucleinacid |
| NK-Zellen | Natürliche Killer-Zellen |
| NO | Nitric oxide (Stickstoffmonoxid) |
| oGTT | oraler Glukose-Toleranz-Test |
| PBMC | Peripheral blood mononuclear cells |
| PCR | Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion) |
| PG-I ₂ | Prostaglandin I ₂ |
| PTCA | Perkutane Transluminale Coronar-Angioplastie |
| PW-Doppler | pulsed-wave Doppler |
| RPMI-Medium | Roswell Park Memorial Institute-Medium |
| sGC | Soluble guanylate cyclase (lösliche Guanylatzyklase) |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor |
| TULIP | Tübinger Lebensstil-Interventions-Programm |
| WHO | World Health Organization |

Literatur

- [1] Aiello RJ, Bourassa P-AK, Lindsey S, Weng W, Natoli E, Rollins BJ, Milos PM. Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19(6): 1518-1525.
- [2] American Diabetes Association. Clinical Practice Recommendations: Screening for Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 1998; 21(1): 20-22.
- [3] Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol.* 1995; 26(5): 1235-1241.
- [4] Arakelyan A, Petrakova J, Hermanova Z, Boyajyan A, Lukl J, Petrek M. Serum levels of the MCP-1 chemokine in patients with ischemic stroke and myocardial infarction. *Mediators Inflamm.* 2005; 3: 175-179.
- [5] Ardigo D, Franzini L, Valtuena S, Monti LD, Reaven GM, Zavaroni I. Relation of plasma insulin levels to forearm flow-mediated dilatation in healthy volunteers. *Am J Cardiol.* 2006; 97(8): 1250-1254.
- [6] Balletshofer BM, Rittig K, Stock J, Häring HU. Indikatoren einer beginnenden Atherosklerose: Erfassung der endothelialen Dysfunktion mittels hochauflösendem Ultraschall. *Ultraschall in Med.* 2003; 24(3): 153-161.
- [7] Balletshofer BM, Goebbel S, Rittig K, Lehn-Stefan A, Renn W, Enderle M, Dietz K, Häring HU. Einfluss der Untersuchererfahrung auf intra- und interindividuelle Variabilität bei der Erfassung der peripheren Endothelfunktion mittels hochauflösendem Ultraschall. *Ultraschall in Med.* 2001; 22(5): 231-235.
- [8] Balletshofer BM, Rittig K, Enderle MD, Volk A, Maerker E, Jacob S, Matthaei S, Rett K, Häring HU. Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. *Circulation* 2000; 101(15): 1780-1784.
- [9] Balletshofer BM, Rittig K, Stock J, Lehn-Stefan A, Overkamp D, Dietz K, Häring HU. Insulin resistant young subjects at risk of accelerated atherosclerosis exhibit a marked reduction in peripheral endothelial function early in life but not differences in intima-media thickness. *Atherosclerosis* 2003; 171(2): 303-309.
- [10] Baron AD. Vascular reactivity. *Am J Cardiol.* 1999; 84(1A): 25-27.
- [11] Berry KL, Skyrme-Jones RA, Meredith IT. Occlusion cuff position is an important determinant of the time course and magnitude of human brachial artery flow-mediated dilation. *Clin Sci (Lond).* 2000; 99(4): 261-267.

- [12] Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998; 394(6696): 894-897.
- [13] Bruun JM, Lihn AS, Pederson SB, Richelsen B. Monocyte Chemoattractant Protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): Implication of macrophages resident in the AT. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(4): 2282-2289.
- [14] Bürrig KF. Endothel und lokale Faktoren beim Werdegang der Atherosklerose; in Doerr W, Leonhardt H: Normale und pathologische Anatomie. *Georg Thieme, Stuttgart, New York* 1993; 53: 68-73.
- [15] Buselmaier W, Tariverdian G. Humangenetik. *Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York*, 2004: 18-21.
- [16] Busse R, Fleming I, Schini VB. Nitric oxide formation in the vascular wall: regulation and functional implications. *Current Top Microbiol Immunol.* 1995; 196: 7-18.
- [17] Caballero AE. Endothelial Dysfunction in Obesity and Insulin Resistance: A Road to Diabetes and Heart Disease. *Obesity Research* 2003; 11(11): 1278-1289.
- [18] Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000; 87(10): 840-844.
- [19] Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Lane CR, Lim EP, Kalyanaraman N, Nemesh J, Ziaugra L, Friedland L, Rolfe A, Warrington J, Lipshutz R, Daley GQ, Lander ES. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet.* 1999; 22(3): 231-238.
- [20] Celermajer DS. Endothelial Dysfunction. Does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol.* 1997; 30(2): 325-333.
- [21] Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol.* 1994; 24(6): 1468-1474.
- [22] Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340(8828): 1111-1115.
- [23] Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Deanfield JE. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol.* 1994; 24(2): 471-476.
- [24] Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the Pathogenesis of Vascular Disease. *Circ Res.* 2004; 95(9): 858-866.

- [25] Cherry PD, Furchgott RF, Zawadzki JV, Jothianandan D. The role of endothelial cells in the relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proc Nat Acad Sci.* 1982; 79(6): 2106-2110.
- [26] Cipollone F, Marini M, Fazia M, Pini B, Iezzi A, Reale M, Paloscia L, Materazzo G, D'Annunzio E, Conti P, Chiarelli F, Cuccurullo F, Mezzetti A. Elevated circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with restenosis after coronary angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21(3): 327-334.
- [27] Christiansen T, Richelsen B, Bruun JM. Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. *Int J Obes.* 2005; 29(1): 146-150.
- [28] Clarkson P, Celermajer DS, Donald AE, Sampson M, Sorensen KE, Adams M, Yue DK, Betteridge DJ, Deanfield JE. Impaired vascular reactivity in insulin-dependent diabetes mellitus is related to disease duration and low density lipoprotein cholesterol levels. *J Am Coll Cardiol.* 1996; 28(3): 573-579.
- [29] Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med.* 1997; 48: 489-509.
- [30] Cooke JP, Rossitch E Jr, Andon NA, Loscalzo J, Dzau VJ. Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Clin Invest.* 1991; 88(5): 1663-1671.
- [31] Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39(2): 257-265.
- [32] Corretti MC, Plotnick GD, Vogel RA. Technical aspects of evaluating brachial artery vasodilatation using high-frequency ultrasound. *Am J Physiol.* 1995; 268: 1397-1404.
- [33] Cuevas AM, Guasch V, Castillo O, Irribarra V, Mizon C, San Martin A, Strobel P, Perez D, Germain AM, Leighton F. A high-fat diet induces and red wine counteracts endothelial dysfunction in human volunteers. *Lipids* 2000; 35(2): 143-148.
- [34] Dawson TC, Kuziel WA, Osahar TA, Maeda N. Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 1999; 143(1): 205-211.
- [35] De Lemos JA, Morrow DA, Sabatine MS, Murphy SA, Gibson CM, Antman EM, McCabe CH, Cannon CP, Braunwald E. Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003; 107(5): 690-695.

- [36] Deo R, Khera A, McGuire DK, Murphy SA, Meo Neto Jde P, Morrow DA, de Lemos JA. Association among plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1, traditional cardiovascular risk factors, and subclinical atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 44(9): 1812-1818.
- [37] Doris PA. Hypertension genetics, single nucleotide polymorphisms, and the common disease: common variant hypothesis. *Hypertension* 2002; 39: 323-331.
- [38] Duffy SJ, Keaney JF Jr, Holbrook M, Gokce N, Swerdloff PL, Frei B, Vita JA. Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; 104(2): 151-156.
- [39] Egashira K, Zhao Q, Kataoka C, Ohtani K, Usui M, Charo IF, Nishida K-I, Inoue S, Kato M, Ichiki T, Takeshita A. Importance of monocyte chemoattractant protein-1 pathway in neointimal hyperplasia after periarterial injury in mice and monkeys. *Circ Res.* 2002; 90(11): 1167-1172.
- [40] Elherik K, Khan F, McLaren M, Kennedy G, Belch JJ. Circadian variation in vascular tone and endothelial cell function in normal males. *Clin Sci (Lond).* 2002; 102(5): 547-552.
- [41] Enderle MD, Sayer R, Balletshofer B, Meisner C, Muck AO, Haasis R, Haering HU, Pfohl M. Acute improvement of peripheral endothelial function in postmenopausal women with coronary artery disease after single oral intake of 17beta-estradiol valerate. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2000; 108(5): 382-385.
- [42] Etsuda H, Takase B, Uehata A, Kusano H, Hamabe A, Kuhara R, Akima T, Matsushima Y, Arakawa K, Satomura K, Kurita A, Ohsuzu F. Morning attenuation of endothelium-dependent, flow-mediated dilation in healthy young men: possible connection to morning peak of cardiac events? *Clin Cardiol.* 1999; 22(6): 417-421.
- [43] Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, Tedder TF, Yoshie O, Imai T, Patel DD. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med.* 1998; 188(8): 1413-1419.
- [44] Furukawa Y, Matsumori A, Ohashi N, Shioi T, Ono K, Harada A, Matsushima K, Sasayama S. Anti-monocyte chemoattractant protein-1/ monocyte chemotactic and activating factor antibody inhibits neointimal hyperplasia in injured rat carotid arteries. *Circ Res.* 1999; 84(3): 306-314.
- [45] Furchgott RF, Bhadrakom S. Reactions of strips of rabbit aorta to epinephrine, isopropylarterenol, sodium nitrite and other drugs. *J Pharmacol Exp Therap.* 1953; 108(2): 129-143.
- [46] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288(5789): 373-376.

- [47] Furchgott RF. Studies on Relaxation of Rabbit Aorta by Sodium Nitrite: the Basis for the Proposal that the Acid-activatable Inhibitory Factor from Retractor Penis is Inorganic Nitrite and the Endothelium-derived Relaxing Factor is Nitric Oxide; in Vanhoutte PM. Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, and Endothelium. *Raven Press, New York* 1988; 401-414.
- [48] Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schomig A, Brand K. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 1998; 98(12): 1164-1171.
- [49] Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim Y-C, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, Jr., Luster AD, Luscinskas FW, Rosenzweig A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 1999; 398(6729): 718-723.
- [50] Gerszten RE, Lim Y-C, Ding HT, Snapp K, Kansas G, Dichek DA, Cabanas C, Sanchez-Madrid F, Gimbrone MA, Jr., Rosenzweig A, Luscinskas FW. Adhesion of monocytes to vascular cell adhesion molecule-1-transduced human endothelial cells. Implications for atherogenesis. *Circ Res.* 1998; 82(8): 871-878.
- [51] Ghiadoni L, Donald AE, Cropley M, Mullen MJ, Oakley G, Taylor M, O'Connor G, Betteridge J, Klein N, Steptoe A, Deanfield JE. Mental stress induces transient endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 2000; 102(20): 2473-2478.
- [52] Gonzalez P, Alvarez R, Batalla A, Reguero JR, Alvarez V, Astudillo A, Cubero GI, Cortina A, Coto E. Genetic variation at the chemokine receptors CCR5/CCR2 in myocardial infarction. *Genes Immun.* 2001; 2(4): 191-195.
- [53] Guo J, Van Eck M, Twisk J, Maeda N, Benson GM, Groot PH, Van Berkel TJ. Transplantation of monocyte CC-chemokine receptor 2-deficient bone marrow into ApoE3-Leiden mice inhibits atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23(3): 447-453.
- [54] Han KH, Chang MK, Boullier A, Green SR, Li A, Glass CK, Quehenberger O. Oxidized LDL reduces monocyte CCR2 expression through pathways involving peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Clin Invest.* 2000; 106(6): 793- 802.
- [55] Han KH, Han KO, Green SR, Quehenberger O. Expression of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is increased in hypercholesterolemia: Differential effects of plasma lipoproteins on monocyte function. *J Lipid Res.* 1999; 40(6): 1053-1063.
- [56] Han KH, Hong KH, Park JH, Ko J, Kang DH, Choi KJ, Hong MK, Park SW, Park SJ. C-reactive protein promotes monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis through upregulating CC chemokine receptor 2 expression in human monocytes. *Circulation* 2004; 109(21): 2566-2571.

- [57] Han KH, Tangirala RK, Green SR, Quehenberger O. Chemokine receptor CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis in human monocytes: a regulatory role for plasma LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18(12): 1983-1991.
- [58] Harrison DG. Endothelial function and oxidant stress. *Clin Cardiol.* 1997; 20(11): 11-17.
- [59] Hashimoto M, Akishita M, Eto M, Ishikawa M, Kozaki K, Toba K, Sagara Y, Taketani Y, Orimo H, Ouchi Y. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle. *Circulation* 1995; 92(12): 3431-3435.
- [60] Haskell CA, Cleary MD, Charo IF. Molecular uncoupling of fractalkin-mediated cell adhesion and signal transduction. Rapid flow arrest of CX3CR1-expressing cells is independent of G-protein activation. *J Biol Chem.* 1999; 274(15): 10053-10058.
- [61] Herold, G. *Innere Medizin*, 2005; 610-611.
- [62] Horvath C, Welt FG, Nedelman M, Rao P, Rogers C. Targeting CCR2 or CD18 inhibits experimental in-stent restenosis in primates. Inhibitory potential depends on type of injury and leukocytes targeted. *Circ Res.* 2002; 90(4): 488-494.
- [63] Inoue S, Egashira K, Ni W, Kitamoto S, Usui M, Otani K, Ishibashi M, Hiasa K, Nishida K, Takeshita A. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 2002; 106(21): 2700-2706.
- [64] Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, Luscher TF. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 1995; 91(5): 1314-1319.
- [65] Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kawatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, Ohnishi Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Nagai R, Kadowaki T. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem.* 2006; 281(36): 26602-26614.
- [66] Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 2006; 116(6): 1494-1505.
- [67] Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T, Kugiyama K, Oga-wa H, Yasue H. Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. *J Am Coll Cardiol.* 1999; 34(1): 146-154.

- [68] Kennedy J, Kelner GS, Kleyensteuber S, Schall TJ, Weiss MC, Yssel H, Schneider PV, Cocks BG, Bacon KB, Zlotnik A. Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. *J Immunol.* 1995; 155(1): 203-209.
- [69] Kielbassa K, Schmitz C, Gerke V. Disruption of endothelial microfilaments selectively reduces the transendothelial migration of monocytes. *Exp Cell Res.* 1998; 243(1): 129-141.
- [70] Kinard F, Jaworski K, Sergent-Engelen T, Goldstein D, Van Veldhoven PP, Holvoet P, Trouet A, Schneider YJ, Remacle C. Smooth muscle cells influence monocyte response to LDL as well as their adhesion and transmigration in a coculture model of the arterial wall. *J Vasc Res.* 2001; 38(5): 479-491.
- [71] Knippers R. Molekulare Genetik. *Georg Thieme Verlag*, 2006; 504-514.
- [72] Kranzhofer R, Clinton SK, Ishii K, Coughlin SR, Fenton JW 2nd, Libby P. Thrombin potently stimulates cytokine production in human vascular smooth muscle cells but not in mononuclear phagocytes. *Circ Res.* 1996; 79(2): 286-294.
- [73] Lauer T, Kleinbongard P, Preik M, Rauch BH, Deussen A, Feelisch M, Strauer BE, Kelm M. Direct biochemical evidence for eNOS stimulation by bradykinin in the human forearm vasculature. *Basic Res Cardiol.* 2003; 98(2): 84-89.
- [74] Leeson P, Thorne S, Donald A, Mullen M, Clarkson P, Deanfield J. Non-invasive measurement of endothelial function: effect on brachial artery dilatation of graded endothelial dependent and independent stimuli. *Heart* 1997; 78(1): 22-27.
- [75] Lekakis J, Papamichael C, Vemmos C, Stamatelopoulos K, Voutsas A, Stamatelopoulos S. Effects of acute cigarette smoking on endothelium-dependent arterial dilatation in normal subjects. *Am J Cardiol.* 1998; 81(10): 1225-1228.
- [76] Mannion TC, Vita JA, Keaney JF Jr, Benjamin EJ, Hunter L, Polak JF. Non-invasive assessment of brachial artery endothelial vasomotor function: the effect of cuff position on level of discomfort and vasomotor responses. *Vasc Med.* 1998; 3(4): 263-267.
- [77] Mano T, Masuyama T, Yamamoto K, Naito J, Kondo H, Nagano R, Tanouchi J, Hori M, Inoue M, Kamada T. Endothelial dysfunction in the early stage of atherosclerosis precedes appearance of intimal lesions assessable with intravascular ultrasound. *Am Heart J.* 1996; 131(2): 231-238.
- [78] Maslin CL, Kedzierska K, Webster NL, Muller WA, Crowe SM. Transendothelial migration of monocytes: the underlying molecular mechanisms and consequences of HIV-1 infection. *Curr HIV Res.* 2005; 3(4): 303-317.

- [79] Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 1999; 22(9): 1462-1470.
- [80] Mine S, Okada Y, Tanikawa T, Kawahara C, Tabata T, Tanaka Y. Increased expression levels of monocyte CCR2 and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with diabetes mellitus. *Biochem and Biophys Research Communications*. 2006; 344(3): 780-785.
- [81] Mizuno T, Matsui H, Imamura A, Numaguchi Y, Sakai K, Murohara T, Okumura K. Insulin resistance increases circulating malondialdehyde-modified LDL and impairs endothelial function in healthy young men. *Int J Cardiol*. 2004; 97(3): 455-461.
- [82] Mori E, Komori K, Yamaoka T, Tanii M, Kataoka C, Takeshita A, Usui M, Egashira K, Sugimachi K. Essential role of monocyte chemoattractant protein-1 in development of restenotic changes (neointimal hyperplasia and constrictive remodeling) after balloon angioplasty in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation* 2002; 105(24): 2905-2910.
- [83] Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 2000; 95(10): 3032-3043.
- [84] Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. International union of pharmacology. XXII: nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*. 2000; 52(1): 145-176.
- [85] Ni W, Egashira K, Kitamoto S, Kataoka C, Koyanagi M, Inoue S, Imaizumi K, Akiyama C, Nishida KI, Takeshita A. New anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 2001; 103(16): 2096-2101.
- [86] Nieto M, Navarro F, Perez-Villar JJ, del Pozo MA, Gonzalez-Amaro R, Mellado M, Frade JM, Martinez AC, Lopez-Botet M, Sanchez-Madrid F. Roles of chemokines and receptor polarization in NK-target cell interactions. *J Immunol*. 1998; 161(7): 3330-3339.
- [87] Nitenberg A, Valensi P, Sachs R, Dali M, Aptekar E, Attali JR. Impairment of coronary vascular reserve and ACh-induced coronary vasodilation in diabetic patients with angiographically normal coronary arteries and normal left ventricular systolic function. *Diabetes* 1993; 42(7): 1017-1025.
- [88] Ochensberger B, Tassera L, Bifrare D, Rihs S, Dahinden CA. Regulation of cytokine expression and leukotriene formation in human basophils by growth factors, chemokines and chemotactic agonists. *Eur J Immunol*. 1999; 29(1): 11-22.
- [89] Ortlepp JR, Vesper K, Mevissen V, Schmitz F, Janssens U, Franke A, Hanrath P, Weber C, Zerres K, Hoffmann R. Chemokine receptor (CCR2) genotype is associated with

- myocardial infarction and heart failure in patients under 65 years of age. *J Mol Med.* 2003; 81(6): 363-367.
- [90] Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med.* 1990; 323(1): 22-27.
- [91] Papamichael CM, Aznaouridis KA, Karatzis EN, Karatzi KN, Stamatelopoulos KS, Vamvakou G, Lekakis JP, Mavrikakis ME. Effect of coffee on endothelial function in healthy subjects: the role of caffeine. *Clin Sci (Lond).* 2005; 109(1): 55-60.
- [92] Park IW, Wang JF, Groopman JE. HIV-1 Tat promotes monocyte chemoattractant protein-1 secretion followed by transmigration of monocytes. *Blood* 2001; 97(2): 352-358.
- [93] Perticone F, Ceravolo R, Candigliota M, Ventura G, Iacopino S, Sinopoli F, Mattioli PL. Obesity and body fat distribution induce endothelial dysfunction by oxidative stress: protective effect of vitamin C. *Diabetes* 2001; 50(1): 159-165.
- [94] Peters W, Charo IF. Involvement of chemokine receptor 2 and its ligand, monocyte chemoattractant protein-1, in the development of atherosclerosis: lessons from knockout mice. *Curr Opin Lipidol.* 2001; 12(2): 175-180.
- [95] Petrková J, Cermakova Z, Drabek J, Lukl J, Petrek M. CC chemokine receptor (CCR)2 polymorphism in Czech patients with myocardial infarction. *Immunol Lett* 2003; 88: 53-55.
- [96] Phillips RJ, Lutz M, Premack B. Differential signaling mechanisms regulate expression of CC chemokine receptor-2 during monocyte maturation. *J Inflamm.* 2005; 2: 14.
- [97] Piemonti L, Calori G, Mercalli A, Lattuada G, Monti P, Garancini MP, Costantino F, Ruo-tolo G, Luzi L, Perseghin G. Fasting plasma leptin, tumor necrosis factor-alpha receptor 2, and monocyte chemoattracting protein 1 concentration in a population of glucose-tolerant and glucose-intolerant women. *Diabetes Care* 2003; 26(10): 2883-2889.
- [98] Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1992; 267(34): 24173-24176.
- [99] Quyyumi AA. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am J Med.* 1998; 105(1A): 32-39.
- [100] Rabin RL, Park MK, Liao F, Swofford R, Stephany D, Farber JM. Chemokine receptor responses on T cells are achieved through regulation of both receptor expression and signaling. *J Immunol.* 1999; 162(7): 3840-3850.
- [101] Raitakari OT, Celermajer DS. Flow-mediated dilation. *J Clin Pharmacol.* 2000; 50(5): 397-404.

- [102] Randolph GJ, Furie MB. A soluble gradient of endogenous monocyte chemoattractant protein-1 promotes the transendothelial migration of monocytes in vitro. *J Immunol.* 1995; 155(7): 3610-3618.
- [103] Reddy KG, Nair RN, Sheehan HM, Hodgson JM. Evidence that selective endothelial dysfunction may occur in the absence of angiographic or ultrasound atherosclerosis in patients with risk factors for atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 1994; 23(4): 833-843.
- [104] Reidy MA, Fingerle J, Lindner V. Factors controlling the development of arterial lesions after injury. *Circulation* 1992; 86(6): 43-46.
- [105] Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2002; 347(20): 1557-1565.
- [106] Rodriguez CJ, Miyake Y, Grahame-Clarke C, Di Tullio MR, Sciacca RR, Boden-Albala B, Sacco RL, Homma S. Relation of plasma glucose and endothelial function in a population-based multiethnic sample of subjects without diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 2005; 96(9): 1273-1277.
- [107] A. Roessner. Grundlagen in der Pathologie des Kreislaufs; in E. Grundmann: *Einführung in die allgemeine Pathologie*, Kapitel 9.1, 19-199, 9.Auflage G.Fischer, Stuttgart, New York, 1994.
- [108] Romano M, Diomede L, Sironi M, Massimiliano L, Sottocorno M, Polentarutti N, Guglielmotti A, Albani D, Bruno A, Fruscella P, Salmona M, Vecchi A, Pinza M, Mantovani A. Inhibition of monocyte chemotactic protein-1 synthesis by statins. *Lab Invest.* 2000; 80(7): 1095-1100.
- [109] Roque M, Kim WJ, Gazdoin M, Malik A, Reis ED, Fallon JT, Badimon JJ, Charo IF, Taubman MB. CCR2 deficiency decreases intimal hyperplasia after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22(4): 554-559.
- [110] Ross R. Atherosclerosis - An inflammatory Disease. *NEJM* 1999; 340(2): 115-126.
- [111] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362(6423): 801-809.
- [112] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis- an update. *NEJM* 1986; 314(8): 488-500.
- [113] Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: Basic chemokines grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22: 891-928.
- [114] Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993; 22(4): 1-14.

- [115] Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 2000; 96(1): 34-40.
- [116] Schechter AD, Berman AB, Taubman MB. Chemokine Receptors in Vascular Smooth Muscle. *Microcirculation* 2003; 10(3-4): 265-272.
- [117] Schmidt RF, Thews G. Physiologie des Menschen. *Springer-Verlag*, 27.Auflage 1997: 526-534.
- [118] Schratzberger P, Dunzendorfer S, Reinisch N, Kahler CM, Herold M, Wiedermann CJ. Release of chemoattractants for human monocytes from endothelial cells by interaction with neutrophils. *Cardiovasc Res.* 1998; 38(2): 516-521.
- [119] Schwartz SM, Heimark RL, Majesky MW. Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Physiol Rev.* 1990; 70(4): 1177-1209.
- [120] Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM. Loss of endothelial pertussis toxin-sensitive G protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circulation* 1991 ; 83(2): 652-660.
- [121] Shin WS, Szuba A, Rockson SG. The role of chemokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights. *Atherosclerosis* 2002; 160(1): 91-102.
- [122] Sica A, Saccani A, Borsatti A, Power CA, Wells TN, Luini W, Polentaratti N, Sozzani S, Mantovani A. Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes. *J Exp Med.* 1997; 185(5): 969-974.
- [123] Sozzani S, Luini W, Borsatti A, Polentarutti N, Zhou D, Piemonti L, D'Amico G, Power CA, Wells TN, Gobbi M, Allavena P, Mantovani A. Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. *J Immunol.* 1997; 159(4): 1993-2000.
- [124] Spieker LE, Luscher TF. Protection of endothelial function. *Handbook of Experimental Pharmacology* 2005; 170: 619-644.
- [125] Sun H, Koike T, Ichikawa T, Hatakeyama K, Shiomi M, Zhang B, Kitajima S, Morimoto M, Watanabe T, Asada Y, Chen YE, Fan J. C-reactive protein in atherosclerotic lesions: its origin and pathophysiological significance. *Am J Pathol.* 2005; 167(4): 1139-1148.
- [126] Suzuki M, Takamisawa I, Suzuki K, Hiuge A, Horio T, Yoshimasa Y, Harano Y. Close association of endothelial dysfunction with insulin resistance and carotid wall thickening in hypertension. *Am J Hypertens.* 2004; 17(3): 228-232.

- [127] Szalai C, Duba J, Prohaszka Z, Kalina A, Szabo T, Nagy B, Horvath L, Csaszar A. Involvement of polymorphisms in the chemokine system in the susceptibility for coronary artery disease (CAD). Coincidence of elevated Lp(a) and MCP-1 -2518 G/G genotype in CAD patients. *Atherosclerosis* 2001; 158(1): 233-239.
- [128] Takahashi K, Mizuarai S, Araki H, Mashiko S, Ishihara A, Kanatani A, Itadani H, Kotani H. Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *J Biol Chem*. 2003; 278(47): 46654-46660.
- [129] Takeya M, Yoshimura T, Leonard EJ, Takahashi K. Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein-1 monoclonal antibody. *Hum Pathol*. 1993; 24(5): 534-539.
- [130] Tangirala RK, Murao K, Quehenberger O. Regulation of expression of the human monocyte chemotactic protein-1 receptor (hCCR2) by cytokines. *J Biol Chem*. 1997; 272(12): 8050-8056.
- [131] Tickenbrock L, Schwable J, Strey A, Sargin B, Hehn S, Baas M, Choudhary C, Gerke V, Berdel WE, Muller-Tidow C, Serve H. Wnt signaling regulates transendothelial migration of monocytes. *J Leukoc Biol*. 2006; 79(6): 1306-1313.
- [132] Troseid M, Lappegard KT, Claudi T, Damas JK, Morkrid L, Brendberg R, Mollnes TE. Exercise reduces plasma levels of the chemokines MCP-1 and IL-8 in subjects with the metabolic syndrome. *European Heart Journal* 2004; 25(4): 349-355.
- [133] Tsou C-L, Haskell CA, Charo IF. Tumor necrosis factor- α -converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine. *J Biol Chem*. 2001; 276(48): 44622- 44626.
- [134] Tucci M, Quatraro C, Frassanito MA, Silvestris F. Deregulated expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in arterial hypertension: role in endothelial inflammation and atheromasia. *Journal of Hypertension* 2006; 24(7): 1307-1318.
- [135] Uehata A, Lieberman EH, Gerhard MD, Anderson TJ, Ganz P, Polak JF, Creager MA, Yeung AC. Noninvasive assessment of endothelium-dependent flow-mediated dilation of the brachial artery. *Vasc Med*. 1997; 2(2): 87-92.
- [136] Valdes AM, Wolfe ML, O'Brien EJ, Spurr NK, Gefter W, Rut A, Groot PH, Rader DJ. Val64Ile polymorphism in the C-C chemokine receptor 2 is associated with reduced coronary artery calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22(11): 1924-1928.
- [137] Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, McLenachan JM, Fish RD, Yeung AC, Vekshtein VI, Selwyn AP, Ganz P. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 1990; 81(2): 491-497.
- [138] Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *Am J Cardiol*. 1997; 79(3): 350-354.

- [139] Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. A comparison of brachial artery flow-mediated vasodilation using upper and lower arm arterial occlusion in subjects with and without coronary risk factors. *Clin Cardiol.* 2000; 23(8): 571-575.
- [140] Weber KS, Nelson PJ, Grone HJ, Weber C. Expression of CCR2 by endothelial cells: implications for MCP-1 mediated wound injury repair and in vivo inflammatory activation of endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19(9): 2085-2093.
- [141] Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003; 112(12): 1796-1808.
- [142] Wendelhag I, Gustavsson T, Suurkula M, Berglund G, Wikstrand J. Ultrasound measurement of wall thickness in the carotid artery: fundamental principles and description of a computerized analysing system. *Clinical physiology* 1991; 11(6): 565-577.
- [143] Wenzel UO, Fouqueray B, Grandaliano G, Kim YS, Karamitosos C, Valente AJ, Abboud HE. Thrombin regulates expression of monocyte chemoattractant protein-1 in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1995; 77(3): 503-509.
- [144] Werns SW, Walton JA, Hsia HH, Nabel EG, Sanz ML, Pitt B. Evidence of endothelial dysfunction in angiographically normal coronary arteries of patients with coronary artery disease. *Circulation* 1989; 79(2): 287-291.
- [145] Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17(11): 2479-2488.
- [146] Wysocki SJ, Zheng MH, Smith A, Lamawansa MD, Iacopetta BJ, Robertson TA, Papadimitriou JM, House AK, Norman PE. Monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in injured pig artery coincides with early appearance of infiltrating monocyte/macrophages. *J Cell Biochem.* 1996; 62(3): 303-313.
- [147] Yao X, Kwan HY, Chan FL, Chan NW, Huang Y. A protein kinase G-sensitive channel mediates flow-induced Ca(2+) entry into vascular endothelial cells. *FASEB J* 2000; 14(7): 932-938.
- [148] Yu X, Dluz S, Graves DT, Zhang L, Antoniades HN, Hollander W, Prusty S, Valente AJ, Schwartz CJ, Sonenshein GE. Elevated expression of MCP-1 by vascular smooth muscle cells in hypercholesterolemic primates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89(15): 6953-6957.
- [149] Zeiher AM, Drexler H, Saurbier B, Just H. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest.* 1993; 92(2): 652-662.

- [150] Zeiher AM, Schachinger V, Minners J. Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function. *Circulation* 1995; 92(5): 1094-1100.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. B. Balletshofer für die Überlassung des spannenden Themas und die freundliche Unterstützung bedanken.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank meinem Betreuer Herrn Dr. med. Kilian Rittig, der mir über lange Zeit immer wieder beratend zur Seite stand und mir mit seinen Anmerkungen, Vorschlägen und nicht zuletzt mit seiner Geduld bei dieser Arbeit sehr geholfen hat.

Vielen Dank allen Mitarbeitern der TULIP-Studie für die gute Zusammenarbeit rund um die Messungen.

Allen Probanden vielen Dank für die Teilnahme an den zahlreichen Untersuchungen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre Motivation, Unterstützung und Geduld bedanken. Herzlichen Dank auch meinem Bruder für die wertvolle Hilfe bei allen computertechnischen Problemen.

Lebenslauf

| | |
|--------------|--|
| Name | Susanne Gauckler |
| Geburtsdatum | 07.05.1982 |
| Geburtsort | Tübingen |
| Eltern | Annemarie Gauckler, geb. Schweizer, Gymnasiallehrerin Stefan Gauckler, Forstbeamter |

Schulbildung

| | |
|-----------|-------------------------------|
| 1988-1992 | Grundschule Mössingen-Belsen |
| 1992-2001 | Quenstedt-Gymnasium Mössingen |
| 2001 | Abitur |

Studium

| | |
|--------------|--|
| seit 04/2002 | Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen |
| 03/2004 | Physikum |
| 02-06/2006 | Auslandssemester in Alcalá de Henares, Spanien |
| 02/2007 bis | Praktisches Jahr |
| 01/2008 | 1. Tertial Neurologie, Marienhospital Stuttgart 2. Tertial Innere, Diakonie-Klinikum Stuttgart 3. Tertial Chirurgie, Diakonie-Klinikum Stuttgart |
| 06/2008 | 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung |

Ärztliche Tätigkeit

| | |
|--------------|--|
| Seit 11/2008 | Assistenzärztin in der Abteilung für Innere Medizin und konservative Intensivmedizin, Marien Hospital Düsseldorf |
|--------------|--|

Sonstiges

| | |
|------------------------|---|
| 07/2003 bis 11/2004 | 25%-Anstellung als Pflegehelferin in der Kardiologie der Medizinischen Klinik Tübingen |
|------------------------|---|